



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***KLEBSİELLA PNEUMONİAE* KLİNİK İZOLATLARINDA
AGAR DİLÜSYON YÖNTEMİ İLE İNTRAVENÖZ
FOSFOMİSİN DİRENCİNİN SAPTANMASI VE
MEROPENEM, İMİPENEM, AMİKASİN
ANTİBİYOTİKLERİ İLE SİNERJİST ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DR. NURULLAH UZUNER

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DİYARBAKIR 2022



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***KLEBSİELLA PNEUMONİAE* KLİNİK İZOLATLARINDA
AGAR DİLÜSYON YÖNTEMİ İLE İNTRAVENÖZ
FOSFOMİSİN DİRENCİNİN SAPTANMASI VE
MEROPENEM, İMİPENEM, AMİKASİN
ANTİBİYOTİKLERİ İLE SİNERJİST ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DR. NURULLAH UZUNER

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN: PROF. DR. NEZAHAT AKPOLAT

DİYARBAKIR 2022

ÖZET

Bu çalışmada yoğun bakım ve klinikte yatan hastaların çeşitli numunelerinde üremiş karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının agar dilüsyon yöntemi ile fosfomisin disodyum direnç durumu ve amikasin, meropenem, imipenem antibiyotikleriyle sinerjistik etkisi araştırılmıştır. Böylece karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşlarının etken olduğu invaziv enfeksiyonlarda en etkin ampirik tedavi modellerinin oluşturulması amaçlanmıştır.

Çalışmaya Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı Birimi'ne 20.03.2021-31.12.2021 tarihleri arasında yoğun bakım ve kliniklerden gönderilen çeşitli hasta örneklerinde üreyen 71 adet *K. pneumoniae* izolatı dahil edilmiştir. Suşlar MALDI-TOF MS (bioMérieux, Fransa) ile tanımlandı. İzolatların antimikrobiyal duyarlılık testleri, Phoenix NMIC-400/ID paneli kullanılarak BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, A.B.D) otomatize sistemi sistemi ile çalışılmıştır. Otomatize sistemde karbapenem dirençli olarak tespit edilen izolatların karbapenem direnci; ertapenem, meropenem ve imipenem antibiyotik diskleri ile disk difüzyon yöntemi kullanılarak teyit edilmiştir. Disk difüzyon yönteminde de karbapenem direnci saptanan suşlar çalışmaya dahil edilmiştir.

Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının fosfomisin disodyum direnç durumu ve fosfomisinin amikasin, meropenem, imipenem antibiyotikleriyle sinerjistik etkisi agar dilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır.

Agar dilüsyon yöntemi sonucunda izolatların %97,2'si fosfomisine, %69'u amikasin, %84,5'i meropenem ve %94,4'ü imipenem dirençli bulunmuştur. İzolatların %25,35'inde fosfomisin-amikasin, %45,07'sinde fosfomisin-meropenem ve %21,12'sinde fosfomisin-imipenem kombinasyonu sinerjistik etki gösterdi. Tüm izolatlar ve tüm kombinasyonlar içerisinde sadece tek bir suşta fosfomisin-amikasin kombinasyonunda antagonist etki tespit edilmiştir.

Fosfomisin disodium, Multi Drug Rezistans (Çoklu İlaç Dirençli) MDR ve karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşlarının etken olduğu invaziv enfeksiyonlara karşı amikasin, meropenem ve imipenem ile kombine olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: *Klebsiella pneumoniae*, Fosfomisin disodyum, İmipenem, Meropenem, Amikasin, Agar dilüsyon, Checkerboard

ABSTRACT

In this study, fosfomycin disodium resistance status and synergistic effect with amikacin, meropenem, imipenem antibiotics were investigated by agar dilution method of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates grown in various samples of patients hospitalized in the intensive care unit and clinic. Thus, it is aimed to establish the most effective empirical treatment models for invasive infections caused by carbapenem resistant *K. pneumoniae* strains.

71 *K. pneumoniae* isolates grown in various patient samples sent from intensive care units and clinics to Dicle University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Bacteriology Laboratory Unit between 20.03.2021 and 31.12.2021 were included in the study. Strains were identified by MALDI-TOF MS (bioMerieux, France). Antimicrobial susceptibility tests of the isolates were performed with the BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, USA) automated system using the Phoenix NMIC-400/ID panel. Carbapenem resistance of isolates detected as resistant to carbapenem in the automated system was confirmed by using ertapenem, meropenem and imipenem antibiotic discs and disc diffusion method. Strains with carbapenem resistance in the disc diffusion method were included in the study.

The fosfomycin disodium resistance status of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates and the synergistic effect of fosfomycin with amikacin, meropenem, imipenem antibiotics were investigated by agar dilution method.

As a result of the agar dilution method, 97,2% of the isolates were resistant to fosfomycin, 69% to amikacin, 84,5% to meropenem and 94,4% to imipenem. The combination of fosfomycin-amikacin in 25,35% of the isolates, fosfomycin-meropenem in 45,07% and fosfomycin-imipenem in 21,12% showed a synergistic effect. In all isolates and all combinations, antagonism was detected in the fosfomycin-amikacin combination in only one strain.

Fosfomycin disodium can be used in combination with amikacin, meropenem and imipenem against invasive infections caused by multidrug rezistans (MDR) and carbapenem resistant *K. pneumoniae* strains.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, Fosfomycin disodium, Imipenem, Meropenem, Amikacin, Agar dilution, Checkerboard.



İÇİNDEKİLER

Sayfalar

ÖZET.....	i
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT).....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER VE TABLOLAR.....	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Enterobacteriales</i> Ailesi.....	3
2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	4
2.2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nin patogenezi ve virülans faktörleri.....	4
2.2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'da antimikrobiyal direnç mekanizmaları.....	5
2.2.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nin epidemiyolojisi.....	8
2.2.4. Klinik.....	8
2.2.5. MDR veya PDR <i>Klebsiella pneumoniae</i> enfeksiyonlarında tedavi seçenekleri.....	9
2.3. Fosfomisin.....	10
2.3.1. Etki mekanizması.....	11
2.3.2. Fosfomisinin farmakokinetik özellikleri.....	13
2.3.3. Fosfomisinin farmakodinamik özellikleri.....	13
2.3.3. Fosfomisinin antibakteriyel spektrumu.....	13
2.3.4. İmmünomodülatör aktivite.....	15
2.3.5. Fosfomisine karşı direnç mekanizmaları.....	15
2.3.6. Klinikte fosfomisin kullanımı.....	18
2.3.7. Toksisite ve yan etkiler.....	18
2.4. Antibiyotik Duyarlılık Yöntemleri.....	19
2.4.1. Disk difüzyon yöntemi.....	19
2.4.2. Gradient difüzyon test yöntemi [epsilometer test (Etest)].....	19
2.4.3. Agar dilüsyon yöntemi.....	19
2.4.4. Sıvı makrodilüsyon yöntemi.....	21
2.4.5. Sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemi.....	21
2.4.6. Otomatize sistemler.....	21
2.5. Antibiyotik Kombinasyon Testleri.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Gereçler.....	27
3.1.1. Çalışmaya alınan örnekler.....	27
3.1.2. Kullanılan besiyerleri ve malzemeler.....	27
3.1.3. Kullanılan cihazlar ve aletler.....	27
3.2. Yöntemler.....	28
3.2.1. Bakteri izolatlarının toplanması.....	28
3.2.2. Klinik örneklerin kültür işlemleri.....	28
3.2.3. Bakteri izolatlarının tanımlanması.....	29
3.2.4. Antimikrobiyal duyarlılık testi.....	30
4. BULGULAR.....	48
5. TARTIŞMA.....	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67

7. KAYNAKLAR.....	68
8. EKLER.....	80



SİMGELER VE KISALTMALAR

ADT:	Antimikrobiyal Duyarlılık Testi
AME:	Aminoglikozid modifiye eden enzim
ATCC:	American Type Culture Collection
BAL:	Bronko Alveolar Lavaj
BOS:	Beyin Omurilik Sıvısı
CB:	Checkerboard
CFU:	Colony Forming Unit
CLSI:	Clinical and Laboratory Standards Institute
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
EMB:	Eosin Metilen Blue
ESBL:	Geniş Spektrumlu beta-Laktamaz
ETA:	Endotrakeal aspirat
EUCAST:	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FİK:	Fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu
IL:	İnterlökin
IV:	İntravenöz
İYE:	İdrar yolu enfeksiyonu
KAMHB:	Kasyon Ayarlı Mueller Hinton Buyyon
KKA:	Koyun kanlı agar
KPC:	<i>K. pneumoniae</i> karbapenemaz
KPC Kp:	KPC üreten <i>Klebsiella pneumoniae</i>
KRE:	Karbapenem Dirençli Enterobacterales
LPS:	Lipopolisakkarid
MDR:	Multi Drug Rezistans (Çoklu İlaç Dirençli)
MHA:	Mueller-Hinton Agar
MİK:	Minimum İnhibitor Konsantrasyon
MRSA:	Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
PEP:	Fosfoenolpiruvat
PDR:	Pandrug Rezistans (Tüm İlaçlara Dirençli)
SMD:	Sıvı mikrodilüsyon
ÜSE:	Üriner Sistem Enfeksiyonu
VRE:	Vankomisine Dirençli Enterokok
XDR:	Extensively Drug Resistant (Yaygın İlaç Direnci)

ŞEKİLLER VE TABLOLAR

Şekil 1. A) Fosfomisin kalsiyumun kimyasal yapısı B) Fosfomisin disodyumun kimyasal yapısı C) Fosfomisin Trometaminin kimyasal yapısı

Şekil 2. Fosfomisin antibiyotik solusyonunun seri sulandırımı

Şekil 3. Bakteri süspansiyonunun hazırlanıp besiyerine inoküle edilmesi

Şekil 4. Fosfomisin-Amikasin kombinasyonunun MHA besiyerlerinde yerleşimi.

Şekil 5. Fosfomisin-Meropenem kombinasyonunun MHA besiyerlerinde yerleşimi.

Şekil 6. Fosfomisin-İmipenem kombinasyonunun MHA besiyerlerinde yerleşimi.

Şekil 7. Temsili kombinasyon çalışması için fosfomisin-amikasin antibiyotik solusyonlarının hazırlanması.

Şekil 8. Mermer zemin üzerine inokülasyon için çizilen şablon.

Şekil 9. Mermer zemin üzerine çizilen şablona besiyerinin tam uyması için, petri kabına yapılan işaretlemeler.

Şekil 10. 4 numaralı suşa ait fosfomisin çalışmasının temsili görünümü

Şekil 11. 4 numaralı suşa ait meropenem çalışmasının temsili görünümü

Şekil 12. 4 numaralı suşa ait fosfomisin-meropenem kombinasyon çalışmasının temsili görünümü

Şekil 13. Agar plaklarında MİK sonuçlarının değerlendirilmesi

Tablo 1. *K. pneumoniae* için DDT’de karbapenemlerin zon çapı kesme noktaları.

Tablo 2. Fosfomisin-imipenem kombinasyonu için antibiyotik çözeltilerinin hazırlanması

Tablo 3. Fosfomisin-meropenem kombinasyonu için antibiyotik çözeltilerinin hazırlanması

Tablo 4. Fosfomisin-imipenem kombinasyonu için antibiyotik çözeltilerinin hazırlanması

Tablo 5. 4 numaralı izolata ait hesaplanan FİK indeksleri

Tablo 6. Test edilen *K. pneumoniae* izolatlarının kliniklere ve yaş durumuna göre dağılımı

Tablo 7. Test edilen *K. pneumoniae* izolatlarının klinik örneklerle göre dağılımı

Tablo 8. Antibiyotiklerin EUCAST kriterleri uyarınca *Enterobacterales* ailesi için MİK sınır değerleri.

Tablo 9. İzolatların Phonex otomatize sistem ADT sonuçları

Tablo 10. Kombinasyon çalışmasına dahil olan antibiyotiklerin tek başına MİK değerleri ve kombinasyonlarının FİK indeksleri-etkileşimlerinin hastaların demografik özelliklerine göre dağılımı

Tablo 11. *K. pneumoniae* izolatlarına karşı antibiyotik kombinasyonlarının FİK indeksleri ve etkileşimleri

Tablo 12. Agar dilüsyon yöntemi ile test edilen *K. pneumoniae* suşlarının saptanan MİK aralıkları, MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri ve kombinasyonlarda kullanılan antibiyotiklere duyarlılıkları (n=71 izolat)

Tablo 13. Çalışmadaki antibiyotik kombinasyonu sonucu oluşan etkiler

Tablo 14. Kolistin dirençli izolatlarda (n=34) antibiyotik kombinasyonu sonucu oluşan etkiler

Tablo 15. Fosfomisin-imipenem etkileşiminin imipenem direnci ile ilişkisi

Tablo 16. Fosfomisin-amikasin etkileşiminin amikasin direnci ile ilişkisi

Tablo 17. Fosfomisin-meropenem etkileşiminin fosfomisin direnci ile ilişkisi

Tablo 18. Fosfomisin-amikasin etkileşiminin örnek çeşidi ile ilişkisi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda artan MDR ve yaygın ilaç dirençli (“extensively drug resistant”, XDR) bakteri sorunu, bu enfeksiyonların tedavisi için yeni antibiyotik seçeneklerinin değerlendirilmesi ve var olan antibiyotiklerin de yeniden gözden geçirilmesini zorunlu kılmıştır (1,2).

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (ESBL) üreten, florokinolona dirençli ve karbapeneme dirençli *Enterobacterales* üyeleri, vankomisine dirençli *Enterokok* (VRE), penisiline dirençli *Streptococcus pneumoniae*, MDR *Pseudomonas aeruginosa* ve MDR *Acinetobacter* türleri, antibiyotik direnci konusunda en sık sorun yaşanan bakterilerdir (3). MDR bakterileri arasında, karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae*, ciddi hastane enfeksiyonları ile ilişkili yeni ortaya çıkan bir problemdir (4). Antimikrobiyallere karşı mikroorganizmaların geliştirdiği direnç enfeksiyon hastalıklarının tedavisini zorlaştırmaktadır ve neticede mortalite oranı gün geçtikçe artmaktadır (5,6). Antimikrobiyal direnç tehdidinin küresel sağlık ve ekonomik sonuçları da vardır. Sadece dirençli enfeksiyonlar, dünya çapında her yıl tahmini 700.000 ölümden sorumlu tutulmaktadır. Herhangi bir önlem alınmazsa, 2050 yılına kadar 100 trilyon dolarlık kümülatif maliyetle sonuçlanabileceği öngörülmektedir (7).

Dirençli enfeksiyonlar sağlık bakımı maliyetini; hastanede yatış süresinin uzamasına ve tedavide çoklu ilaçlara ihtiyaç duyulmasına neden olarak artırmaktadır. Bir mikroorganizmanın üç veya daha fazla antimikrobiyal sınıftan en az birer antimikrobiyal ilaca dirençli olmasına ‘multidrug rezistans’ MDR denilmektedir. MDR ve tüm ilaçlara dirençli ‘pandrug rezistans (PDR) *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* suş sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Geçmiş yıllarda *Enterobacterales* üyelerine karşı sefalosporinler, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları, karbapenemler, sülfonamidler, aminoglikozidler ve florokinolonlar gibi çok çeşitli antibiyotikler güvenle kullanılabiliyordu. Ancak zamanla bu antibiyotiklere karşı bakterilerin geliştirdiği direnç (ESBL, AmpC beta-laktamaz, karbapenemaz) nedeniyle, *Enterobacterales* türlerinin oluşturduğu toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlar karşısında bu antibiyotikler yetersiz kalmıştır (8). Antimikrobiyal direnç fenotiplerinin artışı ve yeni antibiyotiklerin kısıtlı olması nedenlerinden dolayı polimiksin, fosfomisin ve tigesiklin gibi eskiden kullanılan bazı

antibiyotiklerin kombinasyon şeklinde tedavide kullanılması gündeme gelmiştir. Özellikle tedaviye dirençli Gram negatif bakterilere bağlı gelişen enfeksiyonlarda kombine tedavisinin uygulanması önemli bir seçenektir (5,6). Bu çalışmada yatan hastaların çeşitli numunelerinde üremiş karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının agar dilüsyon yöntemi ile fosfomisin disodyum direnç durumu ve amikasin, meropenem, imipenem antibiyotikleriyle sinerjistik etkisi araştırılmıştır. Böylece karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşlarının etken olduğu invaziv enfeksiyonlarda en etkin ampirik tedavi modellerinin oluşturulması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Enterobacterales* Ailesi

Enterobacterales ailesi tıbbi açıdan önem arz eden gram negatif basillerin oluşturduğu en büyük ve en heterojen topluluktur. Bu aileye ait Gram-negatif basiller, klinik örneklerden en sık izole edilen bakterilerdir. Bugüne kadar bu ailede 50'den fazla cins, yüzlerce tür ve alt tür tanımlanmıştır. Bu cinsler farklı yöntemler kullanılarak sınıflandırılmıştır. Biyokimyasal özellikleri, antijenik yapıları, gen dizilimi ile genomlarının moleküler analizi ve kütle spektrometrisi ile protein kompozisyonu sınıflandırmada kullanılan kriterlerdir. Bu ailenin karmaşıklığına karşı nispeten az sayıda cins ve tür insan enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Bu bakteriler bitkilerde, suda, toprakta, insan ve hayvanların bağırsaklarında (normal barsak florası olarak) olmak üzere doğada çok çeşitli ortamlarda bulunabilmektedirler. *Enterobacterales* üyeleri neredeyse her türlü bulaşıcı hastalıkta etken olabilmekte ve laboratuvara gönderilen herhangi bir örnekten izole edilebilmektedir (9,10).

Bu ailede bulunan başlıca cinsler; *Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Yersinia*, *Morganella*, *Providencia*, *Serratia*'dır (11).

Enterobacterales üyeleri, birçok bağırsak enfeksiyonu da dahil olacak şekilde çok çeşitli insan hastalıklarına neden olmaktadır. Tüm bakteriyemilerin yaklaşık 1/4 ile 1/3'ünden *Enterobacterales* bakterileri sorumludur. İdrar yolu enfeksiyonlarının (İYE) %70'inden fazlasında etkendirler. Bu aileden *Salmonella serotip Typhi*, *Shigella* türleri, *Yersinia pestis* gibi üyeler klinik örneklerden izole edildiğinde daima insan hastalığı ile ilişkilendirilir ve çeşitli toksin ve virülans faktörleri sentezleyebilmektedirler. *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis* gibi üyeler ise normal kommensal flora üyeleri olarak insan vücudunda bulunabilen fırsatçı enfeksiyon etkenleri olarak tanımlanmaktadır (10).

Enterobacterales ailesinin üyeleri, ortak bir antijene (enterobakteriyel ortak antijen) sahiptir. 0.3-1.0x1.0-6.0 µm büyüklüğe sahip, sporsuz, Gram-negatif basillerdir. Tüm üyeler, kanlı agar gibi seçici olmayan ve MacConkey agar gibi seçici besiyerlerinde hızlı bir şekilde büyüyebilir. *Enterobacterales* üyelerinin tümü fakültatif anaerob, glikozu fermente eden, oksidaz negatif, katalaz pozitif ve nitratı

indirgeyen basillerdir. Sitokrom oksidaz enzimine sahip olmamaları basit ve hızlı bir şekilde *Enterobacterales* üyelerinin diğer birçok *Vibrio*, *Pseudomonas* gibi fermentatif ve non-fermentatif Gram-negatif basilden ayrılmasını sağlar.

Enterobacterales üyeleri koyun kanlı agarda (KKA) mat gri, büyük, kuru veya mukoid koloniler oluşturur. *Klebsiella* gibi kapsülü olan bazı *Enterobacterales* üyeleri besiyerinde karakteristik bir şekilde belirgin mukoid, ıslak, viskoz koloniler oluşturur. Kanlı agarda hemoliz oluşturma durumu değişkenlik gösterir. Besiyeri yüzeyinde bir film tabakası oluşturan veya swarming yapan koloniler, mikroorganizmanın çok hareketli ve muhtemelen bir *Proteus* türü olduğunu gösterir. Mac Conkey agarda kırmızı renkli veya eozin metilen mavisi (EMB) agarda yeşil refle veren koloni görünümü, bakterinin besiyerinde bulunan laktoz şekerini kullanarak ortamda asit oluşturma yeteneğinde olduğunu gösterir (11-13).

2.2. *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae; *Klebsiellae* takımı içinde yer alan 4 cinsten biri olan *Klebsiella*'nın (diğer cinsler; *Enterobacter*, *Hafnia* ve *Serratia*) bir türüdür. *Klebsiella* cinsi; *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. granulomatis*, *K. variicola*, *K. singaporensis* ve *K. alba* olmak üzere altı tür içerir. *K. pneumoniae* bu cinsin tipik türüdür (14). *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* ve *K. granulomatis* insanlarda hastalık oluşturan türlerdir (11).

Klebsiella cinsinin üyeleri belirgin bir kapsüle sahiptir. Bu yapı besiyerindeki kolonilerin mukoid görünümünden ve türlerin virülansından sorumlu tutulmaktadır. Ancak tüm *Klebsiella* suşları mukoid değildir. *K. pneumoniae*'nin MacConkey agarda oluşturduğu kolonilerin büyük, mukoid olmasının yanında rengi de mordur. Mor görünüm laktoz fermentasyonunun ve fermentasyon sonucunda da asit üretildiğinin göstergesidir. *K. pneumoniae* diğer tüm *Klebsiella* türleri gibi hareketsiz, indol, ornitin ve oksidaz negatiftir. Veoges-Proskauer, ONPG, sitrat, üreaz ise pozitifdir. Lizini dekarboksile eder. Laktoz, sükroz, sorbitol şekerlerini fermante edebilir. Kligler Iron Agarda yüzey ve dip kısımları asidiktir (sarı renkli) (14).

2.2.1. *Klebsiella pneumoniae*'nin patogenezi ve virülans faktörleri

K. pneumoniae'nin en önemli virülans faktörü besiyerinde mukoid koloni görünümüne de neden olan polisakkarit kapsülüdür. Bu kapsül sayesinde bakteri

fagositozdan korunmakta; ayrıca kapsül lökosit göçünün gecikmesine neden olmaktadır (15). *K. pneumoniae*'nin diğer virülans faktörleri hipermukoviskozite, fimbria (pilus), lipopolisakkarit (LPS), membran taşıyıcıları ve siderofordur (16,17). Hipervirülan *K. pneumoniae* hipermukoviskozite fenotipi ile ilişkilendirilen, sıklıkla gençlerde piyogenik karaciğer apseleri, endoftalmi, osteomyelit gibi ciddi enfeksiyonlardan sorumlu önemli bir patojendir. Bu patojenlerin karbapenemlere karşı oluşturdıkları direnç giderek artmaya başlamıştır (18).

Bakterilerin hayatta kalması için gerekli olan elementlerden birisi demirdir (19,20). *Siderofor*; *K. pneumoniae*'nin, bakteriyel replikasyonunda görevli ve virülans faktörü olarak kullanılan düşük moleküler ağırlıklı, yüksek afiniteli demir şelatörleridir. Bu moleküller *K. pneumoniae* tarafından enfeksiyon sırasında salgılanarak doku yıkımında ve bakterinin sistemik yayılımında görev almaktadır. Bakterilerin büyümesini indüklemesiyle enfeksiyonları ağırlaştırdığı tahmin edilmektedir (21).

K. pneumoniae, kapsül polisakkarit, adezin yapıları ve demir alım mekanizmaları gibi konak immünitesinden kaçmasını sağlayan virülans faktörlere sahiptir. *K. pneumoniae*'nin idrar yolunda yapışmasında ve üriner sistemde kolonize olmasında mannoz duyarlı ve mannoz dirençli hemaglutinasyon pilileri olan fimbriae tip1 ve tip3 görevlidir. *K. pneumoniae*'nin şiddetli İYE'den K1 ve K2 kapsüller serotipleri sorumlu tutulmaktadır. Bu serotipler mukoviskoziteye bağlı A genini (magA) içermektedir (22,23). Bakterilerin ürettiği ekzopolisakkarit matriks ile oluşturduğu biyofilm yapısı *K. pneumoniae*'de de bulunmaktadır. Bu yapı ile bakteriler nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel koşullardaki değişimlerden, ultraviyoleten ve fagositozdan korunmaktadır. Böylece *K. pneumoniae*'nin virulansına katkı sağlanmaktadır (16,24,25).

2.2.2. *Klebsiella pneumoniae*' da antimikrobiyal direnç mekanizmaları

Enterobacterales ailesi üyelerinde meydana gelen antibiyotik direncinde çeşitli mekanizmalar sorumlu tutulmuştur. Bunlar; genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar 'extended spectrum betalactamases' (ESBL), karbapenemazlar, Aminoglikozid modifiye eden enzim (AME)lerin bakterilerce sentezlenmesi, kinolon direncini sağlayan modifiye edici enzimde meydana gelen mutasyonlar, porin ve eflux pompasının neden olduğu direnç mekanizmalarıdır. Plazmidle kodlanan ESBL

ve karbapenamazlar sonucunda MDR ve XDR *K. pneumoniae* suşları oluşmaktadır. Bu suşlar geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere (penisilin, 3-4. kuşak sefalosporin, karbapenem ve monobaktamlar) karşı dirençlidir. Aynı zamanda bu suşlarda sulfonamid, aminoglikozid ve kinolon direnci de görülebilmektedir. *Klebsiella* ve *E. coli* için antibiyotik direnci sıklıkla plazmid aracılı gelişmektedir. MDR fenotipinde aynı direnç plazmidi üzerinde ESBL, AME, kinolon direnç belirleyicisini kodlayan genler birlikte bulunmaktadır. *E. coli* ve *Klebsiella* arasında VIM, IMP ve NDM-tip B Sınıfı karbapenamazlar ve CTX-M ailesine ait ESBL'ler yaygın olarak bulunmaktadır. OXA-48 ailesi, *Enterobacterales* üyelerinde bulunan birincil OXA tipi karbapenamazdır. Zayıf karbapenamaz olan OXA-48 ailesi enzimleri ilk olarak Türkiye'den bildirilmiştir. OXA-48 ailesi enzimleri bulunduran suşlar genellikle seftazidim ve sefepim gibi geniş spektrumlu sefalosporin grubu antibiyotiklere duyarlıdır. *K. pneumoniae* karbapenamaz (KPC)-tip A sınıfı, *Klebsiella* türlerinde en sık görülen karbapenamazdır (26).

K.pneumonia'daki beta-laktam direnci birden fazla yol ile gelişebilmektedir. Bunlar; bakterinin sentezlediği bazı enzimler [yüksek düzey AmpC beta-laktamaz, karbapenamaz üretimi (blaOXA, blaKPC'ler ve metallo-b-laktamazlar) ve oksasilinaz gibi] ile beta-laktam antibiyotiklerin inhibisyonu, porin genlerinde (OmpK35 ve OmpK36) meydana gelen mutasyon sonucu beta-laktam antibiyotiklere karşı bakteri geçirgenliğinin azalması ve eflüks pompa sistemleri aracılığıyla olan mekanizmalardır (29). Beta laktamazlardan Ambler sınıf A karbapenamazlar (KPC, PER vb.), B sınıfı karbapenamazlar (NDM, VIM vb.) ve D sınıfı karbapenamazlar (OXA, PSE) plazmitler üzerinde taşınmakta ve diğer bakterilere kolay bir şekilde aktarılabilmektedir (28).

Mikrobiyologlar, MDR olan bir *Enterobacterales* üyesi ortaya çıkarsa dikkatli olmalıdır. *Enterobacterales*'de beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı gelişen hemen hemen tüm dirençlerde, kromozomal veya edinilmiş beta-laktamaz enzimleri aracılık etmektedir. Antibiyotik direnci önceden duyarlı klinik suşlarda da görülebilmektedir. Bu direnç plazmitlerin (R faktörleri veya R plazmitleri) transfer edilmesi sonucu görülmektedir. Bu plazmitler beta-laktamaz enzimleri üreten genleri kodlamaktadır. Böylece 1, 2 ve 3. kuşak sefalosporinleri, aztreonamı ve penisilinleri hidrolize edebilen genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar veya ESBL'ler

oluşmaktadır. Bu dirençli suşların saptanması, sadece etkenin izole edildiği hastanın tedavisinde değil, aynı zamanda hastane enfeksiyonlarının sürveyansında da yol gösterici olmaktadır (9). KPC üreten *K. pneumoniae* (KPC Kp), son on yılda dünyada hızla yayılmıştır. KPC Kp suşları tipik olarak karbapenem grubu antibiyotiklere (ertapenem, doripenem, imipenem, meropenem), florokinolonlara, sefalosporinlere, penisilinlere ve sıklıkla aminoglikozitlere dirençlidir. Karbapenemaz direnci diğer *Enterobacterales* türlerinde de oluşabildiğinden, bu çok ilaca dirençli suşlar için “Karbapenem Dirençli *Enterobacterales* (KRE)” ifadesi kullanılmıştır (29).

2.2.2.1. Aminoglikozid direnci

K. pneumoniae'nin aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı geliştirdiği direncin en yaygın mekanizmalarından birisi; aminoglikozid adeniltransferaz, aminoglikozid asetiltransferaz ve aminoglikozid fosforilazlar gibi aminoglikozidleri modifiye eden enzimlerin bakteri tarafından üretimidir. Böylece aminoglikozidler inaktive edilmektedir (30,31).

Bu mekanizma dışında, porin genlerinde meydana gelen regülasyon sonucu aminoglikozidlerin bakteri hücrelerine alımının azalması, eflüks pompalarında değişim, ribozomal bağlanma bölgelerinde meydana gelen değişiklikler gibi mekanizmalarla da direnç gelişebilmektedir (32).

2.2.2.2. Kinolon direnci

K. pneumoniae'da florokinolon grubu antibiyotiklere karşı gelişen direncin nedenleri arasında; eflux pompalarının artan üretimi, hedef enzimlerin ve/veya proteinlerinin değiştirilmesi ve hedef bölge gen mutasyonları sayılmaktadır (27).

2.2.2.3. Tigesiklin direnci

K. pneumoniae'nin tigesikline karşı geliştirdiği direnç mekanizmaları; kromozomal olarak kodlanmıştır ve antibiyotiğin hem 30S hem de 16S ribozomal birim hedeflerinin modifikasyonlarını ve hücre geçirgenliğindeki değişiklikleri içerir. AcrAB-TolC ve OqxAB eflux pompalarının aşırı ekspresyonunun ve düzenleyicileri RarA, RamA, RamR ve AcrR'nin ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin de dirence katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Mekanizması tam bilinmemekle beraber, alternatif bir tigesiklin direnci mekanizması olduğu düşünülen yeni bir pompa olan KpgABC gibi diğer pompaların artan ekspresyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir.

Tigesiklin direnci; porin geni olan ompK35'in transkripsiyonunun azaldığı *K. pneumoniae* suşlarında daha yüksek bulunmuştur (27).

2.2.2.4. Kolistin direnci

K. pneumoniae'nin yapısında bulunan LPS'lerin yapısında meydana gelen modifikasyon, kolistine karşı gelişen dirençte en yaygın sebeptir. Bu değişiklik de LPS'nin anyonik özelliklerinde değişikliğe neden olan mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Bir diğer kolistin direnci nedeni ise; plazmid aracılı meydana gelmektedir. Mcr-1 geni sorumlu tutulmaktadır. Mcr-1 dünya genelindeki plazmid aracılı kolistin direncinden sorumlu ana nedenlerden biridir (33).

2.2.3. *Klebsiella pneumoniae*'nin epidemiyolojisi

Kritik hastalarda *Enterobacterales* üyelerine bağlı gelişen enfeksiyonlar ciddi ve ölümcül seyredebilmektedir. *K. pneumoniae*, dirençli etkenlerin çoğunluğunu oluşturan "ESKAPE" patojenler (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* ve *Enterobacter* türleri) tanımlamasının içerisinde yer alan bir suştur (34). MDR Gram-negatif bakterilerin dünya genelinde hızla artışı, insan sağlığı için tehdit olmaya devam etmektedir (35). Karbapenem grubu antibiyotiklere dirençli olan *Enterobacterales* türlerinin dünya genelinde görülüyor olması en acil halk sağlığı tehdidi arasında yer almaktadır (36). MDR *K. pneumoniae* Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) tarafından insan sağlığı için acil tehdit oluşturan mikroorganizmalardan biri olarak belirlenmiştir (37).

2.2.4. Klinik

Normal kişiler taşıyıcı olarak orofarenkslerinde %1-6 oranında *K. pneumoniae* bakterisini bulundurlar. Hastanede yatan hastalarda ise bu kolonizasyon oranı %20'ye kadar çıkabilir. Hastanede yatan hastalarda görülen bu artmış kolonizasyon prevalansı, sıklıkla diyabetis mellitus, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, alkolizm gibi immün sistemi zayıflatan sebeplerin varlığında hastalarda ortaya çıkan akciğer enfeksiyonlarının kaynağı olabilmektedir (38).

Klebsiella cinsinin en sık izole edilen türleri *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca*'dır. Bu türler sıklıkla toplum veya hastane kaynaklı primer lobar pnömoni etkeni olarak izole edilmektedirler. *K. pneumoniae* pnömonisi, alveolar boşluklarda yoğun nekroz ve kanama ile birlikte görülen, yıkıcı olma eğiliminde olan bir akciğer enfeksiyonu

tablosudur. Bu yıkım; mukoid, kalın ve tuğlalı veya görünüşte ince ve "kuş üzümü jöle benzeri" olabilen balgam üretimiyle sonuçlanmaktadır. Ağır olgularda kronik kaviter hastalık, hemoptizi ve akciğer apseleri görülebilmektedir. *K. pneumoniae* pnömonisinde plörit tablosu sıklıkla görülmektedir (hastaların yaklaşık %80'inde plöritik ağrı şikayeti bulunur). *K. pneumoniae* akciğer dışında da enfeksiyon yapabilmektedir (enterit, menenjit, İYE, sepsis, yara ve yumuşak doku enfeksiyonları, endojen endoftalmit, endokardit pyojenik karaciğer abseleri gibi) (27,39,40).

K. pneumoniae, sağlık bakımı ile ilişkili enfeksiyonların en sık etkenlerinden biridir. Gram negatif bakterilerin neden olduğu hastane enfeksiyonlarının üçte biri *K. pneumoniae* fırsatçı bakterisi tarafından oluşturulmaktadır (27,35).

K.pneumoniae, hem toplum hem de hastane kaynaklı İYE'de sık olarak tespit edilen bir patojendir. *K. pneumoniae*, toplumdan kazanılmış İYE'nin ikinci en sık etkenidir. Bu suşlar MDR olmaya meyilli olduğu için kan dolaşımı enfeksiyonları, menenjit, karaciğer apsesi, İYE ve pnömoni tedavisindeki antibiyotik seçenekleri sınırlanmaktadır. *K. pneumoniae*'nin 2017 yılı DSÖ'nün Küresel Öncelik Listesi'nde yer alan uluslararası endişe verici ilk üç patojenden biri olarak belirlenmesi de bu bakteriye yönelik yeni antibiyotiklerin araştırılması, keşfi ve geliştirilmesinin gerekli olduğunu göstermektedir (22,25).

2.2.5. MDR veya PDR *Klebsiella pneumoniae* enfeksiyonlarında tedavi seçenekleri

MDR *K. pneumoniae*'nin etken olduğu enfeksiyonlara bağlı hastaneye yatış oranı son yıllarda giderek artmıştır. Bu hastalarda mortalite ise %26-68 olarak belirtilmektedir (41). MDR gram negatif bakteriler antibiyotiklerin çoğuna karşı direnç geliştirmişlerdir. Bu bakteriler beta-laktamaz enzimleri üretmektedirler. Beta-laktamaz üreten suşlar, genellikle plazmid aracılı olduğu için hastane ortamlarında çok hızlı yayılabilmektedir (42).

Ampisiline doğal dirençli olan *K. pneumoniae*; birçok antibiyotiğe de direnç kazanabilme yeteneğindedir. Önceleri *K pneumoniae* enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla sefalosporin ve aminoglikozid grubu antibiyotikler kullanılmaktaydı. Ancak ESBL enzimleriyle, kullanılan bu antibiyotiklere karşı direnç gelişiminin neticesinde son yıllarda karbapenemler tedavide kullanılmaya başlanmıştır. Ancak bu defa da

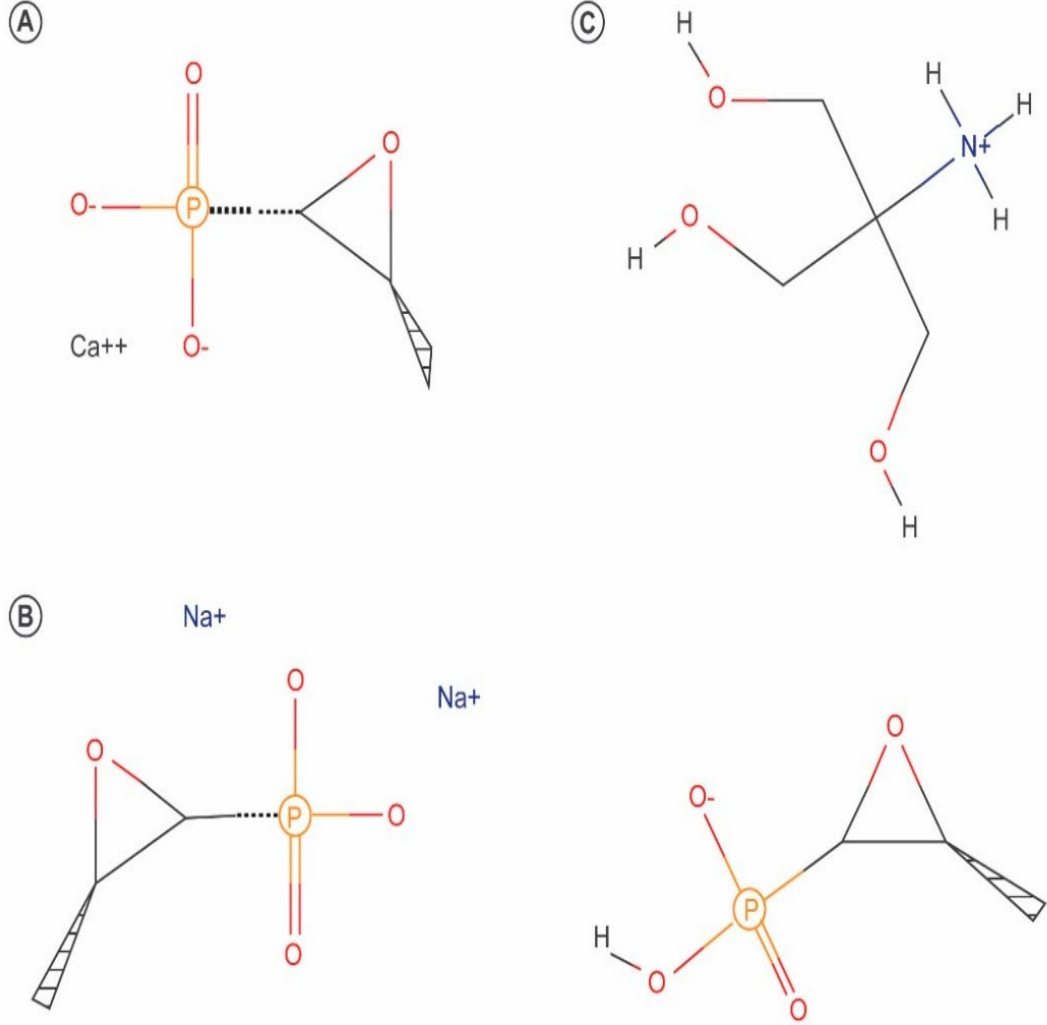
karbapenamaz üreten *K. pneumoniae* suşlarında görülen artış; tedavi için yeni arayışları zorunlu kılmıştır. MDR *K. pneumoniae* enfeksiyonları; tedavisi zor, yüksek mortaliteyle seyreden enfeksiyonlardır. Karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonlarında tedavide kullanılabilen antibiyotiklerden biri de kolistindir. Ancak kolistin dirençli suşların da son zamanlarda görülüyor olması ve kolistin dirençli suşlarda tigesiklin, fosfomisin, gentamisin ve seftazidim/avibaktam dahil olmak üzere mevcut etkili antimikrobiyallerin sayısının sınırlı olması nedeniyle tedavide zorluk yaşanmaktadır (35).

2.3. Fosfomisin

Uluslararası tedavi rehberleri toplumdaki direnç oranı %20 ve üzerine çıkan ilaçların ampirik tedavide kullanılmaması gerektiğini vurgulamaktadır (43). Son yıllarda MDR (geniş spektrumlu beta-laktamaz ve/veya metallo-beta-laktamaz üreten) bakteri sorunu ciddi bir tehdit olmaya başlamıştır. Bu durum bu bakterilere bağlı gelişen enfeksiyonların tedavisinde yeni arayışları netice vermiştir. Fosfomisin, MDR bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde alternatif bir ajan olarak tekrar ele alınmaktadır (1).

Fosfomisin 1969'da *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces viridochromogenes* ve *Streptomyces wedmorensis*'den üretilmiş, fosfoenolpiruvat (PEP) analogu olan, düşük molekül ağırlıklı doğal bir antibiyotiktir (44-46). Fosfomisinin; fosfomisin trometamin (veya fosfomisin trometamol) ve fosfomisin kalsiyum olmak üzere iki oral formülasyonu; ayrıca fosfomisin disodyum olarak intravenöz (IV) formülasyonu mevcuttur (Şekil1) (45). Fosfomisin, fosfonik antibiyotikler sınıfına aittir. Parenteral kullanıma uygun fosfomisin, fosmidomisin ve alafosfalin olmak üzere üç fosfonik antibiyotik bilinmektedir. Bu antibiyotiklerden sonuncusu terk edilmiştir. Başlangıçta, uzun yıllar boyunca fosfomisin disodyum, menenjit dahil ciddi enfeksiyonları olan hastalara parenteral olarak uygulandı (1). Daha yakın zamanlarda, özellikle İYE tedavisinde kullanılmak üzere monobazik, suda çözünür bir fosfomisin tuzu olan fosfomisin trometamol olarak oral bir formda üretilmiştir. Fosfomisin trometamol tuzu dışında diğer ürünlere ilişkin veriler ise sınırlıdır (47). Fosfomisin, mevcut antibiyotikler içerisinde moleküler kütlesi en düşük (138 Da) olan antibiyotiktir. Bu durum antibiyotiğe geniş yayılabilirlik avantajı sağlar. Etkin madde normal saklama koşulları altında 2-3 yıl kadar stabil kalabilmektedir.

Fosfomisin asidik ortamlarda kararsız olduğu için parenteral yol ile kullanıma uygun hazırlanan disodyum tuzu içeren formülasyonunun oral biyoyararlanımı zayıftır (47). Çoğu Avrupa ülkesinde fosfomisin disodyum uzun yıllardır kullanılmasına rağmen, örneğin Türkiye'de klinik kullanıma ancak yakın zamanda kavuşmuştur (48).



Şekil 1. A) Fosfomisin kalsiyumun kimyasal yapısı B) Fosfomisin disodyumun kimyasal yapısı C) Fosfomisin Trometaminin kimyasal yapısı (49).

2.3.1. Etki mekanizması

Fosfomisin bakterisidal, bir epoksit halkasına sahip, fosfonik antibiyotikler grubunda yer alan PEP analogudur. Bakteri hücre duvarında bulunan peptidoglikan tabaka, N-asetil muramik asidin (NAMA) ve N-asetil glikozaminin (NAG) birbirini takip eden birimlerinin pentapeptid çapraz bağları ile bağlanması ile oluşmaktadır. Peptidoglikan sentezinin ilk basamağı bakteri sitoplazmasında gerçekleşir. Uridin difosfat (UDP)-NAG'ın 3'-hidroksil grubundan inorganik fosfatın ayrılması ile PEP'den gelen enol piruvatın UDP-NAG'a eklenmesinin gerçekleştiği bu

basamaktaki reaksiyonu katalizleyen enzim; UDP-NAG enol piruvil transferaz (MurA) enzimidir (50,51).

L- α -gliserofosfat taşıyıcı (GlpT) [glukoz-6-fosfat (G6P) tarafından indüklenir] ve heksoz monofosfat taşıyıcı (UhpT) (gliseraldehid-3-fosfat tarafından indüklenir) permeazlar fosfomisin moleküllerinin bakteri hücresinin içine taşınmasında görevli iki transport sistemidir. GlpT, başlangıçtaki aktivitesini herhangi bir uyarıya gerek duymadan gerçekleştirir; ancak ortamda G6P yoksa UhpT aktive olamaz (51-53).

Fosfomisin sitoplazmaya girdikten sonra PEP analogu gibi davranır. Fosfomisin, MurA enzimini (peptidoglikan sentezinden sorumlu ana enzim), bu enzimin 115. sistein kalıntısına kovalent bağ ile irreversible bağlanarak inhibe eder. Böylece UDP-NAMA oluşumunu önleyerek antibakteriyel etkisini peptidoglikan sentezini inhibe ederek göstermektedir (1,52,53). Fosfomisin, peptidoglikan sentezini, beta-laktamlar ve glikopeptidlerden daha erken bir basamakta inhibe eder (45,54). Yapılan çalışmalarda, fosfomisinin 30 dakika içinde bakterisidal etkinliğini gösterebildiği tespit edilmiştir (1).

Bakteri fimbrialarının sentezini ve hareket yeteneklerini azaltan fosfomisin, hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif üropatojenlerin üriner sistem epitelyumuna ve idrar kateterlerinin iç yüzeyine yapışmasını ve o bölgede kolonize olmasını engellemektedir. Adezif özellikleri ile bakteriler idrar akımına karşı koyabilmekte, hücre yüzeyine yapışabilmekte, dokulara girebilmekte ve mesane yüzeyinde birikebilmektedir. Adezif özellik alt üriner sistem enfeksiyonu (ÜSE) patogenezinde çok önemli bir faktördür. Fosfomisin, antiadezif etkiyi inhibitör konsantrasyonların altında kalsa bile oluşturabilmektedir. Fosfomisin, bakterilerin biyofilm tabakalarına geçer. Böylece bakterilerin üzerinde etkinliğini devam ettirebilir. Fosfomisin düşük inhibitör konsantrasyonlarda bile, *E. coli*'nin patojenite ile ilgili enzimleri sentezlemesini ve plazmid transferi yapabilme yeteneklerini zayıflatmaktadır (55-57).

Fosfomisinin anaerobik koşullarda antimikrobiyal aktivitesi artırıldığında, bakterilerin biyofilmelerinin derin katmanlarına nüfuz edebilmektedir (45,58). Bazı çalışmalarda fosfomisinin, tedavide tek başına veya başka antibiyotiklerle kombine

olarak kullanılması durumunda, bakterilerin sayısını azalttığı; ayrıca bakterilerin biyofilm tabakasında değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (45).

2.3.2. Fosfomisin farmakokinetik özellikleri

Fosfomisin; hidrofilik, düşük molekül ağırlıklı fosfonik asit türevi bir antibiyotiktir. IV fosfomisinin %93-99'u değişmeden böbrekten idrarla atılmaktadır (45,54). Fosfomisinin oral formülasyonu kullanıldığında da hızla metabolize olarak idrarda değişmeden yüksek konsantrasyonda atılmaktadır (59).

Fosfomisin IV yol ile verildiğinde; cilt-subkutan dokuya ve yumuşak dokulara, kas dokusuna, beyin omurilik sıvısına, akciğere, kemik dokuya, önemli konsantrasyonlarda geçebilmektedir. Fosfomisin normal şartlarda kan-beyin bariyerini geçen bir antibiyotiktir. Bununla beraber meningeal inflamasyon durumunda beyin omurilik sıvısındaki konsantrasyonu artmaktadır (45).

2.3.3. Fosfomisin farmakodinamik özellikleri

Fosfomisin *S. aureus* ve *P. aeruginosa* için zamana bağlı bakterisid aktiviteye sahipken; *S. pneumoniae*, *E. faecium*, *P. mirabilis* ve *E. coli* için konsantrasyona bağlı bakterisid etki göstermektedir (54,58). Fosfomisin trometamolün gebelik kategorisi B'dir. Plasentayı basit difüzyonla geçebilen fosfomisin diğer maddelerin plasentadan geçişine etki etmemektedir (45).

Hastaya uygulanan ilacın konsantrasyonuna bağlı olarak fosfomisin; *P. mirabilis* ve *E. coli* bakterilerine karşı in vitro şartlarda uzun süren (3,4-4,7 saat) postantibiyotik etki oluşturmaktadır. Bu etki *S. aureus* suşlarına karşı daha kısa (0,5-1,4 saat) süreli olarak belirlenmiştir (58). Fosfomisinin diğer ilaçlarla birlikte uygulanmasına engel bir durum belirtilmemiştir. Ancak fosfomisin digoksin seviyelerini veya etkisini artırabildiği için bu hastaların yakın takip edilmesi gerekmektedir. Kontraseptik yöntemlerden olan kombine östrojen kullanan bir hastaya fosfomisin tedavisi başlandığında doğum kontrol başarısızlık riski bulunmuştur. Tifo ve Bacille Calmette-Guerin (BCG) aşılı ile birlikte fosfomisin kullanılmamalıdır. Aksi takdirde aşı etkinliği azalabilir (45).

2.3.3. Fosfomisin antibakteriyel spektrumu

Fosfomisin, Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere, ESBL üreten *Enterobacterales* üyelerine bakterisid etkilidir. Penisiline dirençli *S. pneumoniae*, MRSA, metisiline dirençli koagülaz negatif *Staphylococcus* (MRKNS) türleri, çoklu

ilaca dirençli *P. aeruginosa*, vankomisine duyarlı veya dirençli *Enterococcus* türleri, ESBL, karbapenemaz üreten *Enterobacterales* gibi patojenlerle oluşan enfeksiyonların tedavisinde kullanılmıştır (1,51). *P. aeruginosa* suşları dışındaki Gram-negatif basillere, Gram-pozitif koklardan daha etkilidir (1). *P. aeruginosa* suşlarında ise fosfomisin duyarlılığı değişkenlik gösterebilmektedir. Ancak özellikle aztreonam, meropenem, sefepim gibi antibiyotiklerle kombine edildiğinde *P.aeruginosa* 'ya etkili olduğu gösterilmiştir (60).

K. pneumoniae, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *S. pyogenes*, *S. schottmuelleri* ve *S. aureus*'un etken olduğu intraperitoneal enfeksiyonlarda fosfomisinin IV formunun etkinliği gösterilmiştir (44). *Klebsiella*, *Enterobacter* ve *Serratia* suşlarının fosfomisin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri *E. coli*'den daha yüksektir. *C. trachomatis*, *V. fischeri*, *B. cepacia*, *S. maltophilia*, *S. capitis*, *S. saprophytius* ve *M. tuberculosis* fosfomisine doğal olarak dirençlidir. *Acinetobacter* türleri, *M. morgani* ve *L. monocytogenes* de fosfomisine genellikle dirençlidir (44,45,54,60).

Bazı in vitro çalışmalarda, fosfomisin ile aminoglikozidler, bazı beta-laktam grubu antibiyotikler ve diğer bazı ajanlar birlikte kullanıldığında; özellikle dolaşım, üriner sistem, solunum yolu enfeksiyonlarında görülen bakteriyel etkenlere karşı sinerjist etki oluşturduğu bildirilmiştir (1). *Acinetobacter baumannii* fosfomisine dirençli bir suştur. Ancak aminoglikozid grubu bir antibiyotik ile kombine kullanıldığında bu etkene karşı sinerjistik etki oluşabilmektedir (56,61).

Fosfomisin aminoglikozid grubu bir antibiyotik ile kombine kullanılması durumunda sinerjist ve additif antibakteriyel etkinin görülmesinin yanı sıra kombine kullanımda aminoglikozidlerin nefrotoksik yan etkilerinde de azalma görülebilmektedir (55-57).

Fosfomisin trometamin özellikle unkomplike İYE'de, fosfomisin disodyum ise; sepsis, yumuşak doku enfeksiyonları gibi daha ciddi enfeksiyonlarda tercih edilmektedir. Fosfomisinin etki spektrumu geniştir. İntravenöz yolla verilen fosfomisin disodyumun %93'ü böbreklerden atılmaktadır. Böbrek yetmezliği durumunda antibiyotik konsantrasyonu artış göstermektedir. Bu nedenle antibiyotik dozu ayarlanmalıdır. Beyin omurilik sıvısı (BOS) ve aköz humor de dahil dokulara

dağılımı iyidir. İlaça bağlı hipokalemi, hipernatremi, nötropeni, eozinofili, diyare, bulantı, baş ağrısı, flebit gibi yan etkiler görülebilmektedir (52).

2.3.4. İmmünomodülatör aktivite

Fosfomisin; lenfosit, monosit ve nötrofil işlevini değiştirebilmektedir. İn vitro şartlarda B ve T lenfositlerinin aktivasyonunu inhibe etmektedir. Fosfomisin; kronik böbrek yetmezliği olup hemodiyalize giren hastalarda ve böbrek transplantasonlu hastalarda fırsatçı patojenlerin nötrofillerce fagosite edilmesini ve nötrofillerin bakterileri öldürme yeteneğini artırmaktadır. Akut inflamatuvar sitokin yanıtını etkilemektedir. Fosfomisin; interlökin (IL)-1, tümör nekroz faktörü-alfa ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokin üretimini azaltmakta; IL-6 ve IL-10 üretimini ise artırmaktadır (45,58).

2.3.5. Fosfomisine karşı direnç mekanizmaları

Fosfomisin ile diğer antibakteriyel ajanlar arasında çapraz direnç gelişimi, fosfomisinin kimyasal yapısı ve hücre duvar sentezinin erken evrelerini engelleyen etki mekanizmasından dolayı izlenmemekte veya çok nadir olarak izlenmektedir. Bu nedenle dirençli mikroorganizmaların tedavisinde kombine olarak kullanılması sonucu potansiyel olarak sinerji gelişmektedir. Bakteriler fosfomisine karşı nadiren direnç geliştirmektedir. Direnç, sıklıkla kromozomal kaynaklı veya nadiren plazmid aracılığıyla gelişmektedir. Bakterilerde fosfomisin direncinin nadir görülme nedenlerinden biri olarak, bu antibiyotiğin bakteriyel adezyonu azaltması düşünülmüştür (1,57,62).

Fosfomisine karşı direnç, hedef bölge modifikasyonu, hedef bölgedeki ilaç alımının azalması, fosfomisinin bakteri tarafından inaktive edilmesi gibi mekanizmalarla gerçekleşebilmektedir (7).

2.3.5.1. MurA ile ilişkili kazanılmış direnç

E.coli'de MurA'nın 115. Pozisyonunda bulunan sistein aminoasiti yerine aspartat aminoasiti geçerse fosfomisinin bağlanma afinitesi azalmakta, böylece izolatlar fosfomisine dirençli hale gelmektedir. *Chlamydia türleri*, *Mycobacterium tuberculosis* ve *Vibrio fischeri* suşlarında bu durum mevcuttur ve fosfomisine doğal dirençlidirler (63,64).

Bir çalışmada, *P. putida*'da peptidoglikan sentezinde bir kurtarma yolunun tanımlandığı bildirildi. Fosfomisin hedefi olan MurA peptidoglikan sentezinde yer almaz ve bu da doğal fosfomisin direnciyle sonuçlanır (45).

2.3.5.2. Fosfomisine azalmış geçirgenlik/permeabilitenin azalması

Bakterilerde ilacın hücre içerisine taşınımında görevli olan iki temel transport sistemi olan L-alfa-gliserofosfat (GlpT) ve heksoz fosfat sistemleri gibi yapısal ve düzenleyici proteinleri kodlayan genlerde görülen mutasyonlar; kromozomal mutasyonları oluşturmaktadır. Böylece fosfomisin bakteri hücresinin içerisine geçememekte veya az geçmekte ve hedef bölgeye ulaşması engellenmektedir (1,57). Yaygın olarak fosfomisine duyarlı bakterilerde (*E. coli* gibi) ortaya çıkan direnç, genellikle bu mekanizma ile oluşmaktadır (45).

Heksoz fosfat transport sisteminde (G6P tarafından indüklenir) meydana gelen hasara bağlı oluşan dirençli suşlar sıklıkla in vitro ortamda ortaya çıkmaktadır. L-alfa-gliserofosfat transport sisteminin kaybı sonucu gelişen dirençli suşlar ise daha çok in vivo oluşur (50).

2.3.5.3. Enzimatik inaktivasyon

Bu mekanizma ile gelişen fosfomisin direncinden; fosfomisini inaktive edici enzimlerin üretimi sorumlu tutulmaktadır. Fosfomisin değiştirici enzimler (FosA, FosB, FosX) kromozomal olarak ve özellikle *E. coli*'de transfer edilebilir plazmidler aracılığıyla olmak üzere iki şekilde kodlanabilmektedir (8,64).

Plazmid aracılı oluşan dirençler bakteri türleri arasında yayılım göstermektedir. Plazmid aracılı Fos enzimleri glioksalaz süper familyasındandır. Plazmid aracılığıyla oluşan fosfomisin direnci ilk olarak FosA geni tarafından kodlanan metaloenzim glutatyon S transferaz enziminde gösterilmiştir. FosA, glutatyon ve fosfomisin arasındaki reaksiyonu inaktif bir eklentiye katalize eder. FosA geni sıklıkla Gram-negatif bakterilerde (*Pseudomonas spp*, *Acinetobacter spp* ve *Enterobacterales* üyelerinde) bulunur. FosA yapısına sahip FosA2, FosA3, FosA4, FosA5 ve FosA6 gibi yeni subtipler de tanımlanmıştır. *E. coli*'de plazmid aracılı olarak üretilen FosA3, epidemiyolojik açıdan en önemli Fos enzimi olarak gösterilmiştir. Glutatyon S transferaz enzimini aynı zamanda FosB geni de kodlamaktadır. FosB geni de özellikle Gram-pozitif bakterilerdeki reaksiyonu katalize eder. FosB3 *E. faecium*'da tanımlanmıştır. Fos genleri, aynı plazmidde veya

bir konjuge plazmidde bulunan başka antibiyotiklere direnç kazandıran farklı genlerle birlikte başka bakterilere transfer edilebilmektedir. Bu nedenle fosfomisin direnciyle beraber tetrasiklinler, beta-laktamlar, kinolonlar, aminoglikozidler, makrolidler ve sülfonamidler gibi ek antibiyotik dirençleri de görülebilmektedir. Örneğin; plazmid aracılı FosB3 geni; vanA geni ile birlikte bulunabilmektedir. Bu nedenle bu tür plazmidlerin elde edilmesi fosfomisin ve vankomisine eş zamanlı direnç ile sonuçlanabilmektedir. FosX, *L. monocytogenes*'de bulunabilen kromozomal enzimdir. Bu enzim fosfomisinin su ile reaksiyonunu katalize etmekte görevlidir. FosC ise, *P. syringae*'de bulunur ve fosfomisin direnç gelişiminde görevli glutatyon S transferaza benzer bir enzimdir. FosC, ATP kullanır ve fosfomisine bir fosfat grubu ekleyip fosfomisinin özelliklerini değiştirerek ilacı inaktive eder. Glutatyon S transferaz, fosfomisinin epoksit grubunu açıp antibiyotiğin epoksit halkasının C1'ine, tripeptid glutatyon sisteinde bulunan sülfidril grubunu ekleyerek fosfomisini etkisiz hale getirir (1,8,45,63).

2.3.5.4. Heterorezistans

MİK'den daha yüksek antibiyotik konsantrasyonlarında dahi büyüeyebilen bakteri alt popülasyonlarının varlığına heterorezistans denilmektedir. Bu durum genellikle tedavi başarısızlığı ve tekrarlayan enfeksiyon durumlarında karşımıza çıkmaktadır (65). *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa* (MDR ve MDR olmayan) suşlarında fosfomisine heterorezistans tanımlanmıştır (45).

2.3.5.5. Antibiyotik modifikasyonu ilişkili kazanılmış direnç

Fosfomisin direnci, genellikle fosfomisine duyarlı olan *E.coli* gibi bakterilerde özellikle antibiyotik tedavisi sırasında fosfomisinin bakteri hücrelerine girişini ve taşınmasını sağlayan sistemlerde meydana gelen mutasyonlar sonucunda görülür. Fosfomisin taşıyıcılarını kodlayan kromozomal glpT ve uhpT genlerinde görülen mutasyonlar, fosfomisinin bakteri hücrelerine alımını engellemekte veya azalmasına neden olmaktadır. Bu genlerle kodlanan proteinler, bakterilerde virülans veya metabolik fonksiyonlar için gerekli olan karbonhidrat veya gliserol taşıyıcılarıdır. CyaA ve ptsI genlerindeki mutasyonlar da saptanmış ve pilus biyosentezinde azalma ve epitelyal hücrelere yapışabilme kabiliyeti ile ilişkilendirilmiştir. MurA'daki mutasyonlar, fosfomisin için enolpiruvil transferazın

daha düşük afinitesiyle sonuçlanmaktadır. Bununla beraber enolpiruvil transferazın aşırı ekspresyonunun da fosfomisin direnciyle sonuçlandığı gösterilmiştir (45,54). *Klebsiella* türleri ve *P.aeruginosa*; fosfomisin tedavisi sırasında en sık direnç geliştiren bakterilerdir (1).

2.3.6. Klinikte fosfomisin kullanımı

Gram pozitif ve negatif bakterilerde artan antibiyotik direnç oranları, yeni antibiyotiklerin sınırlı olması nedeniyle eski antibiyotiklere tekrar ilgi uyandırmaya başlamıştır ve eski antibiyotikler tedavi seçeneği olarak düşünölmeye başlanmıştır. Fosfomisin, son yıllarda ise çok ilaca dirençli bakterilerin etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde faydalı görünmektedir (45).

Fosfomisin, kadınlarda *E. coli* ve *E. faecalis* suşlarına bağılı gelişen komplike olmayan İYE'lerin (akut sistit) oral tedavisinde kullanılmak üzere 1996 yılında ABD'de Food Drug Administration (FDA) tarafından onay almıştır (44). Fosfomisinin oral formu aynı zamanda akut komplike olmayan sistitte terapötik seçenektir. İYE tedavisinde IV de uzun süredir bazı ölkelerde kullanılmaktadır (44,58). Son zamanlarda, fosfomisinin İYE dışındaki endikasyonlarda da özellikle MDR bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda kullanılmasına ilgi artmaktadır (44).

Fosfomisin; düşük direnç oranları, yüksek düzeyde tolere edilebilir ve güvenilir olması, in vivo aktivitesi ve klinik etkinliğı ve farmakokinetik ve farmakodinamik avantajları nedenleriyle dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde tercih edilecek ajanlar arasındadır (1).

2.3.7. Toksisite ve yan etkiler

Böbrek fonksiyonları bozuk ve/veya aralıklı olarak diyalize giren hastalarda günlük doz miktarı ayarlanmalıdır (45). Fosfomisine bağılı yan etkiler düşük oranlarda gözlenmektedir (%1-17) (1). Bununla birlikte tüm yan etkiler sıklıkla hafif düzeyde seyreder. Fosfomisin genellikle iyi tolere edilen bir antibiyotiktir (55,66). Temelde gastrointestinal sistem yan etkileri görölmektedir. Nadir olarak da deri ve deri altı dokulara ait yan etkiler görölebilmektedir (61). Oral yol ile uygulanan fosfomisin tremetamin formülasyonu sonrası en sık görölen yan etkiler sıklık sırasına göre; ishal, gecici bulantı ve epigastrik/abdominal ağrının eşlik ettiğı hafif, kendini sınırlayan, hasta tarafından tolere edilebilen gastrointestinal rahatsızlıklardır. Güçsüzlük, baş dönmesi, baş ağrısı, deride döküntü, kızarıklık ve vajinit, bakteriyel

veya fungal süper enfeksiyonlar daha nadir görülen yan etkilerdir (1,45,58). Bazı hastalarda fosfomisin kullanımına bağlı transaminaz değerleri yükselebilmektedir (56).

Fosfomisin parenteral yol ile uygulandığında en sık döküntü, gastrointestinal, periferik flebit ve hipokalemi yan etkileri görülmektedir (67).

Bu yan etkiler genelde iyi tolere edilirler ve tedavinin kesilmesini gerektirmezler. Fosfomisin, tedavide yüksek dozda kullanıma izin verebilen bir antibiyotiktir. Bu özelliğini; uygun güvenlik profilinden almaktadır. Böylece sistemik enfeksiyonları tedavi ederken farmakodinamik hedeflere ulaşma olasılığı artırabilmektedir. Yüksek fosfomisin seviyeleri ayrıca fosfomisine karşı olası direnç gelişimini düşük oranlarda tutabileceği düşünülmektedir (58).

Hipernatremi ve hipokalemi IV fosfomisinin potansiyel yan etkileridir. IV fosfomisin 1 gramında, 0.32 g sodyum bulunmaktadır. Buna bağlı hipernatremi görülebilmektedir. Fosfomisinin renal tübüllerin distal kısmında potasyumun idrar ile atılımını artırdığı düşünülmektedir. Bunun sonucu olarak da fosfomisin tedavisi alan hastalarda hipokalemi görülebilmektedir. Bu nedenle, fosfomisin tedavisi altında hastalara potasyum takviyeleri uygulanmalı ve potasyum seviyeleri düzenli olarak takip edilmelidir (45).

Fosfomisin; geçici nötropeni, trombositopeni, eozinofili, bilirubin ve karaciğer enzimlerinde artışa neden olabilmektedir. Fosfomisin aminoglikozid grubu antibiyotiklerle kombine edildiğinde aminoglikozidlerin nefrotoksik etkisini azaltmaktadır. Bunu; aminoglikozidlerin mast hücrelerinden histamin salınımına neden olmasını inhibe ederek gerçekleştirmektedir. Fosfomisinin nefrotoksisiteyi azaltma özelliği ayrıca vankomisin, amfoterisin B ve cisplatin ile kombine edildiğinde de görülmektedir (8,45).

Fosfomisin, intramusküler enjeksiyon şeklinde uygulandığında hastalarda uygulama yerinde ağrı oluşabilmekte; ayrıca eozinofil sayılarında değişiklikler gözlenebilmektedir. Bu yan etkiler sıklıkla geçicidir (61). Aplastik anemi, astım alevlenmesi, kolestatik sarılık, anafilaktik şok, anjiyoödem, toksik megakolon, optik nörit ve hepatik nekroz gibi ciddi yan etkiler ise çok daha nadir görülmektedir (58). Hastanın geçmişinde fosfomisin tedavisi sonrası anafilaktik şok öyküsü mevcutsa fosfomisin kontraendikedir (45).

2.4. Antibiyotik Duyarlılık Yöntemleri

2.4.1. Disk difüzyon yöntemi

Bu yöntemin kullanımı kolay ve maliyeti diğer yöntemlere göre düşüktür. Bu nedenle hala yaygın olarak kullanılmaktadır. Disk difüzyon yönteminde bir MİK değeri elde edilemez (dilüsyon yöntemlerinin aksine). Ancak ilacın inhibisyon zon çapı aynı etkenin MİK değerleri ile kıyaslanabilmektedir. Böylece duyarlılık kategorisi tahmin edilebilmektedir. Tüm disk difüzyon yöntemlerindeki temel prensip, bir diske emdirilen ilacın, diskten agarın içine doğru yayılması esasına dayanır. Diskler standart 6 mm çapındadır. Bu disklerde test edilen ilacın belirli bir miktarı emdirilmiş olarak bulunmaktadır. Antimikrobiyal ajan emdirilmiş disk nemli agar yüzeyi ile temas ettiği anda su filtre kağıdına emilir ve antimikrobiyal ajan agara hızla yayılır. Agara daha önce bir bakteri süspansiyonu inoküle edildiyse antimikrobiyalın agara yayılmaya başlamasıyla eş zamanlı olarak bakteriler de agarda üremeye başlayacaktır. Kritik bir bakteri hücre kütesine ulaşıldığında, antimikrobiyal ajanın inhibitör aktivitesinin üstesinden gelinir ve bakteri üremesi meydana gelir. Eğer şartlara riayet edilerek yapılırsa, kritik hücre kitlesine ulaşılan noktalar, bakteri üremesinin sınırlandığı keskin sınırlı bir çember oluşturacaktır. Büyüyen ve inhibe edilen bakterilerin bu arayüzündeki diffüz antimikrobiyal ajan konsantrasyonu, kritik konsantrasyon olarak bilinir ve seyreltme testlerinde elde edilen MİK'e yaklaşır.

2.4.2. Gradient difüzyon test yöntemi [epsilometer test (Etest)]

Agar yüzeyine yerleştirilmiş antimikrobiyal madde emdirilmiş şeritler mevcuttur. Disk difüzyon testi ile aynı prensipler Etest yönteminde de geçerlidir. Ancak bu yöntemde MİK değerleri, bir şerit boyunca düzenli olarak azalan (gradient) konsantrasyonları uygulanarak elde edilir. Şerit üzerinde, artan sayıda küçük noktalar içeren sıralı alanlara 15 farklı antibiyotik konsantrasyonunun uygulanması prensibine dayanır. Şerit inokülasyon ortamına yerleştirildiğinde, yüksek antibiyotik konsantrasyonunun olduğu uçtan düşük konsantrasyonun olduğu uca doğru antibiyotiğin besiyerine difüze olmasına yol açar.

2.4.3. Agar dilüsyon yöntemi

Bu yöntem, katı besiyeri kullanılarak yapılan testlerde referans yöntemidir. Standart bulanıklıktaki bir bakteri süspansiyonu, her birinde antimikrobiyal

maddenin terapötik aralıktaki farklı bir konsantrasyonunun bulunduğu agar plaklarına inoküle edilir. Ekim yapılan agar dilüsyon plakları 35°C’de 18 saat inkübe edilir. Agar dilüsyon plaklarının herhangi birindeki antibiyotik konsantrasyonuna duyarlı mikroorganizmalar, ekim bölgesinde üremez. Dirençli olanlar ise koloni şeklinde üreme gösterir. Organizmanın üremediği konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenir.

2.4.4. Sıvı makrodilüsyon yöntemi

Antimikrobiyaller için uygulanan ilk duyarlılık testlerinden biri olmasına rağmen günümüzde de referans yöntemlerden biri olarak kabul görmektedir. Öncelikle hazırlanmış olan standart miktarlardaki sıvı besiyerlerine antimikrobiyalin seri dilüsyonları eklenir. Daha sonra standart miktarlarda belirlenen izolat süspansiyonları eklenir. Sıklıkla besiyeri olarak 10 adet tüpe 1-2 ml hacimlerde olacak şekilde katyon ayarlı Mueller-Hinton sıvı besiyeri (KAMHB) kullanılır. İşlemler bittikten sonra 35°C’de 18 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda tüpler bulanıklık açısından değerlendirilir. Bulanıklık varlığı, tüpte bulunan antimikrobiyal konsantrasyonunun bakteri üremesini inhibe etmediğini gösterir. MİK; gözle görülür üremenin engellendiği (bulanıklık olmayan tüpler) serinin ilk tüpündeki antimikrobiyal konsantrasyonudur.

2.4.5. Sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemi

Makrodilüsyon yöntemi ile prensip olarak aynıdır. Farklı olarak, mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı duyarlılıkları ayrı ayrı tüplerde değil, plastik bir kapta bir seri kuyucukta saptanmaktadır. Çok sayıda mikroorganizmanın basit ve ucuz olarak antibiyotik duyarlılıkları çalışılabilmektedir. Bu yöntem European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ve Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından MİK tayininde kullanılan uluslararası referans bir yöntemdir. Her plak, duyarlılık testi paneline dahil edilecek antimikrobiyal ajanların sayısına ve konsantrasyonuna bağlı olarak 80, 96 veya daha fazla mikro kuyucuk içerebilmektedir.

2.4.6. Otomatize sistemler

Yaygın olarak kullanılan bu sistemlerin manuel yöntemlere göre bazı avantajları mevcuttur. Bunlar arasında; daha hızlı sonuç verme, çok sayıda izolatin duyarlılık testlerinin aynı anda çalışılabilmesi, daha az iş gücü gerektirmesi ve

sonuçların yüksek oranda tekrarlanabilir olması sayılabilir. Ayrıca uzman bilgisayar sistemlerinin geliştirilmesiyle, sonuçlar sistemde oluşturulan uzman kurallarını uygulamak şartıyla, cihaz üzerinde yorumlanabilmesine ve gerektiğinde duyarlılık verilerinin geri getirilip incelenebilmesine olanak vermektedir (68).

2.5. Antibiyotik Kombinasyon Testleri

Antibiyotiklerin geliştirilmesi uzun süreler almaktadır. Ayrıca bakterilerin antibiyotiklere karşı hızla geliştirmeye devam ettiği direnç de hali hazırda kullanımda olan antibiyotiklerin etkisinin devamlılığının sağlanmasının önemini göstermektedir. Bunun sonucu olarak da bakterilerin oluşturduğu dirençle başa çıkabilmek için antibiyotiklerin kombine şekilde tedavide kullanılması zorunluluğu ortaya çıkmıştır.

Kombine antibiyotik tedavisi uygulandığında kombinasyonda bulunan antibiyotikler arasında sinerji, additif etki, indiferan etki ve antagonizma olmak üzere 4 farklı etkileşim olabilmektedir.

1-Sinerjist etki: Bu etkide test edilen antibiyotiklerin birlikte oluşturduğu etki, her bir antibiyotiğin tek başına kullanılması ile oluşan etkisinden önemli oranda yüksektir. Yani sinerjist etkide pozitif etkileşim görülmektedir.

Kombine antibiyotik kullanımında sinerjistik etki; antibiyotiklerin bakterilerde farklı hedefleri farklı yollardan veya aynı yoldan inhibe etmesi şeklinde olabildiği gibi, aynı hedefi farklı yollardan inhibe etmesi şeklinde de olabilmektedir. Sinerjistik etki ile, toksik etkileri düşürme, direnç gelişimini önleme, daha geniş spektrumlu antimikrobiyal etki sağlanabilmekte ve polimikrobiyal enfeksiyonların tedavisi başarı ile tedavi edilebilmektedir.

2-Antagonist etki: Antagonist etkide test edilen antibiyotiklerin birlikte oluşturduğu etki, her bir ilacın tek başına kullanılması sonucu oluşan etkiden önemli oranda düşüktür. Antagonist etkide negatif etkileşim vardır.

3-Additif etki (kısmi sinerji): Additif etkide test edilen antibiyotiklerin birlikte oluşturduğu etki antibiyotiklerin ayrı ayrı kullanılması ile elde edilen etkilerinin toplamı kadardır.

4-İndiferan etki: İlaçların kombinasyon halindeki etkisi, kombinasyona girip etkisi yüksek olan antibiyotiğin etkisi kadardır. Bu etkide antibiyotikler arası etkileşim yoktur (69-71).

Sinerji Saptama Yöntemleri

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

1- Dilüsyon yöntemleri

a-Mikrodilüsyon

b-Makrodilüsyon

c-Agar dilüsyon

2- Zamana bağlı öldürme yöntemi (Time-kill)

3- Disk diffüzyon yöntemi

4- Etest (Epsilometer) yöntemi

Genel olarak dilüsyon yöntemleri ile antibiyotik kombinasyonlarının inhibisyon etkisi; zamana bağlı öldürme yönteminde ise bakterisidal etki araştırılır (69,70).

2.5.1.1. Dilüsyon yöntemleri [Checkerboard-dama tahtası (CB)]

2.5.1.1.1. Mikrodilüsyon CB

Araştırmacılar tarafından en sık kullanılan sinerji saptama yöntemidir. Bu yöntemin çalışması ve sonuçları yorumlaması kolaydır (70,72).

Her suş ve test edilecek antibiyotik kombinasyonu için bir tane olmak üzere 96 kuyucuklu ve U-tabanlı steril mikropalak gereklidir. Öncelikle antibiyotik kombinasyon testi için kombinasyona girecek antibiyotiklerin ayrı ayrı stok solüsyonları farklı mikropalalarda hazırlanır. İlk antibiyotik solüsyonu yukarıdan aşağı, diğeri ise soldan sağa doğru seri olarak dilüe edilir. Daha sonra ikinci antibiyotik bulunduğu mikropalaktan, birinci antibiyotik solüsyonunu bulunduran mikropalağa aktarılır. Yine mikropalağın ayrı bir bölgesinde, antibiyotikler için MİK değerlerini saptamak üzere 2 ayrı sütun kullanılır. Kombinasyonda kullanılacak her bir antibiyotik için belirlenmiş olan veya beklenen MİK değerinin en az 3-4 dilüsyon altından, en az 2 (tercihen 8) dilüsyon üstü kullanılır. Test için, uygun besiyerine subkültürü yapılan izolatların taze (bir gecelik) kültürü kullanılır. İzolatları inoküle etmek için KAMHB (Mg+2: 10-12,5 mg/L, Ca+2: 20-25 mg/L destekli Mueller-Hinton Buyyon) veya steril %0.5 tuzlu su kullanılır (70).

Inokulum hazırlama

Öncelikle 0.5 McFarland bulanıklığında ($1,5 \times 10^8$ Colony Forming Unit (CFU)/ml) bakteri süspansiyonu hazırlanır. Mikrodilüsyon testlerinde son aşama olarak her bir kuyucuğa standart miktarda bakteri inoküle edildiğinde, bakterinin son konsantrasyonu ortalama 5×10^5 CFU/ml olmalıdır. Doğru bakteri konsantrasyonunun ayarlanabilmesi için kuyucuklara konan inokülumun net hacmi bilinmelidir. Eğer bir kuyucukta 0,1 ml besiyeri ve inoküle edilecek bakteri süspansiyonu miktarı 0,01 ml ise; 0.5 McFarland süspansiyonu (yaklaşık 1×10^8 CFU/ml) 1:20 sulandırılarak 5×10^6 CFU/ml elde edilmelidir. Bu süspansiyondan 0,01 ml alınıp mikropalak kuyucuğuna eklenirse, test edilen bakterinin son konsantrasyonu ortalama 5×10^5 CFU/mL olacaktır (73).

Her mikropakta bir kuyucuk üreme kontrolü için antibiyotiksiz bırakılır. İnkübasyon süresinin sonunda sonuçlar okunurken, bu kuyucukta yoğun bakteri üremesinin görülmesi gerekmektedir. Her mikropakta başka bir kuyucuğa ise sadece besiyeri (antibiyotik koyulmaz) koyulur. Bu kuyucuk besiyerinin steril olup olmadığını kontrol etmek için kullanılır. İnkübasyon süresi sonunda bu kuyucukta üreme olmaması beklenir.

Çalışmanın kalite kontrolü çalışmaya uygun American Type Culture Collection (ATCC) suşlarıyla yapılır. Kalite kontrol için de çalışma izolatlarına uygulanan antibiyotik stok solüsyon ve sulandırımları uygulanır.

İnokülum saflık kontrolü için kullanılan bakteri süspansiyonunun (5×10^6 CFU/mL) 1:100 dilüe edilmiş halinden 1 µl alınarak kanlı agara ekilir. 1 günlük inkübasyon süresi sonunda kanlı agarda üreyen kolonilerin saf olup olmadığı araştırılır (70).

İnokülum yoğunluğunun kontrolü için üreme kontrol kuyucuğundan alınan 10 µl süspansiyon 1:10 dilüsyon oranında serum fizyolojik ile bir tüp içerisinde dilüe edilir. Bu tüpten 1:10 dilüsyon daha yapılarak toplamda 1:100 dilüsyon elde edilmiş olur. Bu dilüsyonun (1:100) bulunduğu tüpten 1:5 dilüsyon yapılarak 1:500 dilüsyona ulaşılır. Bu son dilüsyondan 100 µL alınır ve kanlı agara subkültür yapılır. 16-20 saat $35-37^\circ\text{C}$ 'de inkübasyon sonunda plakta ortalama 100 koloni (75-125) bulunmalıdır. Antibiyotik kombinasyon paneli tamamlandıktan sonra mikropalak 16-20 saat süreyle $35-37^\circ\text{C}$ etüvde inkübasyona bırakılır.

Kalite kontrol suşlarının MİK değerleri standart MİK değerleriyle uyumluysa, inokulum saflık kontrolü, üreme kontrolü, besiyeri sterilite kontrolü ve inokulum yoğunluk sonuçları beklendiği gibi ise test geçerli kabul edilir ve mikrop plak okunur. Öncelikle antibiyotiklerin tek başlarına MİK değerleri okunarak belirlenir. Ardından kombinasyon kuyucukları okunur. Üreme olan kuyucuklar kayıt altına alınır. Kombinasyon çalışmasının sonuçlarını yorumlayabilmek için ilk olarak her iki antibiyotiğin ayrı ayrı fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu (FİK) değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmalıdır (70).

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

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

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

$FİKİ \leq 0,5$ ise sinerjistik; $> 0,5 - \leq 1$ ise additif; $> 1 - < 4$ ise indiferan; ≥ 4 ise antagonistik etki olarak yorumlanır (69,74,75).

2.5.1.1.2. Makrodilüsyon Yöntemi

Bu yöntemin; çalışmanın mikrop plak yerine deney tüplerinde yapılması dışında mikrodilüsyondan yöntem olarak bir farkı bulunmamaktadır. Her tüpte bulunması gereken miktar 1ml'dir (0,25 ml birinci antibiyotik, 0,25 ml ikinci antibiyotik solüsyonundan ve 0,5 ml de bakteri süspansiyonundan olmak üzere). Bununla birlikte makrodilüsyon yönteminde büyük hacimlerle çalışıldığı için mikrodilüsyonda kullanılan panelin tamamını bu yöntemle yürütmek çok zordur. Sıklıkla kısıtlı panel hazırlanır. 1:2 MİK, MİK ve 2xMİK değerleriyle çalışılır. Antibiyotik stok solüsyonları her tüpte istenen son konsantrasyonun 4 katı olmalıdır. Değerlendirmeler mikrodilüsyon metodundaki gibidir (70).

2.5.1.1.3. Agar Dilüsyon Yöntemi

Kombinasyonda az sayıda antibiyotik ve çok sayıda izolat kullanılacaksa bu yöntem tercih edilebilir. Klasik agar dilüsyon yöntemindeki adımlar takip edilir. Stok antibiyotik solüsyonları istenen son konsantrasyonun 20 katı yoğunlukta hazırlanmalıdır (petride bulunan 20 ml besiyeri ile dilüe edileceği için). Besiyerine

eklenen her bir antibiyotik solüsyonu miktarı petrideki agar miktarının %5'ini geçmemelidir. Agar yüzeyine 10^4 CFU bakteri içerecek şekilde inokülasyon yapılır. Değerlendirmeler mikrodilüsyon yönteminde olduğu gibi yapılır (69,70).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Çalışmaya alınan örnekler

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 20.03.2021-31.12.2021 tarihleri arasında yoğun bakım ve kliniklerden gönderilen çeşitli hasta numunelerinden enfeksiyon etkeni olarak izole edilen toplam 71 adet *Klebsiella pneumoniae* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya sadece yoğun bakım ve kliniklerde tedavi gören hastalarda enfeksiyon oluşturan izolatlar dahil edilmiştir. Aynı klinikte aynı zamanda tedavi gören hastalardan sadece bir tanesi çalışmaya dahil edilirken, aynı hastanın tekrar numunelerinde üreyen etkenler çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.1.2. Kullanılan besiyerleri ve malzemeler

- 1) %5 KKA (RTA™ lab. İstanbul Turkey)
- 2) KAMHB (Becton Dickinson, ABD)
- 3) Fosfomisin disodyum salt hidrat (Sigma-Aldrich, ABD)
- 4) Amikasin (Sigma-Aldrich, ABD)
- 5) Meropenem (Sigma-Aldrich, ABD)
- 6) İmipenem (Sigma-Aldrich, ABD)
- 7) d-Glikoz 6-fosfat disodyum salt hidrat (Sigma-Aldrich, ABD)
- 8) %0,9 steril serum fizyolojik
- 9) Steril distile su
- 10) %20 gliserollü Tryptic Soy Broth

3.1.3. Kullanılan cihazlar ve aletler

- 1) Etüv
- 2) Otoklav
- 3) Buzdolabı (-20 °C)
- 4) Hassas terazi
- 5) Vortex
- 6) McFarland Cihazı (BD)
- 7) Mezür (250 ml, 500 ml)
- 8) Balon joje (250 ml, 1000 ml, 2000 ml 6000 ml)
- 9) Steril Petri kutuları (90 mm)

- 10) Steril tüp
- 11) Steril cam pipet (5ml, 10ml, 25 ml)
- 12) Steril eküvyon
- 13) Steril plastik öze (10 µl)
- 14) Ayarlanabilir otomatik pipet (1-10µl)
- 15) Ayarlanabilir otomatik pipet (100-1000µl)
- 16) Steril folkon tüpü (50 ml)
- 17) Beg
- 18) Steril enjektör (10ml, 50ml)
- 19) Maldi-TOF MS (bioMerieux, Fransa)
- 20) BD Phonex (Becton Dickinson Diagnostics, Baltimore MD)
- 21) Benmari
- 22) Steril Eppendorf tüpleri (2 ml)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Bakteri izolatlarının toplanması

Çalışmaya Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden [kan, yara, endotrakeal aspirat (ETA), bronkoalveolar lavaj (BAL)], plevra, doku, dren, aspirat, BOS) izole edilmiş MALDI-TOF MS (bioMerieux, Fransa) ile tanımlanmış ve otomatize SMD sistemi BD Phonex (Becton Dickinson Diagnostics, Baltimore MD) ile antibiyotik duyarlılık testleri yapılmış toplam 71 adet Karbapenem dirençli *K.pneumoniae* suşu dahil edilmiştir. Karbapenem direnci ayrıca; ertapenem, meropenem ve imipenemin disk difüzyon yöntemi ile doğrulandı. Agar dilüsyon testinin tüm izolatlar için aynı şartlar altında yapılması amacıyla saf kültür olarak elde edilen izolatlar daha sonra kullanılmak üzere %20 gliserollü Tryptic Soy Broth besiyerine alınarak -20°C 'de stoklanmıştır.

3.2.2. Klinik örneklerin kültür işlemleri

Periferik kan örnekleri Bactec Plus aerobic/F veya BD Bactec Peds Plus/F şişelerine inoküle edilerek BACTEC FX (Becton Dickinson, A.B.D) sisteminde inkübasyona bırakılmıştır. Üreme sinyali veren şişelerden katı besiyerlerine (%5 KKA, EMB) subkültürler yapılmıştır. Alt solunum yolu örnekleri olan ETA ve BAL örnekleri kantitatif yöntemle; diğer tüm örnekler seyreltme yöntemiyle besiyerlerine ekilmiştir.

Trakeal aspirat örneklerinden ilk olarak Gram boyama preparatı hazırlanmıştır. Bartlett ve Murray-Washington skorlama sistemi kullanılarak Bartlett skoru 0'dan ve/veya Murray skoru 3'den büyük olan örnekler değerli kabul edilip kültür değerlendirmesine alınmıştır (76).

Yara kültürü örneklerinden yapılan Gram boyama preparatını değerlendirmede Q skorlama sistemi kullanılmıştır. Q skoru sıfırdan büyük olan örnekler değerli kabul edilip değerlendirmeye alınmıştır (77).

3.2.3. Bakteri izolatlarının tanımlanması

Kültürde üreyip enfeksiyon etkeni olduğu düşünülen izolatlar, Maldi Biotyper 3 (Bruker Daltonics, ABD) sistemi kullanılarak kütle spektrometre (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight-Mass Spectrometry: MALDI-TOF-MS) yöntemi ile tanımlanmıştır.

Taze kültürde saf olarak üreyen kolonilerden, ön ekstraksiyon işlemi uygulanmadan temiz bir kürdan ile bir miktar alınıp paslanmaz çelik plağın üzerindeki küçük dairesel haznelere sürülerek kuruması için beklendi. Dairesel haznelere sürülmüş kolonilerin üzerine sırası ile 1 µl formik asit, 1 µl siyano 4-hidroksisinnaminik asit (HCCA)'ten oluşan matrix çözeltisi eklendi. İşlemler arasında örnekler oda ısısında kurumaya bırakıldı. Kullanılan matriks çözeltisi, lazer ışınlarının çelik plak üzerinde bulunan suşlara iletilmesini sağlar. Böylece suştaki moleküllerin düzgün bir şekilde iyonizasyonunu sağlayan bir ortam oluşturur. Ayrıca matrix; lazer ışınlarının çoğunu absorbe ederek ısı enerjisine çevirmektedir. Isı ise örneğin dış kısmının buharlaşmasını sağlamaktadır. Lazer ışınlarının iyonize ettiği moleküller kütle-yük (m/z) oranlarına göre hız kazanmaya başlar. Bu hız ile cihaz içinde bulunan silindirik alanda hareket ederler. Böylece cihazdaki dedektöre ulaşırlar. Çalışmamızda Microflex LT (Bruker Daltonics, Almanya) sistemi kullanılmıştır. Bu sistem ile pozitif lineer mod, 2-20 kDa kütle aralığında iyonlar oluşturulmuştur. Moleküllerin dedektöre çarpması sonucu iyonların ölçümüyle spektrumlar oluşur. Bu spektrumlar MALDI Biotyper 3.1 yazılımı (Bruker Daltonics, Almanya) kullanılarak, veri tabanında bulunan spektrum görüntüleriyle karşılaştırılır. Üretici firmanın talimatı doğrultusunda tanımlama sisteminin kalibrasyonu için her çalışma öncesinde Bakteriyel Test Standardı kullanılmıştır.

MALDI-TOF MS sisteminde, mevcut veri tabanındaki spektrumlarla benzerlik oranına göre mikroorganizmaları tanımlama skorları elde edilir. Tanımlamanın güvenilirliği ile tanımlama skorunun yüksekliği doğru orantılıdır. Skor ≥ 2 ise tanımlama cins ve tür düzeyinde; 1,7-2 arasında ise cins düzeyinde güvenilir bir tanımlama olduğunu gösterir (78,79).

Güvenilir olmayan sonuçlarda; kültürün taze olup olmaması, örneklerin saf alınıp alınmadığı, cihazın kalibre edilme durumları ve periyodik bakımlarının yapılıp yapılmadığının kontrol edilmesi önerilmektedir (80). Çalışmamızda izole edilen bakteri suşları kütle spektrometre ile tür düzeyinde güvenilir skorlarla tanımlanmıştır.

3.2.4. Antimikrobiyal duyarlılık testi

Çalışmaya dahil edilen izolatların ADT'leri, Phoenix NMİC-400/ID paneli kullanılarak BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, A.B.D) otomatize sistemi ile çalışıldı. Kültürde saf üreyen *K. pneumoniae* suşlarından 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyon otomatize sistemin ilgili panellerine aktarıldı. Yaklaşık 16-18 saat sonra çıkan ADT sonuçları EUCAST v.11.0 kriterleri ve uzman kurallarına göre değerlendirildi (81).

Otomatize sistemin karbapenem duyarlılığı için verdiği duyarlılık sonuçları kayıt altına alındı. Otomatize sistemde Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* olarak sonuçlanan suşların karbapenem direnci disk difüzyon yöntemi ile doğrulandı.

Taze kültürde bulunan saf bakteri kolonilerinden birkaç tanesi steril pamuklu eküvyon çubuğu ile alındı. Steril tuzlu su (%0,85 NaCl) içinde 0,5 McFarland standart bakteri yoğunluğu oluşturacak şekilde süspansiyon haline getirildi. Süspansiyon hazırlandıktan sonra 15 dakika içinde inokülasyon yapıldı. Steril pamuklu eküvyon çubuğu, inokulum süspansiyonu içine daldırıldı ve çubuğun pamuklu kısmı tüpün duvarlarına bastırılarak pamuktaki fazla sıvı atıldı. Pamuktaki inokulum Mueller-Hinton agar (MHA) yüzeyinin her tarafına eşit olacak şekilde üç yönde yayıldı. Ertapenem, meropenem ve imipenem diskleri inokülasyon bitiminden sonra 15 dakika içinde agar yüzeyine yerleştirildi. Bakteri süspansiyonu inoküle edilen ve antibiyotik diskleri yerleştirilen plaklar 15 dakika içinde ters çevrilip normal atmosfer koşullarında $35\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 16-20 saat etüvde inkübe edildi. Zon

çapları otomatik zon ölçer ile ölçüldü. Zon çapları EUCAST referans sınır değer tablolarına göre değerlendirildi (Tablo1) (81,82).

Tablo 1. *K. pneumoniae* için DDT’de karbapenemlerin zon çapı kesme noktaları.

Karbapenemler	Disk içeriği (µg)	Zon çapı kesme noktaları (mm)	
Ertapenem	10	25	25
İmipenem	10	22	19
Meropenem*	10	22	16
Meropenem**	10	22	22

*Menenjit dışı enfeksiyonlarda **Menenjit enfeksiyonlarında

3.2.4.1. Agar Dilüsyon Yöntemiyle ADT

Antibiyotik stok ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması

EUCAST *Enterobacterales* ailesi üyeleri için fosfomisin duyarlılığının saptanmasında referans yöntem olarak agar dilusyonu önermektedir (81).

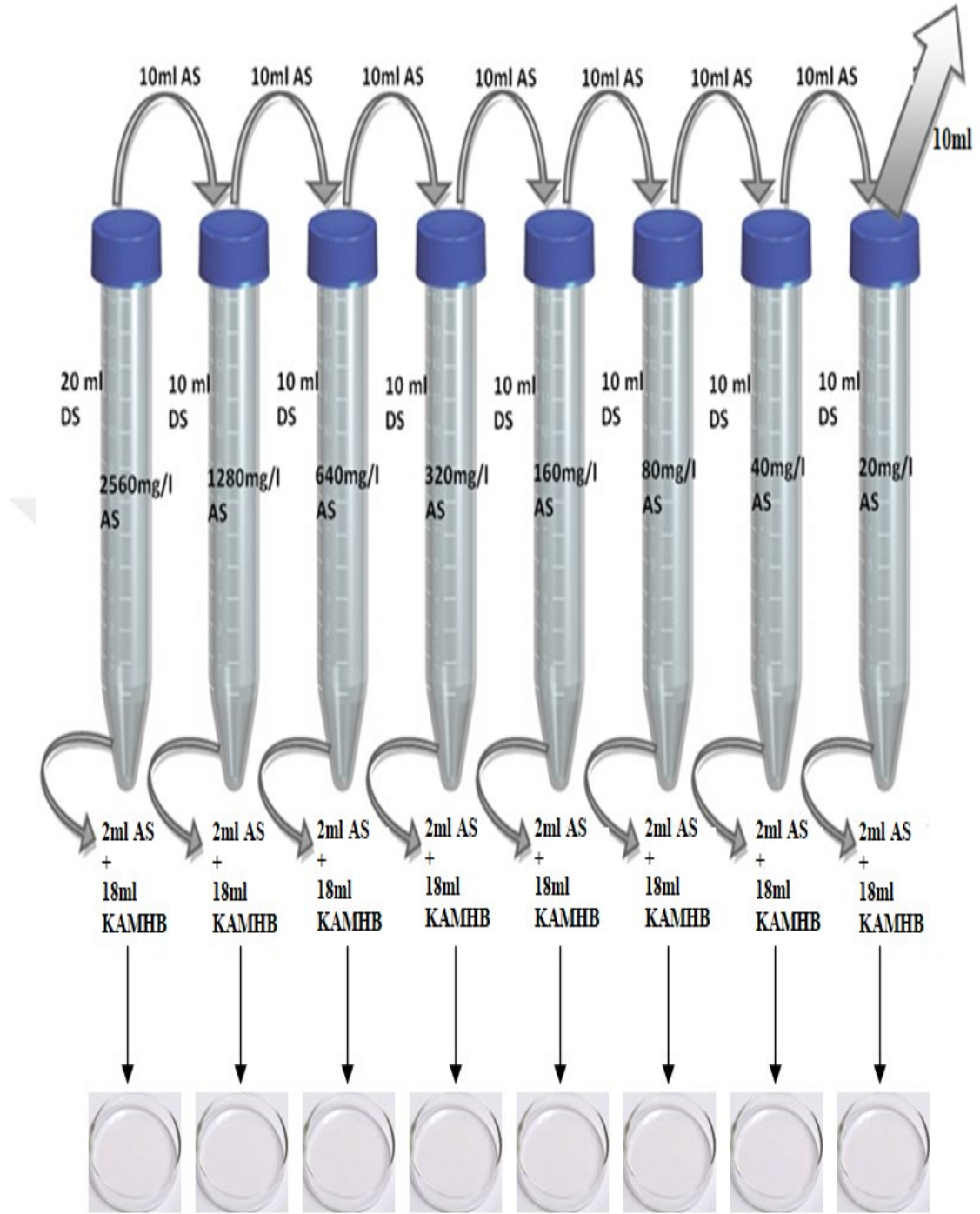
Agar dilüsyon testinde kullanılmak üzere toz halindeki fosfomisin disodyum salt hidrat (Sigma-Aldrich, ABD) antibiyotiğini dilüe etmek için steril distile su kullanılmıştır. Fosfomisin disodyum için EUCAST, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 11.0’da *Enterobacterales* ailesi üyeleri için MİK sınır değerini; S (duyarlı): ≤ 32 mg/l, R (dirençli): >32 mg/l olarak belirlemiştir. Amikasin için S: ≤ 8 mg/l, R: >8 mg/l, imipenem için; S (duyarlı): ≤ 2 mg/l, R (dirençli): >4 mg/lve meropenem için (menenjit dışındaki enfeksiyonlarda) S: ≤ 2 mg/l, R: >8 mg/l, meropenem (menenjitte); S: ≤ 2 mg/l, R: >2 mg/l olarak belirlemiştir (Tablo 8). Antibiyotiklerin konsantrasyonları, duyarlı MİK aralığının 4 kat alt, 3 kat üst konsantrasyonları test edilecek şekilde hazırlandı. Buna bağlı olarak çalışmanın fosfomisin için 2 mg/l-256 mg/l, amikasin için 0,5 mg/l-64 mg/l, meropenm ve imipenem için 0,125 mg/l-16 mg/l dilüsyon aralığında yapılması planlanmıştır.

Öncelikle aşağıda yer alan hacim/ağırlık/potens formülüne göre 256 mg/l son konsantrasyonda bakteri süspansiyonu elde etmek için steril şartlarda 51,2 mg fosfomisin disodyum tartıldı ve 20 ml steril distile suda çözündürülerek fosfomisin disodyum stok solüsyonu (2560 mg/l konsantrasyonda fosfomisin disodyum) hazırlanmıştır. Antibiyotik solüsyonu; MHA ile 1/9 oranında karıştırıldığında son konsantrasyonun 256 mg/l olması sağlanmış oldu.

Sulandırım için içinde 10 ml steril distile su bulunan falkon tüpüne 10 ml kullanım solüsyonundan aktararak seri dilüsyonları sağlandı. Son konsantrasyon olan 2 mg/l'ye ulaşana kadar toplamda 7 defa seri dilüsyon yapıldı (Şekil2).

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

Amikasin, meropenem ve imipenem için yukarıdaki başlangıç stok solüsyonu hazırlama yönteminin aynısı kullanıldı. Amikasin dilüsyon aralığı 0,5 mg/l-64 mg/l; meropenem ve imipenem için dilüsyon aralığı 0,125 mg/l-16 mg/l olarak hesaplandı. Başlangıç için 12,8 mg amikasin tartıldı, meropenem için 3,2 mg ve imipenem için 3,2 mg antibiyotik tartıldı. Her bir antibiyotik için 7'şer defa seri sulandırım yapıldı. Böylece her antibiyotik için 8 farklı konsantrasyonda antibiyotik süspansiyonu elde edildi.



Şekil 2. Fosfomisin antibiyotik solusyonunun seri sulandırımı.

Besiyerlerinin hazırlanması

Besiyeri olarak KAMHB (Becton Dickinson, USA) kullanıldı. MHA firma önerileri doğrultusunda hazırlanıp 1 atm basınçta 121 °C’de 15–20 dakika otoklavda (Hirayama, Japonya) steril edildi. Ardından soğutulmuş ve 45-50°C sabit sıcaklığa ayarlanmış su banyosunda agar plakları dökülene kadar bekletilmiştir.

G6P'nin besiyerine eklenmesi

Gliserol-3-fosfat taşıyıcı (GlpT) ve glikoz-6-fosfat taşıyıcı (UhpT) permeazlar fosfomisin moleküllerinin bakteri hücresinin içine taşınmasında görevlidir. GlpT, başlangıçtaki aktivitesini herhangi bir uyarıya gerek duymadan gerçekleştirir; ancak ortamda G6P yoksa UhpT aktive olamaz. Bu nedenle fosfomisinin bakteri hücresine girişini artırıp, enfeksiyon bölgesindeki fizyolojik şartlara yakın bir ortam sağlanması için agar dilüsyon ve SMD yöntemlerinde ortama G6P eklenmesi gerekmektedir. G6P ilavesi ile MİK değeri düşer, böylece teorik değere yakın bir sonuç elde edilmiş olur (yalancı dirençler ekarte edilmiş olur). Gram-negatif ve Gram-pozitif etkenlerin fosfomisine direnç durumu araştırılırken, SMD, agar dilüsyon, Etest ve disk difüzyonu teknikleri kullanılabilir. EUCAST; agar dilüsyon yönteminde kullanılan MHA ve SMD'de kullanılan sıvı besiyerine 25 mg/l G6P ilave edilmesini önermektedir (45,51,81).

1 litre besiyeri için 25 mg G6P tartıldı. Hazırlanan ve 45-55°C'ye soğutulmuş olan 1 litre besiyerinden 20 ml miktarda alınıp içerisinde 25 mg G6P çözdürüldü. G6P içeren 20 ml'lik MHA, 0,45 UM gözeneklere sahip besiyeri filtresinden (Alkim, Türkiye) geçirilerek steril edildi. Steril edilen karışım kalan besiyerine tekrar eklendi. Böylece 25 µg/ml (25 mg/L) konsantrasyonda G6P elde edilmiş oldu (83).

Petrilerin hazırlanması

Yapılacak dilüsyon sayısı kadar [örneğin fosfomisin için 2 mg/l-256 mg/l (8 dilüsyon)] petri plağı alındı. Petrilerin üzerine antibiyotik konsantrasyonları not edildi. 4 farklı antibiyotiğin 3 farklı kombinasyonunda ve kombinasyona giren antibiyotiklerin tek başlarına MİK'lerinin belirlenmesi için çok sayıda petri kullanılacağı için her bir petri üzerine izolatların inokülasyonların yapılacağı numaralı çizimler yapmak zor ve zaman alıcı olacaktı. Bu nedenle numaralı inokulum karelerinin mermer tezgah üzerine standart olarak çizilmesine karar verildi. Standart olarak her biri 1cm² alandan oluşan toplam 55 adet kare çizildi. Her karenin içine suşa karşılık gelecek sayılar yazıldı. Petrilerin üzerine de bu standart çizime tam yerleşecek şekilde işaretlemeler yapıldı (Şekil3,4). Böylece inokülasyon, sonuçların okunması ve takibi standart hale getirildi ve kolaylaştırıldı.

Kullanılan 90 mm'lik plaklardaki besiyeri-antibiyotik solüsyonu karışımı toplam miktarı, 20 ml olarak belirlendi. Ticari firmanın önerileri doğrultusunda

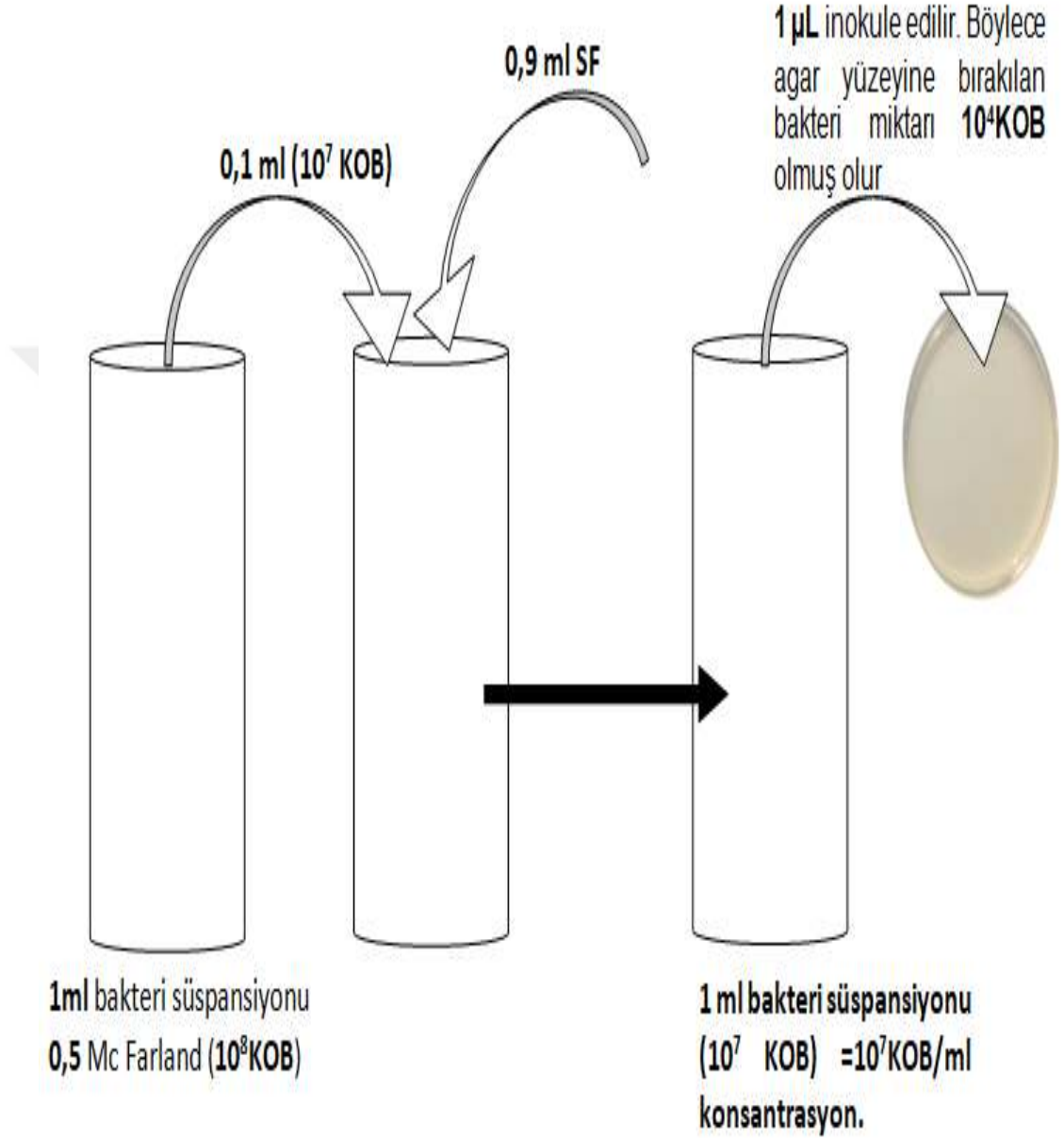
hazırlanarak steril edilen KAMHAB besiyeri su banyosunda 45-50 °C'ye soğutularak, hazırlanan her bir tüpteki stok antibiyotik solusyonundan 1 kısım (2 ml)+9 kısım MHA (18 ml) ile petri plaklarının içerisinde iyice karıştırıldı (antibiyotik 1/10 dilüe edildi). Böylece petrilere uygun (fosfomisin için 2 mg/l-256 mg/l, amikasin için 0,5 mg/l-64 mg/l ve meropenem-imipenem için 0,125 mg/l-16 mg/l) son antibiyotik konsantrasyonları elde edildi. Aynı besiyerinden hazırlanmış, antibiyotik içermeyen plaklar üreme kontrolü için kullanılmıştır. Besiyeri ve antibiyotik solusyonu karışımları oda ısısında katılaşmaya bırakıldı.

Besiyerlerine inokülasyon ve izolatların hazırlanması

Saklamaya alınmış suşlar oda ısısına getirilerek %5 KKA'ya inoküle edildi. Taze kültürden bir miktar koloni alınarak doğrudan koloni süspansiyon yöntemi ile steril serum fizyolojik içerisinde densitometre (bioMerieux, Fransa) optik okuyucu kullanılarak otomatik olarak 0,5 McFarland bulanıklık oluşturuldu. Agar dilüsyon, EUCAST tanımlayıcı döküman 3.1 kılavuz önerileri doğrultusunda yapılmıştır (84).

Agar dilüsyon prosedürüne göre petri yüzeyindeki son bakteri sayısının 10^4 KOB olması gerekmektedir. Bunun için öncelikle 0,5 McFarland (0.5 McFarland standardına ayarlanmış kültürler birçok suş için yaklaşık $1-2 \times 10^8$ CFU/ml bakteri içerir) bulanıklıkta bakteri süspansiyonu hazırlandı. Ardından serum fizyolojik ile 1/10 oranında dilüe edildi. Böylece 10^7 KOB/ml konsantrasyonda bakteri süspansiyonu elde edildi. Bu dilüe edilmiş bakteri süspansiyonundan önce üreme kontrol plağına (antibiyotik içermeyen) 1 µl miktarda inokülasyon yapıldı. Ardından en düşük konsantrasyondan başlamak üzere farklı antibiyotik konsantrasyonları içeren plaklara pipet yardımıyla her inokülden 2 µl miktarda suşa ait işaretlenen alan hizasında agar yüzeyine bırakıldı (Şekil3). Böylece 5-8 mm çapında alanların içerisine her bir suş için 10^4 KOB miktarda bakteri inoküle edilmiş oldu. Bir suş için besiyerine yapılan son inokülüm; süspansiyon hazırlandıktan sonra 15 dakika içinde gerçekleştirilmiştir. İnokülasyon işlemine öncelikle üreme kontrol plağından (antibiyotik içermeyen) başlandı. Ardından düşük antibiyotik konsantrasyonu içeren plaktan daha yüksek antibiyotik konsantrasyon içeren petrilere doğru yapılmıştır. Son olarak da kontaminasyon olmadığından veya önemli bir miktar antibiyotiğin taşınıp taşınmadığından emin olmak için, ikinci bir üreme kontrol plağı inoküle edilmiştir. İnoküle edilen plaklar oda sıcaklığında inokülüm noktalarının agara

absorbe olmalarına kadar bekletildi (30 dakikadan fazla olmamak koşuluyla noktalar kuruyana kadar beklendi). Plaklar ters döndürölüp ve $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 16-20 saat inkübe edildi.



Şekil 3. Bakteri süspansiyonunun hazırlanıp besiyerine inoküle edilmesi.

Kombinasyon çalışma prosedürü:

Bu çalışmada fosfomisin (Sigma-Aldrich, ABD), amikasin (Sigma-Aldrich, ABD), meropenem (Sigma-Aldrich, ABD), imipnem (Sigma-Aldrich, ABD) antibiyotiklerinin ve Glukoz-6-Fosfatın (Sigma-Aldrich, ABD) toz formları kullanılmıştır.

Bu amaçla “Ağırlık (mg) = Hacim (mL) x Konsantrasyon (mg/L)/Potens (µg/mg)” formülü uyarınca antibiyotik tozları tartılarak, uygun konsantrasyonlarda antibiyotik solüsyonları hazırlandı. Antibiyotiklerin konsantrasyonları, duyarlı MİK aralığının 4 kat alt, 3 kat üst konsantrasyonları test edilecek şekilde hazırlandı. Hazırlanan antibiyotik çözeltileri, vakit kaybetmeden kullanıldı.

Kombinasyon çalışmasında fosfomisin için 2 mg/l-256 mg/l, amikasin için 0,5 mg/l-64 mg/l, imipenem ve meropenem için 0,125 mg/l-16 mg/l dilüsyon aralıkları belirlenmiştir.

Kombinasyona girecek fosfomisin stok antibiyotik solüsyonu için hacim/ağırlık/potens formülü uyarınca 50 ml distile su içerisinde 256 mg fosfomisin çözdürüldü (5120 mg/l konsantrasyonda fosfomisin disodyum). Amikasin, imipenem ve meropenem ile ayrı ayrı kombinasyonlar çalışılacağı için 3 adet fosfomisin antibiyotik stok solüsyonu hazırlandı.

Sulandırım için içinde 25 ml steril distile su bulunan falkon tüplerine 25 ml kullanım solüsyonundan aktararak seri dilüsyonları sağlandı. Son konsantrasyon olan 40 mg/l’ye ulaşana kadar toplamda 7 defa dilüsyon yapıldı. 40 mg/l derişimde fosfomisin içeren son tüpten 25 ml alınıp atılmıştır. Böylece 8 tüp içerisinde 25’er ml farklı konsantrasyonlarda fosfomisin antibiyotik solüsyonu hazırlanmıştır.

Amikasinin, meropenemin, imipenemin kombinasyon çalışmasına dahil edilmesi için gerekli stok solüsyonun hazırlanmasında da aynı yöntem kullanılmıştır. Ancak amikasin için 0,5 mg/l-64 mg/l konsantrasyon aralığı belirlendiği için başlangıç tartımında amikasinden 64 mg, meropenem için 0,125 mg/l-16 mg/l konsantrasyon aralığı belirendiği için başlangıç tartımında amikasinden 16 mg ve imipenem için 0,125 mg/l-16 mg/l konsantrasyon aralığı belirendiği için başlangıç tartımında amikasinden 16 mg alınıp 50’şer ml distile su içerisinde çözdürülmüştür. Sulandırım işlemleri fosfomisinde olduğu gibi yapılmıştır. Son konsantrasyon amikasin için 10 mg/l, meropenem için 2,5 mg/l ve imipenem için 2,5 mg/l olmuştur. Böylece kombinasyona girecek her bir antibiyotik için 8’er tane içerisinde 25’er ml ve farklı konsantrasyonlarda antibiyotik süspansiyonu içeren tüp hazırlandı (fosfomisin üç antibiyotikle de kombinasyona girdiği için fosfomisin antibiyotik kullanım süspansiyonu 24 adet hazırlandı). İçerisinde G6P bulunan KAMHAB besiyerinden 18 ml, fosfomisin stok solüsyonundan 1 ml ve kombinasyona girecek

diğer antibiyotik solüsyonundan 1 ml alınarak steril petri kutusunda karıştırılıp katılaşmaya bırakılmıştır. Böylece her antibiyotiğin, aynı miktardaki diğer antibiyotik solüsyonu ile karıştığı için derişimi yarıya düşecek; ayrıca 9 kat da besiyeri ile dilüe olacaktır.

Fosfomisinin 5120 mg/l konsantrasyonu bulunan tüplerden 1'er ml alınıp, amikasinin 10 mg/l-1280 mg/l konsantrasyon aralığında bulunan 8 dilüsyon tüpünün her bir konsantrasyonundan 1'er ml alınarak steril petri kutusunda karıştırılmıştır. Ardından fosfomisinin 2560 mg/l konsantrasyonu bulunan tüplerden 1'er ml alınıp yine amikasinin 10 mg/l-1280 mg/l konsantrasyon aralığında bulunan 8 dilüsyon tüpünün her bir konsantrasyonundan 1'er ml alınarak steril petri kutusunda karıştırılmıştır. Bu şekilde en son fosfomisinin 40 mg/l konsantrasyonu bulunan tüplerden 1'er ml alınıp amikasinin 10 mg/l-1280 mg/l konsantrasyon aralığında bulunan 8 dilüsyon tüpünün her bir konsantrasyonundan 1'er ml alınarak steril petri kutusunda karıştırılmıştır.

Fosfomisinin 5120 mg/l konsantrasyonu bulunan tüplerden 1'er ml alınıp, meropenemin 2,5 mg/l-320 mg/l konsantrasyon aralığında bulunan 8 dilüsyon tüpünün her bir konsantrasyonundan 1'er ml alınarak steril petri kutusunda karıştırılmıştır. Ardından fosfomisinin 2560 mg/l konsantrasyonu bulunan tüplerden 1'er ml alınıp yine meropenemin 2,5 mg/l-320 mg/l konsantrasyon aralığında bulunan 8 dilüsyon tüpünün her bir konsantrasyonundan 1'er ml alınarak steril petri kutusunda karıştırılmıştır. Bu şekilde en son fosfomisinin 40 mg/l konsantrasyonu bulunan tüplerden 1'er ml alınıp meropenemin 2,5 mg/l-320 mg/l konsantrasyon aralığında bulunan 8 dilüsyon tüpünün her bir konsantrasyonundan 1'er ml alınarak steril petri kutusunda karıştırılmıştır.

Fosfomisinin 5120 mg/l konsantrasyonu bulunan tüplerden 1'er ml alınıp, imipenemin 2,5 mg/l-320 mg/l konsantrasyon aralığında bulunan 8 dilüsyon tüpünün her bir konsantrasyonundan 1'er ml alınarak steril petri kutusunda karıştırılmıştır. Ardından fosfomisinin 2560 mg/l konsantrasyonu bulunan tüplerden 1'er ml alınıp yine imipenemin 2,5 mg/l-320 mg/l konsantrasyon aralığında bulunan 8 dilüsyon tüpünün her bir konsantrasyonundan 1'er ml alınarak steril petri kutusunda karıştırılmıştır. Bu şekilde en son fosfomisinin 40 mg/l konsantrasyonu bulunan tüplerden 1'er ml alınıp imipenemin 2,5 mg/l-320 mg/l konsantrasyon aralığında

bulunan 8 dilüsyon tüpünün her bir konsantrasyonundan 1'er ml alınarak steril petri kutusunda karıştırılmıştır.

Böylece antibiyotik kombinasyonu içim toplamda 64 farklı petri kutusunda 64 farklı antibiyotik karışımı elde edilmiş oldu. Antibiyotik solüsyonlarının karışımlarının bulunduğu her petri kutusuna 18 ml MHA içerisine eklenmiştir. Böylece kombinasyon çalışmasına dahil olan her antibiyotik konsantrasyonu, başlangıç stok solüsyonu için hazırlanan derişiminin 1/20'ye düşürülmüş oldu (1/2 sulandırım aynı miktardaki kombinasyona giren diğer antibiyotik solüsyonundan, 1/10 da besiyeri sulandırımından kaynaklı).

Kombinasyon çalışmasına giren fosfomisin farklı derişimlerde antibiyotik solüsyonu içeren tüplerden 1'er ml solüsyon alınarak düz bir zeminde şekil4'de gösterildiği gibi 1A'dan başlayarak 1H'ye doğru konsantrasyonu azalacak şekilde; ayrıca A hizasında en yüksek konsantrasyonda fosfomisin solüsyonu içeren petriler olacak ve her harf hizasında bulunan fosfomisin konsantrasyonları aynı olacak şekilde A'dan H'e doğru azalan konsantrasyonlarda petri kablalarına aktarılıp sırasıyla dizildi. Fosfomisin ile kombinasyona girecek diğer antibiyotik ise 1'den 8'e doğru artan konsantrasyonlarda ve her rakam hizasında aynı konsantrasyonu bulunduracak şekilde petri kaplarına 1'er ml aktarılmıştır.

Kombinasyonlarda kullanılan antibiyotikler ve hazırlanışları

Tablo 2. Fosfomisin-amikasin kombinasyonu için antibiyotik çözeltilerinin hazırlanması.

	Fosfomisin	Amikasin
Konsantrasyon (mg/l)	256	64
Potenst (µg/mg)	1	1
Ağırlık (mg)	512	128
Hacim (ml)	100	100
Çözücü	Distile su	Distile su
Sulandırıcı	Distile su	Distile su
Duyarlı MİK sınır değeri	≤32	≤8
Dilüsyon aralığı (mg/l)	2-256 mg/l	0,125-64 mg/l

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	FOS:256mg/l AK:0,5mg/l	FOS:256mg/l AK:1mg/l	FOS:256mg/l AK:2mg/l	FOS:256mg/l AK:4mg/l	FOS:256mg/l AK:8mg/l	FOS:256mg/l AK:16mg/l	FOS:256mg/l AK:32mg/l	FOS:256mg/l AK:64mg/l
B	FOS:128mg/l AK:0,5mg/l	FOS:128mg/l AK:1mg/l	FOS:128mg/l AK:2mg/l	FOS:128mg/l AK:4mg/l	FOS:128mg/l AK:8mg/l	FOS:128mg/l AK:16mg/l	FOS:128mg/l AK:32mg/l	FOS:128mg/l AK:64mg/l
C	FOS:64mg/l AK:0,5mg/l	FOS:64mg/l AK:1mg/l	FOS:64mg/l AK:2mg/l	FOS:64mg/l AK:4mg/l	FOS:64mg/l AK:8mg/l	FOS:64mg/l AK:16mg/l	FOS:64mg/l AK:32mg/l	FOS:64mg/l AK:64mg/l
D	FOS:32mg/l AK:0,5mg/l	FOS:32mg/l AK:1mg/l	FOS:32mg/l AK:2mg/l	FOS:32mg/l AK:4mg/l	FOS:32mg/l AK:8mg/l	FOS:32mg/l AK:16mg/l	FOS:32mg/l AK:32mg/l	FOS:32mg/l AK:64mg/l
E	FOS:16mg/l AK:0,5mg/l	FOS:16mg/l AK:1mg/l	FOS:16mg/l AK:2mg/l	FOS:16mg/l AK:4mg/l	FOS:16mg/l AK:8mg/l	FOS:16mg/l AK:16mg/l	FOS:16mg/l AK:32mg/l	FOS:16mg/l AK:64mg/l
F	FOS:8mg/l AK:0,5mg/l	FOS:8mg/l AK:1mg/l	FOS:8mg/l AK:2mg/l	FOS:8mg/l AK:4mg/l	FOS:8mg/l AK:8mg/l	FOS:8mg/l AK:16mg/l	FOS:8mg/l AK:32mg/l	FOS:8mg/l AK:64mg/l
G	FOS:4mg/l AK:0,5mg/l	FOS:4mg/l AK:1mg/l	FOS:4mg/l AK:2mg/l	FOS:4mg/l AK:4mg/l	FOS:4mg/l AK:8mg/l	FOS:4mg/l AK:16mg/l	FOS:4mg/l AK:32mg/l	FOS:4mg/l AK:64mg/l
H	FOS:2mg/l AK:0,5mg/l	FOS:2mg/l AK:1mg/l	FOS:2mg/l AK:2mg/l	FOS:2mg/l AK:4mg/l	FOS:2mg/l AK:8mg/l	FOS:2mg/l AK:16mg/l	FOS:2mg/l AK:32mg/l	FOS:2mg/l AK:64mg/l

Şekil 4. Fosfomisin-Amikasin kombinasyonunun MHA besiyerlerinde yerleşimi.

FOS: Fosfomisin, **AK:** Amikasin.

Tablo 3. Fosfomisin-meropenem kombinasyonu için antibiyotik çözeltilerinin hazırlanması.

	Fosfomisin	Meropenem
Konsantrasyon (mg/l)	256	16
Potenst (µg/mg)	1	1
Ağırlık (mg)	512	32
Hacim (ml)	100	100
Çözücü	Distile su	Distile su
Sulandırıcı	Distile su	Distile su
Duyarlı MIK sınır değeri	≤32	≤2
Dilüsyon aralığı (mg/l)	2-256 mg/l	0,125-16 mg/l

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	FOS:256mg/l MEM:0,125mg/l	FOS:256mg/l MEM:0,25mg/l	FOS:256mg/l MEM:0,5mg/l	FOS:256mg/l MEM:1mg/l	FOS:256mg/l MEM:2mg/l	FOS:256mg/l MEM:4mg/l	FOS:256mg/l MEM:8mg/l	FOS:256mg/l MEM:16mg/l
B	FOS:128mg/l MEM:0,125mg/l	FOS:128mg/l MEM:0,25mg/l	FOS:128mg/l MEM:0,5mg/l	FOS:128mg/l MEM:1mg/l	FOS:128mg/l MEM:2mg/l	FOS:128mg/l MEM:4mg/l	FOS:128mg/l MEM:8mg/l	FOS:128mg/l MEM:16mg/l
C	FOS:64mg/l MEM:0,125mg/l	FOS:64mg/l MEM:0,25mg/l	FOS:64mg/l MEM:0,5mg/l	FOS:64mg/l MEM:1mg/l	FOS:64mg/l MEM:2mg/l	FOS:64mg/l MEM:4mg/l	FOS:64mg/l MEM:8mg/l	FOS:64mg/l MEM:16mg/l
D	FOS:32mg/l MEM:0,125mg/l	FOS:32mg/l MEM:0,25mg/l	FOS:32mg/l MEM:0,5mg/l	FOS:32mg/l MEM:1mg/l	FOS:32mg/l MEM:2mg/l	FOS:32mg/l MEM:4mg/l	FOS:32mg/l MEM:8mg/l	FOS:32mg/l MEM:16mg/l
E	FOS:16mg/l MEM:0,125mg/l	FOS:16mg/l MEM:0,25mg/l	FOS:16mg/l MEM:0,5mg/l	FOS:16mg/l MEM:1mg/l	FOS:16mg/l MEM:2mg/l	FOS:16mg/l MEM:4mg/l	FOS:16mg/l MEM:8mg/l	FOS:16mg/l MEM:16mg/l
F	FOS:8mg/l MEM:0,125mg/l	FOS:8mg/l MEM:0,25mg/l	FOS:8mg/l MEM:0,5mg/l	FOS:8mg/l MEM:1mg/l	FOS:8mg/l MEM:2mg/l	FOS:8mg/l MEM:4mg/l	FOS:8mg/l MEM:8mg/l	FOS:8mg/l MEM:16mg/l
G	FOS:4mg/l MEM:0,125mg/l	FOS:4mg/l MEM:0,25mg/l	FOS:4mg/l MEM:0,5mg/l	FOS:4mg/l MEM:1mg/l	FOS:4mg/l MEM:2mg/l	FOS:4mg/l MEM:4mg/l	FOS:4mg/l MEM:8mg/l	FOS:4mg/l MEM:16mg/l
H	FOS:2mg/l MEM:0,125mg/l	FOS:2mg/l MEM:0,25mg/l	FOS:2mg/l MEM:0,5mg/l	FOS:2mg/l MEM:1mg/l	FOS:2mg/l MEM:2mg/l	FOS:2mg/l MEM:4mg/l	FOS:2mg/l MEM:8mg/l	FOS:2mg/l MEM:16mg/l

Şekil 5. Fosfomisin-Meropenem kombinasyonunun MHA besiyerlerinde yerleşimi.

FOS: Fosfomisin, **MEM:** Meropenem

Tablo 4. Fosfomisin-imipenem kombinasyonu için antibiyotik çözeltilerinin hazırlanması.

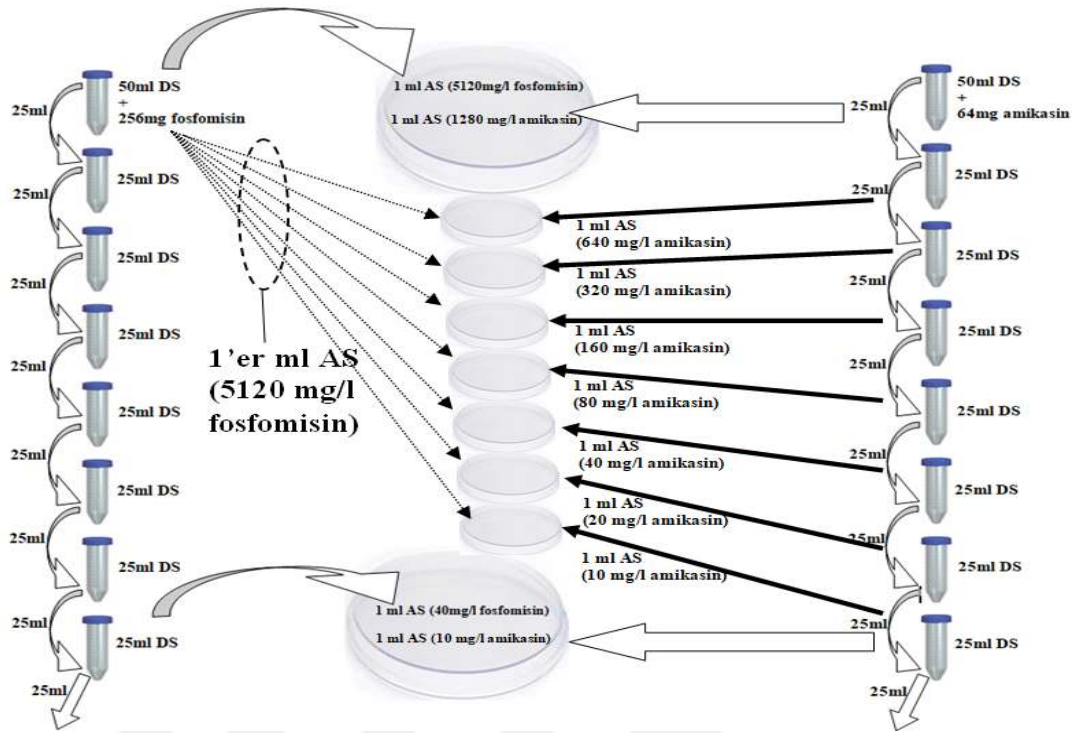
	Fosfomisin	İmipenem
Konsantrasyon (mg/l)	256	16
Potenst (µg/mg)	1	1
Ağırlık (mg)	512	32
Hacim (ml)	100	100
Çözücü	Distile su	Fosfat tamponu*
Sulandırıcı	Distile su	Fosfat tamponu*
Duyarlı MİK sınır değeri	≤32	≤2
Dilüsyon aralığı (mg/l)	2-256 mg/l	0,125-16 mg/l

*Fosfat tamponu: ph:7,2, 0,01 mol/l

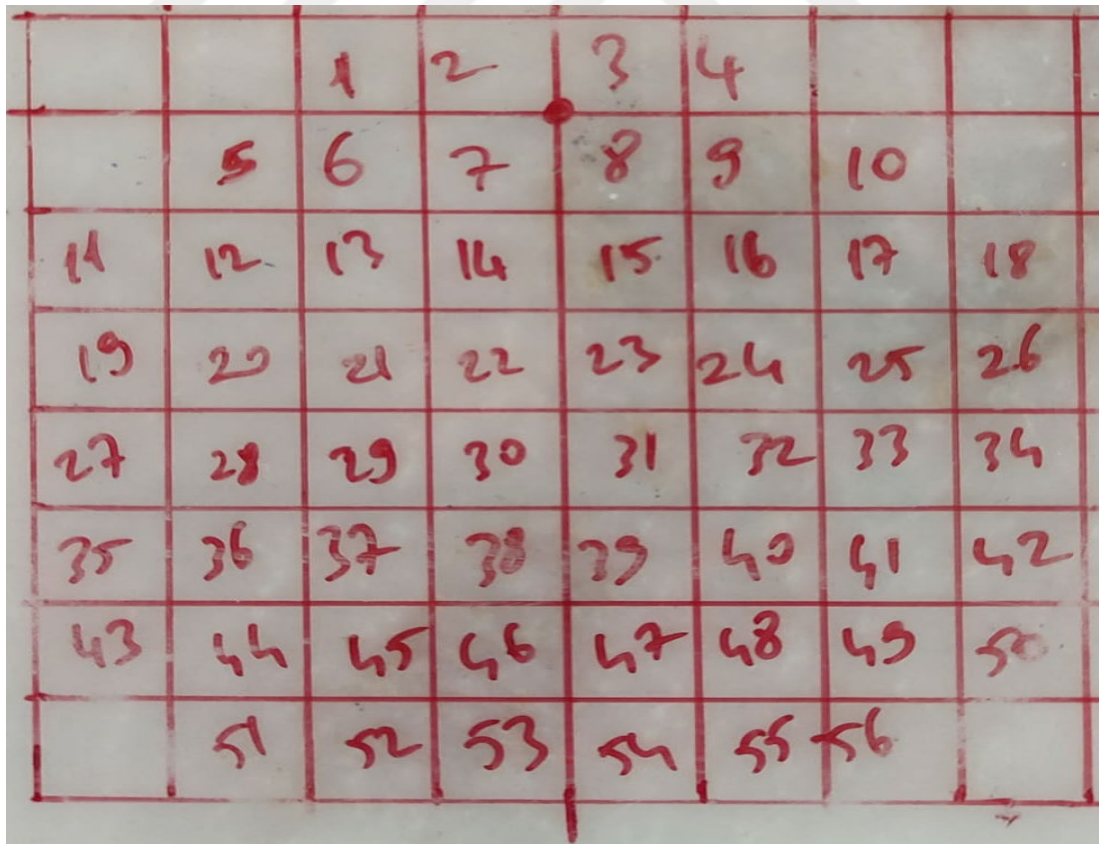
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	FOS:256mg/l IPM:0,125mg/l	FOS:256mg/l IPM:0,25mg/l	FOS:256mg/l IPM:0,5mg/l	FOS:256mg/l IPM:1mg/l	FOS:256mg/l IPM:2mg/l	FOS:256mg/l IPM:4mg/l	FOS:256mg/l IPM:8mg/l	FOS:256mg/l IPM:16mg/l
B	FOS:128mg/l IPM:0,125mg/l	FOS:128mg/l IPM:0,25mg/l	FOS:128mg/l IPM:0,5mg/l	FOS:128mg/l IPM:1mg/l	FOS:128mg/l IPM:2mg/l	FOS:128mg/l IPM:4mg/l	FOS:128mg/l IPM:8mg/l	FOS:128mg/l IPM:16mg/l
C	FOS:64mg/l IPM:0,125mg/l	FOS:64mg/l IPM:0,25mg/l	FOS:64mg/l IPM:0,5mg/l	FOS:64mg/l IPM:1mg/l	FOS:64mg/l IPM:2mg/l	FOS:64mg/l IPM:4mg/l	FOS:64mg/l IPM:8mg/l	FOS:64mg/l IPM:16mg/l
D	FOS:32mg/l IPM:0,125mg/l	FOS:32mg/l IPM:0,25mg/l	FOS:32mg/l IPM:0,5mg/l	FOS:32mg/l IPM:1mg/l	FOS:32mg/l IPM:2mg/l	FOS:32mg/l IPM:4mg/l	FOS:32mg/l IPM:8mg/l	FOS:32mg/l IPM:16mg/l
E	FOS:16mg/l IPM:0,125mg/l	FOS:16mg/l IPM:0,25mg/l	FOS:16mg/l IPM:0,5mg/l	FOS:16mg/l IPM:1mg/l	FOS:16mg/l IPM:2mg/l	FOS:16mg/l IPM:4mg/l	FOS:16mg/l IPM:8mg/l	FOS:16mg/l IPM:16mg/l
F	FOS:8mg/l IPM:0,125mg/l	FOS:8mg/l IPM:0,25mg/l	FOS:8mg/l IPM:0,5mg/l	FOS:8mg/l IPM:1mg/l	FOS:8mg/l IPM:2mg/l	FOS:8mg/l IPM:4mg/l	FOS:8mg/l IPM:8mg/l	FOS:8mg/l IPM:16mg/l
G	FOS:4mg/l IPM:0,125mg/l	FOS:4mg/l IPM:0,25mg/l	FOS:4mg/l IPM:0,5mg/l	FOS:4mg/l IPM:1mg/l	FOS:4mg/l IPM:2mg/l	FOS:4mg/l IPM:4mg/l	FOS:4mg/l IPM:8mg/l	FOS:4mg/l IPM:16mg/l
H	FOS:2mg/l IPM:0,125mg/l	FOS:2mg/l IPM:0,25mg/l	FOS:2mg/l IPM:0,5mg/l	FOS:2mg/l IPM:1mg/l	FOS:2mg/l IPM:2mg/l	FOS:2mg/l IPM:4mg/l	FOS:2mg/l IPM:8mg/l	FOS:2mg/l IPM:16mg/l

Şekil 6. Fosfomisin-İmipenem kombinasyonunun MHA besiyerlerinde yerleşimi.

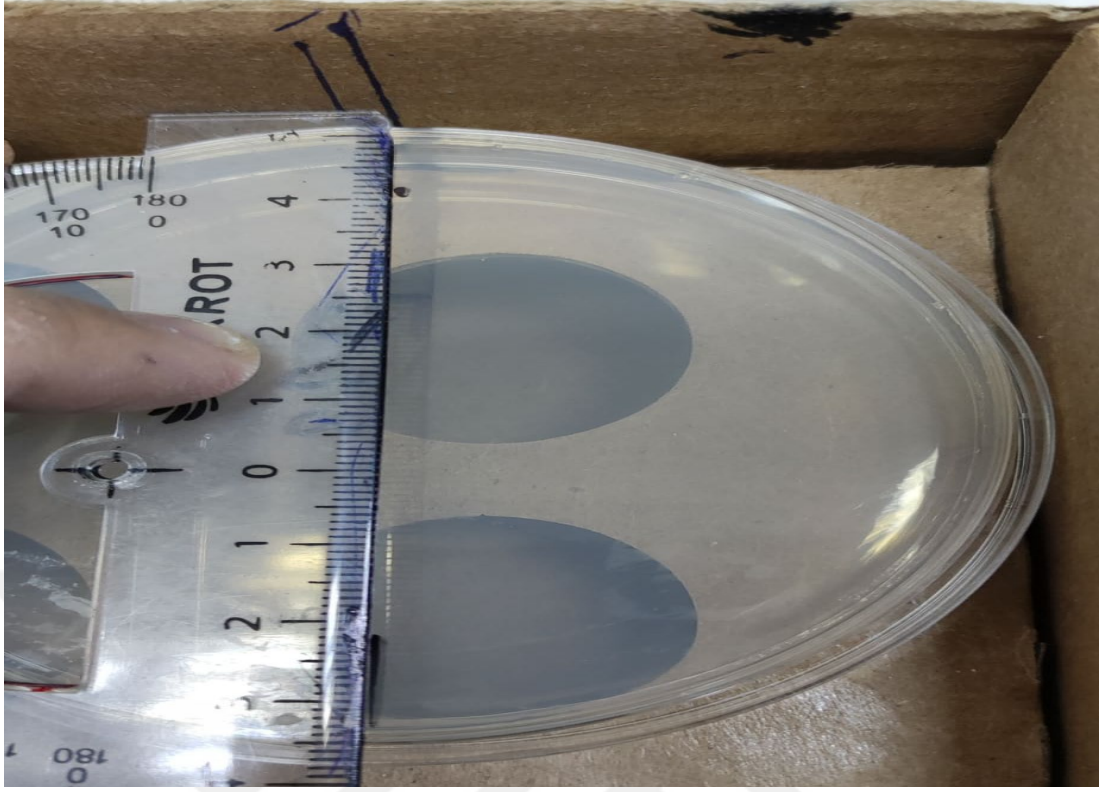
FOS: Fosfomisin, **IPM:** Meropenem



Şekil 7. Kombinasyon çalışması için fosfomisin-amikasin antibiyotik solüsyonlarının temsili hazırlanması.



Şekil 8. Mermer zemin üzerine inokülasyon için çizilen şablon.



Şekil 9. Mermer zemin üzerine çizilen şablona besiyerinin tam uyması için, petri kabına yapılan işaretlemeler.

Test sonucunun okunması

Plaklar daha önceden standart olarak çizilip numaralandırılmış şablonun üzerine, plak üzerinde şablona tam yerleşecek şekilde belirlenen işaretlere dikkat edilerek yerleştirilmiş ve sonuçlar değerlendirilmeye başlanmıştır. Üremeyi inhibe eden en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak kaydedildi. Tek bir koloni üremesi veya inokulumun neden olduğu üreme benzeri izler dikkate alınmadı.

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

Şekil 10. 4 numaralı suşa ait fosfomisin çalışmasının temsili görünümü.

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

Şekil 11. 4 numaralı suşa ait meropenem çalışmasının temsili görünümü.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	FOS:256mg/l MEM:0,125mg/l	FOS:256mg/l MEM:0,25mg/l	FOS:256mg/l MEM:0,5mg/l	FOS:256mg/l MEM:1mg/l	FOS:256mg/l MEM:2mg/l	FOS:256mg/l MEM:4mg/l	FOS:256mg/l MEM:8mg/l	FOS:256mg/l MEM:16mg/l
B	FOS:128mg/l MEM:0,125mg/l	FOS:128mg/l MEM:0,25mg/l	FOS:128mg/l MEM:0,5mg/l	FOS:128mg/l MEM:1mg/l	FOS:128mg/l MEM:2mg/l	FOS:128mg/l MEM:4mg/l	FOS:128mg/l MEM:8mg/l	FOS:128mg/l MEM:16mg/l
C	FOS:64mg/l MEM:0,125mg/l	FOS:64mg/l MEM:0,25mg/l	FOS:64mg/l MEM:0,5mg/l	FOS:64mg/l MEM:1mg/l	FOS:64mg/l MEM:2mg/l	FOS:64mg/l MEM:4mg/l	FOS:64mg/l MEM:8mg/l	FOS:64mg/l MEM:16mg/l
D	FOS:32mg/l MEM:0,125mg/l	FOS:32mg/l MEM:0,25mg/l	FOS:32mg/l MEM:0,5mg/l	FOS:32mg/l MEM:1mg/l	FOS:32mg/l MEM:2mg/l	FOS:32mg/l MEM:4mg/l	FOS:32mg/l MEM:8mg/l	FOS:32mg/l MEM:16mg/l
E	FOS:16mg/l MEM:0,125mg/l	FOS:16mg/l MEM:0,25mg/l	FOS:16mg/l MEM:0,5mg/l	FOS:16mg/l MEM:1mg/l	FOS:16mg/l MEM:2mg/l	FOS:16mg/l MEM:4mg/l	FOS:16mg/l MEM:8mg/l	FOS:16mg/l MEM:16mg/l
F	FOS:8mg/l MEM:0,125mg/l	FOS:8mg/l MEM:0,25mg/l	FOS:8mg/l MEM:0,5mg/l	FOS:8mg/l MEM:1mg/l	FOS:8mg/l MEM:2mg/l	FOS:8mg/l MEM:4mg/l	FOS:8mg/l MEM:8mg/l	FOS:8mg/l MEM:16mg/l
G	FOS:4mg/l MEM:0,125mg/l	FOS:4mg/l MEM:0,25mg/l	FOS:4mg/l MEM:0,5mg/l	FOS:4mg/l MEM:1mg/l	FOS:4mg/l MEM:2mg/l	FOS:4mg/l MEM:4mg/l	FOS:4mg/l MEM:8mg/l	FOS:4mg/l MEM:16mg/l
H	FOS:2mg/l MEM:0,125mg/l	FOS:2mg/l MEM:0,25mg/l	FOS:2mg/l MEM:0,5mg/l	FOS:2mg/l MEM:1mg/l	FOS:2mg/l MEM:2mg/l	FOS:2mg/l MEM:4mg/l	FOS:2mg/l MEM:8mg/l	FOS:2mg/l MEM:16mg/l

Şekil 12. 4 numaralı suşa ait fosfomisin-meropenem kombinasyon çalışmasının temsili görünümü.

FOS: Fosfomisin, **MEM:** Meropenem

Koyu renkle işaretlenen alanlar üreme olan plaklarda bulunan antibiyotik konsantrasyonlarını temsil etmektedir. 4 numaralı izolata ait MİK değerleri şekillerde de görüldüğü gibi **fosfomisin:** 512 mg/l, **meropenem:** 4 mg/l'dir.

Kombinasyon plaklarında üreme gözlenmeyen en düşük MİK değerli kuyucuklar; C1, D3, E5, F7 ve H8 plaklarıdır.

Tablo 5. 4 numaralı izolata ait hesaplanan FİK indeksleri.

Plak	FOS _{MİK} (mg/l)	MEM _{MİK} (mg/l)	FİK _{FOS}	FİK _{MEM}	FİK İndeksi
C1	64	0,125	0,125	0,031	0,156
D3	32	0,5	0,062	0,125	0,187
E5	16	2	0,031	0,5	0,531
F7	8	8	0,015	2	2,015
H8	2	16	0,003	4	4,003

FOS: Fosfomisin, **MEM:** Meropenem, **FİK:** Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon

Sonuçlar FİK indeksi formülüne göre hesaplamalar yapıldığında Tablodaki gibi olmaktadır. Dolayısıyla D2 plağının FİK indeksi en düşük 0,156 ($\leq 0,5$) çıktığı için fosfomisin ve meropenem arasında sinerjist etki vardır.

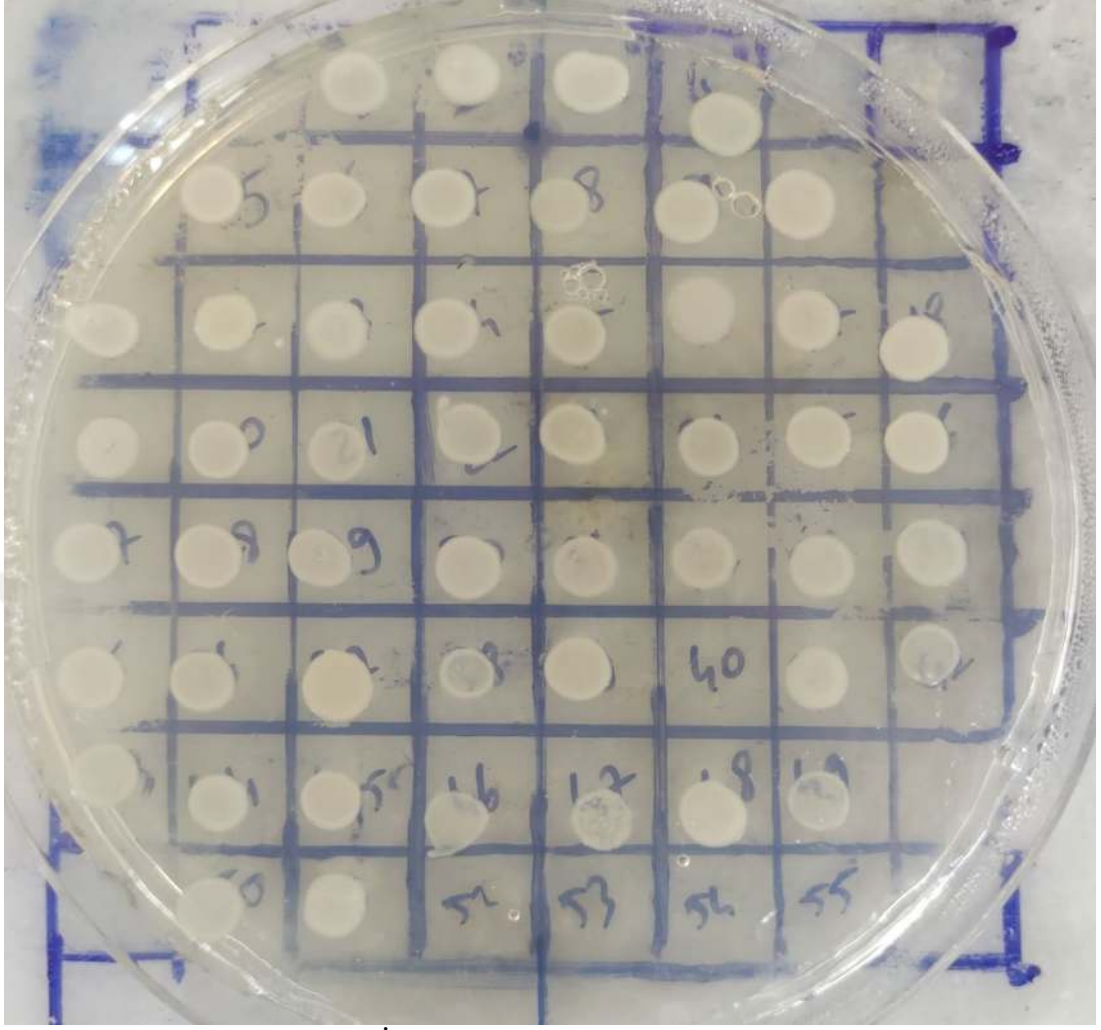
Bu şekilde 71 adet izolat için her bir izolat fosfomisin-amikasin, fosfomisin-imipenem ve fosfomisin-meropenem kombinasyonu ve fosfomisin, meropenem, imipenem, amikasinin tek başına MİK'inin belirlenmesi için agar dilüsyon yöntemi ile çalışma tamamlanmıştır. 71 adet suş tek bir plağa sığmadığı için, iki plakta çalışılmıştır. Kombinasyon çalışmaları için toplamda 384 adet petri, antibiyotiklerin tek başına MİK'inin belirlenmesi için toplamda 64 adet petri kullanılmıştır. Herbir suşun 3 farklı antibiyotik kombinasyonunun FİK indekleri ayrı ayrı hesaplanmıştır.

Kalite Kontrol Suşlarının Çalışılması

Antibiyotik içermeyen agar plaklarına yapılan bakteri ekimleri ile besiyeri ve izolatların üreme kontrolü yapılmıştır. Kalite kontrolde *E. coli* ATCC 25992, *E. coli* ATCC 13846 standart suşları kullanılmıştır.

MİK sonuçlarının değerlendirilmesi

İnkübasyon süresi (16-20 saat) sonunda sonuçlar birbirinden bağımsız olarak çift göz kontrollü olarak değerlendirilmiştir. Üremenin olmadığı en düşük antibiyotik konsantrasyonun olduğu plağa karşılık gelen konsantrasyon MİK olarak belirlenmiştir (Şekil 13). MİK sonuçları EUCAST v.11.0 önerilerine göre değerlendirildi. Fosfomisin için MİK ≤ 32 mg/L olan değerler duyarlı; >32 mg/L olan değerler ise dirençli, amikasin için MİK ≤ 8 mg/L olan değerler duyarlı; >8 mg/L olan değerler ise dirençli, meropenem için (menenjit dışı enfeksiyonlarda) MİK ≤ 2 mg/L olan değerler duyarlı; >2 mg/L olan değerler ise dirençli, meropenem için (menenjit enfeksiyonlarında) MİK ≤ 2 mg/L olan değerler duyarlı; >2 mg/L olan değerler ise dirençli, imipenem için MİK ≤ 2 mg/L olan değerler duyarlı; >4 mg/L olan değerler ise dirençli olarak yorumlanmıştır (81).



Şekil 13. Agar plaklarında MİK sonuçlarının değerlendirilmesi.

Araştırma verilerinin istatistiksel değerlendirmesinde IBM SPSS 21.0 for windows istatistik paket programı kullanıldı. Ölçümsel değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) ile, kategorik değişkenler sayı ve yüzde (%) ile sunuldu. Fosfomisin duyarlılığı ile kombinasyonların sinerjist etkileşim oranlarının karşılaştırmasının istatistiksel analizinde Ki-kare testi kullanılmıştır. Nitel değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanıldı. Hipotezler çift yönlü alındı, $p \leq 0.05$ ise istatistiksel olarak anlamlı sonuç kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 71 izolatın %81,5'i erişkin hastadan izole edilmiştir. Enfeksiyonların yaklaşık %86'sı yoğun bakım %14'ü ise klinik kaynaklıydı. Poliklinik hastaları çalışmaya dahil edilmemiştir. *K. pneumoniae*'ya bağlı enfeksiyonların tamamı hastaların hastaneye yatışlarının üzerinden 48 saat geçtikten sonra oluşmuştur. *K. pneumoniae* en çok kan ve alt solunum yolu örneklerinden (26 suş ETA, 1 suş BAL olmak üzere) izole edilmiştir (sırasıyla %40,8 ve %38). %8,4'ü yara, %4,2'si doku, %2,8'i plevra, %2,8'i aspirat, %1,4'ü dren ve %1,4'ü BOS'dan izole edilmiştir. Çalışmaya alınan *K. pneumoniae* izolatlarının (n=71) tümü, ertapenem, ampisilin, ampisilin/sulbaktam, sefuroksime dirençli idi. İzolatların %64,7'si amikasin, %61,4'ü gentamisine, %91,54'i sefepime, %91,4'ü seftazidime, %93'ü seftriaksona, %95,7'si piperasilin/tazobaktama, %98,5'i amoksisilin/klavunata, %95,7'si siprofloksasine, %94,2'si levofloksasine, %62,8'i trimetoprim/sülfametoksazole, %80,28'i imipenem ve %80,5'i meropenem dirençli idi. Kolistin için otomatize sistemin dirençli sonuçlandığı suşlar dirençli olarak kabul edildi. Otomatize sistemde duyarlı sonuçlandırılan suşlara güvenilmediği için istatistiksel analize sokulmamıştır. Toplamda 35 suş kolistine dirençli 7 suş ise SMD yöntemi ile kolistine duyarlı tespit edilmiştir. PDR izolat sayısı 25 (%35,2), MDR izolat sayısı 46 (%64,8) idi.

K. pneumoniae izolatlarının fosfomisin MİK değerleri agar dilüsyon yöntemi sonucunda 16-512 mg/l, amikasin için 0,5-128 mg/l, meropenem için 0,25-128 ve imipenem için 0,5-32 mg/l arasında bulunmuştur. Fosfomisin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırası ile 256 mg/l ve 512 mg/l, amikasin için sırası ile 64 mg/l ve 128 mg/l, meropenem için sırası ile 32 mg/l ve 32 mg/l, imipenem için sırası ile 16 mg/l ve 32 mg/l bulunmuştur. Agar dilüsyon yöntemi sonucunda izolatların %97,2'si fosfomisine, %69'u amikasin, %84,5'i meropenem ve %94,4'ü imipenem dirençli bulunmuştur.

Agar dilüsyon ile kombinasyon çalışması sonucunda; izolatların %25,35'inde fosfomisin-amikasin, %45,07'sinde fosfomisin-meropenem ve %21,12'sinde fosfomisin-imipenem kombinasyonu sinerjist etki gösterdi. Additif etki ise fosfomisin-amikasin için %46,47, fosfomisin-meropenem için %28,16 ve fosfomisin-imipenem için %38,02 saptanmıştır. Tüm izolatlar ve tüm

kombinasyonlar içerisinde sadece tek bir suşta fosfomisin-amikasin kombinasyonunda antagonist etki tespit edilmiştir.

Yapılan Ki-kare istatistiki analizlerinde; fosfomisin-amikasin, fosfomisin-imipenem ve fosfomisin-meropenem kombinasyonlarının sinerji, additif, indiferan olma durumunun kolistin direnci ile ilişkisi bulunmamıştır ($p>0,05$). Fosfomisin-amikasin arasında sinerji/additif etkileşim olma durumu numunenin ETA veya kan olması ile ilişkili bulunmuştur. Yapılan Ki-kare analizine göre kan örneklerindenden izole edilen *K. pneumoniae*'da fosfomisin-amikasin arasında sinerji görülmesi ETA örneklerine göre istatistiki olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p=0,020$). Agar dilüsyon yöntemiyle tek başına fosfomisine dirençli bulunan izolatların antibiyotik kombinasyonlarının sinerji durumu incelendiğinde; yapılan Ki-kare analizi sonucunda, fosfomisine dirençli bulunan *K. pneumoniae* izolatlarında fosfomisin-meropenem arasında sinerji görülen izolat sayısı, additif etki görülen izolat sayısına göre istatistiki olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p=0,018$). Kombinasyon çalışmasına giren fosfomisin dışındaki diğer antibiyotiklerin agar dilüsyon yöntemi ile tek başlarına bulunan duyarlılık durumlarının; bulunduğu kombinasyonda fosfomisinle oluşturduğu sinerjist-additif-indiferan etki arasında ilişki olup olmadığı Ki-kare analizi ile araştırılmıştır. Agar dilüsyonla imipenemin dirençli bulunduğu *K. pneumoniae* suşları arasında fosfomisin-imipenem kombinasyonu sonucu indiferan etkinin olduğu suş sayısı sinerjist etkinin olduğu suş sayısına göre istatistiki olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p=0,034$). Yine Agar dilüsyonla amikasin dirençli bulunan *K. pneumoniae* suşları arasında fosfomisin-amikasin kombinasyonu sonucu indiferan etkinin olduğu suş sayısı sinerjist etkinin olduğu suş sayısına göre istatistiki olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p=0,026$).

Tablo 6. Test edilen *K. pneumoniae* izolatlarının kliniklere ve yaş durumuna göre dağılımı.

	Yoğun bakım (n,%)	Klinik(n,%)	Toplam(n)
Erişkin	50 (%70,5)	8(%11,0)	58(%81,5)
Çocuk	11(%15,5)	2(%3,0)	13(%18,5)
Toplam	61(%86)	10(14)	71(%100)

Tablo 7. Test edilen *K. pneumoniae* izolatlarının klinik örneklere göre dağılımı.

Klinik Örnek	n	%
Kan	29	40,8
ETA, BAL	27	38,0
Yara	6	8,4
Doku	3	4,2
Plevra	2	2,8
Aspirat	2	2,8
Dren	1	1,4
BOS	1	1,4

Tablo 8. Antibiyotiklerin EUCAST kriterleri uyarınca *Enterobacterales* ailesi için MİK sınır değerleri.

Antibiyotik	MİK (mg/l) sınır değerleri	
	Duyarlı	Dirençli
Fosfomisin	≤32	>32
Amikasin	≤8	>8
Meropenem*	≤2	>8
Meropenem**	≤2	>2
İmipenem	≤2	>4

* Menenjit dışı enfeksiyonlar için **Menenjit için

Tablo 9. İzolatların Phonex otomatize sistem ADT sonuçları.

İzolat numarası		Phonex otomatize sistem antibiyogram sonuçları																
		AK	ETP	AM	AMS	FEP	CAZ	CRO	CXM	CIP	COL	GM	IPM	LEV	MEM	TZP	SXT	AXC
1.	**	S	R	R	R	R	R	R	R	R	X	S	R	R	R	R	R	R
2.	**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
3.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4.	**	R	R	R	R	YDD	S	S	R	R	R	S	YDD	R	R	R	S	R
5.	**	S	R	R	R	S	S	S	R	R	X	S	S	R	YDD	R	S	S
6.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
7.	**	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	YDD	R	S	R	R	R
8.	**	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	YDD	R	R	R	S	R
9.	**	R	R	R	R	R	R	R	R	S	X	R	R	S	R	R	R	R
10.	**	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R
11.	**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
12.	**	S	R	R	R	R	R	R	R	R	X	S	S	R	S	R	R	R
13.	*	R	R	R	R	R	X	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	X
14.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
16.	**	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R
17.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
18.	**	S	R	R	R	YDD	S	YDD	R	R	X	S	R	R	R	R	S	R
19.	**	R	R	R	R	R	R	R	R	S	X	S	R	S	R	S	S	R
20.	**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
21.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	X	R	R	R	R	R	R	R
22.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	X	R	R	R	R	R	R	R
23.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
24.	**	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	YDD	R
25.	**	S	R	R	R	R	R	R	R	R	X	S	S	R	S	R	R	R
26.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
27.	**	S	R	R	R	YDD	R	R	R	R	X	S	S	R	S	S	R	R
28.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
29.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
30.	**	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
31.	**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	YDD	R	S	R
32.	**	S	R	R	R	R	YDD	YDD	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R
33.	**	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
34.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
35.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
36.	**	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R
37.	**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R
38.	**	S	R	R	R	R	R	R	R	R	X	S	R	R	R	R	R	R
39.	**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	X	S	R	R	R	R	S	R
40.	**	S	R	R	R	R	R	R	R	R	X	R	S	R	S	R	R	R
41.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
42.	**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	X	R	YDD	R	R	R	R	R
43.	**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
44.	**	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R
45.	**	S	R	R	R	R	R	R	R	S	X	R	YDD	S	YDD	R	S	R
46.	**	S	R	R	R	R	R	R	R	R	X	S	R	R	R	R	YDD	R
47.	**	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R
48.	**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
49.	**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	X	S	R	R	R	R	S	R
50.	**	S	R	R	R	R	R	R	R	R	X	S	R	R	R	R	S	R
51.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
52.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	X	R	R	R	R	R	R	R
53.	**	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R
54.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	X	R	R	R	R	R	R	R
55.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	X	R	R	R	R	R	R	R
56.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	X	R	R	R	R	R	R	R
57.	**	S	R	R	R	YDD	R	R	R	R	X	S	R	R	R	R	S	R
58.	**	S	R	R	R	R	R	R	R	R	X	S	R	R	R	R	S	R
59.	**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	X	R	R	R	R	R	S	R
60.	**	R	R	R	R	R	YDD	R	R	R	X	R	R	R	R	R	R	R
61.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
62.	**	S	R	R	R	YDD	YDD	YDD	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
63.	**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	X	S	S	R	YDD	R	S	R
64.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
65.	**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	X	R	YDD	R	R	R	S	R
66.	**	S	R	R	R	R	R	R	R	R	X	R	S	R	S	R	R	R
67.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
68.	**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	X	S	R	R	R	R	S	R
69.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
70.	**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
71.	*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

*PDR izolatlar **MDR izolatlar R: dirençli S: duyarlı YDD: Yüksek dozda duyarlı

AK: Amikasin, ETP: Ertapenem AM: Ampisilin AMS: Ampisilin-sulbaktam

FEP: Sefepim CAZ: Seftazidim CRO: Seftriakson CXM: Sefuroksim

CIP: Siprofloksasin COL: Kolistin GM: Gentamisin İPM: İmipenem

LEV: Levofloksasin MEM: Meropenem TZP: Piperasilin-tazobaktam

SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol AXC: Amoksisilin-klavunat

Tablo 10. Kombinasyon çalışmasına dahil olan antibiyotiklerin tek başına MİK değerleri ve kombinasyonlarının FİK indeksleri-etkileşimlerinin hastaların demografik özelliklerine göre dağılımı.

		Agar dilüsyon yöntemi antibiyotik antibiyogram sonuçları MİK (mg/l)					K. pneumoniae izolatlarına karşı antibiyotik kombinasyonlarının FİK indeksleri ve etkileşimleri									
		COL	FOS	AK	MEM	IPM	FOS-AK FİKİ	YORUM	FOS-MEM FİKİ	YORUM	FOS-IPM FİKİ	YORUM				
1.	X		512-R	2-S	16-R	32-R	0,5	Sinerji	0,257	Sinerji	0,281	Sinerji	E	60	YB	KAN
2.	R		512-R	128-R	32-R	32-R	2	İN	0,265	Sinerji	0,312	Sinerji	E	52	YB	KAN
3.	R		512-R	128-R	16-R	32-R	0,503	ADD	1,5	İN	0,503	ADD	K	4	YB	ETA
4.	R		512-R	32-R	4-YDD	8-R	0,515	ADD	0,156	Sinerji	0,281	Sinerji	E	42	YB	ETA
5.	X		64-R	1-S	0,25-S	16-R	0,562	ADD	0,531	ADD	0,093	Sinerji	K	44	KL	DOKU
6.	R		256-R	128-R	32-R	32-R	1	ADD	0,257	Sinerji	0,5	Sinerji	E	<1	YB	KAN
7.	R		256-R	8-S	8-YDD	4-YDD	0,375	Sinerji	0,187	Sinerji	0,375	Sinerji	K	<1	KL	KAN
8.	S		16-S	64-R	16-R	32-R	1	ADD	1	ADD	0,625	ADD	E	73	YB	KAN
9.	X		512-R	128-R	32-R	32-R	0,75	ADD	0,25	Sinerji	0,5	Sinerji	E	<1	YB	YARA
10.	R		128-R	8-S	0,5-S	1-S	0,625	ADD	0,5	Sinerji	0,625	ADD	E	22	YB	ETA
11.	R		512-R	128-R	32-R	32-R	2	İN	2	İN	1	ADD	K	83	YB	KAN
12.	X		128-R	2-S	4-YDD	0,5-S	0,5	Sinerji	0,062	Sinerji	0,375	Sinerji	K	90	YB	KAN
13.	R		512-R	128-R	32-R	8-R	2	İN	2	İN	1,25	İN	E	45	YB	ETA
14.	R		256-R	128-R	32-R	32-R	2	İN	1,25	İN	0,75	ADD	E	1	YB	ETA
15.	R		512-R	128-R	32-R	32-R	2	İN	2	İN	2	İN	K	35	YB	DOKU
16.	S		128-R	1-S	0,5-S	8-R	0,75	ADD	0,625	ADD	0,281	Sinerji	K	21	YB	ETA
17.	R		512-R	128-R	32-R	32-R	2	İN	0,375	Sinerji	0,375	Sinerji	K	1	YB	KAN
18.	X		128-R	1-S	32-R	32-R	1,5	İN	2	İN	2	İN	E	87	YB	ETA
19.	X		256-R	128-R	32-R	32-R	1	ADD	0,01	Sinerji	0,039	Sinerji	E	60	YB	ETA
20.	S		256-R	128-R	32-R	16-R	1,5	İN	0,75	ADD	0,75	ADD	E	64	YB	ETA
21.	X		512-R	128-R	32-R	32-R	2	İN	2	İN	2	İN	E	66	YB	ETA
22.	X		256-R	16-R	32-R	32-R	2	İN	1,25	İN	1,5	İN	K	17	YB	KAN
23.	R		256-R	128-R	32-R	32-R	1	ADD	2	İN	2	İN	E	65	YB	ETA
24.	S		256-R	32-R	32-R	16-R	2	İN	0,5	Sinerji	1,25	İN	K	61	KL	KAN
25.	R		512-R	8-S	0,5-S	4-YDD	0,125	Sinerji	0,125	Sinerji	0,312	Sinerji	K	70	KL	ASPIRAT
26.	R		256-R	128-R	32-R	8-R	0,281	Sinerji	0,625	ADD	0,75	ADD	K	75	YB	ETA
27.	X		64-R	2-S	32-R	8-R	0,625	ADD	0,046	Sinerji	0,562	ADD	E	71	YB	KAN
28.	R		256-R	128-R	32-R	8-R	2	İN	0,75	ADD	1	ADD	E	74	KL	PLEVRA
29.	R		64-R	128-R	32-R	8-R	1,031	İN	0,375	Sinerji	1,25	İN	E	79	YB	ETA
30.	R		256-R	128-R	32-R	32-R	2	İN	0,5	Sinerji	0,75	ADD	E	26	KL	KAN
31.	S		64-R	16-R	32-R	16-R	0,5	Sinerji	0,375	Sinerji	1,007	İN	E	56	YB	KAN
32.	R		128-R	4-S	32-R	16-R	0,625	ADD	0,25	Sinerji	0,562	ADD	E	49	YB	PLEVRA
33.	R		128-R	2-S	32-R	16-R	1,25	İN	0,5	Sinerji	0,625	ADD	E	67	YB	ETA
34.	R		256-R	128-R	32-R	32-R	2	İN	0,562	ADD	0,562	ADD	E	33	YB	ETA
35.	R		64-R	128-R	32-R	32-R	0,375	Sinerji	0,375	Sinerji	0,531	ADD	E	3	YB	ETA
36.	R		512-R	1-S	32-R	32-R	0,75	ADD	2	İN	2	İN	K	59	YB	KAN
37.	S		64-R	32-R	32-R	32-R	0,75	ADD	0,562	ADD	1	ADD	E	22	YB	BOS
38.	X		256-R	8-S	16-R	32-R	0,625	ADD	1	ADD	1	ADD	E	67	YB	ETA
39.	X		512-R	16-R	32-R	32-R	4,125	ANTA	2	İN	2	İN	K	89	YB	KAN
40.	X		128-R	8-S	4-YDD	16-R	0,5	Sinerji	0,25	Sinerji	0,625	ADD	E	3	YB	KAN
41.	R		512-R	128-R	32-R	32-R	0,75	ADD	0,562	ADD	2	İN	E	38	YB	ETA
42.	X		128-R	128-R	32-R	16-R	0,375	Sinerji	0,5	Sinerji	1,015	İN	E	33	YB	ETA
43.	R		512-R	128-R	32-R	32-R	2	İN	2	İN	2	İN	E	47	YB	ETA
44.	R		512-R	1-S	32-R	32-R	0,75	ADD	2	İN	2	İN	E	43	YB	ETA
45.	X		256-R	2-S	8-YDD	16-R	0,5	Sinerji	2	İN	0,625	ADD	E	1	KL	KAN
46.	X		256-R	2-S	32-R	16-R	0,5	Sinerji	0,531	ADD	1	ADD	E	69	YB	DREN
47.	R		512-R	1-S	32-R	32-R	1	ADD	2	İN	2	İN	K	89	YB	ETA
48.	R		128-R	128-R	32-R	32-R	0,75	ADD	0,5	Sinerji	1,003	İN	E	20	YB	YARA
49.	X		128-R	32-R	32-R	32-R	1	ADD	1	ADD	2	İN	E	73	YB	ETA
50.	X		64-R	128-R	32-R	16-R	0,625	ADD	1,003	İN	2	İN	E	51	YB	KAN
51.	R		64-R	128-R	32-R	16-R	0,625	ADD	1	ADD	1,5	İN	K	43	KL	YARA
52.	X		64-R	128-R	32-R	32-R	2	İN	1,003	İN	1,5	İN	E	66	YB	KAN
53.	S		256-R	32-R	32-R	32-R	0,515	ADD	0,375	Sinerji	1	ADD	E	1	YB	KAN
54.	X		128-R	128-R	32-R	16-R	0,253	Sinerji	0,253	Sinerji	0,625	ADD	E	37	YB	YARA
55.	X		64-R	128-R	32-R	16-R	0,503	ADD	0,5	Sinerji	1	ADD	K	82	YB	KAN
56.	X		256-R	128-R	32-R	32-R	0,503	ADD	0,531	ADD	1,003	İN	K	40	YB	YARA
57.	X		16-S	0,5-S	32-R	16-R	2	İN	1	ADD	1,125	İN	K	57	KL	DOKU
58.	X		64-R	4-S	32-R	32-R	0,625	ADD	0,625	ADD	1,062	İN	E	48	YB	KAN
59.	X		128-R	8-S	32-R	16-R	1	ADD	1	ADD	1,007	İN	K	1	YB	ETA
60.	X		64-R	64-R	32-R	16-R	0,625	ADD	0,503	ADD	1	ADD	E	20	YB	KAN
61.	R		64-R	128-R	32-R	32-R	0,281	Sinerji	0,503	ADD	0,5	Sinerji	K	42	YB	KAN

62.	R	128-R	2-S	32-R	16-R	0,5	Sinerji	0,375	Sinerji	0,75	ADD	K	79	YB	KAN
63.	X	64-R	64-R	8-YDD	8-R	0,312	Sinerji	0,312	Sinerji	0,531	ADD	E	58	YB	KAN
64.	R	64-R	128-R	32-R	16-R	0,531	ADD	0,5	Sinerji	1	ADD	E	37	YB	ETA
65.	X	64-R	64-R	32-R	16-R	0,25	Sinerji	0,253	Sinerji	0,515	ADD	K	1	YB	KAN
66.	X	128-R	4-S	8-YDD	16-R	0,25	Sinerji	0,093	Sinerji	0,375	Sinerji	E	<1	YB	KAN
67.	R	512-R	128-R	32-R	16-R	0,625	ADD	0,375	Sinerji	1,5	İN	K	72	YB	ETA
68.	X	128-R	16-R	32-R	16-R	0,281	Sinerji	0,253	Sinerji	0,253	Sinerji	E	58	KL	YARA
69.	R	512-R	64-R	32-R	16-R	0,75	ADD	2	İN	1,5	İN	K	4	YB	BAL
70.	R	512-R	64-R	32-R	16-R	0,75	ADD	2	İN	1,5	İN	K	83	YB	KAN
71.	R	512-R	128-R	32-R	16-R	0,562	ADD	0,75	ADD	1,015	İN	E	21	YB	ASPIRAT

FOS: Fosfomisin **AK:** Amikasin **MEM:** Meropenem **İPM:** İmipenem

COL: Kolistin **FİKİ:** FİK indeksi, **ADD:** Additif, **İN:** İndiferan,

ANTA: Antagonizma **S:** Duyarlı **R:** Dirençli **YDD:** Yüksek dozda duyarlı **X:** Çalışmadı

Tablo 11. *K. pneumoniae* izolatlarına karşı antibiyotik kombinasyonlarının FİK indeksleri ve etkileşimleri.

	FOS-AK FİKİ	YORUM	FOS-MEM FİKİ	YORUM	FOS-İPM FİKİ	YORUM
1.	0,5	Sinerji	0,257	Sinerji	0,281	Sinerji
2.	2	İN	0,265	Sinerji	0,312	Sinerji
3.	0,503	ADD	1,5	İN	0,503	ADD
4.	0,515	ADD	0,156	Sinerji	0,281	Sinerji
5.	0,562	ADD	0,531	ADD	0,093	Sinerji
6.	1	ADD	0,257	Sinerji	0,5	Sinerji
7.	0,375	Sinerji	0,187	Sinerji	0,375	Sinerji
8.	1	ADD	1	ADD	0,625	ADD
9.	0,75	ADD	0,25	Sinerji	0,5	Sinerji
10.	0,625	ADD	0,5	Sinerji	0,625	ADD
11.	2	İN	2	İN	1	ADD
12.	0,5	Sinerji	0,062	Sinerji	0,375	Sinerji
13.	2	İN	2	İN	1,25	İN
14.	2	İN	1,25	İN	0,75	ADD
15.	2	İN	2	İN	2	İN
16.	0,75	ADD	0,625	ADD	0,281	Sinerji
17.	2	İN	0,375	Sinerji	0,375	Sinerji
18.	1,5	İN	2	İN	2	İN
19.	1	ADD	0,01	Sinerji	0,039	Sinerji
20.	1,5	İN	0,75	ADD	0,75	ADD
21.	2	İN	2	İN	2	İN
22.	2	İN	1,25	İN	1,5	İN
23.	1	ADD	2	İN	2	İN
24.	2	İN	0,5	Sinerji	1,25	İN
25.	0,125	Sinerji	0,125	Sinerji	0,312	Sinerji
26.	0,281	Sinerji	0,625	ADD	0,75	ADD
27.	0,625	ADD	0,046	Sinerji	0,562	ADD
28.	2	İN	0,75	ADD	1	ADD
29.	1,031	İN	0,375	Sinerji	1,25	İN
30.	2	İN	0,5	Sinerji	0,75	ADD
31.	0,5	Sinerji	0,375	Sinerji	1,007	İN
32.	0,625	ADD	0,25	Sinerji	0,562	ADD
33.	1,25	İN	0,5	Sinerji	0,625	ADD
34.	2	İN	0,562	ADD	0,562	ADD
35.	0,375	Sinerji	0,375	Sinerji	0,531	ADD
36.	0,75	ADD	2	İN	2	İN
37.	0,75	ADD	0,562	ADD	1	ADD
38.	0,625	ADD	1	ADD	1	ADD
39.	4,125	ANTA	2	İN	2	İN
40.	0,5	Sinerji	0,25	Sinerji	0,625	ADD
41.	0,75	ADD	0,562	ADD	2	İN
42.	0,375	Sinerji	0,5	Sinerji	1,015	İN
43.	2	İN	2	İN	2	İN
44.	0,75	ADD	2	İN	2	İN
45.	0,5	Sinerji	2	İN	0,625	ADD
46.	0,5	Sinerji	0,531	ADD	1	ADD
47.	1	ADD	2	İN	2	İN
48.	0,75	ADD	0,5	Sinerji	1,003	İN
49.	1	ADD	1	ADD	2	İN
50.	0,625	ADD	1,003	İN	2	İN

51.	0,625	ADD	1	ADD	1,5	İN
52.	2	İN	1,003	İN	1,5	İN
53.	0,515	ADD	0,375	Sinerji	1	ADD
54.	0,253	Sinerji	0,253	Sinerji	0,625	ADD
55.	0,503	ADD	0,5	Sinerji	1	ADD
56.	0,503	ADD	0,531	ADD	1,003	İN
57.	2	İN	1	ADD	1,125	İN
58.	0,625	ADD	0,625	ADD	1,062	İN
59.	1	ADD	1	ADD	1,007	İN
60.	0,625	ADD	0,503	ADD	1	ADD
61.	0,281	Sinerji	0,503	ADD	0,5	Sinerji
62.	0,5	Sinerji	0,375	Sinerji	0,75	ADD
63.	0,312	Sinerji	0,312	Sinerji	0,531	ADD
64.	0,531	ADD	0,5	Sinerji	1	ADD
65.	0,25	Sinerji	0,253	Sinerji	0,515	ADD
66.	0,25	Sinerji	0,093	Sinerji	0,375	Sinerji
67.	0,625	ADD	0,375	Sinerji	1,5	İN
68.	0,281	Sinerji	0,253	Sinerji	0,253	Sinerji
69.	0,75	ADD	2	İN	1,5	İN
70.	0,75	ADD	2	İN	1,5	İN
71.	0,562	ADD	0,75	ADD	1,015	İN

FOS: Fosfomisin, **AK:** Amikasin, **MEM:** Meropenem, **İPM:** İmipenem,

FİKİ: FİK indeksi, **ADD:** Additif, **İN:** İndiferan, **ANTA:** Antagonizma

Tablo 12. Agar dilüsyon yöntemi ile test edilen *K. pneumoniae* suşlarının saptanan MİK aralıkları, MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri ve kombinasyonlarda kullanılan antibiyotiklere duyarlılıkları (n=71 izolat).

				Duyarlı		Yüksek dozda duyarlı		Dirençli	
	MİK aralık (mg/l)	MİK ₅₀ (mg/l)	MİK ₉₀ (mg/l)	n	%	n	%	n	%
Fosfomisin	16-512	256	512	2	2,8	0	0	69	97,2
Amikasin	0,5-128	64	128	22	31,0	0	0	49	69,0
Meropenem	0,25-32	32	32	4	5,6	7	9,9	60	84,5
İmipenem	0,5-32	16	32	2	2,8	2	2,8	67	94,4

Tablo 13. Çalışmadaki antibiyotik kombinasyonu sonucu oluşan etkiler.

	Sinerji FİKİ ≤ 0.5		Additif FİKİ >0.5-≤1		İndiferan FİKİ >1-< 4		Antagonizma FİKİ ≥ 4	
	n	%	n	%	n	%	n	%
FOS-AK	18	25,35	33	46,47	19	26,76	1	1,40
FOS-MEM	32	45,07	20	28,16	19	26,76	0	0
FOS-İPM	15	21,12	27	38,02	29	40,84	0	0

FOS: Fosfomisin **MEM:** Meropenem **İPM:** İmipenem **FİKİ:** FİK indeksi

Tablo 14. Kolistin dirençli izolatlarda (n=34) antibiyotik kombinasyonu sonucu oluşan etkiler.

	Sinerji FİKİ ≤ 0.5		Additif FİKİ >0.5-≤1		İndiferan FİKİ >1-< 4		Antagonizma FİKİ ≥ 4	
	n	%	n	%	n	%	n	%
FOS- AK	6	17,14	17	48,57	12	34,28	0	0
FOS- MEM	16	45,71	7	20	12	34,29	0	0
FOS- İPM	7	20	13	37,14	15	42,86	0	0

FOS: Fosfomisin **MEM:** Meropenem **İPM:** İmipenem **FİKİ:** FİK indeksi

Tablo 15. Fosfomisin-imipenem etkileşiminin imipenem direnci ile ilişkisi.

	FOS-İPM SİN	FOS-İPM İN	Toplam	p
İPM-R	12	29	41	0,034
İPM-S	3	0	3	
Toplam	15	29	44	

Tablo 16. Fosfomisin-amikasin etkileşiminin amikasin direnci ile ilişkisi.

	FOS-AK SİN	FOS-AK İN	Toplam	p
AK-R	9	16	25	0,026
AK-S	9	3	12	
Toplam	18	19	37	

Tablo 17. Fosfomisin-meropenem etkileşiminin fosfomisin direnci ile ilişkisi.

	FOS-MEM SİN	FOS-MEM ADD	Toplam	p
FOS-R	32	16	48	0,018
FOS-S	0	4	4	
Toplam	32	20	52	

Tablo 18. Fosfomisin-amikasin etkileşiminin örnek çeşidi ile ilişkisi.

	FOS-AK SİN	FOS-AK ADD	Toplam	p
ETA	3	15	18	0,020
KAN	11	10	21	
Toplam	14	25	39	

5. TARTIŞMA

Geçmiş yıllarda *Enterobacterales* üyelerine karşı sefalosporinler, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları, karbapenemler, sülfonamidler, aminoglikozidler ve florokinolonlar gibi çok çeşitli antibiyotikler güvenle kullanılabiliyordu. Ancak zamanla bu antibiyotiklere karşı bakterilerin geliştirdiği direnç (ESBL, AmpC beta-laktamaz, karbapenemaz) nedeniyle, *Enterobacterales* türlerinin oluşturduğu toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlar karşısında bu antibiyotikler yetersiz kalmıştır (8). Karbapenem dirençli *K. pneumoniae*, birçok ilaca dirençli hastane patojenlerinden biridir (85,86). Antimikrobiyal direnç fenotiplerinin artışı ve yeni antibiyotiklerin kısıtlı olması nedenlerinden dolayı polimiksin, fosfomisin ve tigesiklin gibi eskiden kullanılan bazı antibiyotiklerin kombinasyon şeklinde tedavide kullanılması gündeme gelmiştir. Özellikle tedaviye dirençli Gram negatif bakterilere bağlı gelişen enfeksiyonlarda kombine tedavisinin uygulanması önemli bir seçenektir (5,6).

MDR Gram-negatif bakterilerin etken olduğu enfeksiyonlarda sıklıkla kolistin ile başka antibiyotikler kombine olarak kullanılmaktadır. Ancak kolistine karşı da gelişen direnç oranlarındaki artış, fosfomisinli kombinasyonların tedavide kullanılmasını gerekli kılmıştır (61,87,88). Fosfomisin MDR ve PDR Gram-negatif bakterilerin tedavisinde güvenle kullanılabilen etkili bir antibiyotiktir (58). Bununla birlikte sistemik enfeksiyonların tedavisinde IV fosfomisin (fosfomisin disodyum) tedavisi tek başına verildiğinde direnç gelişimi olabilmektedir. Bu nedenle sistemik enfeksiyonların tedavisinde monoterapi olarak IV fosfomisin tedavisi önerilmemektedir (89).

Fosfomisin, peptidoglikan sentezini inhibe eden geniş spektrumlu, başka ilaçlarla çapraz direncin görülmediği veya düşük düzeyde görüldüğü için diğer bazı antimikrobiyal ajanlarla kombinasyon halinde uygulanabilen bir antibiyotiktir. İyi tolere edilir ve güvenilirdir. Yan etkisi nadir görülmektedir. İn vivo aktivitesi, klinik etkinliği, farmakokinetik ve farmakodinamik avantajları nedenleriyle MDR *Enterobacterales* ailesine karşı tedavi seçeneği olarak kullanılabilmektedir (1,48,58,90). Fosfomisin, tedavide yüksek dozda kullanıma izin verebilen bir antibiyotiktir. Bu özelliğini uygun güvenlik profilinden almaktadır. Böylece sistemik enfeksiyonları tedavi ederken farmakodinamik hedeflere ulaşma olasılığı

artabilmektedir. Yüksek fosfomisin seviyelerinin ayrıca fosfomisine karşı olası direnç gelişimini düşük oranlarda tutabileceği düşünülmektedir (58).

Fosfomisin duyarlılığı için CLSI agar seyreltme yöntemini önermektedir. Literatürde sinerji çalışmalarında farklı yöntemler de kullanılmıştır (62). EUCAST *Enterobacterales* ailesi üyeleri için fosfomisin duyarlılığının saptanmasında referans yöntem olarak agar dilüsyonu önermektedir (81). Bu nedenle bu çalışmada agar dilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Ancak fosfomisinin MİK ve inhibisyon zon çapının belirlendiği mikroorganizmalarda ve aynı mikroorganizma için belirlenmiş olan MİK ve inhibisyon zon çapı referans aralıklarında CLSI ve EUCAST arasında farklılık bulunmaktadır (57). Ayrıca bazı çalışmalarda fosfomisin duyarlılığının saptanmasında kullanılan yöntemler arasında uyumsuzluklar da tespit edilebilmektedir. Cueto ve ark. (91) fosfomisin duyarlılık çalışmalarında SMD ve agar dilüsyon MİK'leri arasında bazı tutarsızlıklar bildirmiştir. ESBL-pozitif *E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının fosfomisin duyarlılığının saptanması için agar dilüsyon, SMD ve disk difüzyon yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, yöntemler arası uyum *E. coli* izolatları için yüksek iken; *K. pneumoniae* izolatlarında anlamlı oranda uyumsuzluklar tespit edilmiştir (91). MDR Gram-negatif bakterilerin fosfomisin duyarlılığının in vitro olarak tespit edildiği bir çalışmada, gradyan testi ile agar dilüsyon yöntemi karşılaştırılmıştır. Gradyan testinin fosfomisin duyarlılığını saptamada oldukça yetersiz kaldığı bulunmuştur (92).

ESBL-pozitif *Enterobacterales* izolatlarında fosfomisinin duyarlılığı çok iyi düzeylerde dir. ESBL-pozitif *E. coli* izolatlarında fosfomisin duyarlılığı %86-100 bulunmuştur (93). Barry ve Fuchs (94) İYE etkeni olan 20 adet *K. pneumoniae* suşunun fosfomisin duyarlılığını da araştırdıkları çalışmalarında agar dilüsyon ve SMD yöntemlerini karşılaştırmışlardır. İzolatların tamamı (%100) fosfomisine duyarlı bulunmuştur (CLSI kriterleri). Ayrıca SMD ile elde edilen MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerinin agar dilüsyona göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

İYE'den izole edilen *K. pneumoniae* izolatları fosfomisine in vitro olarak %78-80 oranında duyarlıdır (53). ESBL ve AmpC-pozitif *Enterobacterales* izolatlarında (n:284) fosfomisin MİK aralıkları $\leq 2-512$ mg/l bulunmuştur. *K. pneumoniae*'nin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırası ile 4-16 mg/l ve 16-128 mg/l bulunmuştur (3). Falagas ve ark. (90) fosfomisinin in vitro ve in vivo etkinliğinin

araştırıldığı 17 çalışmayı derlemelerinde incelemişlerdir. 11 çalışmada fosfomisine duyarlı MDR *Enterobacterales* izolat sayısı $\geq$ %90 bulunmuştur. Ballesterro-Tellez ve ark. (95) çalışmalarına dahil ettikleri 139 *K.pneumoniae* suşunun fosfomisin duyarlılığını agar dilüsyon ve SMD yöntemleri ile çalışmışlardır. *K.pneumoniae* suşlarının %35,3'ü fosfomisine dirençli bulunmuştur. Camarlinghi ve ark. (96) 2018 yılında yayınlanan araştırmasında KPC pozitif 78 *K.pneumoniae* suşunun agar dilüsyonla fosfomisin direnç oranını %42,3 bulmuştur. Türkiye'de yapılan 2020 yılına ait bir tez çalışmasında; İYE etkeni olan 44 adet *K. pneumoniae* izolatının fosfomisin direnci agar dilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır. İzolatların %75'i fosfomisine dirençli bulunmuştur. Aynı çalışmada *K.pneumoniae* suşlarının MİK değerlerinin 64 mg/l'de yoğunlaştığı görülmüştür. MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırası ile 64 mg/l ve 1024 mg/l olarak bulunmuştur (97).

Aprile ve ark. (56) 2020 yılına ait, 85 karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatının da dahil edildiği çalışmalarında fosfomisin direnç oranı agar dilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır. KPC Kp suşlarının %24'ünde, NDM ve OXA48 pozitif olan suşların %100'ünde ve sadece OXA48 üreten suşların %37,5'inde fosfomisin direnci tespit etmişlerdir (98).

Fosfomisin ESBL-pozitif ve KPC Kp izolatlarına in vitro olarak etkili bir antibiyotiktir (MİK₅₀ 0,5-16 mg/l) (99). Tigesiklin ve kolistine dirençli, KPC Kp izolatlarının %86-93'ü fosfomisine duyarlı olarak bulunmuştur (99,100). Kaase ve ark. (101) yaptıkları bir çalışmada, içinde farklı tip karbapenemaz enzimi (KPC, OXA-48,VIM, NDM) üreten 80 *Enterobacterales* izolatının da dahil olduğu toplamda 107 adet karbapenem dirençli *Enterobacterales* suşunun fosfomisin duyarlılığını agar dilüsyon yöntemi ile çalışmışlardır. İzolatların %78'ini fosfomisine duyarlı (MİK $\leq$ 32 mg/l) olarak tespit etmişlerdir. MİK₅₀ ve MİK₉₀ sırasıyla 8 mg/l ve 512 mg/l olarak tespit edilmiştir. *E. coli* suşlarının fosfomisin MİK değerleri *K. pneumoniae* ve *E. cloacae* suşlarından önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur. CLSI kriterleri baz alındığında fosfomisinin ESBL pozitif *Enterobacterales* üyelerine karşı kümülatif duyarlılığı %91,3 olarak bildirilmektedir. Bazı çalışmalar ise bu literatür verilerinin aksini göstermektedir. Fosfomisinin klinik uygulamada yaygın veya artan direnç durumu nadir görülmesine rağmen; in vitro çalışmalarda fosfomisine karşı hızlı direnç geliştiği bildirilmiştir (45). Fosfomisin; *Klebsiella*, *Enterobacter* ve

Serratia türleri için oldukça yüksek bir MİK'e sahiptir (48). *Enterobacterales* üyelerine karşı fosfomisin duyarlılığının %50'den daha az olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Başka bir çalışmada ise fosfomisinin *Klebsiella* türlerinin sadece %50'sine karşı etkili olduğu bildirilmiştir (90,102).

Bu çalışmada *K. pneumoniae* izolatlarının fosfomisin MİK değerleri agar dilüsyon yöntemi sonucunda 16-512 mg/l arasında; fosfomisin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ise sırası ile 256 mg/l ve 512 mg/l bulunmuştur. Agar dilüsyon yöntemi sonucunda izolatların sadece 2 tanesi fosfomisine duyarlı (MİK: 16mg/l), %97,2'si fosfomisine dirençli (MİK>32 mg/l) tespit edilmiştir.

Son yıllarda MDR ve XDR izolatlarla gelişen enfeksiyonların tedavisinde yaşanan sorunlar fosfomisinin diğer bazı antibiyotiklerle kombinasyonunu tekrar gündeme getirmiştir (53). Fosfomisin MDR ve PDR Gram-negatif bakterilerin tedavisinde güvenle kullanılabilen etkili bir antibiyotiktir (58). IV fosfomisin tek başına sistemik enfeksiyonların tedavisinde kullanıldığında direnç gelişebildiği için bu enfeksiyonların tedavisinde IV fosfomisinin başka antibiyotiklerle kombine olarak kullanılması önerilmektedir (89). Fosfomisini diğer antibiyotiklerle kombine olarak kullanmak, zamanla fosfomisine direnç gelişimini de azaltacaktır (3).

Fosfomisinin diğer antibiyotiklerle in vitro etkileşimi başta CB yöntemi olmak üzere zamana karşı öldürme deneyleri, agar dilüsyon, SMD ve gradyan testi yöntemleriyle değerlendirilmektedir. CB yönteminin çalışması ve sonuçları yorumlaması kolay olduğu için bu yöntem araştırmacılar tarafından en sık tercih edilen sinerji saptama yöntemidir. Sinerjik aktivitenin saptanması için FİKİ ve koloni sayısındaki azalma kullanılmaktadır. *K. pneumoniae* izolatlarına karşı fosfomisin ile diğer antibiyotikler arasında görülen sinersit etkinin *K. pneumoniae* suşlarında bulunan dirence sebep olan enzimle ilişkili olduğu gösterilmiştir (44,51,70,72). Bu çalışmada agar dilüsyon yöntemi ile çalışılan fosfomisin kombinasyonlarının in vitro etkileşimleri CB yöntemi ile saptanmıştır.

Yapılan bazı in vitro çalışmalarda fosfomisin ile aminoglikozidler, bazı beta-laktam grubu antibiyotikler ve diğer bazı ajanlar birlikte kullanıldığında; özellikle dolaşım, üriner sistem, solunum yolu enfeksiyonlarında görülen bakteriyel etkenlere karşı sinerjist etki oluşturduğu bildirilmiştir Sinerjist etkinin yanı sıra çeşitli antimikrobiyal ajanların neden olduğu nefrotoksisiteyi azaltması ve bazı penisilin

bağlayıcı proteinlerin ekspresyonunu azaltması da fosfomisin diğer antibiyotiklerle kombine edilme nedenleri arasındadır (1,58,61,87,88).

Fosfomisin aminoglikozid grubu bir antibiyotik ile kombine kullanılması durumunda sinerjist ve additif antibakteriyel etki görülmektedir. Bununla birlikte kombine kullanımda aminoglikozidlerin nefrotoksik yan etkilerinde azalma olduğu da gösterilmiştir (55,56,57). *K. pneumoniae* izolatlarında fosfomisinin beta-laktam antibiyotiklerle sinerjist etki göstermesinin nedeni olarak kombinasyona giren antibiyotiklerin hücre duvarı sentezini farklı aşamalarda inhibe etmesi gösterilmiştir. Örneğin; fosfomisin hücre duvarı sentezinin ilk aşamasını, beta-laktamlar ise son aşamasını inhibe ederek etki etmektedir (103). Ayrıca fosfomisinin PBP'lerin işlevini değiştirme gücü, fosfomisin ve beta-laktam antibiyotikler arasındaki sinerjik etkiyi indükleyebilir (104,105).

ESBL-pozitif *K. pneumoniae* izolatlarında fosfomisinin diğer antibiyotiklerle sinerjist etkisi farklı oranlarda bulunmuştur. Karbapenemlerden en yüksek sinerji oranı imipenemle olmak üzere karbapenemlerle %43-78, kolistin ile %7, tigesiklin ile %21 ve netilmisin ile %43 oranlarında sinerjik aktivite göstermiştir (56).

Fosfomisinin, karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarına karşı karbapenemlerle %70, netilmisinle %42, tigesiklinle %30 ve kolistinle %36 sinerjist etkili olduğu göstermiştir. KPC-2 üreten *K. pneumoniae* izolatlarına karşı fosfomisin; meropenem ile %65, kolistin ile %12 sinerjist etki göstermiştir. Aynı izolatlara karşı gentamisinle kombinasyonunda ise farksız etki göstermiştir (32). Benzer olarak VIM ve NDM üreten *K. pneumoniae* izolatlarında da fosfomisin-kolistin, fosfomisin-kolistin-meropenem kombinasyonları sinerjik etki göstermiştir (106). Türkiye’de yapılan 12 adet OXA-48 üreten *K. pneumoniae* suşuna karşı fosfomisinin imipenem, meropenem, kolistin ve tigesiklin ile kombinasyonunun in vitro sinerjistik aktivitesinin değerlendirildiği bir çalışmada; fosfomisin kombinasyonu imipenem, meropenem ile sırasıyla %42 ve %33 oranlarında sinerjistik bulunmuştur. Çalışmada sadece 1 izolat fosfomisine duyarlı, kalan 11 izolat dirençli bulunmuştur. Çalışmada *K. pneumoniae* izolatlarına karşı fosfomisinin kolistin ile kombinasyonu antagonist etki göstermiştir (4).

Avery ve ark. (107) KRE izolatlarında fosfomisinin, piperasilin/tazobaktam, tobramisin, aztreonam, sefepim, seftazidim, seftazidim/avibaktam,

seftolozan/tazobaktam ve meropenem paranteral antibiyotikleri ile etkileşimlerini gradyan difüzyon şeridi çapraz test yöntemi ile belirlemiştir. İzolatların hiçbirine karşı antagonizma gözlenmezken; %22'sine karşı fosfomisin ile diğer antibiyotiklerin sinerjistik veya additif etkili olduğu belirtilmiştir. Çalışma için seçilen izolatlar, en az 1 karbapenemaz (KPC, NDM veya OXA) içeriyordu. Üç *K. pneumoniae* izolatı, farklı Ambler sınıflarından (NDM ve OXA-48 benzeri) karbapenemazları birlikte ürettiği tespit edildi. Sınıf B VIM enzimleri 3 *K. pneumoniae* izolatında mevcuttu. Ek olarak, 17 (%34,7) KRE izolatı AmpC-pozitif ve 16 (%32,7) izolatta kesik porinler (yani OmpC, OmpF veya OmpK) tespit edildi. *K. pneumoniae* izolatlarına karşı fosfomisin MİK_{50/90}'ı sırası ile ≥ 1024 , ≥ 1024 mg/l idi. MİK'ler *Klebsiella* spp. için en yüksekti. (N=35, MİK₅₀ ≥ 1024 mg/l). Onbir fosA-pozitif *K. pneumoniae* izolatı için fosfomisin MİK'leri 96 ila ≥ 1024 mg/L arasında çok yüksek olarak saptanmıştır (MİK₅₀ ≥ 1024 mg/l). Çalışmada tüm KRE izolatlarına karşı meropenem-fosfomisin sinerji oranı %2, additif etki oranı %20,4 indifferans etki %77,6 bulunmuştur (107).

Samonis ve ark. (103) MDR *K. pneumoniae* suşlarında fosfomisinin karbapenemler ile sinerjistik etkili olduğunu bildirmiştir. Çalışmalarında 50 serin karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* izolatına karşı fosfomisinin imipenem, meropenem ile sinerji oranları sırasıyla %74 ve %70 olarak raporlanmıştır.

Toplam 136 adet (45 kan, 39 dren, 32 idrar, 9 katater, 8 safra, 2 yara ve 1 adet de dışkı örneğinden olmak üzere) KPC Kp suşunun dahil edildiği bir çalışmada; izolatların fosfomisin ile imipenem, ertapenem, tigesiklin, kolistin ve amikasin antibiyotikleriyle etkileşimleri CB yöntemi ile incelenmiştir. Fosfomisin-amikasin kombinasyonunun KPC Kp suşlarında kalıcı bakterisidal etkinlik ile terapötik bir seçenek olabileceği bildirilmiştir. Tüm suşlar (%100) ETP'ye dirençli, 19 izolat (%14,0) imipeneme, %42,8'i fosfomisine ve %41,2'si amikaseine duyarlı bulunmuştur. Fosfomisinin bir karbapenem grubu antibiyotik ile (imipenem ve ertapenem) kombinasyonunda en büyük sinerjistik etki görülmüştür (sırasıyla izolatların %15,4 ve %22,1'ine karşı). Fosfomisin-amikasin arasında sinerjistik etkinin görüldüğü suş sayısı 7 (%5,1) idi. Fosfomisin-imipenem ve fosfomisin-amikasin kombinasyonlarında additif etkinin görüldüğü suş sayısı sırası ile 114 (%83,8) ve 109 (%80,1) bulunmuştur. Aynı antibiyotik kombinasyonlarında indifferan etkinin

görüldüğü suş oranı sırası ile %0,7 ve %14,7 idi. Hiçbir suşa karşı fosfomisin-imipenem ve fosfomisin-amikasin arasında antagonist etkileşim bulunmamıştır. Fosfomisin-imipenem ve fosfomisin-ertapenem kombinasyonlarında, fosfomisine duyarlı izolatlar karşı (sırasıyla %20,7 ve %34,5) fosfomisine dirençli izolatlar göre daha fazla in vitro sinerjistik aktivite gösterdi (108).

Özellikle fosfomisine duyarlı izolatlarda izolatların amikasinine dirençli olup olmadığına bakılmaksızın fosfomisin-amikasin kombinasyonu ile 24 saat boyunca sinerjik ve bakterisidal bir etki (4-5 log₁₀ CFU/ml'ye kadar) gösterilmiştir. Buna bağlı olarak fosfomisin-amikasin kombinasyonun gelişmiş antibakteriyel aktivite göstereceği düşünülmektedir. Dört mg/l ve altındaki MİK'lerde fosfomisin ve karbapenemleri (özellikle imipenem) içeren ampirik bir kombinasyon rejiminin, KRE enfeksiyonlarını tedavi etmek için bir adjuvan rejim olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Fosfomisin-amikasin kombinasyonu, amikasinin MİK değerinin altında kullanıldığında bile 24 saat boyunca en iyi bakterisit etkiyi göstermiştir. Bunun nedeni, fosfomisinin hücre içine amikasin alımını artırması ve bunun sonucunda protein sentezini inhibe etmek ve büyümeyi geciktirmek için yeterli bir hücre içi konsantrasyona yol açması olabilir (108).

Çoklu ilaca dirençli *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve heterojen MRSA çalışmaları, fosfomisin-amikasin kombinasyonunun in vitro katkı ve sinerjik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (109,110).

Cai ve ark. (109), fosfomisin-aminoglikozid kombinasyonlarının in vitro olarak pozitif bir etki göstermesinin yanı sıra, biyofilm ile enfekte olmuş bir sıçan modelinde terapötik etkileri iyileştirdiğini gösterdi. Geriye dönük bir çalışma, fosfomisin-amikasin kombinasyonunun etkinlik ve bakteriyel klirens oranının %71,4 olduğunu, buna karşın tek başına amikasinin sırasıyla %57,1 ve %28,6 ve tek başına fosfomisininin sırasıyla %33,3 ve %16,7 olduğunu göstermiştir (111).

Vergara-López ve ark. (110), metisiline dirençli *S. epidermidis* ve karbapenem dirençli *K. oxytoca*'nın izole edildiği sistemik bir enfeksiyon bildirmiştir. Amikasin birincil antimikrobiyal ve fosfomisini yardımcı tedavi olarak kullandılar ve yüksek dozlarda fosfomisinin uzun süreli kullanımının yararlı olduğunu ve mükemmel bir güvenlik profiline sahip olduğunu buldular.

Fosfomisin, KPC Kp izolatlarına karşı imipenem, ertapenem, tigesiklin, kolistin ve amikasinin antibakteriyel aktivitesini artırmaktadır. Bununla birlikte, fosfomisin-amikasin kombinasyonunun, neden olan bakteriler amikasına dirençli olduğunda bile, KPC Kp enfeksiyonları için terapötik bir seçenek olarak büyük bir potansiyel göstermektedir (108). KPC Kp izolatlarında, in vitro olarak zamana karşı öldürme eğrisi yöntemiyle fosfomisin ve meropenem arasında sinerji gözlenmiştir (106,112).

Tamamı kandan izole edilmiş karbapenemlere ve kolistine dirençli 9 adet *K. pneumoniae* suşunun enfeksiyon etkeni olduğu 9 hastanın incelendiği bir çalışmada fosfomisin tedavisi in vivo olarak incelenmiştir. Fosfomisinin meropenem ile kombinasyonu sonucundaki etkileşimler de in vitro incelenmiştir. İn vitro çalışma sonuçlarına göre tüm suşlar fosfomisine dirençli saptanmıştır (MİK: 256 mg/l->1024 mg/l). Fosfomisin MİK₅₀ ve MİK₉₀ sırasıyla 512 mg/l ve 1024 mg/L idi. Tüm suşlar meropeneme dirençli bulunmuştur. Tedavide fosfomisinin en sık meropenem ile kombine olarak kullanılmıştır. Fosfomisin MİK değerleri agar dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Fosfomisin+meropenem alan hastalardan elde edilen izolatlar, dama tahtası ve zaman öldürme deneyleriyle sinerjizm açısından araştırılmıştır. 9 *K. pneumoniae* suşunun 7 tanesinde CB yöntemi ile fosfomisin-meropenem etkileşimi araştırıldı. 7 izolatın hepsinde fosfomisin ve meropenem arasında sinerjizm meydana geldi. İzolatların tamamı zaman öldürme deneylerine tabi tutulmuştur. Test edilen 9 *K. pneumoniae* suşundan 8'inde (%88,8) fosfomisin-meropenem arasında sinerjizm 1'inde indiferan etkileşim görülmüştür. Meropenem MİK'leri yüksekti. Fosfomisin MİK'leri de yüksekti. Bu da monoterapinin başarısını sınırlamış olabilir. Fosfomisin ve meropenem kombine edildiğinde çoğu izolatta sinerjizm meydana geldi. Bazı çalışmalar, meropenem ile çoğunlukla kolistin olmak üzere diğer antimikrobiyaller arasında sinerjizm olduğunu göstermektedir (113).

Yirmi birinci yüzyılda tekrar gündeme gelen IV fosfomisinin literatürde tedavide kullanıldığı klinik çalışmalar sınırlıdır. IV fosfomisin özellikle ciddi enfeksiyonlarda diğer bazı antibiyotiklerle kombine olarak günde 3-4 defa, 2-24 gr dozunda kullanılmaktadır (45).

Primer olarak MRSA, MRSE, VRE, MDR *Enterobacterales* ve MDR *P. aeruginosa* suşlarının etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde diğer bazı

antibiyotiklerle (beta-laktamlar, florokinolonlar, karbapenemler, glikopeptidler ve aminoglikozidler) kombine edilerek kullanılabilen bir antibiyotiktir (3). Bununla beraber fosfomisin meropenem ile kombine olarak tedavide kullanıldığına dair klinik çalışmalar çok azdır (114). MDR Gram-negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde fosfomisin ile başka antibiyotiklerin kombinasyon tedavisi hala tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda faydalı bulunmuşken (115,116); bazılarında ise aksine faydalı bulunmamıştır (117).

Apisarnthanarak ve Mundy (118) *P. aeruginosa*'nın etken olduğu pnömoni olgularını retrospektif olarak incelemek için çalışmalarında, tedavide fosfomisin-kolistin ve fosfomisin-doripenem kombinasyonlarının etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Grabein B ve ark. (119) meta analizlerinde IV fosfomisin tedavisi almış toplam 5527 hastanın değerlendirildiği 128 çalışma incelenmiştir. Hastalarda sıklıkla sepsis, İYE, solunum yolu enfeksiyonu, kemik ve eklem enfeksiyonları, santral sinir sistemi enfeksiyonları görülmüştür. 1990 yılından sonra yapılan çalışmalarda sıklıkla MDR enfeksiyonlar için IV fosfomisin ile beta-laktam veya aminoglikozid grubu antibiyotikler kombine şekilde kullanılmıştır. Karşılaştırmalı çalışmalarda IV fosfomisin ve diğer antibiyotikler arasında klinik (OR 1,44, %95 CI 0,96-2,15) veya mikrobiyolojik (OR 1,28, %95 CI 0,82-2,01) etkinlik açısından hiçbir fark gözlenmemiştir. Tedavide tek başına IV fosfomisin kullanıldığında direnç gelişme oranı %3,4 olarak saptanmıştır. IV fosfomisin tedavisi genellikle tedavinin kesilmesini gerektirmeyen hafif yan etkilerle birlikte, olumlu bir güvenlik profili göstermiştir.

KPC Kp suşlarının etken olduğu hastane enfeksiyonlarında IV fosfomisin (2-4 gr, 4×1) tedavisi klinik başarı sağlamıştır (120). In vitro olarak fosfomisine duyarlı olup XDR veya PDR olan izolatların (41 adet *K. pneumoniae* ve 17 adet *P. aeruginosa* izolatı) etken olduğu yoğun bakımda tedavi gören 48 bakteriyemi ve ventilatörle ilişkili pnömoni hastasının incelendiği prospektif, gözlemsel bir çalışmada, IV fosfomisin ile tigesiklin veya kolistinin kombine olarak uygulandığı hastaların %54'ünde klinik; %56'sında mikrobiyolojik yanıt elde edilmiştir. Tedavi sırasında üç olguda fosfomisine direnç gelişmiştir (121).

Bu çalışmada *K. pneumoniae* izolatlarının agar dilüsyon yöntemi sonucunda fosfomisin MİK değerleri 16-512 mg/l, amikasin için 0,5-128 mg/l, meropenem için

0,25-128 mg/l ve imipenem için 0,5-32 mg/l arasında bulunmuştur. Fosfomisin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırası ile 256 mg/l ve 512 mg/l, amikasin için sırası ile 64mg/l ve 128 mg/l, meropenem için sırası ile 32 mg/l ve 32 mg/l, imipenem için sırası ile 16 mg/l ve 32 mg/l bulunmuştur. Agar dilüsyon yöntemi sonucunda izolatların %97,2'si fosfomisine, %69'u amikasına, %84,5'i meropeneme ve %94,4'ü imipeneme dirençli bulunmuştur. Agar dilüsyon ile kombinasyon çalışması sonucunda; izolatların %25,35'inde fosfomisin-amikasin, %45,07'sinde fosfomisin-meropenem ve %21,12'sinde fosfomisin-imipenem kombinasyonu sinerjist etki gösterdi. Additif etki ise fosfomisin-amikasin için %46,47, fosfomisin-meropenem için %28,16 ve fosfomisin-imipenem için %38,02 saptanmıştır. Tüm izolatlar ve tüm kombinasyonlar içerisinde sadece tek bir suşta fosfomisin-amikasin kombinasyonunda antagonist etki tespit edilmiştir.

Yapılan fosfomisin ile diğer antibiyotikler arasındaki in vitro sinerji çalışmaları in vivo olarak hasta tedavilerinde kombinasyon seçenekleri için yol gösterici olmaktadır. Bununla beraber literatür verileri klinik yanıt ile in vitro çalışma sonuçlarının her zaman uyumlu olmadığını da göstermektedir. Örneğin karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında in vitro olarak sıklıkla etkileşimi araştırılan fosfomisin-karbapenem, fosfomisin-kolistin, fosfomisin-aminoglikozid kombinasyonlarının sinerjik aktivitenin değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir. Hatta bazı çalışmalarda karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşlarına karşı bu kombinasyonlarda antagonist etki bile saptanmıştır (122). Preklinik çalışmalarda, *K. pneumoniae*'ye (geniş spektrumlu beta-laktamaz üreten ve KPC üreten izolatlar dahil) karşı (birçok izolat ikinci ilaca dirençli olmasına rağmen), fosfomisin bazlı kombinasyon tedavisinin sinerjik etkileri olduğunu göstermiştir (4,103,123). Bununla birlikte bir çalışmada kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni olan KRE (OXA-48 üreten) bakterilerine karşı kombinasyon tedavilerinin yüksek tedavi başarısızlığı ile sonuçlandığı bildirilmiştir (4). Farklı etkileşimlerin sebebinin, izolatlarda eşzamanlı olarak bulunabilecek eflüks pompası, hedef modifikasyonu veya bir plazmid üzerinde bulunan farklı direnç genlerinin aynı bakteriye aktarılması, klinik tanı, tedavinin başlangıcı ve hastanın immünsistemi gibi çeşitli faktörlere bağlı olabileceği düşünülmektedir (4,122).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İnvaziv MDR bakterilerin tedavisinde yeni antimikrobiyallere olan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. Eski antibiyotiklerin kombinasyon şeklinde tedavide kullanımı yeni antibiyotikler keşfedilene kadar çözüm olarak düşünülebilir. Fosfomisin oral formu uzun yıllardır İYE’de güvenle kullanılan bir antibiyotiktir. Fosfomisin IV formulasyonu (disodyum tuzu) ise MDR ve karbapenemlere dirençli *K. pneumoniae* suşlarının etken olduğu invaziv enfeksiyonlara karşı meropenem, amikasin ve imipenem ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* suşları üzerinde fosfomisin kombinasyon çalışmaları hala sınırlıdır. Bu nedenle daha fazla in vitro ve in vivo çalışmaya ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Baylan O. Fosfomycin: Past, present and future [Fosfomisin: Dünü, bugünü ve geleceği]. Mikrobiyol Bul. 2010;44(2):311-21.
2. Bader MS, Loeb M, Brooks AA. An update on the management of urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance. Postgrad Med. 2017;129(2):242-58.
3. Zhanel GG, Zhanel MA, Karlowsky JA. Intravenous fosfomycin: An assessment of its potential for use in the treatment of systemic infections in Canada. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2018; 2018: 8912039.
4. Evren E, Azap ÖK, Çolakoğlu Ş, Arslan H. In vitro activity of fosfomycin in combination with imipenem, meropenem, colistin and tigecycline against OXA 48–positive *Klebsiella pneumoniae* strains. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;76(3):335-8.
5. Wei W, Hai-fei Y. Synergy against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in vitro by two old antibiotics: colistin and chloramphenicol. Int J Antimicrob Agents. 2017;49(3):321-6.
6. Tuon FF, Rocha JL, Merlini AB. Combined therapy for multi-drug-resistant *acinetobacter baumannii* infection-is there evidence outside the laboratory? J Med Microbiol. 2015;64(9):951-9.
7. Holmes EAF, Hughes DA. Challenges for economic evaluation of health care strategies to contain antimicrobial resistance. Antibiotics. 2019;8(4).
8. Sastry S, Doi Y. Fosfomycin: Resurgence of an old companion. J Infect Chemother. 2016;22(5):273-80.
9. 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.213.
10. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 8th ed. Philadelphia: Elsevier; 2016.p.253.
11. Ku YH, Chuang YC, Chen CC, Lee MF, Yang YC, Tang HJ, et al. *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Meningitis: Epidemiology, Virulence and Antibiotic Resistance. Sci Rep. 2017; 7: 6634.

12. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 8th ed. Philadelphia: Elsevier; 2016. p. 253-254.
13. 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.499.
14. 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.235,269-270.
15. Lewinson W. Review of Medical Microbiology and Immunology. Çev: Şener B, Esen B M-H, editor.
16. Vuotto C, Longo F, Pascolini C, Donelli G, Balice MP, Libori MF, et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. J Appl Microbiol. 2017 Oct;123(4):1003-1018.
17. Cescutti P, De Benedetto G, Rizzo R. Structural determination of the polysaccharide isolated from bio films produced by a clinical strain of *Klebsiella pneumoniae*. Carbohydr Res. 2016;430(22): 29-35.
18. Lee CR, Lee JH, Park KS, Jeon JH, Kim YB, Cha CJ, et al. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms. Front Cell Infect Microbiol. 2017 Nov 21;7:483.
19. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. Proc Natl Acad Sci USA. 2015;112(27):E3574-81.
20. Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. Microbiol Spectr. 2016;4(1).
21. Holden VI, Breen P, Houle S, Dozois CM, Bachman MA. *Klebsiella pneumoniae* Siderophores Induce Inflammation, Bacterial Dissemination, and HIF-1 Stabilization during Pneumonia. mBio. 2016 Sep 13;7(5):e01397-16.

22. Eghbalpoor F, Habibi M, Azizi O, Karam MRA, Bouzari S. Antibiotic resistance, virulence and genetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* in community- And hospital-acquired urinary tract infections in Iran. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2019;66(3):349-66.
23. Caneiras C, Lito L, Melo-Cristino J, Duarte A. Community-and hospital-acquired *Klebsiella Pneumoniae* urinary tract infections in Portugal: Virulence and antibiotic resistance. *Microorganisms*. 2019;16;7(5):138.
24. Domenico P, Salo RJ, Cross AS, Cunha BA. Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*. 1994;62(10):4495–9.
25. Høiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *Apmis*. 2017;125(4):272-5.
26. Cag Y, Caskurlu H, Fan Y, Cao B, Vahaboglu H. Resistance mechanisms. *Ann Transl Med*. 2016;4(17):2-9.
27. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41(3):252-75.
28. Stuart JC, Leverstein-Van Hall MA. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36:205-10.
29. 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. 271.
30. Yamane K, Wachino JI, Doi Y, Kurokawa H, Arakawa Y. Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(6):951-3.
31. Ma L, Lin CJ, Chen JH, Fung CP, Chang FY, Lai YK, et al. Widespread dissemination of aminoglycoside resistance genes *armA* and *rmtB* in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Taiwan producing CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(1):104-11.
32. Nasiri G, Peymani A, Farivar TN, Hosseini P. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* collected from Qazvin and Tehran provinces, Iran. *Infect Genet Evol*. 2018;64:219-24.

33. Elgendy SG, Abdel Hameed MR, El-Mokhtar MA. Tigecycline resistance among *Klebsiella pneumoniae* isolated from febrile neutropenic patients. J Med Microbiol. 2018;67(7):972-5.
34. Izadpanah M, Khalili H. Antibiotic regimens for treatment of infections due to multidrug-resistant Gram-negative pathogens: An evidence-based literature review. J Res Pharm Pract. 2015;4(3):105-14.
35. Petrosillo N, Taglietti F, Granata G. Treatment Options for Colistin Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Present and Future. J Clin Med. 2019;8(7):934.
36. Ernst CM, Braxton JR, Rodriguez-Osorio CA, Zagieboylo AP, Li L, Pironti A, et al. Adaptive evolution of virulence and persistence in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Nat Med. 2020;26:705-711.
37. Fasciana T, Gentile B, Aquilina M, Ciammaruconi A, Mascarella C, Anselmo A, et al. Co-existence of virulence factors and antibiotic resistance in new *Klebsiella pneumoniae* clones emerging in south of Italy. BMC Infect Dis. 2019;19(1):1-10.
38. Reynolds HY. Pneumonia due to *Klebsiella (Friedlanders pneumonia)*. In Wyngaarden JB, Smith LH, eds. Cecil Textbook of Medicine. 16th Ed. Philadelphia, PA: Saunders, 1982:1430-1432.
39. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 8th ed. Philadelphia: Elsevier; 2016. p. 262.
40. 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. 270.
41. Towner KJ. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. J Hosp Infect. 2009;73(4):355-63.
42. Van Looveren M, Goossens H, Baquero F, Bruce J, Cookson B, Cornaglia G, et al. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter spp.* in Europe. Clin Microbiol Infect. 2004;10(8):684-704.
43. Warren JW. Practice guidelines for the treatment of uncomplicated cystitis. Curr Urol Rep. 2001;2:326-9.
44. Silver LL. Fosfomycin: Mechanism and resistance. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017;7(2):1-11.

45. Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakas KZ. Fosfomycin. Clin Microbiol Rev. 2016;29(2):321-47.
46. Kollef MH, Ricard JD, Roux D, Francois B, Ischaki E, Rozgonyi Z, et al. A Randomized Trial of the Amikacin Fosfomycin Inhalation System for the Adjunctive Therapy of Gram-Negative Ventilator-Associated Pneumonia: IASIS Trial. Chest. 2017;151(6):1239-46.
47. Fosfomycin and derivatives by E. Bergogne-Berezin in antimicrobial agents. Bryskier A, ed. Washington, DC: ASM press, chapter 37 p.972.
48. Raz R. Fosfomycin: an old-new antibiotic. Clinical Microbiology and Infection. 2012;18(1).
49. Dijkmans AC, Zacarías NVO, Burggraaf J, Mouton JW, Wilms EB, Nieuwkoop CV, et al. Fosfomycin: Pharmacological, Clinical and Future Perspectives. Antibiotics (Basel). 2017 Oct 31;6(4):24
50. Kumar S, Parvathi A, Hernandez RL, Cadle KM, Varela MF. Identification of a novel UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) from *Vibrio fischeri* that confers high fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. Arch Microbiol 2009; 191: 425-9.
51. Díez-aguilar M. Current key topics in fosfomycin. Spanish J Chemother. 2019;32(1):8–18.
52. Popovic M, Steinort D, Pillai S, Joukhadar C. Fosfomycin: an old, new friend? Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010;29(2):127-42.
53. Hazırolan G. Fosfomisin: Geçmişe Dönüş. Klimik Derg. 2020;33(3):213-22.
54. Reffert JL, Smith WJ. Fosfomycin for the treatment of resistant gram-negative bacterial infections: Insights from the society of infectious diseases pharmacists. Pharmacotherapy. 2014;34(8):845-57.
55. Schito GC. Why fosfomycin trometamol as first line therapy for uncomplicated UTI? Int J Antimicrob Agents 2003; 22(Suppl 2): 79-83.
56. Greenwood D. Antibiotic and Chemotherapy. 8th ed. 2003, Churchill Livingstone, Toronto. p:294-6.

57. Garau J. Other antimicrobials of interest in the era of extended-spectrum β -lactamases: fosfomicin, nitrofurantoin and tigecycline. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(Suppl 1): 198-202.
58. Roussos N, Karageorgopoulos DE, Samonis G, Falagas ME. Clinical significance of the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of fosfomicin for the treatment of patients with systemic infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34(6):506-15.
59. O'Donnell J, Gelone S, Abrutyn E. Selecting drug regimens for urinary tract infections: Current recommendations. *Infect Med*. 2002;19(11):14-22.
60. Falagas ME, Kanellopoulou MD, Karageorgopoulos DE, Dimopoulos G, Rafailidis PI, Skarmoutsou ND, et al. Antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant Gram negative bacteria to fosfomicin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27(6):439-43.
61. Falagas ME, Giannopoulou KP, Kokolakis GN, Rafailidis PI. Fosfomicin: use beyond urinary tract and gastrointestinal infections. *Clin Infect Dis* 2008;46:1069-77.
62. Kastoris AC, Rafailidis PI, Vouloumanou EK, Gkegkes ID, Falagas ME. Synergy of fosfomicin with other antibiotics for Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010;66(4):359-68.
63. Falagas ME, Athanasaki F, Voulgaris GL, Triarides NA, Vardakas KZ. Resistance to fosfomicin: Mechanisms, Frequency and Clinical Consequences. *Int J Antimicrob Agents*. 2019;53(1):22-8.
64. Ito R, Mustapha MM, Tomich AD, Callaghan JD, McElheny CL, Mettus RT, et al. Widespread fosfomicin resistance in gram-negative bacteria attributable to the chromosomal *fosA* gene. *MBio*. 2017;8(4):1-9.
65. Campos AC da C, Andrade NL, Couto N, Muters NT, de Vos M, Rosa AC de P, et al. Characterization of fosfomicin heteroresistance among multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from hospitalized patients in Rio de Janeiro, Brazil. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020;22:584-93.
66. Falagas ME, Kopterides P. Old antibiotics for infections in critically ill patients. *Curr Opin Crit Care*. 2007;13:592-7.

67. Iarikov D, Wassel R, Farley J, Nambiar S. Adverse Events Associated with Fosfomycin Use: Review of the Literature and Analyses of the FDA Adverse Event Reporting System Database. *Infect Dis Ther*. 2015;4(4):433-58.
68. 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.1106-1115.
69. Koksall İ. Sinerji Testleri: Laboratuvaradan kliniğe yaklaşımlar. XXXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Girne, 11 Kasım 2010.
70. Bal Ç. Antibiyotik Kombinasyonlarının İn vitro Etkinliğinin Saptanması. *Flora*. 1999;4(4):219-229.
71. Aktaş G. Antibiyotik Kombinasyonları ve Sinerjistik Etkileşimleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 44(2):47-55, 2014.
72. 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.
73. Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (UMS). MİK Saptama Yöntemleri. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara; 2014.
74. 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.
75. 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;54(11):4678-83.
76. Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği. Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanları için Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Uygulama Rehberi-Solunum Sistemi Örnekleri, Ankara; 2015.
77. Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği. Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanları için Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Uygulama Rehberi-Deri, Deri Ekleri, Yumuşak Doku Örnekleri-Göz Örnekleri, Ankara; 2015.

78. MALDI Biotyper CA System- Clinical Application for Identification of Microorganisms. Billerica, MA; 2014. (Revision A).
79. 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.
80. 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.
81. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters-Version 11.0. 2021.
82. Antibiyotik Duyarlılık Testleri, EUCAST: Uygulama, Yorum ve Uzman Kurallar. Editör: Prof. Dr. Deniz Gür. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. Cilt 46. Ek Sayı 2016.
83. Grimm H. In vitro investigations with fosfomycin on mueller-hinton agar with and without glucose-6-phosphate. Infection. 1979;7(5):256-9.
84. Committee E, Testing S, Microbiology C, Escmid ID. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. Clin Microbiol Infect. 2000;6(9):509-15.
85. Canton R, Akova M, Carmelli Y, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. Clin Microbiol Infect. 2012;18:413-31.
86. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of β -lactamase inhibitors. Clin Microbiol Rev. 2010;23:160-201.
87. Perdigão Neto LV, Oliveira MS, Martins RCR, Marchi AP, Gaudereto JJ, Da Costa LATJ, et al. Fosfomycin in severe infections due to genetically distinct pan-drug-resistant Gram-negative microorganisms: Synergy with meropenem. J Antimicrob Chemother. 2019;74(1):177-81.
88. Kobayashi Y, Sumitani Y, Sugita K, Aikawa N. Antimicrobial activity of fosfomycin against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. Int J Antimicrob Agents. 2007;30(6):563-4.

89. Karageorgopoulos DE, Wang R, Yu X hong, Falagas ME. Fosfomycin: Evaluation of the published evidence on the emergence of antimicrobial resistance in gram-negative pathogens. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(2):255-68.
90. Falagas ME, Kastoris AC, Kapaskelis AM, et al. Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2010;10:43-50.
91. 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.
92. Perdigão-Neto LV, Oliveira MS, Rizek CF, Carrilho CM, Costa SF, Levin AS. Susceptibility of multiresistant gram-negative bacteria to fosfomycin and performance of different susceptibility testing methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(3):1763-7.
93. Liu HY, Lin HC, Lin YC, Yu SH, Wu WH, Lee YJ. Antimicrobial susceptibilities of urinary extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* to fosfomycin and nitrofurantoin in a teaching hospital in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2011;44(5):364-8.
94. Barry AL, Fuchs PC. In vitro susceptibility testing procedures for fosfomycin tromethamine. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35(6):1235-8.
95. Ballesterro-Téllez M, Docobo-Pérez F, Rodríguez-Martínez JM, Conejo MC, Ramos-Guelfo MS, Blázquez J, et al. Role of inoculum and mutant frequency on fosfomycin MIC discrepancies by agar dilution and broth microdilution methods in *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23(5):325-31.
96. Camarlinghi G, Parisio EM, Antonelli A, Nardone M, Coppi M, Giani T, et al. Discrepancies in fosfomycin susceptibility testing of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* with various commercial methods. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019;93(1):74-6.
97. Akpınar E. Üriner Sistem Enfeksiyonlarında İdrar Kültürlerinden İzole Edilen Gram Negatif Bakterilerde Fosfomisin Duyarlılığının Saptanmasında Otomatize SMD Sistemi (VİTEK-2) İle Agar Dilüsyon Yönteminin Karşılaştırılması.

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haydarpaşa Numune Sağlık Uygulama Ve Araştırma Merkezi, Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanlık Tezi, İstanbul 2020.

98. Aprile A, Scalia G, Stefani S, Mezzatesta ML. In vitro fosfomycin study on concordance of susceptibility testing methods against ESBL and carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. J Glob Antimicrob Resist. 2020;23:286-289.

99. Endimiani A, Patel G, Hujer KM, et al. In vitro activity of fosfomycin against blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(1):526-9.

100. Alexander BT, Marschall J, Tibbetts RJ, Neuner EA, Dunne WM Jr, Ritchie DJ. Treatment and clinical outcomes of urinary tract infections caused by KPC-producing *Enterobacteriaceae* in a retrospective cohort. Clin Ther. 2012;34(6):1314-23.

101. Kaase M, Szabados F, Anders A, Gatermann SG. Fosfomycin susceptibility in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from Germany. J Clin Microbiol. 2014;52(6):1893-7.

102. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, et al. What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. Int J Antimicrob Agents. 2011;37:415-9.

103. Samonis G, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Falagas ME. Synergy of fosfomycin with carbapenems, colistin, netilmicin, and tigecycline against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31(5):695-701.

104. Totsuka K, Uchiyama T, Shimizu K, Kanno Y, Takata T, Yashida T. In vitro combined effects of fosfomycin and β -lactam antibiotics against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Chemother. 1997;3:49-54.

105. Grossato A, Sartori R, Fontana R. Effect of non- β -lactam antibiotics on penicillin-binding protein synthesis of *Enterococcus hirae* ATCC 9790. J Antimicrob Chemother. 199;27(3):263-71.

106. Souli M, Galani I, Boukovalas S, Gourgoulis MG, Chryssouli Z, Kanellakopoulou K, et al. In vitro interactions of antimicrobial combinations with fosfomycin against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and protection of resistance development. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(5):2395-7.
107. Avery LM, Sutherland CA, Nicolau DP. In vitro investigation of synergy among fosfomycin and parenteral antimicrobials against carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019;95(2):216-220.
108. Yu W, Shen P, Bao z, Zhou K, Zheng B, Ji J, et al. In vitro antibacterial activity of fosfomycin combined with other antimicrobials against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;50(2):237-241.
109. Cai Y, Fan Y, Wang R, An MM, Liang BB. Synergistic effects of aminoglycosides and fosfomycin on *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and biofilm infections in a rat model. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64:563-6.
110. Vergara-Lopez S, Dominguez MC, Conejo MC, Pascual A, Rodriguez-Bano J. Prolonged treatment with large doses of fosfomycin plus vancomycin and amikacin in a case of bacteraemia due to methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and IMP-8 metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella oxytoca*. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70:313-15.
111. Zheng HL, Hua JY, Zhu YY. Therapeutic efficacy of amikacin combined with fosfomycin against bacteria producing KPC enzymes. *Chin J Nosocomiol*. 2014;24:2923-42.
112. Hashemian SMR, Farhadi Z, Farhadi T. Fosfomycin: The characteristics, activity, and use in critical care. *Ther Clin Risk Manag*. 2019;15:525-30.
113. Zusman O, Altunin S, Koppel F, Benattar YD, Gedik H, Paul M. et al. Polymyxin monotherapy or in combination against carbapenem-resistant bacteria: systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(1):29-39.
114. Kunakonvichaya B, Thirapanmethree K, Khuntayaporn P et al. Synergistic effects of fosfomycin and carbapenems against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2015;45:556-7.
115. Tumbarello M, Trecarichi EM, De Rosa FG et al. Infections caused by KPC producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70:2133-43.

116. Dinh A, Salomon J, Bru JP et al. Fosfomycin: efficacy against infections caused by multidrug-resistant bacteria. *Scand J Infect Dis*. 2012;44:182-9.
117. de Oliveira MS, de Assis DB, Freire MP, do Prado GVB, Machado AS, Abdala E, et al. Treatment of KPC-producing *Enterobacteriaceae*: suboptimal efficacy of polymyxins. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21:179.e1-7.
118. Apisarnthanarak A, Mundy LM. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia with intermediate minimum inhibitory concentrations to doripenem: combination therapy with high-dose, 4-h infusion of doripenem plus fosfomycin versus intravenous colistin plus fosfomycin. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39:271-2.
119. Grabein B, Graninger W, Rodríguez Baño J, Dinh A, Liesenfeld DB. Intravenous fosfomycin-back to the future. Systematic review and meta-analysis of the clinical literature. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23(6): 363-72.
120. Michalopoulos A, Virtzili S, Rafailidis P, et al. Intravenous fosfomycin for the treatment of nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: A prospective evaluation. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(2):184-6.
121. Pontikis K, Karaiskos I, Bastani S, Dimopoulos G, Kalogirou M, Katsiari M, et al. Outcomes of critically ill intensive care unit patients treated with fosfomycin for infections due to pandrug-resistant and extensively drug-resistant carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;43(1):52-9.
122. MacLeod DL, Velayudhan J, Kenney TF, et al. Fosfomycin enhances the active transport of tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(3):1529-38.
123. Bai Y, Liu B, Wang T, Cai Y, Liang B, Wang R, et al. In vitro activities of combinations of rifampin with other antimicrobials against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:1466-71.

8. EKLER

20.05.2022 10:39

Turnitin

Turnitin Originality Report					
Processed on: 20-May-2022 10:35 +03 ID: 1840456952 Word Count: 21998 Submitted: 1	<table><tr><td>Similarity Index</td><td>13%</td></tr><tr><td>Similarity by Source</td><td>Internet Sources: 12% Publications: 6% Student Papers: 4%</td></tr></table>	Similarity Index	13%	Similarity by Source	Internet Sources: 12% Publications: 6% Student Papers: 4%
Similarity Index	13%				
Similarity by Source	Internet Sources: 12% Publications: 6% Student Papers: 4%				
KLEBSİELLA PNEUMONİAE KLİNİK İZOLATLARINDA AGAR DİLÜSYON YÖNTEMİ İLE İNTRAVENÖZ FOSFOMİSİN DİRENCİNİN SAPTANMASI VE MEROPENEM, İMİPENEM, AMİKASİN ANTİBİYOTİKLERİ İLE SİNERJİST ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI By Nurullah Uzuner					
5% match (Internet from 07-May-2016) http://ftp.pwr.wroc.pl/OpenMandriva/openmandriva2013.0/repository/1386/main/release/avogadro-1.1.0-4-qmv2013.0.i586.rpm					
3% match (Internet from 23-Apr-2021) http://acikerisim.dicle.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11468/4516/539668.pdf?isAllowed=y&sequence=1					
2% match (Internet from 04-Dec-2021) http://acikerisim.dicle.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/11468/6540/Escherichia%20coli%2c%20Klebsiella%20pneumoniae%2c%20Pseudomonas%20aeruginosa%20antibiyotik%20direncliligi%20ara%C5%9Ftirmas%C4%B1.pdf?isAllowed=y&sequence=1					
1% match (publications) Paola Hoff Alves, Roberta Taufer Boff, Afonso Luis Barth, Andreza Francisco Martins. "Synergy of polymyxin B, tigecycline and meropenem against carbapenem-resistant Enterobacter cloacae complex isolates", Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2019					
1% match (Internet from 16-Apr-2021) http://docplayer.biz.tr/7825942-Fosfomisin-dunu-bugunu-ve-gelecegi.html					
1% match () Weide, H. (Hessel) van der, Brunetti, J. (Jlenia) et al. "Investigations into the killing activity of an antimicrobial peptide active against extensively antibiotic-resistant K. pneumoniae and P. aeruginosa", Elsevier BV, 2017					
1% match (Internet from 30-Jan-2022) https://9lib.net/document/ozl79oy4-direncli-acinetobacter-baumannii-suslari-na-cesitli-antibiyotik-kombinasyonlari-nin-sinerjistik.html					