



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KAN DOLAŞIM ENFEKSİYONUNA NEDEN OLAN
KARBAPENEM DİRENÇLİ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
İZOLATLARINDA ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİKLERİN BİYOFİLM
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. ŞEYMA BETÜL KAYHAN
TIPTA UZMANLIK TEZİ

SAMSUN-2022



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KAN DOLAŞIM ENFEKSİYONUNA NEDEN OLAN
KARBAPENEM DİRENÇLİ *KLEBSİELLA PNEUMONİAE*
İZOLATLARINDA ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİKLERİN BİYOFİLM
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Şeyma Betül KAYHAN
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç.Dr. İlkay BOZKURT

Bu tez Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
PYO.TIP.1904.22.001 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN-2022

TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmamın planlanması ve yürütülmesinde desteğini ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım ve saygıdeğer hocam Doç. Dr. İlkey BOZKURT'a,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım başta anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Esra TANYEL olmak üzere değerli hocalarım Prof Dr. Őaban ESEN, Prof. Dr. Aydın DEVECİ, Doç. Dr. Aynur ATİLLA, Doç. Dr. Fatih TEMOİN, Dr. Öğretim Üyesi Tuba Kuruoğlu ve Doç. Dr. Heval Can BİLEK'e,

Tez çalıŐmamın her aşamasında karşılaŐtığım sorunlarda sabırla tüm sorularıma cevap veren hocam Doç. Dr. Kemal BİLGİN'e,

Eğitim hayatım boyunca beraber çalıŐtığım tüm asistan, hemŐire ve personel arkadaşlarıma,

Benzer zamanlarda benimle aynı süreçlerden geçen, her zorluğumda yanımda olan sevgili annem Dr. Rahime KAYHAN, babam Doç. Dr. Mustafa KAYHAN ve sevgili kardeşlerim Ahmet Yasin ve Zeynep Beria'ya teşekkür ederim.

Dr. Şeyma Betül KAYHAN

BEYAN

“Kan Dolaşım Enfeksiyonuna Neden Olan Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Çeşitli Antibiyotiklerin Biyofilm Üzerine Etkisinin Araştırılması” başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, başka bir çalışmadan kopya edilmediğini, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Dr. şeyma Betül KAYHAN

ÖZET

Amaç: Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae*(KDKp) özellikle nozokomiyal enfeksiyonlarda sık karşılaşılan etkenlerdendir, yüksek mortalite ve morbiditeyle ilişkilidir. Biyofilm oluşumu da bakterinin antimikrobiyal direncine katkı sağlayan önemli bir virulans faktörüdür. İn-vitro testlere göre duyarlı antimikrobiyaller kullanılmasına rağmen tedavi yanıtı az hastalarda mutlaka akla gelmelidir. Günümüzde yeni β -laktam- β -laktamaz inhibitörü kombinasyonları önerilmektedir ancak bu antibiyotikler dünyanın çoğu bölgesinde ulaşılabilir değildir, bu nedenle eski antibiyotiklerin kombinasyon rejimiyle kullanımda sinerjistik etkileşimlerini araştırmak gereklidir. Bu çalışma ile bakteremi etkeni KDKp izolatlarının biyofilmi üzerine meropenem, polimiksin B ve tigesiklinin sinerjistik etkileşimlerinin araştırılması ve bu yolla yeni tedavi protokolleri oluştururken bu kombinasyonların in vitro etkileşimleri ile ilgili klinisyenlere fikir verilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Ocak 2019 ve Ocak 2022 tarihleri arasında OMÜTF Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen örneklerden KDKp izolatlarından biyofilm oluşturduğu saptanan 5 izolat seçilmiştir. Minimum inhibitör konsantrasyon(MİK), minimum biyofilm inhibitör konsantrasyon(MBİK) sonra da planktonik formda ve biyofilmde meropenem+polimiksin B ve tigesiklin+polimiksin B kombinasyonlarının sinerjistik etkileşimi araştırılmıştır.

Bulgular: Bakteremi etkeni KDKp izolatlarında biyofilm oluşturma oranı 11/125 saptanmıştır. MİK ve MBİK değerleri karşılaştırıldığında meropenem için 2-8 kat, polimiksin B için 2-128 kat, tigesiklin için 2-1024 kat artış saptanmıştır. Planktonik formda meropenem+polimiksin B kombinasyonunda 1/5 sinerji, 1/5 additif etki, tigesiklin+polimiksin B kombinasyonunda 1/5 additif etki görülmüştür. Biyofilmde ise meropenem+polimiksin B kombinasyonunda 3/5 additif etki, tigesiklin+polimiksin B kombinasyonunda 2/5 sinerji, 2/5 additif etki görülmüştür.

Sonuç: KDKp bakteremilerinde özellikle primer enfeksiyon odağı apse ve üriner sistem olanlarda daha sıklıkla biyofilm oluşturduğu ve biyofilm oluşumunun eşlik ettiği bakteremilerde tigesiklin+polimiksin B kombinasyonunun sinerjistik etkileşim görülebileceği bulunmuştur. Bu antibiyotik kombinasyonlarının, daha fazla izolat sayısı ile in-vitro ve in-vivo çalışmalarla araştırılmasının literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *K.pneumoniae*, bakteremi, biyofilm, antimikrobiyal direnç

ABSTRACT

Objectives: Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKp) is a common cause of nosocomial infections and is associated with high mortality and morbidity. Biofilm development is a significant virulence mechanism that contributes to bacterial antibiotic resistance. Even though using an antimicrobial known to be sensitive based on in-vitro findings, biofilm development should be considered in patients who do not respond to the treatment. New β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations are currently advised, but these drugs are unavailable in the majority of regions of the world, including Turkey. Therefore, it was critical to investigate the synergistic interactions between older antibiotics with combination regimens. The purpose of this study was to examine the synergistic effects of meropenem, polymyxin B, and tigecycline on the biofilm of bloodstream infection-causing CRKp isolates. Provide clinicians with an understanding of the in vitro interactions of various combinations while developing new therapy approaches.

Materials and methods: From the samples delivered to the Medical Microbiology laboratory between January 2019 and January 2022, five CRKp isolates that formed biofilm were chosen. The minimum inhibitory concentration (MIC), the minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC), and the synergistic interaction of meropenem+polymyxin B and tigecycline+polymyxin B combinations in planktonic form and biofilm were evaluated.

Results: The rate of biofilm formation in bacteremia-causing CRKp isolates was shown to be 11/125. Comparing MIC and MBIC values revealed a 2-8 fold increase for meropenem, a 2-128 fold increase for polymyxin B, and a 2-1024 fold increase for tigecycline. In planktonic form, 1/5 synergy, 1/5 additive, and 1/5 additive were seen in the combination of meropenem + polymyxin B and tigecycline + polymyxin B, respectively. In the biofilm, 3/5 additive were observed with meropenem + polymyxin B, whereas 2/5 synergy and 2/5 additive were observed with tigecycline + polymyxin B.

Conclusion: It has been discovered that biofilm production is more prevalent in CDKp bloodstream infections, particularly in those with abscess or urinary tract infection as the major infection focus. The combination of tigecycline and polymyxin B appears to have a synergistic effect on biofilm formation, and it is being considered for the treatment of bloodstream infections accompanied by biofilm formation. The literature requires that exploring these antibiotic combinations with additional isolates and in-vitro and in-vivo studies is conducted.

Key words: *K.pneumoniae*, bloodstream infection, biofilm, antimicrobial resistance

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
BEYAN	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Klebsiella pneumoniae.....	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. Mikrobiyolojik özellikler.....	4
2.1.3. Virulans faktörleri	5
2.1.4. Klinik özellikler.....	11
2.1.5. Tedavi.....	14
2.1.6. Antimikrobial direnç	23
2.2. Biyofilm.....	30
2.2.1. Biyofilmin yapısı ve mikrobiyolojik özellikler	31
2.2.2. Biyofilm oluşumu	32
2.2.3. Biyofilm ilişkili enfeksiyonlar.....	34
2.2.4. Biyofilm varlığında antibiyotik direnci ve direnç mekanizmaları.....	37
2.2.5. Biyofilmde saptama yöntemleri ve biyofilmde antimikrobiyal duyarlılık testleri..	42
2.2.6. Biyofilm ilişkili enfeksiyonların tedavisi	44
2.2.7. K.pneumoniae'da virulans faktörü olarak biyofilm.....	45
3. MATERYAL VE METOD	46
3.1. İzolatların seçimi	46
3.2. Biyofilm oluşum kapasitesinin ölçümü	46
3.3. Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK)) tespiti	47
3.4. Planktonik formda sinerji	49
3.5. Minimum biyofilm inhibitör konsantrasyon (MBİK) belirlenmesi	51
3.6. İkili kombinasyon ile biyofilm inhibisyonu gösterilmesi	53
4. BULGULAR	56

5. TARTIŞMA	75
6. SONUÇLAR	91
7. KAYNAKLAR	93
8. EKLER	110

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µL	: Mikrolitre
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AHL	: N-açıl-L-homoserin lakton
AI	: Autoinducer
ATCC	: American Type Culture Collection
AVI	: Avibaktam
CAESAR network	: Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance network
CAZ	: Seftazidim
CAZ-AVI	: Seftazidim-avibaktam
CDC	: Centers for Disease Control
Cfu	: Coloni forming unit
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
ÇİD/MDR	: Çoklu ilaca dirençli/Multidrug resistance
eDNA	: Ekstrasellüler DNA
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EPS	: Ekstrasellüler polimerik matriks
ESCMID	: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	: Food and Drug Administration
FİK	: Fraksiyone inhibitör konsantrasyon
FISH	: Floresan in situ hibridizasyon
GNB	: Gram negatif bakteri
GSBL	: Genişlemiş spektrumlu β-laktamaz
İBT	: İntrasellüler bakteriyel topluluklar
IDSA	: Infectious Diseases Society of America
İL	: İnterlökin
IMI-REL	: İmipenem-silastatin-relebaktam
İRT	: İnhibitör dirençli β-laktamaz
KA	: Klavulonik asit
KAMHB	: Katyon ayarlı Müller-Hinton Broth
KDE	: Karbapenem dirençli <i>Enterobacteriaceae</i>
KOAH	: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı

KPC	: <i>K.pneumoniae</i> carbapenemase
LPS	: Lipopolisakkarit
MBİK	: Minimum biyofilm inhibitör konsantrasyon
MBK	: Minimum bakterisidal konsantrasyon
MBL	: Metallo- β -laktamaz
MEM	: Meropenem
MEM-VAB	: Meropenem-vaborbaktam
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyon
NDM	: New Delhi MBL
OD	: Optik dansite
OD _c	: Cut-off optik dansite
OMP	: Dış membran proteini
OXA	: Oksasilinaz
PBP	: Penisilin bağlayan protein
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyon
PDR	: Pandrug resistance
PMB	: Polimiksin B
QS	: Quorum sensing
REL	: Relebaktam
RNA	: Ribonükleik asit
TGC	: Tigesiklin
TLR	: Toll-like reseptör
TMP-SMX	: Trimetoprim-sulfometoksazol
TNF	: Tümör nekrozis faktör
TSB	: Triptik Soy Broth
TZB	: Tazobaktam
USHİESA	: Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Surveryans Ağı
VAB	: Vaborbaktam
VİP	: Ventilatör ilişkili pnömoni
XDR	: Extensively drug resistance

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Karbapenem dirençli <i>Enterobacterales</i> enfeksiyonları için IDSA tedavi önerileri.....	20
Tablo 2. Ambler moleküler ve Bush-Jacoby fonksiyonel sınıflamasına göre β -laktamazlar	25
Tablo 3. Karbapenemazların genel özellikleri.....	29
Tablo 4. İzolatların OD değerlerinin pozitif ve negatif kontrole göre biyofilm oluşum kapasitesi açısından değerlendirilmesi.....	47
Tablo 5. İzolatların meropenem, polimiksin B ve tigesiklin MİK değerlerine göre antimikrobiyal duyarlılık açısından değerlendirilmesi.....	49
Tablo 6. Dama tahtası yönteminde mikrodilüsyon elde edilen antibiyotiklerin plak görünümü.	50
Tablo 7. MBİK tespiti için plak görünümü.....	52
Tablo 8. Biyofilm üzerine ikili antibiyotik uygulanması deneyinin plak görünümü. 54	
Tablo 9. Çalışmaya dahil edilen izolatların özellikleri.....	56
Tablo 10. Çalışmaya dahil edilen izolatların meropenem, polimiksin B ve tigesiklin MİK ve MBİK değerlerinin karşılaştırılması.....	57
Tablo 11. Dama tahtası yöntemi ile planktonik formda sinerji tespiti.....	57
Tablo 12. İzolat-1'in meropenem-polimiksin B ve tigesiklin-polimiksin B kombinasyonu ile biyofilm inhibisyonu çalışılan tüm antibiyotik konsantrasyonları ve biyofilm inhibisyonu sonuçları.....	58
Tablo 13. Polimiksin B'nin meropenem ve tigesiklinle kombinasyonlarının İzolat-1'in biyofilmi üzerine etkisi.....	59
Tablo 14. İzolat-2'nin meropenem-polimiksin B ve tigesiklin-polimiksin B kombinasyonu ile biyofilm inhibisyonu çalışılan tüm antibiyotik konsantrasyonları ve biyofilm inhibisyonu sonuçları.....	60
Tablo 15. Polimiksin B'nin meropenem ve tigesiklinle kombinasyonlarının İzolat-2'nin biyofilmi üzerine etkisi.....	61
Tablo 16. İzolat-3'ün meropenem-polimiksin B ve tigesiklin-polimiksin B kombinasyonu ile biyofilm inhibisyonu çalışılan tüm antibiyotik konsantrasyonları ve biyofilm inhibisyonu sonuçları.....	63

Tablo 17a: Polimiksin B'nin meropenem ve tigesiklinle yüksek konsantrasyonda kombinasyonlarının İzolat-3'ün biyofilmi üzerine etkisi.....	64
Tablo 17b: Polimiksin B'nin meropenem ve tigesiklinle düşük konsantrasyonda kombinasyonlarının İzolat-3'ün biyofilmi üzerine etkisi.....	65
Tablo 18. İzolat-4'ün meropenem-polimiksin B ve tigesiklin-polimiksin B kombinasyonu ile biyofilm inhibisyonu çalışılan tüm antibiyotik konsantrasyonları ve biyofilm inhibisyonu sonuçları.....	67
Tablo 19a. Polimiksin B'nin meropenem ile kombinasyonu ve tigesiklinle yüksek konsantrasyonda kombinasyonlarının İzolat-4'ün biyofilmi üzerine etkisi.....	68
Tablo 19b. Polimiksin B'nin tigesiklinle düşük konsantrasyonda kombinasyonlarının İzolat-4'ün biyofilmi üzerine etkisi.....	68
Tablo 20. İzolat-5'in meropenem-polimiksin B ve tigesiklin-polimiksin B kombinasyonu ile biyofilm inhibisyonu çalışılan tüm antibiyotik konsantrasyonları ve biyofilm inhibisyonu sonuçları.....	71
Tablo 21. Polimiksin B'nin meropenem ile kombinasyonu ve tigesiklinle kombinasyonlarının İzolat-5'in biyofilmi üzerine etkisi.....	72
Tablo 22. Tüm izolatların tek kullanımında ve kombinasyon ile kullanımda biyofilm inhibe eden en düşük konsantrasyonları ve FİK indeksine göre yorumu.....	73
Tablo 23. Tüm izolatların planktonik formda ve biyofilmde sinerjistik etkilerinin karşılaştırılması ve sinerjistik etkileşim görülen antibiyotik kombinasyonları.....	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Biyofilm oluşum aşamaları.....	33
Şekil 3. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK tespiti.....	49
Şekil 4. İki farklı izolat için MBİK tespiti.....	53
Şekil 5. İki farklı izolat için biyofilm üzerine meropenem+polimiksin B ve tigesiklin+polimiksin B kombinasyonu uygulanması.....	55
Şekil 6. Polimiksin B'nin meropenem ve tigesiklin ile kombinasyonunda İzolat-1'in oluşturduğu biyofilmin gücüne etkisi.....	59
Şekil 7. Polimiksin B'nin meropenem ve tigesiklin ile kombinasyonunda İzolat-2'nin oluşturduğu biyofilmin gücüne etkisi.....	61
Şekil 8a. Polimiksin B'nin meropenem ve tigesiklinin yüksek konsantrasyonları ile kombinasyonunda İzolat-3'ün oluşturduğu biyofilmin gücüne etkisi.....	65
Şekil 8b. Polimiksin B'nin meropenem ve tigesiklinin düşük konsantrasyonları ile kombinasyonunda İzolat-3'ün oluşturduğu biyofilmin gücüne etkisi.....	66
Şekil 9a. Polimiksin B'nin meropenem ile ve tigesiklinin yüksek konsantrasyonları ile kombinasyonunda İzolat-4'ün oluşturduğu biyofilmin gücüne etkisi.....	69
Şekil 9b. Polimiksin B'nin tigesiklinin düşük konsantrasyonları ile kombinasyonunda İzolat-4'ün oluşturduğu biyofilmin gücüne etkisi.....	70
Şekil 10. Polimiksin B'nin meropenem ve tigesiklin ile kombinasyonunda İzolat-5'in oluşturduğu biyofilmin gücüne etkisi.....	72

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Klebsiella pneumoniae, *Enterobacteriaceae* ailesinden non-fermantatif Gram negatif basildir. Özellikle yenidoğan, yaşlılar ve immünsüprese hastalarda nozokomiyal enfeksiyona sebep olan fırsatçı bir patojendir. Son zamanlarda artan antibiyotik direnci nedeniyle tedavisinde güçlükler ile karşılaşmaktadır. Sınırlı tedavi seçenekleri ile nozokomiyal *K.pneumoniae*'nin yol açtığı enfeksiyonlar ise önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olabilmektedir (1, 2).

K.pneumoniae izolatları hastalar arasında kolaylıkla yayılarak hastane salgınlarına sebep olabilmektedir (3). Ülkemizde tüm sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonların %19,2'sinden *Klebsiella* spp. sorumludur. Tüm kan dolaşım enfeksiyonlarının ise %18,7'sinde *Klebsiella* spp. etkindir (4). *K.pneumoniae*'nin antibiyotik direnci de hızla artmakta ve dünya genelinde yayılmaktadır. Çoğu Avrupa ülkesinde, yıllar içerisinde artan karbapenem direnç oranları bildirilmektedir. Türkiye'de ise Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance network (CAESAR) 2020 verilerine göre; *K.pneumoniae*'nin ertapenem direnci %51, imipenem/meropenem direnci %39 saptanmıştır (5). Ülkemiz Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Surveryans Ağı (USHIESA) 2020 etken dağılımı ve antibiyotik direnç raporuna göre ise *K.pneumoniae* meropenem direnci %61,9 ve kolistin direnci ise %30,4 saptanmıştır (4).

Antibiyotik direnci yanı sıra *K.pneumoniae*'nin biyofilm oluşturma yeteneği de tedaviyi zorlaştırmaktadır. Biyofilm; bazı mikroorganizmaların çevresel etkenlerden korunmak ve yaşamsal faaliyetlerine devam edebilmek amacıyla oluşturdukları kompleks mikrobiyal topluluktur (6). Biyofilm içindeki mikroorganizmalar, oksijen konsantrasyonu ve besinlerin kısıtlı olması nedeniyle fenotipik olarak değişikliğe uğrarlar (7). Ek olarak dışa atım pompaları, matriksteki enzimlere bağlı inaktivasyon gibi mekanizmalar olması, biyofilimde planktonik bakterilere göre daha yüksek oranlarda antibiyotik direnci olmasına yol açar (6). Örneğin *Pseudomonas aeruginosa*'nın planktonik formuna tobramisin 50 µg/mL konsantrasyonda etkili iken biyofilm içindeki bakterilerin 1 mg/L konsantrasyonda bile tobramisine dirençli olduğu tespit edilmiştir (8). Bakteriyel biyofilmler hem canlı dokular hem de implante medikal cihazlar üzerinde kolonize olabilirler. Tüm medikal cihazlar kolonizasyona

duyarlıdır. Hastane kaynaklı enfeksiyonların %60-70 kadarını medikal cihaz ilişkili enfeksiyonlar oluşturmaktadır (9). Başka bir çalışmaya göre ise yoğun bakım ünitelerinde kan dolaşım enfeksiyonlarının %87'si santral venöz kateter varlığında gelişmektedir (10).

Karbapenem dirençli *K.pneumoniae*'nin etken olduğu pnömoni ve sepsis başta olmak üzere her türlü nozokomiyal enfeksiyonda biyofilm formasyonunun da etkisi ile tedavi seçenekleri azalmaktadır. Gün geçtikçe yeni antibiyotikler geliştirilmekle birlikte, özellikle gelişmekte olan ülkelerde bu antibiyotiklere ulaşım imkanları kısıtlıdır ve yeni antibiyotiklerin biyofilm üzerine etkileri bilinmemektedir. Ülkemizde de yeni üretilen antibiyotiklerin erişiminde kısıtlılıklar vardır. Bu nedenle günlük pratikte mevcut antibiyotikler farklı kombinasyonlarla çok ilaca dirençli (ÇİD) *K.pneumoniae*'nin etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaya devam etmektedir. Özellikle klinik pratikte öne çıkan bazı antibiyotik kombinasyonlarının biyofilm üzerine etkisi ile ilgili çalışmaların gerekliliği ise kaçınılmazdır. Biz de bu çalışma ile kan dolaşım enfeksiyonu etkeni *K.pneumoniae* izolatlarında meropenem, polimiksin B, tigesiklin ve kombinasyonlarının biyofilm üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella genusu, 1886'da mikrobiyolog Edwin Klebs'in anısına isimlendirilmiştir. *Enterobacteriaceae* ailesinden gram negatif basillerdir. *Klebsiella* spp. çevrede yaygın olarak bulunur, ek olarak insanlarda nazofarenks, gastrointestinal sistem ve daha nadiren vücudun diğer bölgelerinde asemptomatik olarak kolonize olabilir. *K.pneumoniae*, *K.oxytoca* ve *K.granulomatis* insanlarda hastalık yapabilen başlıca *Klebsiella* türleridir. *K.ozaenae* ve *K.rhinoscleromatis*, DNA homolojisi ve karakteristik klinik özelliklerine bakıldığında *K.pneumoniae*'nin non-fermentatif alt grupları kabul edilmektedir (1).

2.1.1. Epidemiyoloji

İnsanlar *K. pneumoniae*'nin primer rezervuarıdır. Toplumda *K. pneumoniae* taşıyıcılığının dışkı örneklerinde %5-38, nazofarenkste %1-6 oranında olduğu tespit edilmiştir (3). Alkolik hastalarda daha yüksek taşıyıcılık oranları bildirilmiştir (11). Etnik olarak bakıldığında; Çinlilerde dışkıda taşıyıcılık oranlarının %19'dan %88'e kadar arttığı bilinmektedir. Yüksek gastrointestinal kolonizasyon oranlarının ise artmış enfeksiyon riski ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (1). Bu nedenle intestinal kolonizasyon varlığı Çinlilerde *K.pneumoniae* enfeksiyonu için majör risk faktörü olarak kabul edilebilir (12). Hastanede yatan hastalar incelendiğinde ise; dışkıda %77, farenkste %19 ve ellerde %42 gibi daha yüksek taşıyıcılık oranları görülmektedir. Nozokomiyal *Klebsiella* spp. kolonizasyon oranlarının topluma göre yüksek olması hastane florasına maruziyet, yapılan medikal girişimler ve antibiyotik kullanımı ile yakından ilişkilidir (3).

K.pneumoniae'nin etken olduğu pnömoni, karakteristik özellikleri nedeniyle Friedlander hastalığı olarak adlandırılmıştır. Bu özellikler arasında; özellikle alkoliklerde artmış görülme sıklığı, yaygın akciğer tutulumu, üst lobları tutma eğilimi, hemoptizi sonucu "frenk üzümü" renğinde balgam olması ve apse formasyonuna bağlı hassasiyet sayılabilir. Öne çıkan bu özelliklerine rağmen diğer etkenlerin neden olduğu pnömoni tablosundan spesifik olarak ayırt edilemez (1). Bazı hastalar altta yatan hastalıklara bağlı *K.pneumoniae* enfeksiyonuna topluma kıyasla daha duyarlı olabilirler (1, 11). Konakla ilişkili bu risk faktörleri arasında;

- Diyabetes mellitus
 - Kronik alkolizm
 - Maligniteler
 - Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH)
 - Hepatobiliyer hastalıklar
 - Glukokortikoid kullanımı
- Böbrek yetmezliği sayılabilir.

K. pneumoniae genellikle nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan fırsatçı bir patojendir ancak toplum kökenli enfeksiyonlara da neden olabilir. Üriner sistem enfeksiyonları, pnömoni ve bakteremi daha sık olmak üzere, karaciğer apsesi ve diğer intraabdominal enfeksiyonlar, yara enfeksiyonları, intravasküler ya da diğer invaziv cihaz ilişkili enfeksiyonlar, menenjit ve cerrahi alan enfeksiyonlarında etken olarak saptanabilmektedir. Üriner sistem dahil olmak üzere herhangi bir enfeksiyona sekonder bakteremilerde *Escherichia coli*'den sonra ikinci en sık etken olarak bildirilmektedir. Ülkemiz USHİESA verilerine göre 2020 yılında tüm hastane kaynaklı enfeksiyonların %19'unda, hastalık bazında bakıldığında ise pnömonilerin %21,4 ve kan dolaşım enfeksiyonlarının %18,7'sinde *Klebsiella* spp. etken olarak karşımıza çıkmaktadır (4).

2.1.2. Mikrobiyolojik özellikler

Diğer *Enterobacteriaceae* türlerine kıyasla daha kalın ve kısa özelliktedirler. Kirpik oluşturmazlar, hareketsizdirler ve polisakkarit yapıda kapsüle sahiptirler. Bu sayede mukoid koloniler oluşturabilirler ve Gram boyalı preparatlarda bile düzensiz sınırlı görülebilirler.

Klebsiella genusu ilk izole edildiklerinde Mac-Conkey agarda tipik olarak geniş, mukoid ve kırmızı koloniler oluştururlar. Kolonilerin etrafında agara doğru yayılan kırmızı renk laktoz fermentasyonu ve asit üretiminin göstergesidir. Fakültatif anaerobdurlar, anaerob şartlarda daha yavaş ürerler. Optimal üreme sıcaklığı 37°C'dir ancak türe göre 4-43°C'de de üreyebilirler. Soğuk ortamlarda daha sık kapsül oluştururlar. Triptofandan indol üretimine göre *K. oxytoca* ve *K. pneumoniae* ayrımı yapılabilir. *K. pneumoniae* indol negatiftir. Solunum yolundan izole edilmeyen

örneklerde Voges-Proskauer reaksiyonu pozitifdir. Ornitini dekarboksile edemezler, üreyi yavaş hidrolize ederler (1, 13, 14).

Kapsüler polisakkarit yapımının artışına bağlı hipervirulan bir *K.pneumoniae* subgrubu ortaya çıkmıştır. Bu alt tür sağlıklı insanları da etkileyerek, toplum kaynaklı ve hayatı tehdit eden invaziv infeksiyonlara neden olabilir (15).

2.1.3. Virulans faktörleri

Kapsüler polisakkarit; fagositozu önlemesi, erken inflamatuvar yanıtı baskılması, antimikrobiyal direnci sağlaması nedeniyle en önemli virulans faktörü sayılabilir. Diğer virulans faktörleri arasında lipopolisakkarit, fimbria, dış membran proteinleri, demir alım sistemleri ve nitrojen kaynak mekanizmaları sayılabilir (15).

2.1.3.1. Kapsüler antijen

Klebsiella türleri genellikle kompleks asidik polisakkaritler içeren kapsül oluştururlar. Kapsüler antijen, tekrarlayan 4-6 şekerli alt birimlerden ve üronik asitten oluşur. Kapsülün kompleks biyokimyasal yapısı sayesinde bakteriler farklı antijenik kapsüler varyantlar üretebilir. Dünya üzerinde *K.pneumoniae*'nin günümüze kadar tanımlanmış 77'den fazla kapsüler antijenik varyantı vardır. Bu varyantlar coğrafi olarak ve enfeksiyon türüne göre farklılık gösterebilir. Piyojenik enfeksiyonlarda K1 en sık karşılaşılan kapsüler serotiptir. K2 ise sıklıkla üriner enfeksiyonla ilişkilidir (16). Diğer varyantlara bakıldığında; 2, 21 ve 55 ile Avrupa ve Kuzey Amerika'da sık karşılaşırlar. K1 serotipi Tayvan'da bakteremi, karaciğer absesi ve septik endoftalmi, Kore'de karaciğer absesinde en sık karşılaşılan serotiptir. K54 ise Avustralya'da idrar, balgam ve kan örneklerinden en sık izole edilen serotiptir. K1 ve K2 izolatlarının daha virulan olduğu ve daha ciddi infeksiyonlara sebep olduğu düşünülmektedir (17).

Virulans derecesi K antijeninin makrofajlardaki lektin ya da mannoz reseptörleri tarafından tanınmasına bağlıdır. K1 ve K2 dışındaki kapsül antijenleri mannoz-alfa-2/3-mannoz ya da L-rhamnoz-alfa-2/3-L-rhamnoz içerirler ve bu moleküller sayesinde fagositik hücrelere bağlanırlar. Non-opsonik makrofaj aracılı bu fagositoza lektinofagositoz denilir. K1 ve K2 antijenleri bu molekülleri içermezler ve lektinofagositozdan korunurlar (3, 17, 18). Kapsül ek olarak bakterinin kompleman aracılı opsonofagositozdan da korunmasını sağlar (3, 16). K1 antijeninin, nötrofiller tarafından fagosit edildikten sonra bakteriyi nötrofil aracılı intrasellüler öldürmeden

koruyabilmesi sayesinde, *K.pneumoniae* karaciğer gibi uzak odaklara giderek apse oluşumuna sebep olabilir, bu özellik primer invaziv karaciğer apsesi patogenezinde önemlidir (15, 19).

Solunum epitel hücreleri patojenler tarafından salgılanan molekülleri tanımak için Toll-like reseptör (TLR)'leri üretirler. TLR'lerin uyarılması, insan beta-defensinler gibi antimikrobiyal peptitlerin, sitokin ve kemokinlerin üretilmesini sağlayan yolağı başlatır. Vahşi tip kapsüllü *K.pneumoniae* izolatlarında kapsül polisakkaritlerinin etkisi ile TLR2 ve TLR4 üzerinden İL-8 salınımı inhibe edilir (15). Kapsüler polisakkaritler ek olarak konak antimikrobiyal peptitlerine karşı koruyucu kalkan görevi yapar ve bakteriden salgılanan serbest kapsül polisakkaritleri antimikrobiyal peptitlere bağlanarak serbest antimikrobiyal peptit sayısını azaltır (15).

Kapsüler polisakkarit ayrıca dendritik hücre gibi antijen sunan hücrelerin maturasyonunu bozarak bu yolla İL-12 ve Tümör nekrozis faktör (TNF)-alfa gibi pro-Th1 sitokinlerin üretimini azaltır ve dendritik hücre aracılı natural killer hücre migrasyonu da bozulur. Sonuç olarak kapsüler polisakkarit *K.pneumoniae*'ye konak savunmasından kaçma ve hücre içinde kolayca çoğalma imkanı sağlar (15).

2.1.3.2. Hipermukoviskozite fenotipi

Bazı *K.pneumoniae* izolatları mukovisköz ekzopolisakkarit ağ oluşturma yeteneğine sahiptir, bu izolatlar hipermukovisköz fenotip olarak isimlendirilir. Bu izolatlar agar yüzeyinde ip testi ile tanımlanan yapışkan koloniler oluştururlar. Standart öze agar plak üzerine değdirilip uzaklaştırıldığında 5 mm'den fazla uzaması pozitif ip testi olarak değerlendirilir (17).

Hipermukovisköz fenotip yüksek oranda K1 ve K2 serotiplerinde görülür ancak bu serotiplere sınırlı değildir. *magA* (mucoviscosity-associated gene) K1 izolatlarında bulunur, karaciğer apsesi ve metastatik enfeksiyon açısından risk faktörüdür. Ancak *magA*'nın K1 kapsül ile ilişkili olduğu, virulans ile ilişkili olmadığı düşünülmektedir. *rmpA* (regulator of mucoid phenotype) geni ise çoğu izolatta mukoid fenotip oluşumundan sorumlu gendir (1).

Hipermukovisköz fenotip ya da K serotipinden bağımsız olarak artmış kapsüler polisakkarit üretimi, bakteriye diğer fenotiplere göre kompleman aracılı bakteriyel öldürmeye karşı daha fazla korunma sağlar. 151 bakteremi hastasının incelendiği bir

çalışmada hipermukovisköz fenotip %38 oranında tespit edilmiştir. Toplum kaynaklı enfeksiyonlarda nozokomiyal enfeksiyonlara kıyasla daha yüksek oranda bulunmuştur. Sekonder bakteremi varlığında ise hipermukovisköz fenotip, apse kaynaklı izolatlarda diğerlerine kıyasla önemli derecede yüksek oranda tespit edilmiştir (20).

2.1.3.3. Lipopolisakkarit (LPS)

Lipopolisakkarit; dış membrana tutunan hidrofobik lipit A, en dışta yer alan O antijeni ve bunları bağlayan kor polisakkaritten oluşur (15).

En az 9 farklı O antijen grubu tanımlanmıştır. *K.pneumoniae* izolatlarında en sık karşılaşılan O1 serotipidir ve invaziv (hipermukovisköz) izolatlarda daha yaygındır (15). C1q ve C3b'nin hücre duvarına bağlanmasını engelleyerek kompleman aracılı fagositozu önler. Tomas ve ark.'nın çalışmasına göre mutant lipopolisakkarit varlığında bakteri, kompleman bağlanmasına daha duyarlı hale gelir (17, 21, 22). O antijeni olmayan izolatarda kapsüler polisakkarit mikroorganizmayı kompleman aracılı ölümden korur.

İntraperitoneal injeksiyonla septisemi yapılan bir murin enfeksiyon modelinde; hipervirulan *K.pneumoniae* O1:K1 serotipinin serum kaynaklı ölüme direnç, bakteriyel yayılım ve bakteriyemi sonrası kolonizasyonda önemli rol oynadığı görülmüştür. Hipermukovisköz *K.pneumoniae* O1:K2 pnömoni murin modelinde ise hem kapsüler polisakkaritin hem de LPS O antijeninin kanda yayılım ve sepsis gelişimde önemli olduğu ancak pnömoni gelişiminde kapsüler polisakkarit olmasının yeterli olduğu bulunmuştur. Çünkü kapsüler polisakkarit C3 birikimine aracı olur ve patojeni alveoler makrofaj aracılı fagositozdan korur (15, 23). Ancak O antijen varlığı bakteremi gücünü artırarak öldürücü etkiye katkı sağlar. Ek olarak *K.pneumoniae* O5:K57 serotipinde O antijeni üroepitelyal hücrelere tutunmaya katkı sağlar(15, 23).

K.pneumoniae'da iki tip kor polisakkarit tanımlanmıştır. Hipermukovisköz *K.pneumoniae* fenotipi genellikle tip 2 kor polisakkariti sentezler. İntraperitoneal injeksiyonla murin enfeksiyon modelinde; tip 2 polisakkaritin tip 1 polisakkarit ile değiştirilmesinin virulansı azalttığı gösterilmiştir (15).

Lipit A sitoplazmada sentezlenir ve ABC transporter sistemi ile taşınıp dış membrana bağlanır. Lipit A'nın taşınması sırasında oluşan kovalent modifikasyonlar çevresel

faktörlere bağılı bazı enzimlerce katalizlenir, bu enzimler de *Enterobacteriaceae*'da virulansa katkı sağlar. Lipit A modifikasyonları özellikle antimikrobiyal peptitler olmak üzere konak immun sistemine dirençte önemli rol oynar (15).

Lipopolisakkaritler ek olarak; konak akut faz proteini olan LPS-bağlayan proteine bağlanır. Lipit A parçası konak TLR-4 tarafından tanınır ve proinflamatuvar sitokin salınımını artırır. Bu inflamatuvar immun yanıt septik şok gelişiminden sorumludur (1).

2.1.3.4. Sideroforlar

Demir, bakteriyel gelişim için gerekli bir elementtir, elektron transport zincirinde görev alır. Demirin konak dokularında hemoglobin, ferritin gibi proteinlere bağılı bulunması nedeniyle bakterilerin serbest demire ulaşması kolay değildir (3). Bu nedenle bakteriler demir alımını artırmak için farklı mekanizmalar geliştirirler. *K.pneumoniae*'nin taşıdığı demir alım mekanizmaları dört büyük sınıfta toplanabilir: Fe^{+2} taşıyıcı Feo, ABC taşıyıcı, hemofor temelli sistemler ve siderofor temelli sistemler. ABC taşıyıcılarından iki tanesi (Kfu ve Sit) ile sideroforlardan üç tanesinin (salmochelin, aerobaktin ve yersiniabaktin) *K.pneumoniae*'nin virulansında rolü olduğu gösterilmiştir (3, 15).

Hemofor ve sideroforlar bakterilerin demir alımı için ürettiği şelatörlerdendir. Enterobaktin tüm *Enterobacteriaceae* ailesinde bulunur ve prototip siderofor kabul edilir. Memeli hücreleri doğal immun sistemin bir parçası olarak demir alımını önlemek amacıyla enterobaktin bağlayan lipocalin 2 sentezlerler. *K.pneumoniae* da yersiniabaktin (fenolat tip siderofor), salmochelin (enterobaktinin glikozile formu), aerobaktin gibi ek sideroforlar üretir (15).

2.1.3.5. Pili

Bakterilerin konak mukozal yüzeylere yaklaşması ve tutunması enfeksiyon patogenezinde önemli bir adımdır. Bu adheziv özellik *Enterobacteriaceae* ailesinde genellikle pililer ile sağlanır. Pili, diğer adıyla fimbria, flagella dışında filamentöz bakteriyel uzantılardır. Mannoze tarafından inhibe edilme özelliğine bağılı olarak mannoze-duyarlı ve mannoze-dirençli olarak ikiye ayrılabilirler (3, 17). *K.pneumoniae*'nin tanımlanan en az 4 tip fimbriyası vardır: Tip-1 fimbria, tip-3 fimbria,

Kpc fimbria ve KPF-28 adhezin. KPF-28 hariç diğeri hiper mukovisköz fenotip tarafından üretilir (15).

Tip-1 fimbrialar ince, sert ve adheziv özellikte, dış membran yüzeyinde bulunan ip benzeri uzantılardır. Tekrarlayan FimA subünitleri ve ucunda da FimH isimli adhezin molekülünden oluşurlar (15). Tüm *Enterobacteriaceae* ailesinde bulunurlar.

Tip-1 fimbria *E.coli* fimbriyası ile karşılaştırıldığında; *K.pneumoniae*'ya mesane epitel hücrelerinde intrasellüler bakteriyal topluluklar (İBT) oluşturma yeteneği kazandırır. İBT içindeki bakteriler biyofilm topluluklarına benzer büyüme özelliği gösterirler (16). FimH molekülü sayesinde tip-1 fimbria bakteriye konak hücre veya ekstrasellüler matriksteki mannoz içeren yapılara adhezyon özelliği kazandırır (15, 24). Üriner enfeksiyon gelişimi için tip-1 fimbria gereklidir ancak barsak kolonizasyonu ya da akciğer enfeksiyonu gelişiminde etkisi yoktur (15, 19).

Pili patogenezinde faz varyasyonu da düşünülmelidir. Pili, konak mukozal yüzeylere bakteriyel kolonizasyonu sağlar. Daha sonra patojenik mikroorganizmalarda mukozal kolonizasyonu alttaki dokulara invazyon takip eder. Patojen mikroorganizma (bakteri) dokuya girdikten sonra tip 1 pili, lektinofagositoz için hedef haline gelir. Bakteri ve lökosit ayıran itme kuvvetleri pilinin hidrofilik kuvveti nedeniyle zayıflar ve adhezinlerin lökosit yüzeyindeki spesifik mannoz içeren reseptörlere bağlanması sağlanır (17).

Tip-3 fimbria 2-4 nm genişlikte ve 0,5-2 µm uzunlukta çıkıntılardır. Tip-3 fimbria epitel hücrelerine, böbrek ve akciğer dokusuna genellikle mannoz dirençli olarak tutunur, in vitro adhezyondan sorumludur. *K.pneumoniae*'nın biyofilm oluşumuna katkısı büyüktür ancak barsak ve pulmoner enfeksiyonlarda etkisi yoktur. *K.pneumoniae*'nin etken olduğu üriner enfeksiyonlar sıklıkla üriner kateter üzerinde oluşan biyofilm ile ilişkilidir. Hem tip-1 hem de tip-3 fimbria üriner kateter üzerinde biyofilm oluşumuna katkı sağlar (15, 19).

Kpc fimbria hiper mukovisköz *K.pneumoniae* fenotipi ile ilişkilidir ve biyofilm oluşumuna katkı sağlayabilir. KPF-28 adhezinini ise 4-5 nm çapta 0,5-2 mm uzunlukta, ince, esnek bir fimbriadır ve yapısal subünitleri CAZ-5/SHV-4 β-laktamaz kodlayan aktarılabılır R plazmidini üzerinde kodlanır. KPF-28'in memeli barsaklarına kolonizasyonda katkısı olabileceği düşünülmektedir (15, 19).

2.1.3.6. Dış membran proteinleri

OmpA, Gram-negatif bakterilerin majör dış membran proteinlerindedir ve tüm *Enterobacteriaceae*'da bulunur. Solunum yolu epitel hücreleri aracılı inflamatuvar cevabı azaltmada kapsüler polisakkaritlerin gerekli olduğu ancak yeterli olmadığı bilinmektedir. OmpA bu inflamatuvar cevabın azaltılmasını sağlar. Ek olarak bakterinin alveoler makrofajlar tarafından fagositozuna da direnç sağlar. OmpA kaybı *K.pneumoniae*'nın antimikrobiyal peptitlere duyarlı hale gelmesine sebep olur (15).

K.pneumoniae besinler ve sefalosporinler/karbapenemler gibi hidrofilik moleküllerin hücreye girmesini sağlayan iki adet önemli dış membran porini (OmpK35 ve OmpK36) üretir, ek olarak bunların yokluğunu kompanse etmek için KpnO ve OmpK26 gibi alternatif porinler üretir. OmpK35'in antibiyotik direnci ve virulansa katkısı yoktur ancak diğer porinlerin kaybı ile beraber, bakteriye sefalosporin ve karbapenem grubu antibiyotiklere karşı direnç kazandırır. OmpK36 kaybı ayrıca *K.pneumoniae*'nın yüzey yapısının yeniden düzenlenmesine ve fagositoza duyarlılığın artmasına, dolayısıyla virulansta azalmaya sebep olur (15).

K.pneumoniae AcrAB eflüks pompası sentezler, bu pompa hem antibiyotiklerin hem de konak kaynaklı antimikrobiyal peptitlerin (bronkoalveoler sıvıda bulunabilen) bakteriden dışarı atılmasını sağlar. AcrAB inaktivasyonu bakterininin çoklu ilaç dirençli fenotipe dönüşmesine sebep olur ek olarak da murin modele göre pnömoni oluşturma kapasitesinin azalmasına sebep olur. *K.pneumoniae*'nın sentezlediği diğer bir eflüks pompası EefABC'dir. Bu pompanın antibiyotik direnci ile ilişkisi yoktur ancak bakteriye asit toleransı sağlar ve konak gastrointestinal sisteme yerleşme imkanı sağlar (15).

2.1.3.7. Üreaz

Çoğu barsak patojeni üreyi amonyum ve karbondioksit parçalayan sitoplazmik üreaz üretir. Enzimin aktif bölgesinde nikel iyonları bulunur. *K.pneumoniae*'nın üreaz bazlı üre metabolizması bozulduğunda üre yokluğuna bağlı konak gastrointestinal sisteminde bakterinin büyüme yeteneği azalır (15). Üreazın virulans faktörü olarak bir diğer katkısı da bakteriye üriner sistemde büyüme ve enfekte taş oluşturma özelliği kazandırmasıdır. Lokal pH'yı artırarak inorganik tuzların çökmesine sebep olur, bu sayede üriner akım yavaşlar. Enfeksiyon bölgesinden bakteriyel klirens azalır ve

biyofilm oluşur. Bu mekanizma *Proteus* ve *Providencia* türlerinde *K.pneumoniae*'ya kıyasla daha baskındır, *K.pneumoniae* bu türlere göre önemli derecede düşük üreaz sentezlemektedir. Bu nedenle üreaz üretiminin *K.pneumoniae* virulansında rolünün kısıtlı olduğu düşünülmektedir (16).

2.1.4. Klinik özellikler

K.pneumoniae primer olarak nozokomiyal pnömoni, bakteremi, üriner sistem enfeksiyonuna neden olan bir patojen olarak bilinse de daha az sıklıkta toplum kaynaklı pnömoni, üriner sistem enfeksiyonu ve primer karaciğer apse sendromu gibi toplum kaynaklı enfeksiyonlara da neden olabilir.

2.1.4.1. Pulmoner enfeksiyonlar

K.pneumoniae'nın etken olduğu pulmoner enfeksiyonlar arasında nozokomiyal pnömoni, toplum kaynaklı pnömoni, KOAH hastalarında sekonder enfeksiyonlar, karaciğer apsesi ve ampiyem sayılabilir.

Nozokomiyal pnömoni ve ventilatör ilişkili pnömoni (VİP) tipik olarak; yeni gelişen pulmoner infiltrat, ateş, öksürük, balgam artışı ve lökositoz ile seyredir. *K.pneumoniae*'nin etken olduğu nozokomiyal pnömoni ve VİP'de klasik forma benzer bulgularla seyredir. Üst solunum sistemine kolonizasyon özellikle de ventilatör desteği ya da yoğun bakım takibi gerektiren hastalarda sık görülür. Bu nedenle semptomu olmayan hastalarda balgamdan *K.pneumoniae* izole edilmesi enfeksiyon bulgusu kabul edilmez. Radyolojik olarak, nozokomiyal *K.pneumoniae* pnömonisi genellikle bronkopnömoni ya da bronşit görüntüsü oluşturur. Balgamın Gam boyamasında etrafında kapsül bulunan kısa, tombul Gram-negatif basil görülebilir, ancak *K.pneumoniae*'ya spesifik değildir (11, 25).

K.pneumoniae'nin etken olduğu toplum kaynaklı pnömoni özellikle Asya ülkelerinde daha sıktır. Avrupa ve ABD'de ise daha çok alkoliklerde, ciddi KOAH'ı olanlarda ve diyabetik hastalarda görülmektedir (26). Klinik olarak diğer toplum kaynaklı pnömonilere benzer şekilde; öksürük, ateş, göğüs ağrısı, dispne, takipne, balgam artışı, fizik muayenede ral duyulması ve lökositoz semptom ve bulgular ile seyredir. Ek olarak *K.pneumoniae* pnömonisi; yoğun, mukoid ve kanlı balgam üretimine neden olan nekroz ve artmış inflamasyon ile ilişkilidir. Radyolojik görüntülemelerde nozokomiyal pnömoniden farklı olarak lobar pnömoni tutulumu görülür. Uygun ve

erken antimikrobiyal tedaviye rağmen *K.pneumoniae*'nin etken olduğu toplum kaynaklı pnömonilerde mortalite bakteremiye de sebep olması nedeniyle yüksektir (11, 26).

2.1.4.2. Bakteremi

K.pneumoniae Gram negatif baktereminin nispeten sık nedenlerindedir. Nozokomiyal enfeksiyonlar, toplum kaynaklı enfeksiyonlardan daha sıktır. Kanada'da 640 bakteremi vakasının retrospektif incelendiği bir çalışmada, vakaların %70'inin nozokomiyal orijinli olduğu saptanmış ve en sık primer odağın biliyer ve genitoüriner sistem olduğu görülmüştür (27). Solid organ nakli, kronik karaciğer hastalığı, diyaliz ve malignite varlığı en önemli risk faktörleri olarak bulunmuştur. Hastaların %30-47'sinde primer enfeksiyon odağı bulunamaz ve bu durum nozokomiyal hastalarda daha sıktır. Odağın saptanamadığı toplum kaynaklı *K.pneumoniae* bakteremi vakalarında, özellikle de tedaviye rağmen persistan ateşin olduğu vakalarda, Doğu Asya primer karaciğer absesinin sık görüldüğü akılda tutularak batın görüntüleme yapılması önerilir (11).

Nozokomiyal *K.pneumoniae* kan dolaşım enfeksiyonları özellikle de etkenin karbapenem dirençli olduğu durumlarda yüksek mortalite oranlarına sahiptir. Yunanistan'da 2 yıl süre ile karbapenem dirençli *K.pneumoniae* bakteremisi olan yoğun bakım hastalarının dahil edildiği bir çalışmada mortalite oranı %52,8 bulunmuştur. Çalışmaya göre mortalite ile ilişkili risk faktörleri arasında; uygun antimikrobiyal tedavi verilememesi, tedavi başlanmasında gecikme, hastanın daha öncesinde karbapenem dirençli etkenle kolonize olması, primer enfeksiyon odağının saptanamaması, ileri yaş, ciddi sepsis ya da septik şok varlığı olduğu bildirilmiştir (28).

Nozokomiyal kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonu ve enfektif endokarditte ise daha nadiren etken olarak karşımıza çıkar. *K.pneumoniae* bakteremilerinde sadece klinik olarak şüphe varlığında ya da yüksek riskli hastalarda ekokardiyografi yapılması önerilir (11).

2.1.4.3. Genitoüriner sistem enfeksiyonları

K.pneumoniae, *E.coli*'den daha az karşılaşılsa da hem alt hem de üst üriner sistem enfeksiyonlarına sıklıkla sebep olmaktadır. Sistit, piyelonefrit, renal ve perinefritik apse, prostatit ve periprostatik apseye sebep olabilir. Özellikle diyabetes mellitusu olan

hastalarda ve bazen de obstrüksiyon ile ilişkili olarak amfizematöz üriner sistem enfeksiyonuna da sebep olabilir. Renal apse formasyonu, hematojen yolla ya da alt üriner sistemden asendan yolla oluşabilir. Hematojen yayılımı genellikle renal kortikal apse görülür. Tayvan’da yapılan bir çalışmada (29); diyabetes mellitus, ürolitiazis ve immünsüpresyonun majör risk faktörleri olduğu bulunmuştur. Prostatit ve periprostatik apse etkeni olarak ise daha az sıklıkta karşılaşırlar ve genellikle amfizematöz enfeksiyona neden olur. Diyabetes mellitus ve kronik alkolizm, amfizematöz enfeksiyon için risk faktörleri arasında sayılabilir (11).

2.1.4.4. İntraabdominal enfeksiyonlar

Piyojenik karaciğer absesi, genellikle altta yatan hepatobiliyer hastalık ya da kolanjit ile ilişkilidir ve polimikrobiyaldir, *K.pneumoniae* da sık karşılaşılan etkenlerindedir (11). Piyojenik karaciğer absesinden farklı bir sendrom olarak primer invaziv karaciğer absesi; *K.pneumoniae*’nin etken olduğu, toplum kaynaklı ve sıklıkla metastatik yayılım ile seyreden bir sendromdur. Başlangıçta vakalar genellikle Tayvan’dan bildirilmekte iken günümüzde Doğu Asya ülkelerinin tamamından ve sporadik olarak tüm dünya genelinden bildirilmektedir. *K.pneumoniae*’nin etken olduğu primer karaciğer absesi sıklıkla öncesinde bilinen hepatobiliyer hastalığı olanlarda görülür ve sıklıkla monomikrobiyaldir. Tipik manifestasyonu unilobuler tutulum ve multiloküle sıvı koleksiyonudur. Öncesinde antibiyotik kullanımı riski artırır. Sıklıkla hipermukoviskozite gösterir ve hipervirulan fenotip ile ilişkilidir. *K.pneumoniae*’nin etken olduğu karaciğer absesi, diğer karaciğer abselerine kıyasla daha sık metastatik yayılım yapar. En yaygın metastatik tutulumlar; endoftalmi, menenjit ve beyin absesidir (1, 11)

Primer karaciğer absesi ile eş zamanlı olarak dalak absesi ve sirozu olan hastalarda spontan bakteriyel peritonit *K.pneumoniae*’nin etken olduğu diğer intraabdominal enfeksiyonlar arasında sayılabilir (11).

2.1.4.5. Menenjit ve beyin absesi

Nozokomiyal menenjitin sık karşılaşılan bir etkeni olan *K.pneumoniae*, genellikle nörolojik cerrahi sonrası oluşur. Genellikle de Gram pozitif patojenler için profilaksi uygulanan hastalarda görülür. Toplum kaynaklı menenjitin ise çok daha nadir bir etkenidir. Hollanda’da yapılan bir çalışmada 696 vakadan sadece birinde

K.pneumoniae etken olarak saptanmıştır. Doğu Asya'da, özellikle Tayvan'da ise primer karaciğer absesinin metastatik komplikasyonu olarak nispeten daha sık karşılaşılır. Hastalar diğer santral sinir sistemi enfeksiyonlarında da görüldüğü üzere; ateş, bilinç değişikliği, nöbet, ense sertliği gibi bulgularla başvurabilirler (11). Tedavi başlangıcındaki nörolojik durum, komplikasyonlar açısından bilinen en önemli risk faktörüdür (30).

2.1.4.6. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları

K.pneumoniae, fatal nekrotizan yumuşak doku enfeksiyonuna ilerleme potansiyeli olan şiddetli sellülite neden olabilir. Krepitasyon eşlik edebilir. Nekrotizan yumuşak doku enfeksiyonlarında ağrı, şişlik, eritem görülebilir. Enfeksiyonun başlangıcında hastalar, diğer bulgular olmadan sadece şiddetli ağrı ile başvurabilirler. Tayvan'dan sıklıkla bildirilmektedir (11, 31).

2.1.4.7. Diğer enfeksiyonlar

Derin boyun absesi, endoftalmi, psoas absesi, spondilodiskit, vertebral osteomyelit, septik artrit, pürülan perikardit ve piyomiyozit *K.pneumoniae*'nin nadiren etken olduğu diğer enfeksiyonlar arasında sayılabilir. Sıklıkla karaciğer absesi gibi bir odakta kan yoluyla ya da çevre dokulardan bulaş sonucu ortaya çıkar (11).

2.1.5. Tedavi

Gram negatif basiller; bakteriyemi, yabancı cisim ilişkili enfeksiyonlar, intraabdominal enfeksiyonlar, üriner sistem enfeksiyonu ve pnömoni dahil olmak üzere geniş bir aralıkta hastalığa sebep olabilirler. Hastane kaynaklı enfeksiyonların %30'unu oluştururlar. Özellikle ÇİD ve extremely drug resistant (XDR) *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarının tedavisi, kısıtlı antibiyotik varlığı ve bu antibiyotiklerin etkinlikleri ile ilgili bilginin sınırlı olması nedeniyle tedavi eden hekimi zorlar. Tedavi planlanmasında; diğer faktörler yanında enfeksiyon kaynağı, enfeksiyonun ciddiyeti ve bakterinin duyarlılık profili göz önünde bulundurulmalıdır (32, 33).

2.1.5.1. Karbapenemler

Karbapenemler β -laktam grubu bakterisidal antibiyotiklerdir. ABD'de klinik kullanımda olan dört adet karbapenem vardır: İmipenem, meropenem, ertapenem ve

doripenem. Japonya ve Çin’de panipenem, Japonya’da tebipenem ve Japonya, Çin ve Tayland’da biapenem klinik olarak kullanılan diğer karbapenemlerdir (34).

Karbapenemler, bir toprak mikroorganizması olan *Streptomyces cattleya* tarafından üretilen tienamisin türevleridir. En yüksek molekül ağırlıklı PBP’ye bağlanarak hücre duvar sentezini inhibe ederler. Özellikle PBP 1a, 1b, 2 ve 4’e bağlanırlar. Aminopenisilinler ve sefalosporinlerin primer hedefi olan PBP3’e daha az oranda bağlanırlar. Spesifik dış membran proteinleri (OMP) ile periplazmik aralığa ulaşırlar, *P.aeruginosa*’da bilinen en önemli OMP OprD’dir (34).

Tüm karbapenemler benzer antimikrobiyal etkinliğe sahiptir. Tamamı in-vitro Gram pozitif koklara etkili bulunmuştur. Penisilin duyarlı ve dirençli *S.pneumoniae*, oksasilin duyarlı Stafilokoklara etkilidir. Oksasilin dirençli stafilokoklara etkili etkili karbapenem yoktur. *E.faecalis*, imipeneme 2 µg/mL minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinde duyarlıdır ancak diğer karbapenemlerin MİK değeri daha yüksektir. Karbapenemlerin hiçbiri *E.faecium*’a etkili değildir. Çoğu *Enterobacteriaceae* 1 µg/mL ve altındaki MİK değerlerinde imipenem duyarlıdır. Karbapenemaz üreten *K.pneumoniae* izolatları tipik olarak 8 µg/mL ve üstünde MİK değerlerine sahiptir ve tüm karbapenemlere dirençlidir (34). *P.aeruginosa* izolatlarına en etkili olan karbapenem doripenemdir, ertapenemin ise etkinliği yoktur. Karbapenem duyarlı *A.baumannii* izolatları 1 µg/mL MİK değerlerinde imipenem, meropenem ve doripeneme duyarlıdır. Ertapenemin ise *A.baumannii*’ye etkinliği yoktur. Karbapenemlerin hiçbiri *Burkholderia cepacia* ve *Stenotrophomonas maltophilia*’ya karşı etkisizdir. Çoğu anaerob türlerine karbapenemler etkilidir. *Nocardia* spp. karbapenemler tarafından inhibe edilir ancak bazı izolatlar dirençli olabilir. *Actinomyces* spp. ise karbapenem duyarlıdır (34).

Karbapenemler, geniş Gram pozitif, Gram negatif ve anaerob etkinlikleri olması nedeniyle şiddetli enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilir. Bakteremi, hastane kaynaklı pnömoni, intraabdominal enfeksiyon, komplike üriner sistem enfeksiyonları, kemik ve yumuşak doku enfeksiyonları ve jinekolojik enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilir. Genel olarak GSBL ya da AmpC üreten, sefalosporin dirençli *Enterobacteriaceae*’ya etkilidir. İmipenem, meropenem ve doripenem birbirlerinin eş

değeri kabul edilir ve tedavi sırasında aralarında değişiklik yapılabilir. İmipenemin Gram pozitif koklara etkinliği biraz daha fazladır (34).

Genel olarak karbapenemler iyi tolere edilir. *Clostridioides difficile* ilişkili kolit, koagülasyon bozuklukları, nefrotoksisite, hepatotoksisite en sık görülen yan etkilerdendir. Tüm karbapenemler nöbete sebep olabilir, imipenem ile veya nörolojik komorbidite varlığı ya da böbrek yetmezliğinde ise daha sık karşılaşılr (34).

2.1.5.2. Polimiksinler

Polimiksinler, siklik, katyonik polipeptit deterjan molekülllerdir. Klinikte parenteral kullanımı olan 2 adet polimiksin türevi vardır: Polimiksin B ve polimiksin E (kolistimetat sodyum, kolistin). Polimiksin B *Bacillus polymxa*, kolistin ise *Bacillus colistinus* 'tan elde edilmiştir. Kolistinin sülfometil formu inaktif ön ilaçtır. Polimiksin B'nin parenteral ve topikal formu vardır. Kolistinin ise; topikal ve oral kullanım için kolistin sülfat formu, parenteral kullanım için de kolistimetat sodyum formu mevcuttur. Kolistimetat sodyum ayrıca inhaler olarak da kullanılır (35).

Gram negatif bakterilerin dış membran fosfolipitleri ile elektrostatik olarak etkileşime girerek hücre membranlarını parçalar. Ek olarak lipopolisakkaritin lipit A'sına bağlanarak endotoksin aktivitesini de engeller. Gram negatif anaerobik basillere karşı, *Proteus*, *Serratia*, *Morganella* ve *Providencia* türleri hariç, etkinliği mevcuttur (33). *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* gibi çoğu çoklu ilaca dirençli GNB'lere ve karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* (KDE)'ya karşı etkinliği 2 µg/mL ve altındaki dozlarda etkinliği devam etmektedir. KDE'nin endemik olduğu bölgelerde izolatların yarısı polimiksin de dirençlidir (35).

Kolistimetat sodyum ve polimiksin B ÇİD GNB'lerin etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilir. *P.aeruginosa*'nın etken olduğu pnömonilerde polimiksinlerin tedavi başarısı piperasilin, imipenem ve siprofloksasine benzerdir. Ancak çalışmaların bir kısmında suboptimal dozlarda kullanıma bağlı tedavi başarısızlığı görülmektedir. Yeni β-laktam-β-laktamaz inhibitörü kombinasyonları ve yeni aminoglikozitlerle kıyaslandığında kolistinin klinik olarak etkinliğinin daha düşük olduğu düşünülmektedir. Yüksek toksisite oranları nedeniyle daha yüksek dozlarda kullanımı kısıtlanmaktadır, hala optimal doz belirlenememiştir. Bu nedenle polimiksinler daha az toksik ve potansiyel olarak daha etkili ilaçlar ulaşılabilir olduğu

sürece kullanılmamalıdır. Ciddi enfeksiyonlarda ise polimiksin B ile in-vitro sinerjistik etkileşim olduğu gösterilen bir ilaçla kombine kullanılması önerilmektedir. Polimiksin B, ulaşılabilir olduğunda üriner sistem enfeksiyonu hariç kolistine tercih edilmelidir. Üriner sistem enfeksiyonlarında ise kolistin tercih edilmelidir (35).

Kolistin monoterapisinin etkinliğinin kolistin içeren kombinasyon tedavileri ile karşılaştırıldığı çalışmalar göstermiştir ki, kolistin monoterapisinde mortalite ve tedavi başarısızlığı kombinasyon rejimlerinden daha yüksektir. INCREMENT çalışmasına göre kolistin monoterapisi, karbapenem dirençli *K.pneumoniae* enfeksiyonlarının tedavisinde tigesiklin, kolistin veya karbapenem içeren kombinasyonlarla kıyaslandığında artmış mortalite ile ilişkilidir (36). Buna karşın karbapenem dirençli GNB enfeksiyonlarının tedavisinde polimiksinler ile karbapenem, tigesiklin ya da aminoglikozit kombinasyonlarının karşılaştırıldığı bir meta-analize göre ise; polimiksinlere bu ajanlardan herhangi birini eklenmesinin üstünlüğü olmadığı bildirilmiştir, ancak yeterli kanıt düzeyine sahip olmadığı da çalışmada vurgulanmıştır (37).

Polimiksinlerin yan etkileri arasında nefrotoksisite ve nörotoksisite sayılabilir. Doz bağımlı nefrotoksisite sık görülür ancak ilaç kesildikten sonra genellikle böbrek fonksiyonları normale döner. Kolistinin nefrotoksisite riski polimiksin B'den daha fazladır. Nörotoksisite de doz bağımlı ve geri dönüşümlüdür. Apne ve kas zayıflığı ile sonuçlanabilen nöromuskuler blokaja sebep olabilir. Dudaklar etrafında, dilde ve ekstremitelerde parestezi ile seyreden periferik nöropati ise daha az sıklıkta görülür. Aminoglikozitler nörotoksik etkiyi artırabilir (35).

2.1.5.3. Tigesiklin

Tigesiklin, glisiklin grubunda bulunan, dirençli mikroorganizmalar için üretilen bir antibiyotiktir. Tetrasiklinlere benzer şekilde 30S ribozomal subünite bağlanır. Aminoasit transfer RNA molekülünün ribozomun A bölgesine girişini ve elongasyon peptid zincirine aminoasit eklenmesini engeller. Sonuç olarak protein sentezi inhibe olur. Ribozom ile etkileşimi geri dönüşümlü olduğu için bakteriyostatik kabul edilir. Ribozoma tetrasiklinlere kıyasla 5 kat daha güçlü bağlandığı için tetrasiklin direncinden etkilenmez (38). 2015'te komplike deri ve yumuşak doku, intraabdominal enfeksiyonlar ve toplum kaynaklı pnömoni tanıları için Food and Drug Administration

(FDA) tarafından onaylanmıştır. Dirençli aerobik ve anaerobik bakterilere karşı etkinliği gösterilmiştir. Ancak kullanımı sadece önerilen antibiyotiklere ulaşılamayan ya da bu antibiyotiklerin uygulanamadığı durumlarla sınırlıdır (33).

Enterobacteriaceae grubunun çoğu üyesi, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella* türleri hariç, tigesikline duyarlıdır. Tetrasiklinlere karşı geliştirilen direnç mekanizmalarından efluks pompaları ve ribozomal korunma tigesikline karşı etkili değildir. Ancak tetrasikline dirençli bazı türlerde tigesiklin duyarlılığında 2-4 kata kadar azalma görülebilir. *Klebsiella*, *Enterobacter* ve *Citrobacter* türleri için 4 kata kadar duyarlılıkta azalma görüldüğü bildirilmiştir (39).

Tigesiklinin toplum kaynaklı pnömoni, deri yumuşak doku enfeksiyonu ve intraabdominal enfeksiyonlarda kullanım endikasyonu olmakla birlikte, endikasyon dışı kullanımı da yaygındır. Bakteriyemide kullanımı ile ilgili randomize kontrollü çalışma olmamakla birlikte, yukarıda sayılan endikasyonlarda bakteriyemi varlığında önemli tedavi başarısızlığı bildirilmemiştir (40). Ayrıca, N-asetilsistein ve heparin ile birlikte hemodiyaliz kateteri ilişkili kan dolaşım enfeksiyonundan kateter kilit tedavisi olarak uygulanmış ve 18 hastanın 15'inde klinik kür sağlanmıştır (41). Sonuç olarak kan ve idrar gibi vücut sıvılarına geçişinin iyi olmadığı bilinmekle birlikte, özellikle tedavi seçeneklerinin kısıtlı olduğu ÇİD enfeksiyonlarda kombinasyon tedavinin bir parçası olarak kullanılabilir.

Diğer tetrasiklinlerde olduğu gibi en sık bildirilen yan etkiler bulantı, kusma gibi gastrointestinal sistem ile ilgili yan etkilerdir. Transaminazlar ve alkalen fosfataz seviyelerinde geçici yükselmeler yapabilir. Nadiren akut pankreatit yapabilmektedir (38).

2.1.5.4. Diğer tedavi seçenekleri

Fosfomisin, epoksit sınıfı ilk antibiyotiktir. Dirençli Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı geniş spektrumlu bakterisidal etkinliği vardır. Fosfoenol piruvat sentetaz enzimini inhibe ederek N-asetilmuramik asit oluşumunu ve sonuç olarak da hücre duvar sentezini engeller. 1960'larda keşfedilmiştir. Oral ve intravenöz formulasyonu vardır, oral formu uzun zamandır kullanılmakla birlikte intravenöz formu yakın zamanda ülkemizde kullanıma girmiştir. Diğer antibiyotik grupları ile arasında çapraz direnç görülmez. Akciğer, serebrospinal sıvı, kemik dahil olmak üzere

tüm dokular ve serumda anlamlı düzeylere ulaşabilmesi nedeniyle özellikle de dirençli enfeksiyonlarda kombinasyon tedavisinin parçası olarak kullanılmaktadır (42).

Yeni üretilen β -laktam- β -laktamaz inhibitörü kombinasyonları panrezistan *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilir. Seftolozon-tazobaktam *P.aeruginosa*'nın etken olduğu üriner sistem enfeksiyonları için endikasyonu vardır. Seftazidim-avibaktam, sınıf A ve sınıf D karbapenemazlara etkilidir. Çoğu KPC ve OXA-48 üreten *Enterobacteriaceae* veya GSBL ya da AmpC üretimi ile birlikte ilacın hücreye girişinde azalma nedeniyle karbapenem direnci olan bakterilerin tedavisinde kullanılabilir. Ancak metallo- β -laktamaz (MBL) üreten bakterilere karşı etkinliği yoktur, bu amaçla aztreonam ile kombine edilerek kullanılabilir (33).

Meropenem-vaborbaktam ve imipenem-silastatin-relebaktam sadece sınıf A karbapenemazlara etkilidir (43). Vaborbaktam, siklik boronik asit türevi bir β -laktamaz inhibitörüdür. Boronik asit, serin proteazları (KPC gibi serin karbapenemazlar) inhibe eder. *Enterobacteriaceae*'nin etken olduğu piyelonefrit dahil komplike üriner sistem enfeksiyonlarında endikasyonu vardır (42).

Plazomisin, sisomisinden elde edilen yeni kuşak bir aminoglikozittir. Diğer aminoglikozitlere kıyasla karbapenem direncine bağlı olmaksızın polimiksin dirençli *Enterobacteriaceae*'ya etkilidir. Piyelonefrit ve bakteriyemi de dahil olmak üzere komplike üriner sistem enfeksiyonunda kullanım onayı almıştır (42).

Diğer tedavi seçenekleri arasında eravasiklin ve sefiderokol sayılabilir. Sefiderokol, siderofor türevi, sefalosporin grubu yeni bir antibiyotiktir. Ferrik iyonları bağlayarak demir taşıyıcıları ile dış hücre membranını geçer. β -laktamaz üreten *K.pneumoniae* izolatlarına karşı stabilitesinin araştırıldığı bir çalışmada Sınıf A, sınıf D ve MBL'lere karşı stabilitesini korumuştur (42, 44). Gram pozitif bakteriler ve anaeroblara karşı etkinliği yoktur. Eravasiklin, florosiklin türevi yeni bir tetrasiklidir ve tigesiklinden daha potenttir (43).

2.1.5.5. Karbapenem Dirençli *Enterobacterales* tedavisi

Infectious Diseases Society of America (IDSA)'nın 2021'de yayınlanan rehberinde (45) karbapenem dirençli *Enterobacterales* için şu öneriler sunulmuştur (Tablo 1): Karbapenem dirençli ya da karbapenemaz ürettiği gösterilen *Enterobacterales*

enfeksiyonlarında; seftazidim-avibaktam, meropenem-vaborbaktam, imipenem-silastatin-relebaktam veya sefiderokol önerilen tedavi rejimleridir. Üriner sistem enfeksiyonları için nefrotoksisite riski göze alınmıyorsa günde tek doz plazomisin alternatif tedavi seçeneklerindedir. Eğer etken ertapenem dirençli, meropenem duyarlı ise yüksek doz ve uzun infüzyon süresi ile meropenem verilebilir. İntraabdominal enfeksiyonlarda ise tigesiklin ve eravasiklin alternatif monoterapi seçeneklerindedir. Etkenin ürettiği karbapenemazın bilinmesi de tedavi seçiminde yardımcı olur; OXA-48 benzeri enzimler dirençten sorumlu ise meropenem-vaborbaktam ve imipenem-silastatin-relebaktam tedavi için uygun değildir (45). Eğer son yıllarda klinik kullanıma giren yeni β -laktam- β -laktamaz inhibitörü kombinasyonlarına ulaşılamıyorsa, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) ÇİD GNB tedavi rehberine göre kombinasyon tedaviler tercih edilmelidir (46).

Tablo 1. Karbapenem dirençli *Enterobacterales* enfeksiyonları için IDSA tedavi önerileri (45).

	İlk tercih tedavi	Alternatif tedavi
ÜSE		
Komplike olmayan sistit	Kinolonlar, TMP-SMX, nitrofurantoin ya da tek doz aminoglikozit Meropenem*	CAZ-AVI, MEM-VAB, IMI-REL Kolistin
Piyelonefrit ya da komplike ÜSE	CAZ-AVI, MEM-VAB, IMI-REL, sefiderokol Meropenem*	
ÜSE dışında enfeksiyonlar		
Ertapenem dirençli meropenem duyarlı ve karbapenemaz testi ulaşılabilir değil ya da negatif	Meropenem*	CAZ-AVI
Karbapenem dirençli ama karbapenemaz testi ulaşılabilir değil ya da negatif	CAZ-AVI, MEM-VAB, IMI-REL	Sefiderokol Tigesiklin, eravasiklin [§]
KPC karbapenemaz ya da karbapenemaz pozitif ancak türü bilinmiyor	CAZ-AVI, MEM-VAB, IMI-REL	Sefiderokol Tigesiklin, eravasiklin [§]
Metallo- β -laktamaz (NDM, VIM, IMP)	CAZ-AVI ve aztreonam, sefiderokol	Tigesiklin, eravasiklin [§]
OXA-48 benzeri karbapenemaz	CAZ-AVI	Sefiderokol Tigesiklin, eravasiklin [§]

TMP-SMX: Trimetoprim-sulfometoksazol, CAZ-AVI: Seftazidim-avibaktam, MEM-VAB: Meropenem-vaborbaktam, IMI-REL: İmipenem-silastatin-relebaktam

*: Sadece ertapenem dirençli, meropenem duyarlı durumlarda kullanımı önerilir. Sistitte standart infüzyon, diğer enfeksiyonlarda uzamış infüzyon ile uygulanması önerilir.

§: Tigesiklin ve eravasiklinin kullanımı genellikle intraabdominal enfeksiyonlar ile sınırlıdır

ESCMID'in 2021'de yayınlanan rehberine göre tedavi önerileri (46);

- a. KDE'de şiddetli enfeksiyon tablosu varsa ve in-vitro duyarlılık da gösterildiyse seftazidim-avibaktam ya da meropenem-vaborbaktam kullanımı önerilir.
- b. MBL taşıdığı gösterildi ya da seftazidim-avibaktam ve meropenem-vaborbaktam dahil dirençli olduğu gösterildiyse sefiderokol kullanımı önerilir.
- c. Şiddetli enfeksiyonu olmayan hastalarda ise in vitro duyarlılığa dikkat edilerek eski antibiyotiklerden seçilmesi önerilir. Üriner sistem enfeksiyonu için plazomisin dahil aminoglikozitler ya da tigesiklin önerilir.
- d. Tigesiklinin kan dolaşım enfeksiyonu, hastane ya da toplum kaynaklı pnömonide kullanımı önerilmez, pnömoni için kullanılacaksa yüksek dozda kullanılması önerilir.
- e. İmipenem-relebaktam ya da fosfomisinin KDE'de tek başına kullanımı ile ilgili yeterli kanıt yoktur.
- f. Eğer seftazidim-avibaktam, meropenem-vaborbaktam ya da sefiderokol ulaşılabilir ise kombinasyon tedavi önerilmez. MBL ürettiği bilinen veya yeni antibiyotiklere dirençli KDE enfeksiyonlarında seftazidim-avibaktam ile aztreonamın kombine edilmesi önerilir.
- g. Şiddetli enfeksiyon tablosu olan ve yeni β -laktam- β -laktamaz inhibitörü kombinasyonlarına ulaşamayan hastalarda in-vitro aktif olduğu gösterilen birden fazla ilaçla kombinasyon tedavi önerilir.
- h. Meropenem MİK 8 mg/L ve altında olan hastalarda yüksek doz ve uzun infüzyon süresi ile meropenem kombinasyon tedavinin bir parçası olarak uygulanabilir ancak MİK'in 8 mg/L'den yüksek olduğu durumlarda karbapenem temelli kombinasyon rejimlerinin kullanılmaması önerilir.

- i. Düşük riskli ya da şiddetli enfeksiyonu olmayan hastalarda ise enfeksiyon odağına göre in-vitro duyarlı olduğu bilinen eski antibiyotiklerden kullanılması önerilir (46).
- j. KPC üreten *K.pneumoniae* enfeksiyonları başta olmak üzere KDE'nin etken olduğu şiddetli enfeksiyonların tedavisinde yüksek doz ve uzun infüzyon süresiyle meropenemin polimiksin ile kombinasyonun polimiksin monoterapisinden üstün olduğu düşünülmektedir.
- k. İkili karbapenem tedavisi için ise yeterli düzeyde kanıt yoktur.

Tedavide kombinasyon rejimlerinin yeri

Günümüzde karbapenem ve geniş spektrumlu diğer beta laktamlara direnç oranları artmaktadır. Son yıllarda dünya genelinde bu amaçla üretilen antibiyotikler ülkemiz de dahil olmak üzere çoğu gelişmekte olan ülkede ulaşılabilir değildir. Hatta ülkemizde baskın olan karbapenemaz enzimlerine karşı bu antibiyotiklerin çoğu etkili değildir. Bu nedenle klinik kullanımda olan antibiyotiklerin sinerjistik etkileşimlerini araştırılması gereklidir.

Kombinasyon tedavide amaç, etki spektrumunu genişletmek, sinerjistik etki elde etmek ve monoterapide karşımıza çıkabilen dirençli subgrup gelişimini önlemektir. Kombinasyon rejimlerinin aşırı kullanımında ise ilaçların toksik etkilerinde artış, floranın baskılanmasına bağlı süperenfeksiyon gelişimi, dirençli izolatların seçilimi ve maliyet artışı ile karşılaşılabilir. Bu nedenle tedavide uygun kombinasyon rejimlerinin seçimi önemlidir. Çoğu çalışmada ciddi sepsis, septik şokta etkene yönelik kombinasyon tedavi önerilmektedir. Ek olarak karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* ve β -laktamların kullanılmadığı *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* enfeksiyonlarında da kombinasyon tedavi üstün bulunmuştur (47).

Karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae*'da in vitro etkili olduğu bilinen polimiksinler, tigesiklin ya da fosfomisin gibi antibiyotiklerin sinerjistik-additif etkinliklerini araştıran çok sayıda çalışma mevcuttur (33). Monoterapi ile kombinasyon tedavisinin karşılaştırıldığı çalışmalarda mortalite oranlarının bir karbapenem içeren kombinasyon rejimlerinde daha düşük olduğu bulunmuştur (48). Dünya genelinde 33 merkezin katıldığı INCREMENT çalışmasına göre ise ÇİD *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarında sadece şiddetli hastalığı olanlarda

kombinasyon tedavisi daha etkili bulunmuştur (36). Kombinasyon rejimi için ampirik ya da etkene yönelik antibiyotik seçiminde, in-vitro aktif en az iki ilacın verilmesi ve özellikle de intraabdominal enfeksiyonlarda kaynak kontrolünün sağlanmasının gerektiği akılda tutulmalıdır (48).

Pan drug resistant (PDR) GNB enfeksiyonlarında kullanılabilen kombinasyon tedavi seçenekleri arasında; KPC-üreten *K.pneumoniae* için ikili karbapenem, ikili karbapenem+kolistin, *B.cepacia* ve *K.pneumoniae* için seftazidim-avibaktam ile karbapenem kombinasyonu, *A.baumannii* için yüksek doz ampisilin-sulbaktam ile meropenem ya da kolistin kombinasyonu sayılabilir. MBL üreten izolatlar için aztreonam-avibaktam kombinasyonu kullanılabilir (49). Kombinasyonda kullanılacak antibiyotiklerin in vitro ortamda duyarlı ilaçlardan seçilmesi önerilir ancak, iki ilacın da dirençli olduğu kombinasyon rejimlerinde de sinerji görülebilir (47). Kolistin temelli kombinasyonlar ya da fosfomisin karbapenem kombinasyonları son çare ilaçlar arasında sayılır ancak bu kombinasyonlarla ilgili farmakokinetik/farmakodinamik çalışmalar yoktur ve özellikle de izolatın iki ilaca da dirençli olduğu durumlar ile ilgili araştırmalar kısıtlı sayıdadır (43).

2.1.6. Antimikrobiale direnç

K.pneumoniae'nin antimikrobiyal direnci doğal ve kazanılmış direnç olarak ikiye ayrılabilir. Sahip olduğu SHV-1 beta laktamaz sayesinde ampisilin, karbenisilin ve tikarsilin direnci doğal dirence örnek verilebilir (50). Kazanılmış direnç ise kromozal mutasyonlar ile ya da direnç genlerini içeren plazmid, transpozon veya integron gibi hareketli genetik elemanların dirençli bakterilerden alınması sonucu oluşur. Kazanılmış direnç mekanizmaları birkaç başlık altında toplanabilir (51):

- a. İlacı inaktive eden ya da değiştiren enzim sentezlenmesi
- b. İlacın hücre geçirgenliğinde azalma ya da alınan ilacın hücre dışına atılması
- c. Antibiyotik hedef bölgesinde değişiklik olması, hedef bölgenin korunması ya da miktarının artırılması
- d. Antibiyotik ile inhibe edilen yolun yerine alternatif bir yolun kullanılması

2.1.6.1. β -Laktam antibiyotiklere direnç

β -laktam antibiyotikler transpeptidaza (penisilin bağlayan protein) bağlanarak bakteri hücre duvarının ana elemanı olan peptidoglikanın sentezini inhibe ederler. Gram negatif bakterilerde β -laktam antibiyotiklere direnç üç farklı mekanizma ile gelişebilir: Penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) oluşan değişiklikler, ilacın hücreye girişinin engellenmesi veya atım pompaları ile dışarı atılması, β -laktamaz enzimleri ile inaktivasyon. β -laktamazlar ise antibiyotiklerin β -laktam halkasındaki amid bağlarını hidrolize ederek antibiyotiğin etkisini ortadan kaldıran enzimlerdir. Geniş spektrumlu β -laktamaz (GSBL); üçüncü kuşak sefalosporinleri (sefotaksim ve seftazidim gibi sefemler) parçalayan ve klavulonik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi β -laktamaz inhibitörleri ile inhibe olabilen enzimlerdir. TEM ve SHV tipi enzimler, genlerle plazmid üzerinde taşınırlar (52).

2.1.6.1.1. β -Laktamazlar

K.pneumoniae'nin penisilin direnci ilk kez 1960'larda keşfedilmiştir, *bla*_{SHV-1} ve *bla*_{TEM-1} genleri ilk keşfedilen β -laktamaz genleridir (53). Kromozomal sentezlenen SHV-1 enzimi; *K.pneumoniae*'ye ampisilin, tikarsilin ve karbenisiline doğal direnç yeteneği kazandırır (50). Yaklaşık 20 yıl sonra keşfedilen *bla*_{SHV-2} geni ise ilk keşfedilen geniş spektrumlu β -laktamaz (GSBL) genidir. Bu enzim de bakteriye geniş spektrumlu β -laktam antibiyotiklere (3. Kuşak sefalosporinler gibi) direnç yeteneği kazandırır (53). Daha sonra plazmid aracılı *bla*_{TEM-3} gibi GSBL türleri keşfedilmiştir. 1990-2000'lerde *K.pneumoniae*'de GSBL keşfedildikten sonra hastane kaynaklı salgınlarda *K.pneumoniae* baskın etken halinde gelmiştir. Bu dönemde yaygın β -laktamazlar *bla*_{TEM} ve *bla*_{SHV} olmakla birlikte 2000'lerde *bla*_{CTX-M} türü β -laktamazlar keşfedilmiş ve günümüzde sık karşılaşılan β -laktamazlardan biri haline gelmiştir. Horizontal gen transferi ile kazanılan diğer GSBL genleri arasında ise *bla*_{OXA}, *bla*_{GES}, *bla*_{SFO}, *bla*_{PER}, *bla*_{TLA}, *bla*_{VEB} ve *bla*_{KLUC-5} genler sayılabilir (53). Günümüzde kromozomal ya da plazmid, transpozon, integron gibi taşınabilir genetik elemanlarla türler arasında aktarılabilen 2000'den fazla β -laktamaz enzimi olduğu bilinmektedir ve bu enzimler dünya çapında yayılmaktadır. β -laktamazların sınıflandırılması için en yaygın kullanılan iki sınıflandırma sistemi; yapısal özelliklerine göre Ambler ve fonksiyonel özelliklerine göre Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırma sistemidir.

Ambler ve Bush-Jacoby sınıflandırma sistemine göre β -laktamazlar genel özellikleri ile Tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo 2. Ambler moleküler ve Bush-Jacoby fonksiyonel sınıflamasına göre β -laktamazlar (52, 54).

Ambler grup	Bush-Jacoby grup (2009)	Yaygın isim	Tanımlayıcı özellik	Örnek enzimler	Karakteristik inhibitör
A	2a	Penisilinaz	Benzilpenisilin>sefalosporin	PC1	KA, TZB
A	2b	Penisilinaz	Benzilpenisilin ve sefalosporine benzer etki	TEM-1, TEM-2, SHV-1	KA, TZB
A	2be	GSBL	Oksimino- β -laktam ve hidrolizinde artış (Sefepim, sefotaksim, seftazidim, seftriakson, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1	KA, TZB, AVI
A	2br	IRT	Klavulonat, sulbaktam ve tazobaktama direnç	TEM-30, SHV-10	TZB, AVI
A	2ber	GSBL ve IRT	Oksimino- β -laktam hidrolizinde artış ve inhibitör direnci	TEM-50	-
A	2e	GSBL sefalosporinaz	Sefalosporin hidrolizi KA ile inhibe olura ancak aztreonama etkisiz	CepA	KA, ATM
A	2f	Karbapenemaz	Karbapenem, oksimino- β -laktam ve sefamisin hidrolizinde artış	KPC	AVI, REL, VAB
				SME	KA, AVI, VAB
B1, B3	3a	MBL, Karbapenemaz	Monobaktamlar hariç β -laktam hidrolizinde artış	IMP, VIM, NDM, SPM	EDTA
B2	3b	MBL, Karbapenemaz	Karbapenemleri tercih eder	CphA, Sfh-I	EDTA
C	1	Sefalosporinaz	Sefalosporin>benzilpenisilin Sefamisinleri parçalar	P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1	ATM, AVI, VAB
D	2d	Oksasilinaz	Kloksasilin ve oksasilin hidrolizinde artış	OXA-1, OXA-10	Değişken
D	2de	GSBL oksasilinaz	Kloksasilin, oksasilin ve oksimino- β -laktam hidrolizinde artış	OXA-11, OXA-15	Değişken
D	2df	Karbapenemaz	Kloksasilin, oksasilin ve karbapenem hidrolizinde artış	OXA-23, OXA-48, OXA-181, OXA-232	AVI (OXA-48)

KA: klavulonik asit, TZB: Tazobaktam, AVI: Avibaktam, REL: relebaktam, VAB: Vaborbaktam, EDTA: Etilendiamintetraasetik asit ATM: Aztreonam, GSBL: Genişlemiş spektrumlu β -laktamaz, IRT: İnhibitör dirençli β -laktamaz, MBL: Metallo- β -laktamaz.

Ambler moleküler sınıflandırmasına göre β -laktamazlar A, B, C ve D olmak üzere dört gruba ayrılır. A, C ve D grubu β -laktamazlar aktif bölgelerinde serin aminoasiti bulundurur, grup B β -laktamazlar ise aktif bölgelerinde çinko katyonu bulundurur. Bush-Jacoby-Medeiros fonksiyonel sınıflandırmasına göre β -laktamazlar ise 3 ana grup ve çok sayıda subgruba ayrılır. Grup 1; sefalosporinaz olarak adlandırılır, yapısal özelliklerine göre C grubunu oluşturur ve genellikle kromozomal aktarılır. Grup 2, Ambler grup A ve D β -laktamazları içerir. Grup A enzimlerin temel substratı penisilinlerdir, grup D enzimler ise oksasilini hızlı hidrolize edebilme yeteneğine sahiptir. Grup 3 ise Ambler B grubu β -laktamazlardan oluşur, aktif bölgesinde diğerlerinden farklı olarak Zn^{+2} bulundurur ve metallo- β -laktamazlar olarak adlandırılır.

Grup A β -laktamazlar

Bush-Jacoby fonksiyonel sınıflandırmasına göre subgrup 2a'da yer alan enzimler, dar spektrumlu penisilinleri hidrolize eder ve çoğunlukla Gram pozitif koklarda bulunur. Subgrup 2b'de bulunan TEM-1, TEM-2, SHV-1 gibi enzimler ilk kez 1970-1980'lerde izole edilmiş plazmid kökenli β -laktamazlardır. Daha sonraki yıllarda bu enzimlerin mutasyonu sonucu ortaya çıkan TEM-3, SHV-2 ve CTX-M gibi enzimler ise subgrup 2be'de bulunmaktadır. GSBL özelliği olan bu enzimler klavulonik asit gibi β -laktamaz inhibitörleri ile inhibe olur. Klavulonik asit, tazobaktam, sulbaktam gibi β -laktamaz inhibitörlerine direnç gösteren TEM-30 ve SHV-10 gibi mutantlar ise inhibitör dirençli β -laktamazlar olarak adlandırılır ve Bush-Jacoby subgrup 2br grubunda bulunur. TEM-50 ise genişlemiş spektrumlu sefalosporinleri ve monobaktamları inhibe etmekle birlikte β -laktamaz inhibitörlerine karşı direnç gösterir ve Bush-Jacoby subgrup 2ber'yi oluşturur (55).

Karbapenemaz özelliği olan sınıf A β -laktamazlar, Bush-Jacoby sınıflamasına göre 2bf subgrubunu oluşturur ve tazobaktam, klavulonik asit gibi β -laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır. 6 tip sınıf A karbapenemaz bildirilmiştir: GES (Guiana extended spectrum β -laktamase), SME (*Serratia marcescens* enzyme), SHV (sulfhydryl variable lactamase), KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), IMI/NMC-A (imipenemase/non-metallo-carbapenemase-A), SFC (*Serratia fonticola*

carbapenemase). KPC tipi karbapenemaz plazmid ile aktarılır ve bu grubun en sık karşılaşılan örneğidir (55).

Grup B Metallo β -laktamaz

Aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu bulunduran grup B β -laktamazlar, Bush-Jacoby fonksiyonel sınıflamasında grup 3'ü oluşturmaktadır. MBL monobaktamlar hariç tüm β -laktam antibiyotikleri hidrolize eder. Klavulonik asit, tazobaktam ve sulbaktam gibi β -laktamaz inhibitörlerine dirençlidir. Aktif bölgesinde metal iyonu bulunması nedeniyle etilendiamintetraasetik asit (EDTA) gibi şelatör ajan varlığında MBL'lerin enzimatik aktivitesi inhibe olur. IMP (imipenemase), VIM (Verona integrated MBL), SPM (Sao Paulo MBL), GIM (Germany imipenemase), NDM (New Delhi MBL), FIM (Florence imipenemase) karbapenem dirençli metallo- β -laktamazlar arasında sayılabilir (55, 56).

Grup C β -laktamazlar

Bush-Jacoby fonksiyonel sınıflamasına göre grup 1'i oluşturan bu enzimler aynı zamanda sefalosporinaz olarak da adlandırılır. AmpC geni *Enterobacteriaceae* ailesinin bazı üyelerinde kromozomal olarak taşınır. Klavulonik aside karşı dirençlidir ve genellikle sefoksitin ve sefotetan gibi sefamisinleri de hidrolize eder. Normalde birçok türde AmpC ekspresyonu düşük düzeydedir ancak aminopenisilinler, 1. kuşak sefalosporinler, sefamisinler veya klavulonik asit varlığında düzeyleri artar. Sefepim ve karbapenemler genellikle bu tip enzimlerle inhibe edilmezler. Ancak eflüks pompası ya da porin mutasyonu gibi başka bir direnç mekanizması ile eş zamanlı bulunması halinde karbapenem direnci oluşabilir. *Salmonella* spp., *K.pneumoniae* ve *Proteus mirabilis*'te ampC geni bulunmamaktadır. İndüklenebilir β -laktamazlar kromozomal kökenli olmaları nedeniyle türler arasında aktarılamaz ancak 1989 yılında ilk plazmid kökenli AmpC tipi enzim tanımlanmıştır. Bu enzime özellikle *K.pneumoniae*, *E.coli*, *Salmonella* spp. ve *P.mirabilis* gibi kromozomal AmpC taşımayan türlerde rastlanır (57).

Grup D β -laktamazlar

Oksasilinaz olarak da adlandırılan bu enzimler Bush-Jacoby fonksiyonel sınıflamasına göre subgrup 2d, 2de ve 2df'yi oluşturmaktadır. OXA-1 ve OXA-10, kloksasilin ve oksasilini hidrolize eder ve Bush-Jacoby sınıflamasına göre subgrup 2d'yi oluşturur.

OXA-11 ve OXA-15 GSBL aktivitesine sahiptir ve Bush-Jacoby sınıflamasına göre subgrup 2de'yi oluşturur. Karbapenemleri hidrolize eden OXA-23 ve OXA-48 gibi enzimler ise Bush-Jacoby sınıflamasına göre subgrup 2df'yi oluşturur. OXA-23 ve OXA-48 enzimleri, enterik bakterilerden izole edilen plazmidlerde tanımlanmıştır, diğer çoğu OXA tipi enzim ise *Acinetobacter baumannii* izolatlarının kromozomlarından izole edilmiştir (55).

2.1.6.1.2. Bakteriyel membran geçirgenliğinde azalma

Gram negatif bakterilerde penisilin direnci genellikle Gram pozitif bakterilerden farklı olarak dış membran varlığına bağlı oluşmaktadır. Kalın lipopolisakkarit katman çoğu antibiyotiğin hücreye girişi için bariyer görevi yapmaktadır, bu nedenle nefisilin ve eritromisin gibi hidrofobik antibiyotikler hücre duvarını aşamamaktadır. Polimiksinler gibi lipopolisakkarit yapıyı bozan antibiyotiklerin varlığında hidrofobik antibiyotiklerin de etkinliği artmaktadır. Ayrıca hidrofilik antibiyotiklerin hücreye girişini sağlayan çok sayıda porin bulunmaktadır. OmpA, OmpK35, OmpK36 ve OmpK37 bilinen en önemli OMP'lerdir. Ortam şartlarına bağlı olarak bakteriler, porinlerin sayısını ve türünü değiştirmektedir. Örneğin hiperosmolar ortamda OmpF gibi geniş porinlerin sayısı azalırken, OmpC gibi küçük porinlerin salınımı devam etmektedir. Spesifik porinlerin kaybı ile sonuçlanan mutasyon varlığı da β -laktam antibiyotik direncini artırabilir. Örnek olarak; imipenem ile tedavi edilen *P.aeruginosa* enfeksiyonunda direncin bir kısmından OprD protein kaybı (D2 porin olarak da bilinir) sorumludur (56). Ek olarak OmpK35 ve OmpK36 porinlerinin yokluğunun *K.pneumoniae*'da β -laktam direncinden sorumlu olduğu bilinmektedir.

2.1.6.1.3. Karbapenem direnci

Karbapenem direncinden sorumlu mekanizmalar; karbapenemleri parçalayan β -laktamaz üretimi, spesifik OMP ekspresyonunda azalmaya bağlı ajanın hücreye girişinde azalma, ilacın dış membrandan atılımını sağlayan efluks pompa varlığı, Gram pozitiflerde daha etkili olan hedef değişimi ve ilacın hedefe affinitesinde azalma olarak sıralanabilir (55). Porin mutasyonunda azalmaya genellikle AmpC ya da GSBL enzim varlığı eşlik eder.

Karbapenemazlar Ambler sınıf A, sınıf B ve sınıf D'de bulunur. Bush Jacoby sınıflamasına göre ise subgrup 2f, 2df ve grup 3'ü oluşturur. Genel özellikleri ile karbapenemazlar Tablo 3'de anlatılmıştır.

Tablo 3. Karbapenemazların genel özellikleri (52, 58).

	Sınıf A karbapenemazlar	Sınıf B karbapenemazlar	Sınıf D karbapenemazlar
Bush-Jacoby Sınıflamasına göre	2f	3	2df
Epidemiyolojik bölge	ABD, İngiltere	Japonya, Hindistan	Türkiye, Ortadoğu
Plazmid kaynaklı	KPC, GES	NDM	-
Kromozomal	NmcA, SME	IMP, VIM	OXA-23, OXA-48, OXA-181
Aktif bölge	Serin	Çinko	Serin
İnhibitörler	Boronik asit, Klavulonat ile zayıf inhibisyon	Dipikolinik asit, EDTA	-
β-laktamaz inhibitörleri	AVI, REL, VAB	-	AVI

Ambler sınıf B β-laktamazlar (MBL) karbapenemazlar arasında sayılabilir. *S.maltophilia* ve *Elizabethkingia meningoseptica* gibi bazı non-fermenter türlerde kromozomal MBL üretimi intrinsek karbapenem direncinden sorumludur. Ek olarak; VIM ve NDM gibi kazanılmış MBL'ler, KPC ve IMI gibi Ambler sınıf A β-laktamazlar ve Amber sınıf D β-laktamazlar (OXA) karbapenem direncinden sorumludur. KPC üreten izolatlarda karbapenem direnci, *bla_{KPC}* gen kopya sayısına ve dış membran porin kaybı olup olmamasına göre değişkendir (59).

OprD porin proteininin olmaması ya da üretiminde azalma ile birlikte AmpC β-laktamaz üretimi olması *P.aeruginosa*'da karbapenem direncine sebep olan mekanizmalardandır. *K.pneumoniae*'da OmpK35 ve OmpK36 kaybı ile beraber AmpC ya da GSBL bir enzim bulunması durumunda fenotipik olarak karbapenem direnci görülür (60). *Enterobacter* türlerinde OmpC ve OmpF seviyelerinde azalma karbapenem direnci ile ilişkilidir. *P.aeruginosa*'da bulunan MexA-MexB-OprM çoklu ilaç effuks sistemi meropenem ve doripenemin hücre dışına atılmasına sebep olur (34). *K.pneumoniae*'da 2014'te keşfedilen KpnGH çoklu ilaç efluks sistemi bakteriyeye imipenem ve ertapenem direnci kazandırmaktadır (60).

2.1.6.2. Polimiksin direnci

Polimiksinler, Gram negatif bakterilerin dış membranında lipopolisakkarite bağlanıp ekstrasellüler iyonların (Ca^{+2}/Mg^{+2}) yerini değiştirerek membranı parçalar (35). Polimiksin direncinden sorumlu asıl mekanizma; LPS modifikasyon sistemi olarak da bilinen kromozomal hedef değişimi mekanizmasıdır (53).

2.1.6.3. Tigesiklin direnci

Tigesiklin, tetrasiklinlere benzer şekilde 30S ribozomal subünite bağlanarak protein sentezini inhibe eder. ÇİD Gram pozitifler, Gram negatifler ve anaerobik bakteriler olmak üzere geniş bir antibakteriyel etki spektrumuna sahiptir (38). Bilinen tigesiklin direnç mekanizmaları arasında; 30S ve 16S ribozomal subünit hedef bölge değişimi, hücre geçirgenlik değişikliği, artmış efluks pompa salınımı sayılabilir. Tigesiklin efluks pompa aracılı tetrasiklin dirençli izolatlarla etkisini korumaktadır. İntrensek tigesiklin direnci en sık *P.mirabilis* ve *Morganella morgagni*'de görülmektedir, ilaç ile karşılaştıktan sonra AcrAB ve MexAB-OprM efluks pompalarının upregulasyonu sonucu gelişmektedir. *P.aeruginosa*'daki intrensek dirençten ise MexXY multidrug efluks pompası sorumludur. Ek olarak *K.pneumoniae*'da ompK35K porin seviyesinde azalma, *rpsj* tarafından kodlanan S10 protein kaybı da dirence katkı sağlar (38, 53).

2.2. Biyofilm

Biyofilm, mikroorganizmaların çevresel etkilerden korunmak ve yaşamsal faaliyetlerine devam edebilmek amacıyla oluşturdukları doğal çevrede de sık rastlanan bir mikrobiyal yaşam formudur. Mikroorganizmaların canlı ya da cansız yüzeylere geri dönüşümsüz tutunarak kendi ürettiği ekstrasellüler polimerik matriks içine gömülmesi ile oluşur (6, 61).

Modern mikrobiyolojinin babası kabul edilen Robert Koch 1970'lerde bakterileri çoğunlukla tek başına hareket eden mikroorganizmalar olarak tanımlamıştır. Ancak takip eden yıllarda bazı bakterileri öldürmekte zorluk yaşanması, araştırmacıları bakterilerin hayat döngüsünü tekrar incelemeye yönlendirmiştir. O dönemde yapılan çalışmalarda bakterilerin kendi ürettikleri matriks içinde agregatlar oluşturdukları gözlenmiştir (62). Aslında biyofilmler ilk kez 1684'te Antonie van Leeuwenhoek tarafından kendi ürettiği ilkel mikroskobunda dental plak üzerinde gözlenmiştir (63). "Biyofilm" terimi ise ilk kez 1978'de Costerton tarafından kullanılmıştır (62). Ancak

sesil bakterilerin bu bakteriyel biyokütellerin önemli bir parçası olduğu ve bu yüzeylere tutunan bakterilerin ayrıntılı organize olduğu 1980-1990'lara kadar anlaşılammıştır (63).

2.2.1. Biyofilmin yapısı ve mikrobiyolojik özellikler

Biyofilm biyopolimerik matriks içinde, canlı ya da cansız yüzeylere tutunarak çoğalan mikroorganizma topluluklarıdır. Bu topluluklar tek bir mikroorganizmadan oluşabildiği gibi farklı mikroorganizmalar tarafından da oluşturulabilir. Biyopolimerik matriksin görevi; mikroorganizmaların kolonizasyonunu desteklemek, mikroorganizmaları olumsuz çevresel faktörlerden, antibiyotik ve dezenfektan gibi kimyasallardan korumaktır (6). Matriks içinde; polisakkaritler, proteinler ve bakteriden ayrılan ekstrasellüler DNA mevcuttur (64). Ayrıca su ve besinlerin biyofilm içinde dağılmasını sağlayan kanallar da bulunmaktadır (62).

2.2.1.1. Ekzopolisakkaritler

Ekzopolisakkaritler hücre içinde sentezlenip dışarı atılabilir ya da hücre dışında sentezlenebilir. Elektron mikroskopisinde hücre yüzeyine tutunmuş geniş bir ağ şeklinde görülür. Proteinler, nükleik asitler, karbohidratlar ve lipitler için cep görevi görür. Nelson ve arkadaşlarının çalışmasına göre (62) mannoz, galaktoz ve glukoz en sık karşılaşılan karbohidratlardır, takiben ise N-asetil-glukozamin, galaktronik asid, arabinoz, fukoz, rhamnoz ve ksiloz gelmektedir. Eksopolisakkaritler biyofilm spesifik olmasalar da stres cevabı olarak ekzopolisakkaritlerin üretimi artmaktadır (62).

Kolanik asit (M antijeni olarak da bilinir), *Enterobacteriaceae*'da bulunan ekstrasellüler bir heteropolisakkarittir. *E.coli*'nin K-12 izolatında kolanik asit üretiminin defektif olmasına bağlı bağlanma hızı daha yavaştır. *P.aeruginosa* biyofilminde 3 adet ekzopolisakkarit görevlidir: Pel, Psl ve aljinat. Stafilokoklarda biyofilm ilişkili ekzopolisakkarit, polisakkarit intersellüler adhesin (PIA)'dır ve poli N-asetil-glukozamin olarak da bilinir (62).

2.2.1.2. Ekstrasellüler proteinler

Proteinler bir diğer önemli ekstrasellüler matriks bileşenidir. Bazı proteinler hücre yüzeyine tutunur. Polisakkaritlerle birlikte biyofilm oluşumu ve stabilizasyonunda görev alır. *S.mutans* biyofilmindeki glukon bağlayan proteinler (Gbps), ekstrasellüler

proteinlere örnek olarak verilebilir (62). Amiloidler de biyofilm yapısında destek olan ve çözünmeyen fibröz proteinlerdir, *Pseudomonas* spp. biyofilmindeki Fap amiloidleri örnek verilebilir. Fazla salınmaları hücre agregasyonunu sağlar ve biyofilm oluşumunu hızlandır. Biyofilm ilişkili protein (bap) ailesi de örnek verilebilir. *S.aureus* biyofilminde görevli Bap proteini ve *E.faecalis*'teki Esp proteini bu aileye dahildir (62). Matrikste bulunan bazı enzimler biyofilmin parçalanmasında görev alır. Bu enzimler biyopolimerleri yıkarak hücrelere karbon ve enerji kaynağı sağlar. Matriksteki enzimler ek olarak bakterinin biyofilmden kopmasında da görev alır (62).

2.2.1.3. Ekstrasellüler DNA (eDNA)

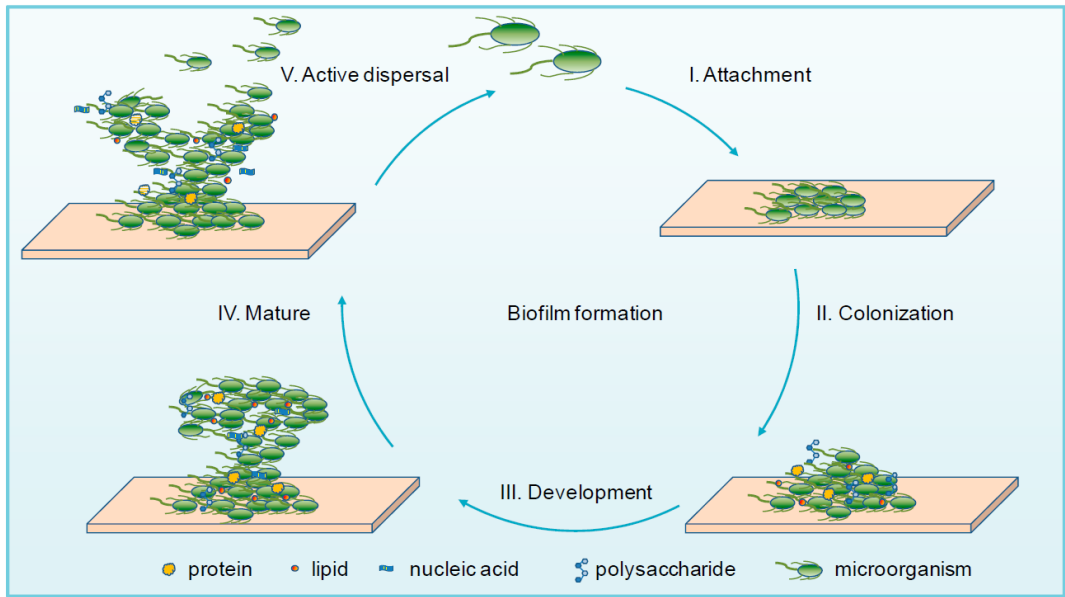
Mattick ve arkadaşlarının çalışmasından önce eDNA'nın parçalanmış hücre kalıntıları olduğu düşünülmekte idi. Ancak son yapılan çalışmalarda DNaz enziminin inhibe edilmesinin *P.aeruginosa*'da biyofilm oluşumunu engellediği görülmüştür. Ekstrasellüler DNA'nın sadece parçalanmış hücrelerden gelmediği ayrıca aktif olarak sekrete edildiği düşünüldüğünde biyofilm oluşumu için önemi anlaşılmaktadır. eDNA, başlangıçta biyofilmin yüzeye bağlanmasında negatif yük nedeniyle itme kuvveti olarak fonksiyon gösterse de hücre ve yüzey arasındaki mesafe arttıkça yüzeydeki reseptörleri uyararak adhezyonu kolaylaştırır. Ayrıca eDNA, *P.aeruginosa*'nın biyofilmden genişlemeden sorumlu seyirme hareketine de yardımcı olur ve bu sayede hücre hareketlerini koordine eder. eDNA'nın sağladığı negatif yük, bazı metal katyonların ve bazı pozitif yüklü antibiyotiklerin çökmesini sağlayabilir, bu mekanizma ile antibiyotik direncine de katkı sağlar (62).

2.2.2. Biyofilm oluşumu

Biyofilm kompleks ve dinamik bir yapıdır. Biyofilm oluşumu 5 aşamada (Resim 1) özetlenebilir (65):

- a. Tutunma: Mikroorganizmaların canlı ya da cansız yüzeye zayıf bağlar ile bağlanması.
- b. Kolonizasyon: Mikroorganizmaların flagella, pili, lipopolisakkaritler, ekzopolisakkaritler, kollajen-bağlayan adheziv proteinler aracılığıyla daha güçlü hidrofilik/hidrofobik etkileşimle yüzeye geri dönüşümsüz tutunması.

- c. Gelişim: Proliferasyon yoluyla çok tabakalı hücre birikimi ve EPS üretilip sekrete edilmesi.
- d. Maturasyon: Besinlerin ve sinyal moleküllerinin biyofilm içinde dağılımını sağlayan kanalların da gelişmesi ile birlikte üç boyutlu stabil biyofilm yapısı oluşması.
- e. Aktif ayrılma: İnternal veya eksternal faktörlerin etkisi ile mikrobiyal hücrelerin gruplar halinde ya da tek başına biyofilmden ayrılması ve başka bölgelere göç edip tekrar biyofilm oluşumunu başlatmaları.



Şekil 1. Biyofilm oluşum aşamaları (65).

Tutunma evresinin başlangıcında pili, yüzey ile hücre arasındaki etkileşimde kritik öneme sahiptir. Tip 4 pili aracılı seyirme hareketi, hücrelerin agregasyonunu ve mikrokoloni oluşmasını sağlar (62). *S.aureus* ve *S.epidermidis* için biyofilm oluşumu fibronektin (Fn), fibrinojen (Fg), vitronektin (Vn) gibi konak matriks proteinlerine bağlanma ile başlar. Bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglikan, yukarıda sıralanan adheziv matriks moleküllerini tanır. Otolizinlerin aracı olduğu nonkovalent bağlanma da biyofilm oluşumunda rol oynar. EPS sentezlendikten sonra geri dönüşümsüz tutunma dönemi başlar. Üzerine en çok çalışma yapılan biyofilmlerden biri olan *P.aeruginosa* biyofilminde aljinat, EPS matriksinin büyük bir polisakkarit bileşenidir ve miktarı biyofilm içindeki bakterilerde planktonik formda olanlara kıyasla birkaç kat fazladır.

Biyofilmin ilk tabakası oluştuktan sonra benzer ya da farklı türlerden mikroorganizmalar biyofilm tabakaları arasına yerleşebilirler. Yeni gelen bakteriler metabolizmaları ve oksijen ihtiyaçlarına göre biyofilm tabakaları içine dağılırlar. Örneğin anaerobik bakteriler daha derin tabakalara yerleşirken aerobik bakteriler daha üst tabakalara yerleşir. Biyofilm içindeki bakteriler özel bir haberleşme sistemi ile birbirleri ile konuşurlar. Bu sistem quorum sensing (QS) olarak adlandırılır. Biyofilm maturasyonu tamamlandıktan sonra, besin eksikliği ya da biyofilmin fazla büyümesi gibi faktörler sebebiyle ayrılma aşamasına geçilir (62). Biyofilmden ayrılarak göç eden bu bakteriler vücudun herhangi bir bölgesine yerleşerek tekrar biyofilm oluşumunu başlatırlar.

2.2.3. Biyofilm ilişkili enfeksiyonlar

Enfeksiyonların patogenezi anlamak için son yıllara kadar yapılan çalışmalarda patojenlerin sadece planktonik formları araştırılmıştır. Günümüzde ise tedavi edilemeyen ya da tedavi sonrası rekürrens görülen enfeksiyonların patogenezi araştırıldıkça, biyofilmin de önemli bir rol oynadığı görülmüştür. Biyofilm ilişkili mikroorganizmaların sebep olduğu endokardit, osteomyelit, sinüzit, idrar yolu enfeksiyonları, periodontit, kistik fibrozis hastalarında kronik solunum yolu enfeksiyonları, orta kulak enfeksiyonu ve özellikle de implante cihaz ilişkili nozokomiyal enfeksiyonlar dahil olmak üzere geniş bir grup hastalık gelişmekte olan ülkelerde sık görülmektedir (66).

2.2.3.1. Kistik fibrozis hastalarında pnömoni

Kistik fibrozis, akciğerde koyu kıvamlı ve yapışkan mukus oluşmasına sebep olarak hastalarda solunumu zorlaştırır. Hastaların %8'i *P.aeruginosa* ile kolonizedir. Ayrıca kullanılan cihazlarda da *P.aeruginosa* ile kontaminasyon olmaktadır. Bu hastalarda verilen tedavi ile hastanın akut dönemde enfeksiyonu kontrol altına alınsa da tam kür elde edilemediğinden, antibiyotik tedavisi kesildikten sonra biyofilm rezervuar olarak fonksiyon gösterir ve tekrarlayan enfeksiyonlara yol açar. Ek olarak *P.aeruginosa*'da biyofilm matriksinin majör polisakkariti olan aljinat, akciğer dokusunda hasara sebep olan bir virulans faktörüdür (62).

2.2.3.2. Oral kavite enfeksiyonları

Oral mikrobiyota farklı mikrobiyal türleri içeren, yapısal ve fonksiyonel olarak organize olmuş bir biyofilm örneğidir. Bakteriye kolonizasyon ve enamel yüzeyinde biyofilm oluşumu için bakteriler arasındaki etkileşim önemlidir. Bakteri yüzeye tutunamazsa, ağızdaki sekresyonlar ile beraber dışarı atılabilir. Oral bakteriler, diş ya da epitel gibi dokular ya da yüzeydeki immobil bakterilere tutunurlar (ko-adhezyon). Genetik olarak farklı hücreler arasındaki etkileşim tutunma sırasında da gerçekleşir (ko-agregasyon). Oral bakteriler en az bir tane koagregasyon partnerine sahiptir. Streptokoklar ve aktinomiçesler kolonizasyonu başlatan bakterilerdir, statherin gibi fosfattan zengin proteinler, α -amilaz gibi enzimler gibi reseptörler aracılığıyla dental plağa tutunurlar (62).

Oral flora elemanları ile patojenik türler arasındaki etkileşim periodontal mikrobiyotayı birçok yönden etkiler ve periodontal hastalıklar ile sonuçlanabilir. Bu patojenler periodontal hastalıklara sebep olabildikleri gibi, hastalık yapmadan oral mikrobiyotaya yerleşip özellikle de immun yetmezliği olan bireylerde disseminasyona da sebep olabilirler. Periodontit ve gingivitis, biyofilm ilişkili periodontal hastalıklardır. Patojenik biyofilm oluşumu ve buna bağlı konağın inflamatuvar yanıtının tetiklenmesi, periodontal dokularda harabiyet ve diş kaybı ile sonuçlanır (66). Periodontal biyofilm ile gingival kan dolaşımı arasındaki anatomik yakınlık, mikrobiyal patojenler ve ürünlerine rezervuar görevi yapan periodontal cepler sayesinde inflamatuvar hücreler ve immunkompleksler insan vücudunun farklı bölgelerine göç edebilir (61).

2.2.3.3. Yara yeri enfeksiyonları

Kronik yaralarda sıklıkla biyofilm bulunur ve biyofilm içermeyen akut yaraların aksine yavaş iyileşir. Diyabetik ayak ülserleri bu grupta sayılabilir. Genellikle yaranın dış yüzeyine yerleşirler ancak *P.aeruginosa* biyofilmi gibi bazı biyofilmler daha derin tabakalara yerleşebilir ve klasik sürüntü kültürü ile tanı konulması zorlaşır. Ek olarak biyofilm oluşuktan sonra yeterli yara debridmanı yapılmadan enfeksiyonun kontrol altına alınması da zorlaşır. *S.aureus* ve *P.aeruginosa* sıklıkla yaralarda beraber izole edilen patojenlerdir. *S.aureus*'un fibrin reseptörü olması sayesinde kemik matriksindeki fibrinojene bağlanıp biyofilm oluşumunu başlatır ve osteomyelite sebep

olur. *S.aureus*'un fibrinojen, kollajen ve laminine bağlanma yeteneği cilt, yumuşak doku hatta kemiğe kolonize olup biyofilm oluşturmasını kolaylaştırır (62, 66).

2.2.3.4. Üriner ve gastrointestinal sistem enfeksiyonları

Üriner ve gastrointestinal sistem normal sağlıklı bir polimikrobiyal floraya sahiptir. Flora; bu sistemlere ait enfeksiyonlar, bakteriyel vajinozis ve cinsel yolla bulaşan hastalıklardan korunma sağlar. Üriner sisteme yerleştirilen kateter gibi biyomateryaller biyofilm oluşumunu artırarak enfeksiyona zemin hazırlarlar. Tüm üriner kateterlerin hem iç hem de dış yüzeyleri bakteriyel biyofilm ile enfektir. Ek olarak *E.coli*'nin enteroagregatif fenotipinin oluşturduğu ishal sendromunda da biyofilmin rol oynadığı düşünülmektedir (62, 66).

2.2.3.5. Protetik eklem enfeksiyonları

Sıklıkla stafilokoklar gibi Gram pozitif koklar protez eklem enfeksiyonlarına sebep olurlar. Bulaş ve kolonizasyon genellikle cerrahi sırasında olur. *S.aureus* gibi virulan bakterilerin etken olduğu enfeksiyonlarda cerrahi sonrası erken dönemde semptomlar oluşur. Koagülaz negatif stafilokoklar ve enterokoklar gibi virulansı daha düşük olan bakterilerin etken olduğu enfeksiyonlar ise daha geç dönemde ağrı, fonksiyon bozukluğu gibi semptomlarla ortaya çıkar (62).

2.2.3.6. Kalp kapak enfeksiyonları

Mekanik kardiyak kapaklar üzerine yerleşen biyofilm, protetik kapak endokarditine sebep olur. Endokardit etiolojisinde yer alan bakteriler arasında *S.epidermidis*, *S.aureus*, *Streptococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Enterococcus spp.* ve *Candida spp.* sayılabilir. Yapay kardiyak kapak üzerindeki biyofilm yırtılabilir ya da kapağı tı kayabilir, bunun sonucunda akımda azalma ya da türbülansa sebep olabilir. Kan dolaşımındaki biyofilm parçaları böbrek ya da beyin gibi son noktalara ulaşarak o bölgelerde tıkanma ya da enfeksiyonun yayılımına sebep olabilir (62).

2.2.3.7. Biyofilm ilişkili cihaz disfonksiyonu

Makrofaj ve dev hücrelerden oluşan yabancı cisim reaksiyonu, yara iyileşmesi sürecinin son aşamasıdır. Yabancı cisim reaksiyonunu oluşturan olaylar arasında; protein adsorbsiyonu, monosit/makrofaj adhezyonu, yabancı cisim dev hücreler ile makrofaj birleşmesi sayılabilir. Biyomateryal yüzey özellikleri implantasyondan

sonraki yabancı cisim reaksiyonunun ilk 2-4 haftasında önemli rol oynar. Çevredeki biyofilm mikroorganizmaları, biyomateryallerde bozulmaya ve bunu takiben klinik cihazda işlev bozukluğuna neden olmaktadır. İmplantta bozulma hafif ağrı, yumuşak dokuda kontraktür ya da fonksiyonel hasar gibi ılımlı klinik bulgulara sebep olabilir. Subklinik enfeksiyonun tanısı için kültür süresinin uzatılması ya da sonikasyon gibi özel yöntemler kullanılması gerekebilir (66).

2.2.4. Biyofilm varlığında antibiyotik direnci ve direnç mekanizmaları

Direnç tanım olarak; bakterisidal ya da bakteriostatik etki gösterdiği bilinen bir ajan ortamda yeterli konsantrasyonda bulursa da mikroorganizmanın büyümeye devam etmesi anlamına gelir. Planktonik kültürde minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ölçülerek hesaplanır. Tolerans ise; mikrobiyal ajan varlığında bakterinin çoğalmadan hayatta kalması olarak tanımlanır. Toleransın ölçüsü minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK), bakterilerin $\geq 99,9\%$ 'unu öldüren en düşük antibiyotik konsantrasyonu olarak tanımlanır. Minimum biyofilm inhibitör konsantrasyon (MBİK) ise biyofilm eradikasyonunu sağlayan en düşük antibiyotik konsantrasyonu olarak tanımlanır (67). Biyofilm oluştuktan sonra kuyucuklardaki sıvı ya da kullanılan deney sisteminin parçası olan iğne ya da kupon gibi materyaller kültüre ekilebilir. Daha sonra kültürdeki canlı koloniler sayılarak biyofilm için MİK (bMİK) ve biyofilm için MBK (bMBK) gibi değerler de ölçülebilir (68).

Antibiyotik direnci, enfeksiyonların tedavisini zorlaştıran en önemli sorunlardan biridir. Biyofilm içindeki bakteriler planktonik forma kıyasla antibiyotiklere ve konak immun sistemi ürünlerine karşı daha dirençlidir (6). Biyofilm içindeki bakterilerin antibiyotiklere karşı planktonik forma kıyasla 10.000 kat daha dirençli olabileceği düşünülmektedir. Costerton ve arkadaşlarının (8) *P.aeruginosa* biyofilmi üzerine yaptıkları çalışmaya göre tobramisin planktonik forma 50 µg/mL konsantrasyonda etkili iken, biyofilm hücreleri 1 mg/mL tobramisine dirençli bulunmuştur. Dezenfektanlara karşı dirençte de artış saptanmıştır. Abee ve arkadaşlarının (69) benzalkonyum klorit ve sodyum hipoklorit gibi iki farklı dezenfektanın *S.aureus* biyofilmi üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada, dezenfektanların inhibitör konsantrasyonlarının planktonik forma kıyasla 50-600 kat arttığını saptamışlardır (62).

2.2.4.1. Antibiyotiklerin biyofilm matriksine düşük penetrasyonu

Literatürde genel olarak kabul edilse ve hala ara sıra alıntı yapılsa da bu mekanizma tam olarak biyofilmin antibiyotik direncini açıklamamaktadır. Örneğin tetrasiklinler uygulandıktan 10 dakika sonra üropatojenik *E.coli* biyofilminin tüm hücrelerine ulaşmaktadır ancak bu durumdan hücre canlılığını etkilenmemektedir (70). Benzer şekilde ampisilin ve siprofloksasin planktonik MİK'i aşan düzeylerde *K.pneumoniae* biyofilmine nüfuz edebilmektedir (71). Başka bir örnek de oksasilin, vankomisin ve sefotaksim gibi antibiyotiklerin *S.aureus* ve *S.epidermidis* biyofilmine geçişinin sınırlı olmasıdır (72) ve buna penetrasyon bariyeri gibi bir durumun sebep olduğu düşünülmektedir. *P.aeruginosa* biyofilminin tobramisinine toleransı da bu duruma örnek verilebilir. Pozitif yüklü tobramisin molekülünün, matriks bileşenlerindeki eDNA ve faj partükülleri gibi pozitif yüklü moleküller ile etkileşiminin penetrasyon bariyeri oluşturduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak azalmış penetrasyon nedeniyle *P.aeruginosa* biyofilminin aminoglikozitlere toleransı artmaktadır. Ancak yeterli süre beklendiğinde tobramisinin *P.aeruginosa* biyofilmine penetre olabildiği de bilinmektedir (73, 74).

Sonuç olarak, antibiyotiklerin biyofilme penetrasyonu antibiyotik duyarlılığını azaltmaktadır. Ancak biyofilm içine hızlı penetre olan ampisilin, florokinolonlar ve rifampin gibi ajanlar ile önemli ölçüde hücre hasarı olmadığı düşünüldüğünde, biyofilmdeki antibiyotik direncinde ek mekanizmaların da sorumlu olduğu görülmektedir. Ek olarak; biyofilm içindeki hücrelerin, biyofilme yavaş penetre olan antibiyotiklere karşı toleransını artıran adaptif bir fenotipik cevap oluşturduğu düşünülmektedir (67).

2.2.4.2. Matrikste bulunan moleküllerin antibiyotiklere etkisi

P.aeruginosa tarafından üretilen Psl bir ekzopolisakkarittir, tekrarlayan pentasakkarit D-glukoz, D-mannoz ve L-rhamnoz subünitlerinden oluşur. Biyofilm oluşumunun erken evrelerinde kolistin, polimiksin B, tobramisin ve siprofloksasine karşı direnç gelişiminde rolü olduğu düşünülmektedir. Psl ayrıca biyofilm oluşumunu inhibe eden bir non-iyonik sürfaktan olan polisorbata-80 direncinde de gereklidir. *P.aeruginosa* biyofilm glikokaliksinin başka bir önemli yapısal bileşeni olan Pel, tobramisin ve gentamisinine karşı korunma sağlar (75, 76).

Endojen ya da ekzojen kaynaklı olmasından bağımsız olarak eDNA biyofilmin antibiyotik direncini artırır. Bir çalışmada *P.aeruginosa* biyofilmine dışarıdan eDNA eklendiğinde tobramisin direncinde 3 kat, gentamisin direncinde 2 kat artış görülmüştür (77). Bazı antibiyotikler ile tedavi edildiğinde eDNA salınımının artabildiği bilinmektedir. Subinhibitör konsantrasyonlarda metisilin varlığı bazı *S.aureus* türlerinde biyofilm matriksine eDNA salınımını artırır (78). Benzer şekilde *S.epidermidis* biyofilminde eDNA salınımı ortamda subinhibitör konsantrasyonlarda vankomisin varlığında artar (79). eDNA'nın biyofilm direncine katkısını açıklayan bir diğer mekanizma da anyonik molekül olması nedeniyle ekstrasellüler çevreyi değiştirmesidir, çevredeki efektif Mg^{+2} konsantrasyonunu azaltır. Biyofilm içindeki asidik ortamın (pH 6.0-6.2) da katkısı ile azalan Mg konsantrasyonu sinyal sistemini tetikleyerek antibiyotik direncine katkı sağlar (80). Ek olarak eDNA, antibiyotik direnç genlerinin horizontal transferini sağlayarak da antibiyotik direncine katkı sağlar (67).

Biyofilm matriksinde yerleşen β -laktamazlar, antibiyotiklerin hedef hücrelere ulaşmasını engellerler. *K.pneumoniae* biyofilmine sekrete edilen β -laktamaz ampisilini yıkarak biyofilm içinde yayılımını önler. Ancak β -laktamaz olmasa da *K.pneumoniae* biyofilm hücreleri planktonik forma göre ampisiline daha dirençlidir (71). Benzer şekilde *P.aeruginosa* matriksine sekrete edilen kromozomal AmpC β -laktamaz da biyofilm direncinde önemli rol oynar. Olgun *P.aeruginosa* biyofilmi genç biyofilme kıyasla meropenem ve seftazidime karşı, matriks içinde artan β -laktamaz konsantrasyonu nedeniyle, daha dirençlidir (81).

2.2.4.3. Besin kısıtlılığı ve stres cevabı

Biyofilm içinde farklı yerleşimlere sahip olan hücreler arasındaki antimikrobiyal duyarlılık, metabolik aktivite ve fenotip farklılıkları fizyolojik heterojenite olarak adlandırılır. Heterojenite, besinler ve oksijenin biyofilm içinde farklı konsantrasyonlarda dağılması nedeniyle oluşur, yüzeye yakın hücreler derinlere yerleşen hücrelere kıyasla daha fazla besin ve oksijene ulaşabilirler. Daha derin hipoksik bölgelere yerleşen hücrelerde metabolik aktivite azalır ve bölünme hızları azalır (82). Çoğu antibiyotiğin hızlı büyüyen hücrelere etkili olması nedeniyle yavaş büyüyen hücrelerde antibiyotiklere tolerans görülür.

Hipoksi, biyofilmin antibiyotiklere toleransını artıran bir diğer faktördür. Bu durumun bir istisnası; *P.aeruginosa* biyofilminin anaerobik ortamda kolistin duyarlılığını korumasıdır, hatta kolistin toleran alt gruplar, biyofilmin oksijenden zengin alanlarına daha çok yerleşmiştir. Bu durum hücre duvarına etkili antibiyotikler için azalmış büyüme hızının, toleransı artıran bir mekanizma olmadığını göstermektedir (83). Oksidatif metabolizma sonucu ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin, bazı antibiyotiklerin bakterisidal etkisine katkı sağladığı düşünülmektedir. Biyofilmin oksijenden fakir kısımlarına yerleşen bakterilerde serbest oksijen radikalleri oluşmamasının biyofilmin antibiyotiklere toleransını artırdığı düşünülmektedir (67).

2.2.4.4. Eflüks pompaları

Eflüks pompaları, bakterilerin toksinleri ve antibiyotikleri dışarı atmasını sağlar. Bazı eflüks pompa gen ürünlerinin planktonik hücrelere kıyasla biyofilm hücrelerinde daha fazla üretilmesi biyofilm direncine katkı sağlar (62, 67). Örneğin, *P.aeruginosa*'nın ilaç direncinden sorumlu PA1875-1877 eflüks pompası biyofilm hücrelerinde planktonik hücrelere kıyasla 10 kat daha fazla salgılanmaktadır (67).

2.2.4.5. Quorum sensing (QS)

Çoğu bakteriyel türün biyofilm oluşturmalarını ve biyofilm içinde iletişim kurabilmesini sağlayan spesifik sinyal molekülleri vardır. QS, bakterilerin hücre yoğunluğunu gözleme ve kolektif davranışları düzenleme amacıyla kullandığı bir haberleşme sistemidir. Gram pozitiflerde peptitler, mantarlarda farnesol ve tyrosol gibi alkoller QS molekülleri olarak tanımlanmıştır. N-açıl-L-homoserin lakton (AHL) ise, Gram negatif bakterilerde iyi tanımlanmış bir sinyal molekülüdür. AHL'nin açıl yan zincirinin uzunluğu ve fonksiyonuna göre birkaç türü vardır. Autoinducer (AI) -2 hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde QS aracılı gen ekspresyonundan sorumludur. Biyofilmde hücrelerin az iken az miktarda AI salgılanır ve tespit edilemeyecek kadar az oranlardadır. Hücre yoğunluğu arttıkça AI miktarı artar ve belirli bir sınır değeri aşıldıktan sonra hedef genleri uyarır ya da baskılar (62).

QS'in bilinen klasik örneklerinden biri; *Vibrio fischeri*'nin biyoluminesens (ışık üretimi) özelliğidir. QS'in ayrıca bakterinin virulansına da katkısı vardır, *P.aeruginosa*'da enfeksiyon patogenezinde önemli rol oynayan ekstrasellüler enzimlerin ve sellüler lizinlerin üretimini sağlar. Bu nedenle *P.aeruginosa* bakterileri

QS sistemi aktive olana kadar enfeksiyona sebep olmadan kolonize olurlar. Kolonideki bakteri sayısı QS sistemini aktive edecek düzeye ulaştıktan sonra virulans faktörleri üretilmeye başlanır. QS ek olarak *P.aeruginosa*'da eDNA, *B.subtilis*'te surfaktin salınımını artırır, bu sayede biyofilm oluşumunda da önemli bir role sahiptir (62, 64).

2.2.4.6. Genetik çeşitlilik

Bakterilerin, biyofilm matriksinden eDNA toplamaları yanında biyofilm içindeki bakteriler arasında konjugasyon yoluyla plazmid aktarma yetenekleri de vardır. Bu konjugasyon yoluyla transfer yeteneği, biyofilm hücrelerinde planktonik hücrelere kıyasla daha etkilidir. Örneğin *S.aureus* biyofilminde ÇİD gen aktarımı planktonik kültüre kıyasla 10 000 kat daha fazladır (84). İntegronlar, bir integrasyon bölgesi, mobilize gen kasetini kodlayan promotör ve integras kodlayan bir genden oluşan genetik elemanlardır. Bazı integronlar sıklıkla antibiyotik direnç genlerini taşırlar. Biyofilm içindeki hücrelerde açıklık cevabına bağlı integras üretimi artar ve buna bağlı olarak gen kasetlerinin kesilme sıklığı artar. Planktonik hücrelere kıyasla biyofilm hücrelerinde bu mekanizma 100 kat daha sıktır (67).

Biyofilm içindeki hücrelerde mutasyon birikme oranı da planktonik hücrelere kıyasla daha yüksektir. Biyofilm içindeki hücrelerde, artmış endojen oksidatif strese bağlı spontan mutasyonların daha sık olması mümkündür. Bu hipotezi test etmek için yapılan çalışmalarda, antioksidan eklendiğinde mutasyon oranının azaldığı görülmüştür (67). Küçük koloni varyantları, osteomyelit ve implante cihaz ilişkili enfeksiyonlar gibi persistan ve tekrarlayan enfeksiyonlarda görülür. Bu varyantlar geçici ya da kalıcı, koloni büyüklüğünde değişiklik, yavaş büyüme, artmış antibakteriyel direnç gibi değişiklikler gösterirler (67).

2.2.4.7. Persistan hücreler

Antimikrobiyal uygulanan planktonik kültürlerde olduğu gibi, biyofilm içindeki hücrelerin bir kısmı uyku halinde kalır ve büyümmez. Bu hücreler “persistan hücreler” olarak adlandırılır. Persistan hücrelerin biyofilmin antibiyotik toleransında rolü olduğu düşünülmektedir. İlk kez 1944'te Joseph Bigger tarafından tanımlanmıştır (85). 250.000.000 *S.aureus* bakterisinden oluşan popülasyonda tedavi sonrası sayıları 100'den az da olsa canlı hücreler olduğunu ve aslında dirençli mutant olmasalar da antibiyotik teması kesildikten sonra yeni bakteri popülasyonu oluşumundan sorumlu

olduklarını keşfetmiştir. Bakteri popülasyonunun %1'den daha azını oluşturan bu hücrelerin genetik olarak diğerlerine benzer olduğu ancak fenotipik olarak farklı olduğu görülmüştür (6, 67, 86).

2.2.5. Biyofilmde saptama yöntemleri ve biyofilmde antimikrobiyal duyarlılık testleri

Biyofilm oluşumunun enfeksiyon patogenezindeki önemi anlaşıldıkça, biyofilmin antibakteriyel dirence katkısı, biyofilm oluşum mekanizması ve önlemeye yönelik stratejileri amaçlayan çalışmalar da hız kazanmıştır. Bu amaçla günümüzde in vitro yöntemler, biyofilm model oluşumu için hayvan deneyleri ve farklı görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır.

İn vitro yöntemler arasında Kongo kırmızılı agar yöntemi, modifiye tüp adherens yöntemi ve mikroplak yöntemi sayılabilir. Kongo kırmızılı agar yönteminde; sukroz eklenmiş beyin-kalp infüzyon agara tek koloni ekim yapılır ve 37 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra renk değişimi değerlendirilir. Siyah-koyu kırmızı renk değişimi olanlar biyofilm pozitif kabul edilir. Standart cam tüp yönteminde; triptik soy broth (TSB) içeren cam tüpler bakteri inokülasyonu sonrası 37 °C'de 24-48 saat inkube edilir. Daha sonra metilen mavisi ile boyanarak değerlendirilir. Modifiye tüp adherens yönteminde (Christensen yöntemi) ise; glukoz eklenmiş TSB'de bakteri inokülasyonu sonrası 37 °C'de 24-48 saat inkube edilir. Safranin, kristal viyole ya da trypan blue gibi bir boya ile boyanarak rengin koyuluğuna göre değerlendirilir. Mikroplak yönteminde ise Christensen yöntemine benzer şekilde deney aşamaları uygulandıktan sonra spektrofotometrik olarak okutulur (6, 61).

Işık mikroskobu ve elektron mikroskobu gibi yöntemler biyofilm oluşumunu direkt gözlemleyebilme imkânı sunar. Konofokal lazer taramalı mikroskopi, floresan in situ hibridizasyon (FISH) gibi yöntemler floresan işaretleme ile biyofilmin değerlendirildiği yöntemlerdendir. Biyofilm oluşum aşamalarını gözlemlemeyi sağlayan Calgary biyofilm cihazı, Centers for Disease Control (CDC) biyofilm reaktörü gibi cihazlar da mevcuttur. Biyofilm ilişkili genler PCR yöntemleri ile değerlendirilebilir (68).

Enfeksiyonun klinik bulgularının beklenenden daha düşük düzeyde olması, implante cihaz varlığı ya da kistik fibrozis gibi biyofilm için predispozan faktör varlığı, 7

günden uzun süreli enfeksiyon, tedavi başarısızlığı ya da rekürrens varlığında biyofilm ilişkili enfeksiyon varlığından şüphelenilmelidir. Biyofilm ilişkili enfeksiyonlar; doku ya da mukusta bulunan biyofilmler, yabancı cisim ilişkili biyofilmler ve yabancı cisim ilişkili olmayan biyofilmler olarak üç gruba ayrılabilir. Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen doku, balgam veya intravenöz kateter ucu gibi örnekler biyofilm varlığı açısından incelenebilir. Rutinde uygulanan ışık mikroskopi ve Gram boyama gibi yöntemlerle doku ve balgam örneklerinde inflamatuvar hücreler, bakteri ve biyofilm matriksi görülebilir. Kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonu ve implante prostetik cihaz enfeksiyonlarında çıkarılan cihazın ya da kateter ucunun vortekslenerek incelenmesi de tanıda yardımcı olur (87).

Biyofilm ilişkili enfeksiyonların tanısında bir diğer önemli problem ise antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesidir. Mikrobiyoloji laboratuvarında uygulanan rutin antimikrobiyal duyarlılık testleri planktonik bakterilerin duyarlılığını göstermektedir. Planktonik hücrelerle biyofilm hücreleri arasında önemli farklılıklar vardır. Biyofilm hücreleri değişen seviyelerde beslenme ve artık ürünlere maruz kalmaktadır, subpopulasyonlar bu nedenle fizyolojik olarak farklılaşmıştır. Buna bağlı olarak biyofilm enfeksiyonlarında tanı ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması zordur (67). Bu amaçla kullanılan Calgary cihazı ve mikrotitrasyon plağı üzerinde biyofilme farklı konsantrasyonlarla antibiyotiklerin uygulandığı yöntemler mevcuttur, ancak bu amaçla tanımlanmış altın standart bir test yoktur (87). Kullanılan yöntemlerin her birinin kendine has avantaj ve dezavantajları vardır.

CDC biyofilm reaktörü veya dönen disk reaktörü; sürekli akım ile kuponlar üzerinde biyofilm oluşmasını sağlayan standardize edilmiş cihazlardır, bu kuponlar üzerinde biyofilm oluştuğundan sonra reaktör içinde bırakılarak ya da reaktörden çıkarılarak antimikrobiyaller uygulanır. Daha sonra vorteks ya da sonikasyon gibi bir işlemle geçirilip sulandırılarak kültüre ekilir ve koloni sayımı yapılır. Öncesinde Calgary biyofilm cihazı olarak bilinen MBİK ölçümüne dayanan deney sistemleri de kullanılmaktadır. Kapağında üzerinde biyofilm oluşmasını sağlayan iğneler bulunan 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakları da bu deneyler arasında sayılabilir. Başka bir yöntem de 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plağında kuyucukların duvarında biyofilm oluşturulması ve daha sonra bu kuyucuklara antimikrobiyal uygulanmasıdır. Bu yöntemde, ek olarak planktonik hücreler ve biyofilm hücreleri arasında minimum

bakterisidal konsantrasyonun karşılaştırılması da mümkündür. Ancak canlı hücre sayısının ölçülememesi bu yöntemin bir dezavantajıdır (67).

2.2.6. Biyofilm ilişkili enfeksiyonların tedavisi

Oluşumunun erken evrelerinde biyofilmler antibiyotiklere daha duyarlıdır. Ancak bu dönemde biyofilm ilişkili enfeksiyonları tanımak çok mümkün değildir. Enfeksiyon tanısı konulduğunda genellikle matur biyofilm oluşmuştur. Biyofilm ilişkili enfeksiyonların tedavisinde antibiyotikler dikkatle seçilmelidir. Seçilen antibiyotikler hem etkene duyarlı olmalı hem de biyofilm matriksini penetre edebilme becerisine sahip olmalıdır. Planktonik forma kıyasla daha dirençli olduğu bilinen biyofilm içindeki bakterilerin tedavisi için kombinasyon tedavilerin monoterapiden daha etkili olabileceği düşünülmektedir (88). Ancak tek başına antibiyotik tedavi genellikle yeterli olmamaktadır. Enfekte cihazın çıkarılması ya da değiştirilmesi ile birlikte antimikrobiyallerin uygulanması en etkili tedavi yöntemidir (9). Nanopartiküller biyofilm ilişkili enfeksiyonların tedavisi için kullanılan yeni yöntemlerdendir, bakteri hücre duvarına bağlanarak direkt etki ile ya da serbest oksijen radikalleri membranın parçalanmasını sağlar. Memeli hücreleri tarafından fagosite edilebilir, bu sayede toksisitesi azalır (9).

Biyofilm ilişkili enfeksiyonlar, biyomedikal cihaz başarısızlığının önemli nedenlerindedir. Kontamine implant uygulanması çevre dokularda enfeksiyon için rezervuar görevi görmektedir ve uygulandıktan sonra da kolonize olabilmektedir. Biyomedikal ilişkili enfeksiyonlar konak immun sistemine de dirençli oldukları için tedavisi zor enfeksiyonlardır (9). Biyomateryallerin kolonizasyonunu önlemek için yapılan araştırmalar mevcuttur. Silikonun teflon ve poliüretana göre bakteriyel adhereense daha yatkın olduğu bulunmuştur. Medikal cihazların farklı yöntemlerle kaplanması, cerrahi alanın antiseptik ile irrigasyonu ve kateter kilit tedaviler medikal implantlar üzerinde biyofilm oluşumunu önleyebilir (9).

Bunlar dışında antimikrobiyal peptitler, antibiyotikler, AHL sinyal moleküllerini inhibe eden ajanlar, EPS ve adhezyon moleküllerinin sentezini inhibe eden moleküller biyofilm inhibisyonu amacıyla araştırılmaktadır (88).

2.2.7. *K.pneumoniae*'da virulans faktörü olarak biyofilm

Üriner sistem enfeksiyonu, pnömoni ve özellikle de yabancı cisim ilişkili enfeksiyonlar gibi enfeksiyonların patogeneğinde *K.pneumoniae*'nin biyofilm oluşturma yeteneği önemli bir rol oynar. Ek olarak biyofilmin, konak immün sistemine azalmış duyarlılık ve bakteriyel dirence katkısı olduğu düşünülmektedir (16, 19). *K.pneumoniae*'nin kapsüler polisakkarit, tip-1 ve tip-3 fimbria gibi virulans faktörleri biyofilm oluşumu için önemlidir. Tip-3 fimbria, MrkA protein subünitlerinden oluşur ve biyofilm oluşumu başlatır. Fimbrianın ucunda yerleşen başka bir protein olan MrkD, fimbriaya adheziv özellik kazandırır ve fimbrial yapışma gücünü belirler.

Biyofilm tabakaları içinde birbirinden farklı bakteri türlerinin bulunabildiği bilinmektedir. Türler, biyofilm içinde üç farklı şekilde yerleşebilirler; ayrı ayrı tek türe ait mikrokoloniler halinde, ko-agregasyon yaparak ya da tabakalar arasında besin ve oksijen ihtiyaçlarına göre dağılarak yerleşebilirler. Biyofilm ilişkili kronik yara enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları ve pnömonide sıklıkla *K.pneumoniae* ve *P.aeruginosa* beraber bulunabilir. *P.aeruginosa* kolonizasyon yeteneği ile biyofilmin bazalini oluşturur, *K.pneumoniae* ise hızlı büyüme yeteneği sayesinde biyofilmin üst kısımda kule benzeri yapı oluşturur (89). Biyofilm içinde *Enterobacter agglomerans* ile beraber bulunduğu ise artmış viskozite nedeniyle biyofilmin dezenfektan direnci de artar (90). Ayrıca *K.pneumoniae*'nin *P.mirabilis*, *E.coli*, *M.morgagni* ve *Candida albicans* gibi patojenlerle beraber biyofilm oluşturabildiği de bilinmektedir (19).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. İzolatların seçimi

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 21.12.2021 tarihli ve 2021/567 sayılı izni ile yürütülmüştür.

Çalışmamız için, Ocak 2019 ve Ocak 2022 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen kan kültürü örneklerinden izole edilen *K.pneumoniae* izolatları incelendi. Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda uygulanan rutin işlemler sırasında tür düzeyinde tanımlama işlemi Vitek-MS (bioMérieux, Fransa) ile yapıldı. Daha sonra antimikrobiyal duyarlılık Vitek 2 Compact (bioMérieux, Fransa) ile çalışıldı. Sonuçlara göre meropenem veya imipeneme dirençli (MİK>8 mg/L) olan izolatlar seçildi ve her hastadan yalnız bir örnek çalışmaya dahil edildi. Seçilen izolatlar saklama besiyerinde çalışma gününe kadar -80 °C'de muhafaza edildi. MİK için *E. coli* ATCC 25922 kontrol izolat olarak kullanıldı. Biyofilm oluşumu için ise, biyofilm oluşturduğu bilinen *K. pneumoniae* ATCC 700603 ve biyofilm oluşturmadığı bilinen *E. coli* ATCC 25922 standart izolatları kullanıldı.

3.2. Biyofilm oluşum kapasitesinin ölçümü

Biyofilm oluşum kapasitesi ölçümü Christensen (91) ve Stepanovic (92) tarafından tanımlanan mikrotitasyon plak yöntemi ile yapıldı .

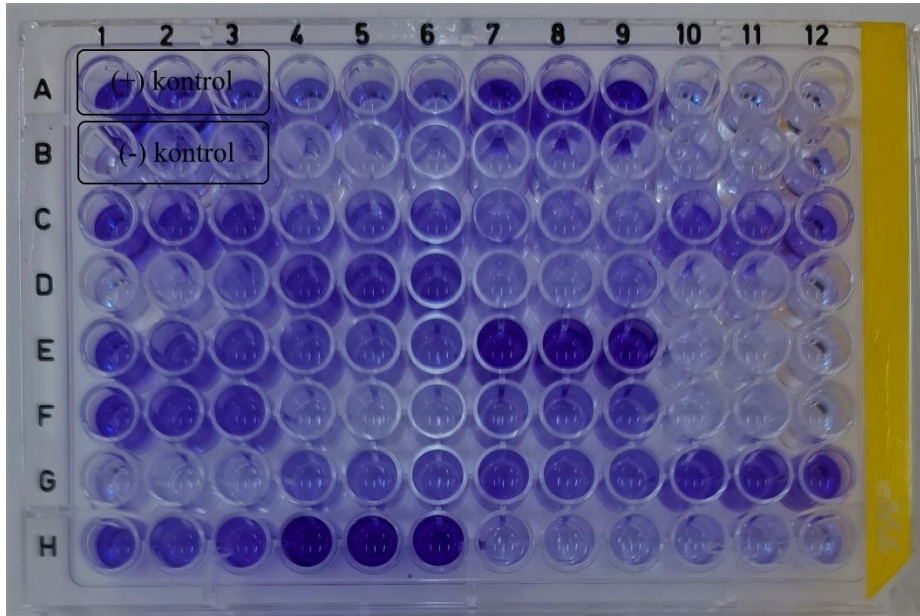
Saklama besiyerinde bulunan *K.pneumoniae* izolatları kanlı agar besiyerine (Beslab, Türkiye) pasajlanarak 37 °C'de 18-24 saat inkübe edildi. Daha sonra saf olduğundan emin olunan kültürler, %0,25 glukoz içeren Tryptic Soy Broth (TSB) (Biolife, İtalya) besiyerine ekilip 37 °C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkubasyondan sonra %0,25 glukoz içeren TSB ile 1:20 oranında dilue edilerek 96 kuyucuklu düz tabanlı polistrien mikrotitrasyon plağının (TPP, İsviçre) her kuyusuna 200 µL konuldu ve 37 °C'de 24 saat daha inkübe edildi. Bu aşamada her izolat için üç kuyucuk kullanıldı. Sonrasında kuyucuklardaki sıvı besiyeri aspire edilip 3 kez steril distile ile yıkanıp ters çevrilip hafifçe vurularak planktonik hücreler uzaklaştırıldı ve kurumaya bırakıldı. Daha sonra kuyucuklara 100 µL %1'lik kristal viyole solusyonundan eklenip 15 dakika oda ısısında bekletildi. Daha sonra 3 kez steril distile su ile yıkanıp boya kalıntıları temizlendikten sonra tekrar oda ısısında kurutuldu. Son olarak kuyucuklara 200 µL

80:20 etanol/aseton solusyonu eklenip 10 dakika beklenecek şekilde boyanın çözünmesi sağlandı ve ELİSA reader optik okuyucu (Chromate Awareness Technology, ABD) ile 492 nm dalga boyunda olarak okutuldu. Elde edilen optik dansite (OD) değerleri, biyofilm oluşturan *K. pneumoniae* ATCC 700603 ve oluşturmayan *E.coli* ATCC 25922 suşları kullanılarak oluşturulan sınıflamaya göre değerlendirildi (93). Deneyler en az iki farklı günde tekrar edildi. Tüm deneylere göre biyofilm oluşturduğundan emin olunan izolatlar seçilerek çalışmaya devam edildi (91-93).

Tablo 4. İzolatların OD değerlerinin pozitif ve negatif kontrole göre biyofilm oluşum kapasitesi açısından değerlendirilmesi (94, 95).

Optik Dansite Değeri	Biyofilm oluşumun değerlendirilmesi	Skor
$OD \leq OD_C$	Biyofilm oluşumu yok	0
$OD_C < OD < 2 \times OD_C$	Zayıf biyofilm oluşumu	+1
$2 \times OD_C < OD < 4 \times OD_C$	Orta derecede güçlü biyofilm oluşumu	+2
$4 \times OD_C < OD$	Güçlü biyofilm oluşumu	+3

$OD_C = \text{ort. } OD_{\text{pozitif kontrol}} - \text{ort. } OD_{\text{negatif kontrol}}$ (93)



Şekil 2. Mikrotitrasyon plağında biyofilm oluşumu.

3.3. Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) tespiti

Çalışma için meropenem (Sigma-Aldrich, ABD), polimiksin B (Sigma-Aldrich, ABD) ve tigesiklin (TCI, Japonya) antibiyotikleri temin edildi. Antibiyotikler için uygun

çözücüler Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI) M100-Ed32 (96) 'ye göre seçildi. Her üç antibiyotik için de çözücü olarak su kullanıldı. Antibiyotik stok solüsyonları hazırlanırken deneylerde kullanılacak konsantrasyonun 10 katında stok solüsyon hazırlanmasına dikkat edildi. Meropenem ve polimiksin B için 8192 mg/L, tigesiklin için 4096 mg/L konsantrasyonda stok solüsyon hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyonlar -20 °C'de çalışma gününe kadar saklandı.

İzolatların meropenem, polimiksin B ve tigesiklin için MİK konsantrasyonları The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (97) önerilerine göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile yapıldı. Çalışma günü biyofilm oluşturduğu bilinen izolatlar öncelikle kanlı agar besiyerine pasajlanıp 18-24 saat inkübe edildi. Saf kültür olduğundan emin olunduktan sonra 0,5 McFarland bulanıklığında (10^8 cfu/mL) süspansiyonlar elde edildi. Daha sonra 96 kuyucuklu U tabanlı mikrotitrasyon plağının (TPP, İsviçre) tüm kuyucuklarına 100 µL katyon ayarlı Muller-Hinton Broth (KAMHB) (HiMedia, Hindistan) konuldu. İlk kuyucuklara 100 µL antibiyotik konularak sonrasında 10. kuyucuğa kadar 2 kat seri dilüsyon yapıldı. 11. ve 12. kuyucuklar pozitif ve negatif kontrol olarak ayrıldı ve antibiyotik eklenmedi. Sonrasında 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonundan KAMHB ile 1:10 dilüsyon hazırlanıp (5×10^5 cfu/mL) 12. kuyucuk hariç 5 µL dağıtıldı. 11. kuyucuk antibiyotik olmayan sadece bakteri süspansiyonu olan pozitif kontrol ve 12. kuyucuk sadece besiyeri olan, antibiyotik ve bakteri süspansiyonu içermeyen kuyucuk olarak hazırlandı. Hazırlanan plaklar 37 °C'de 18-24 saat inkübe edildikten sonra değerlendirildi. Üremenin olmadığı en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak kabul edildi. Tigesiklin için KAMHB taze olarak hazırlanıp kullanıldı (97).

Sonuçlar meropenem için EUCAST v12'ye göre değerlendirildi (97). MİK değeri; 2 mg/L'ye eşit ve altında olan izolatlar duyarlı, 2 ile 8 arasında olan izolatlar orta duyarlı, 8 mg/L üzerinde olanlar dirençli olarak değerlendirildi. Polimiksin B için EUCAST'da MİK sınır değeri olmadığından EUCAST *Enterobacteriaceae* için kolistin MİK değerine göre değerlendirildi. Kolistin için MİK; 2 mg/L'ye eşit ve altında olan izolatlar duyarlı, 2 mg/L üzerinde olan izolatlar dirençli olarak değerlendirildi. Tigesiklin için de EUCAST ve CLSI'da MİK sınır değeri olmadığı için MİK değeri FDA tarafından sunulan *Enterobacteriaceae* kriterlerine göre hesaplandı (98). Bu

değerlere göre tigesiklin için MİK'i 2 mg/L'ye eşit ve altında olan izolatlar duyarlı, 8 mg/L'ye eşit ve üzerinde olan izolatlar dirençli kabul edildi.

Tablo 5. İzolatların meropenem, polimiksin B ve tigesiklin MİK değerlerine göre antimikrobiyal duyarlılık açısından değerlendirilmesi .

	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli
Meropenem*	≤ 2 mg/L	>2 mg/L ve ≤ 8 mg/L	>8 mg/L
Polimiksin B*	≤ 2 mg/L	-	>2 mg/L
Tigesiklin[§]	≤ 2 mg/L	>2 mg/L ve <8 mg/L	≥ 8 mg/L

*: EUCAST v12 (97)'ye göre §:FDA (98)'ya göre



Şekil 3. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK tespiti.

3.4. Planktonik formda sinerji

İzolatların meropenem, polimiksin B ve tigesiklin için MİK değerleri belirlendikten sonra, o izolatın her iki antibiyotik için MİK'i 3 kat üst dilusyonu ve 4 kat alt dilusyonu arasında olacak şekilde dama tahtası plağı hazırlandı.

Planktonik formda meropenem ile polimiksin B ve tigesiklin ile polimiksin B kombinasyonları için sinerji dama tahtası yöntemi ile çalışıldı. Her izolat için kombinasyonda kullanılacak antibiyotik MİK'ine göre antibiyotik dilusyonu hazırlandı. A antibiyotik dilusyonu için, ana plağın ilk 8x8'lik alanına önce 50 µL KAMHB eklendi sonra H sırasına 8. kuyucuğa kadar 50 µL MİK_{AX32} konsantrasyonda hazırlanan A antibiyotik dilusyonundan eklendi ve A sırasına kadar 2 kat seri

dilasyon yapıldı. B antibiyotiğinin dilasyonu için dış plakta yapıldı. Öncelikle plağın 8x8'lik alanına 70 µL KAMHB ve 8. sıraya MİK_Bx32 konsantrasyonda hazırlanan B antibiyotiğinden eklendi. 1. Sıraya kadar seri dilasyon yapıldı ve 50 µL hacim ile ana plağa eklendi. Tigesiklin kombinasyonu için taze KAMHB kullanıldı (97).

Tablo 6. Dama tahtası yönteminde mikrodilasyon elde edilen antibiyotiklerin plak görünümü.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	1/16xMİK _A 1/16xMİK _B	1/16xMİK _A 1/8xMİK _B	1/16xMİK _A 1/4xMİK _B	1/16xMİK _A 1/2xMİK _B	1/16xMİK _A MİK _B	1/16xMİK _A 2xMİK _B	1/16xMİK _A 4xMİK _B	1/16xMİK _A 8xMİK _B	16x MİK _A	16x MİK _B	(+)) K
B	1/8xMİK _A 1/16xMİK _B	1/8xMİK _A 1/8xMİK _B	1/8xMİK _A 1/4xMİK _B	1/8xMİK _A 1/2xMİK _B	1/8xMİK _A MİK _B	1/8xMİK _A 2xMİK _B	1/8xMİK _A 4xMİK _B	1/8xMİK _A 8xMİK _B	8x MİK _A	8x MİK _B	(+)) K
C	1/4xMİK _A 1/16xMİK _B	1/4xMİK _A 1/8xMİK _B	1/4xMİK _A 1/4xMİK _B	1/4xMİK _A 1/2xMİK _B	1/4xMİK _A MİK _B	1/4xMİK _A 2xMİK _B	1/4xMİK _A 4xMİK _B	1/4xMİK _A 8xMİK _B	4x MİK _A	4x MİK _B	(+)) K
D	1/2xMİK _A 1/16xMİK _B	1/2xMİK _A 1/8xMİK _B	1/2xMİK _A 1/4xMİK _B	1/2xMİK _A 1/2xMİK _B	1/2xMİK _A MİK _B	1/2xMİK _A 2xMİK _B	1/2xMİK _A 4xMİK _B	1/2xMİK _A 8xMİK _B	2x MİK _A	2x MİK _B	(+)) K
E	MİK _A 1/16xMİK _B	MİK _A 1/8xMİK _B	MİK _A 1/4xMİK _B	MİK _A 1/2xMİK _B	MİK _A MİK _B	MİK _A 2xMİK _B	MİK _A 4xMİK _B	MİK _A 8xMİK _B	MİK _A	MİK _B	(-)) K
F	2xMİK _A 1/16xMİK _B	2xMİK _A 1/8xMİK _B	2xMİK _A 1/4xMİK _B	2xMİK _A 1/2xMİK _B	2xMİK _A MİK _B	2xMİK _A 2xMİK _B	2xMİK _A 4xMİK _B	2xMİK _A 8xMİK _B	1/2x MİK _A	1/2x MİK _B	(-)) K
G	4xMİK _A 1/16xMİK _B	4xMİK _A 1/8xMİK _B	4xMİK _A 1/4xMİK _B	4xMİK _A 1/2xMİK _B	4xMİK _A MİK _B	4xMİK _A 2xMİK _B	4xMİK _A 4xMİK _B	4xMİK _A 8xMİK _B	1/4x MİK _A	1/4x MİK _B	(-)) K
H	8xMİK _A 1/16xMİK _B	8xMİK _A 1/8xMİK _B	8xMİK _A 1/4xMİK _B	8xMİK _A 1/2xMİK _B	8xMİK _A MİK _B	8xMİK _A 2xMİK _B	8xMİK _A 4xMİK _B	8xMİK _A 8xMİK _B	1/8x MİK _A	1/8x MİK _B	(-)) K

(+) K: Pozitif kontrol (-) K: Negatif kontrol

Tablo 6'ya uygun olarak her izolat için her antibiyotiğin MİK değerine göre meropenem+polimiksin B ve tigesiklin+polimiksin B için plaklar hazırlandı. Daha sonra 0,5 McFarland bulanıklığında (1×10^8 KFU/mL) hazırlanan bakteri süspansiyonları 1:10 oranında dilüe edildi ve sonra 10. sıraya kadar tüm kuyucuklar ve pozitif kontrol olarak 11. sıranın ilk 4 kuyusuna 5 µL bakteri süspansiyonu eklendi. 11. kuyunun kalan 4 kuyusuna negatif kontrol olarak sadece besiyeri konuldu. Plaklar 18-24 saat inkübe edildikten sonra tüm kuyucuklar gözle görülür üreme varlığı açısından değerlendirildi.

Gözle görülür üremenin olmadığı, antibiyotiklerin en düşük konsantrasyonlarını içeren kuyucuklar için fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) ve FİK indeksi ($\sum FİK$) hesaplandı (99-101).

$FİK_A = A \text{ antibiyotiğinin o kuyucuktaki konsantrasyonu} / MİK_A$

$FİK_B = B \text{ antibiyotiğinin o kuyucuktaki konsantrasyonu} / MİK_B$

$\Sigma FİK = FİK_A + FİK_B$

FİK indeksinin en düşük olduğu kuyucuklar değerlendirmeye alındı; $\leq 0,5$ sinerji, 0,5-1 arası additif etki, 1-4 arası indifferens ve ≥ 4 antagonist etkileşim olarak değerlendirildi (101, 102).

3.5. Minimum biyofilm inhibitör konsantrasyon (MBİK) belirlenmesi

Minimum biyofilm inhibitör konsantrasyon, OD_c 'ye göre oluşmuş biyofilmi gideren konsantrasyon ölçülerek belirlendi (68, 103).

Yukarıdaki deney sonuçlarına göre biyofilm oluşturan ve meropenem dirençli izolatlardan 5 tanesi seçilerek çalışmaya devam edildi. Yukarıda tarif edilen yöntemle göre izolatlar önce kanlı agar besiyerine pasajlanarak $37^\circ C$ 'de 18-24 saat inkübe edildi. Daha sonra kanlı agardan %0,25 glukoz eklenmiş TSB içeren cam tüplere ekim yapıldı ve $37^\circ C$ 'de 18-24 saat inkübe edildi. Sonrasında %0,25 glukoz eklenmiş TSB ile 1:20 dilüsyonu hazırlanarak 96 kuyucuklu düz tabanlı mikrotitrasyon plağına, her kuyucuğa 200 μL hacim olacak şekilde aktarıldı. Plağın A ve D sıraları arasında 9. kuyucuklara kadar bir izolat, F ve H sıraları arasında 9. Kuyucuğa kadar başka bir izolat olacak şekilde bakteri süspansiyonu eklendi. Ek olarak her plakta en az 3 kuyu biyofilm oluşturan oluşturan pozitif kontrol *K. pneumoniae* ATCC 700603, en az 3 kuyu biyofilm oluşturmayan negatif kontrol *E. coli* ATCC 25922, en az 3 kuyu test edilen klinik izolat ve bakteri içermeyen kontrol kuyucukları (blank) içerecek şekilde hazırlandı. Hazırlanan plak tekrar $37^\circ C$ 'de 18-24 saat inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra kuyucuklardaki besiyeri nazikçe aspire edildi ve %0,25 glukoz içeren TSB ile üç kez yıkandı. Daha sonra meropenem (MEM), polimiksin B (PMB) için 512 mg/L ile 64 mg/L ve tigesiklin (TGC) için 256 mg/L ile 32 mg/L arasında antibiyotik konsantrasyonları hazırlandı. Tigesiklin kullanılan deneylerde TSB o gün hazırlanarak sterilize edildi. Aşağıdaki plak şablonunda görülen şekilde her kuyucuğa 200 μL hacimde hazırlanan antibiyotik dilüsyonlarından eklendi. 10, 11 ve 12. Kontrol kuyucuklarına da aynı yıkama işlemleri uygulandı ve sonrasında diğerlerinden farklı

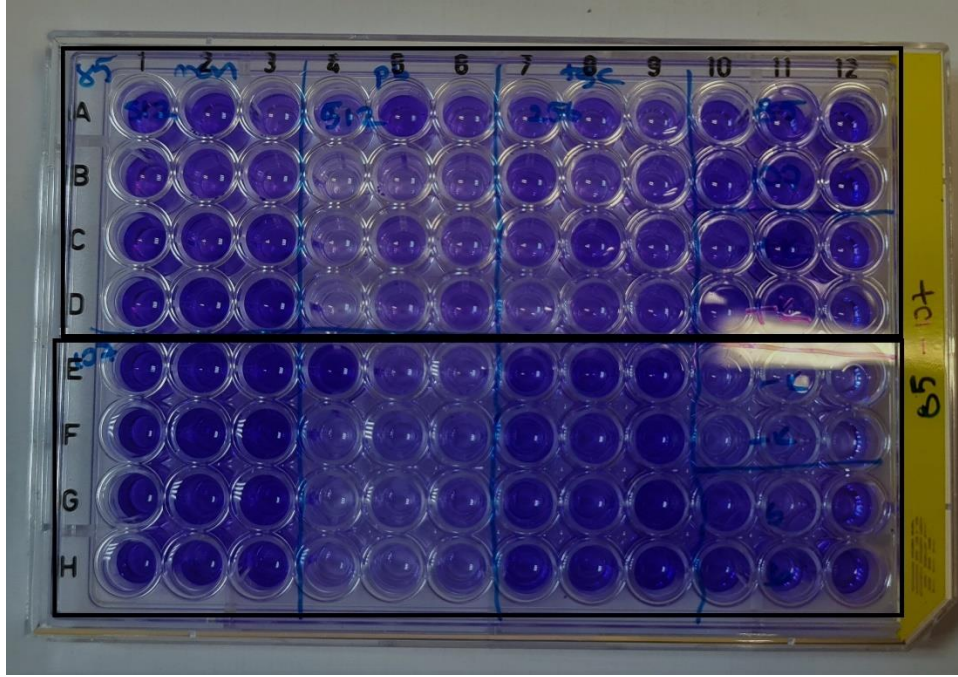
olarak 200 µL %0,25 glukoz içeren TSB eklendi. Plak tekrar 37 °C’de 18-24 saat inhibe edildi.

Tablo 7. MBİK tespiti için plak görünümü.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	512 mg/L MEM	512 mg/L MEM	512 mg/L MEM	512 mg/L PMB	512 mg/L PMB	512 mg/L PMB	256 mg/L TGC	256 mg/L TGC	256 mg/L TGC	Kontrol klinik izolat	Kontrol klinik izolat	Kontrol klinik izolat
B	256 mg/L MEM	256 mg/L MEM	256 mg/L MEM	256 mg/L PMB	256 mg/L PMB	256 mg/L PMB	128 mg/L TGC	128 mg/L TGC	128 mg/L TGC	(+) kontrol	(+) kontrol	(+) kontrol
C	128 mg/L MEM	128 mg/L MEM	128 mg/L MEM	128 mg/L PMB	128 mg/L PMB	128 mg/L PMB	64 mg/L TGC	64 mg/L TGC	64 mg/L TGC	(-) kontrol	(-) kontrol	(-) kontrol
D	64 mg/L MEM	64 mg/L MEM	64 mg/L MEM	64 mg/L PMB	64 mg/L PMB	64 mg/L PMB	32 mg/L TGC	32 mg/L TGC	32 mg/L TGC	Blank	Blank	Blank

Plağın son inkubasyonundan sonra öncelikle tüm kuyucuklardaki sıvı aspire edildi, 3 kez steril distile su ile yıkandı ve oda havasında kurutuldu. Daha sonra %1’lik kristal viyole solüsyonu hazırlanarak her kuyucuğa 100 µL eklendi ve 15 dakika oda havasında beklendi. Boyama sonrası tüm kuyucuklar önce aspire edildi sonra 3 kez steril distile su ile yıkanarak oda havasında kurumaya bırakıldı. Son olarak kuyucuklara 80:20 etanol/aseton solüsyonundan 200 µL hacimde eklenerek 10 dakika oda havasında beklendi ve ELİSA reader optik okuyucu ile 492 nm dalga boyunda okutuldu. Her plakta bulunan biyofilm oluşturan ve oluşturmeyen izolatlar ile OD_c belirlendi ve buna göre skala oluşturuldu. Elde edilen değerler her plak için kendi skalasına göre değerlendirildi. Biyofilm oluşumunun tamamen inhibe edildiği konsantrasyonlar o antibiyotik MBİK değeri kabul edildi (103).

Her izolat ve her antibiyotik konsantrasyonu için aynı deneyde 3 kuyucuk kullanıldı ve deneyler en az farklı 2 günde tekrar edildi.



Şekil 4. İki farklı izolat için MBİK tespiti.

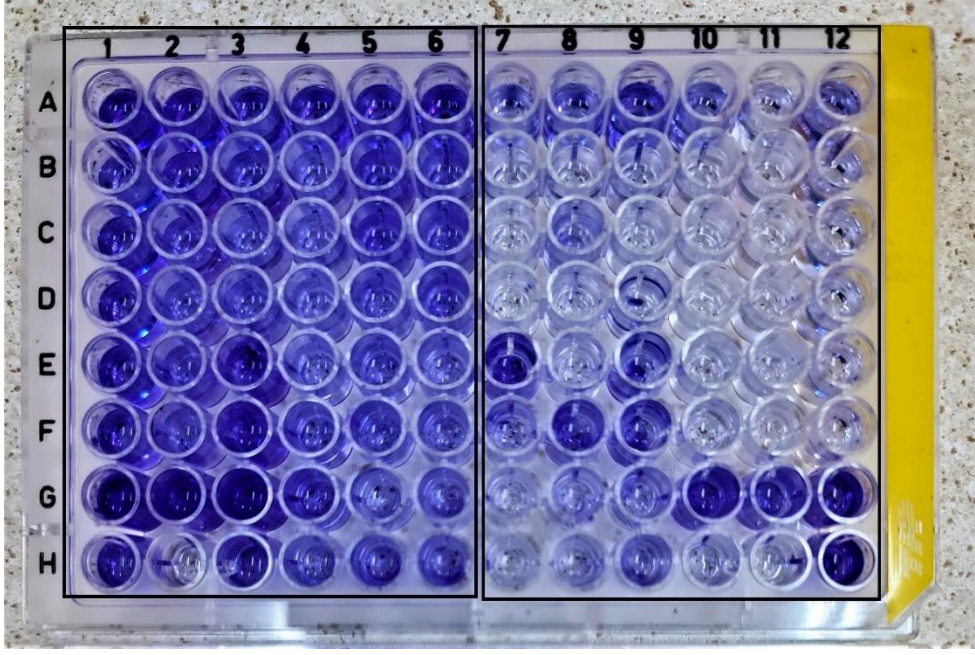
3.6. İkili kombinasyon ile biyofilm inhibisyonu gösterilmesi

Her izolat ve her antibiyotik için MBİK değeri belirlendikten sonra deneyin son aşamasına geçildi. Öncelikle kanlı agarda, sonrasında %0,25 glukoz ilaveli TSB içeren cam tüplerde 37 °C’de 18-24 saat inkübe edildi. Daha sonra da %0,25 glukoz içeren TSB ile 1:20 dilusyonu hazırlandı. A ve F arasında 6. sıra kuyucuklar dahil olmak üzere bir izolat, plağın kalan yarısına benzer şekilde diğer izolat olacak şekilde, 200 µL hacim ile bakteri süspansiyonları eklendi ve 37 °C’de 18-24 saat daha inkübe edildi. Plaklardaki sıvı ve serbest hücreler aspire edildi ve sonrasında 3 kez TSB ile yıkandı. Daha sonra öncelikle her antibiyotiğin MİK’in 4 kat üstünde dış dilusyonları hazırlandı ve plak üzerine her antibiyotikten 100 µL hacimde Tablo 8’de gösterildiği şekilde eklendi. Tigesiklin kullanılan deneylerde yeni hazırlanıp sterilize edilmiş TSB kullanıldı. Her plakta, en az üç kuyucuk biyofilm oluşturan pozitif kontrol, en az üç kuyucuk biyofilm oluşturmeyen negatif kuyucuk, en az 3 kuyucuk klinik izolatlar için kontrol ve antibiyotik veya bakteri içermeyen kontrol kuyucuklar ayrıldı. Plak tekrar 37 °C’de 18-24 saat inkübe edildi.

Tablo 8. Biyofilm üzerine ikili antibiyotik uygulanması deneyinin plak görünümü.

	1	2	3	4	5	6
A	MBİK _A MBİK _B	1/2xMBİK _A MBİK _B	1/4xMBİK _A MBİK _B	MBİK _C MBİK _B	1/2xMBİK _C MBİK _B	1/4xMBİK _C MBİK _B
B	MBİK _A MBİK _B	1/2xMBİK _A MBİK _B	1/4xMBİK _A MBİK _B	MBİK _C MBİK _B	1/2xMBİK _C MBİK _B	1/4xMBİK _C MBİK _B
C	MBİK _A 1/2xMBİK _B	1/2xMBİK _A 1/2xMBİK _B	1/4xMBİK _A 1/2xMBİK _B	MBİK _C 1/2xMBİK _B	1/2xMBİK _C 1/2xMBİK _B	1/4xMBİK _C 1/2xMBİK _B
D	MBİK _A 1/2xMBİK _B	1/2xMBİK _A 1/2xMBİK _B	1/4xMBİK _A 1/2xMBİK _B	MBİK _C 1/2xMBİK _B	1/2xMBİK _C 1/2xMBİK _B	1/4xMBİK _C 1/2xMBİK _B
E	MBİK _A 1/4xMBİK _B	1/2xMBİK _A 1/4xMBİK _B	1/4xMBİK _A 1/4xMBİK _B	MBİK _C 1/4xMBİK _B	1/2xMBİK _C 1/4xMBİK _B	1/4xMBİK _C 1/4xMBİK _B
F	MBİK _A 1/4xMBİK _B	1/2xMBİK _A 1/4xMBİK _B	1/4xMBİK _A 1/4xMBİK _B	MBİK _C 1/4xMBİK _B	1/2xMBİK _C 1/4xMBİK _B	1/4xMBİK _C 1/4xMBİK _B
G	Kontrol klinik izolat	Kontrol klinik izolat	Kontrol klinik izolat	(+) kontrol	(+) kontrol	(+) kontrol
H	Blank	Blank	Blank	(-) kontrol	(-) kontrol	(-) kontrol

İnkübasyon sonrası plaktaki sıvı ve bakteri süspansiyonu aspire edilip 3 kez steril distile su ile yıkandı. Daha sonra %1'lik kristal viyole hazırlanarak 100 µL hacimde tüm kuyucuklara eklenip 15 dakika oda ısısında bekletildi. Sonra boya aspire edilip 3 kez daha steril distile su ile tüm kuyucuklar yıkanarak oda ısısında kurumaya bırakıldı. Son olarak 80:20 etanol/aseton solusyonu hazırlanıp tüm kuyucuklara 200 µL konuldu ve 10 dakika bekletildikten sonra ELİSA optik okuyucu ile 492 nm dalga boyunda okutuldu. Her plakta bulunan pozitif ve negatif kontroller ile OD_C hesaplanarak biyofilm gücü için skala oluşturuldu. Antibiyotik uygulandıktan sonra biyofilm inhibisyonu tamamen inhibe edilen kuyucuklar ve konsantrasyonları not edildi. Ek olarak biyofilm tamamen giderilemese de plaktaki klinik izolatın kontrolüne göre biyofilm gücünü azaltan antibiyotik konsantrasyonları da not edildi. Biyofilm inhibisyonu sağlayan konsantrasyonlar ile FİK indeksi hesaplanarak sinerjistik etkileşim açısından değerlendirildi (68).



Şekil 5. İki farklı izolat için biyofilm üzerine meropenem+polimiksin B ve tigesiklin+polimiksin B kombinasyonu uygulanması.

4. BULGULAR

Bu çalışmada 1 Ocak 2019 ve 10 Ocak 2022 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen kan kültürlerinden izole edilen ve her biri farklı hastaya ait olan *K.pneumoniae* izolatları biyofilm oluşturma kapasitesi yönünden incelendi.

Çalışmamızda 125 *K.pneumoniae* izolatu biyofilm oluşturma kapasitesi yönünden incelenmiştir. Bu izolatlar arasından tekrarlanan deneylerle biyofilm oluşturduğu doğrulanan 11 izolat biyofilm oluşturma gücü yönünden sınıflandırılmıştır. Buna göre; güçlü biyofilm oluşturan 2 izolat, orta derecede biyofilm oluşturan 3 izolat ve zayıf biyofilm oluşturan 6 izolat saptandı. Daha sonra biyofilm oluşturan bu izolatlara meropenem, polimiksin B ve tigesiklin MİK çalışıldı. İzolatlardan biyofilm oluşturan ve meropenem MİK 8 mg/L üzerinde olan 5 izolat seçilerek çalışmaya devam edildi. Çalışmaya dahil edilen izolatların özellikleri Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. Çalışmaya dahil edilen izolatların özellikleri.

İzolatlar	Primer enfeksiyon odağı	Biyofilm oluşturma kapasitesi	Meropenem MİK* (mg/L)		Polimiksin B MİK* (mg/L)		Tigesiklin MİK§ (mg/L)	
1	İntraabdominal enfeksiyon, cerrahi alan enfeksiyonu	+1	128	R	2	S	4	I
2	İntraabdominal apse, karaciğer nakli	+3	512	R	1	S	0,25	S
3	Komplike üriner sistem enfeksiyonu	+3	512	R	2	S	4	I
4	Üriner sistem enfeksiyonu	+1	512	R	0,5	S	2	S
5	Üriner sistem enfeksiyonu	+2	64	R	0,5	S	2	S

S: Duyarlı, I: Yüksek dozda duyarlı, R: Dirençli (EUCAST v12)

*: EUCAST v12’ye göre Meropenem S \leq 2 mg/L, R > 8 mg/L; Polimiksin B S \leq 2 mg/L, R > 2 mg/L

§: FDA kriterlerine göre Tigesiklin S \leq 2 mg/L, R \geq 8 mg/L

İzolatların meropenem, polimiksin B ve tigesiklin için MİK ve MBİK değerleri karşılaştırıldığında meropenem için 1 kattan 8 kata kadar, polimiksin B için 2 kattan

128 kata kadar ve tigesiklin için 2 kattan 1024 kata kadar MBİK değerlerinde artış görülmüştür (Tablo 10).

Tablo 10. Çalışmaya dahil edilen izolatların meropenem, polimiksin B ve tigesiklin MİK ve MBİK değerlerinin karşılaştırılması.

İzolatlar	Meropenem			Polimiksin B			Tigesiklin		
	MİK (mg/L)	MBİK (mg/L)	Fark	MİK (mg/L)	MBİK (mg/L)	Fark	MİK (mg/L)	MBİK (mg/L)	Fark
1	128	128	-	2	2	-	4	64	16 kat
2	512	>512	>1 kat	1	128	128 kat	0,25	>256	>1024 kat
3	512	>512	>1 kat	2	16	8 kat	4	32	8 kat
4	512	>512	>1 kat	0,5	8	16 kat	2	>256	>128 kat
5	64	>512	>8 kat	0,5	4	8 kat	2	>256	>128 kat

İzolatların planktonik formu üzerine meropenem ile polimiksin B ve tigesiklin ile polimiksin B'nin sinerjistik etkileri dama tahtası yöntemiyle araştırılmıştır. Sonuçlar FİK indeksine göre değerlendirilmiştir. FİK indeksi 0,5 altında olan kombinasyonlar sinerji, 0,5 ile 1 arasında olan kombinasyonlar additif, 1 ve 4 arasındaki kombinasyonlar indifferens etkileşim olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar Tablo 11 de verilmiştir.

Tablo 11. Dama tahtası yöntemi ile planktonik formda sinerji tespiti.

İzolatlar	Meropenem-Polimiksin B		Tigesiklin-Polimiksin B	
	FİK indeksine göre	Sinerji görülen konsantrasyonlar (mg/L)	FİK indeksine göre	Sinerji görülen konsantrasyonlar (mg/L)
1	İndifferens	-	İndifferens	-
2	İndifferens	-	İndifferens	-
3	Sinerji	MEM 64 ile PMB 0,5 MEM 32 ile PMB 1	Additif	TGC 2 ile PMB 0,5 TGC 1 ile PMB 1
4	Additif	MEM 128 ile PMB 0,125	İndifferens	-
5	İndifferens	-	İndifferens	-

FİK: Fraksiyone inhibitör konsantrasyon, MEM: Meropenem. PMB: Polimiksin B, TGC: Tigesiklin.

İzolat-1 için tek başına kullanıldığında biyofilm oluşumu; meropenem 128 µg/ml, tigesiklin 64 mg/L ve polimiksin B 2 mg/L konsantrasyonlarında inhibe edildi. Meropenem ile polimiksin B için; meropenem 128 mg/L ile polimiksin B 2 mg/L, 1

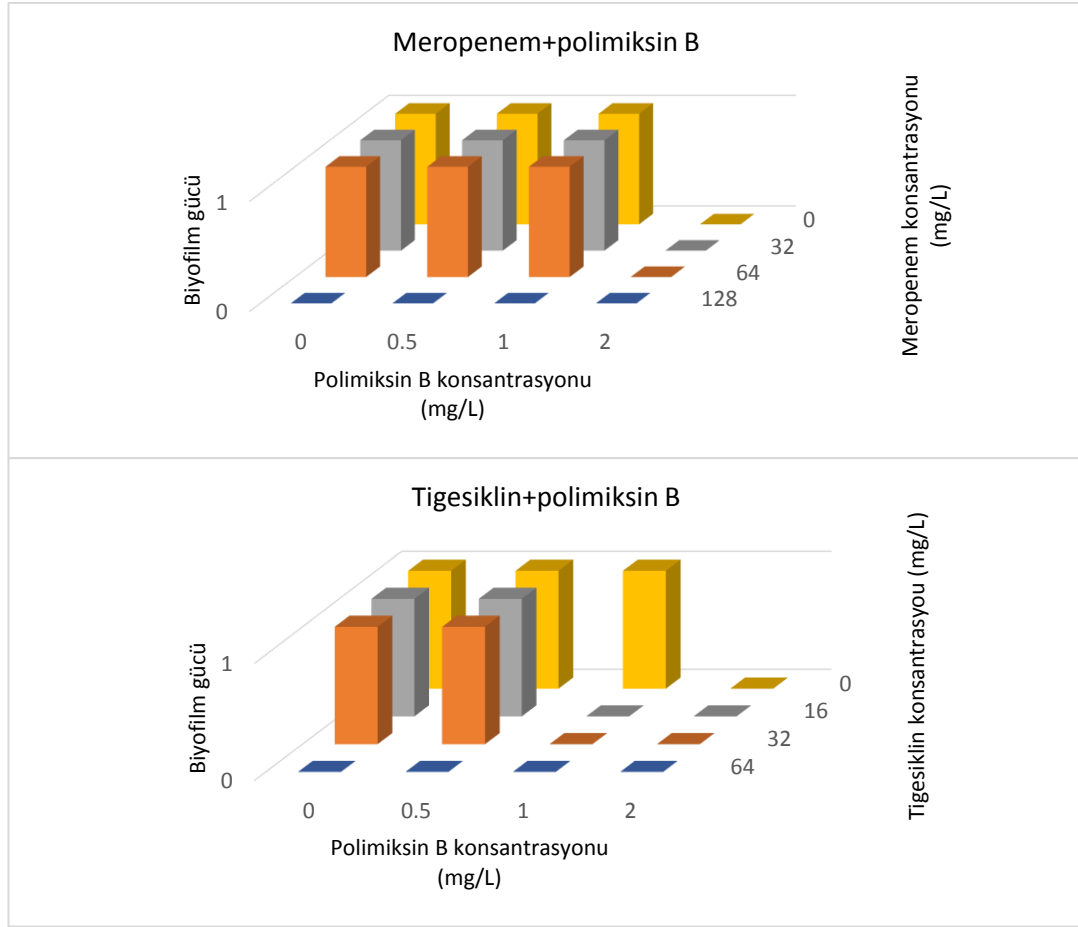
mg/L ve 0,5 mg/L konsantrasyonlarında ve meropenem 64 mg/L ve 32 mg/L ile polimiksin B 2 mg/L konsantrasyonlarında kombine uygulandığında inhibisyon görüldü. Meropenem 64 mg/L ve 32 mg/L ile polimiksin B 1 mg/L ve 0,5 mg/L konsantrasyonlarında kombine uygulandığında ise inhibisyon görülmedi. Tigesiklin ile polimiksin B kombinasyonunda ise; tigesiklin 64 mg/L ile polimiksin B 2 mg/L, 1 mg/L ve 0,5 mg/L konsantrasyonlarında ve meropenem 32 mg/L ve 16 mg/L ile polimiksin B 2 mg/L ve 1 mg/L konsantrasyonlarında kombine uygulandığında inhibisyon görüldü. Meropenem 32 mg/L ve 16 mg/L ile polimiksin B 0,5 mg/L konsantrasyonlarında kombine uygulandığında ise inhibisyon görülmedi (Tablo 12, Tablo 13 ve Şekil 6).

Tablo 12. İzolat-1'in meropenem-polimiksin B ve tigesiklin-polimiksin B kombinasyonu ile biyofilm inhibisyonu çalışılan tüm antibiyotik konsantrasyonları ve biyofilm inhibisyonu sonuçları.

Antibiyotikler	MBİK	
Meropenem	128 mg/L	
Polimiksin B	2 mg/L	
Tigesiklin	64 mg/L	
Meropenem ve polimiksin B kombinasyonu		
Meropenem konsantrasyonu	Polimiksin B konsantrasyonu	İnhibisyon
128 mg/L	2 mg/L	Var
128 mg/L	1 mg/L	Var
128 mg/L	0,5 mg/L	Var
64 mg/L	2 mg/L	Var
64 mg/L	1 mg/L	Yok
64 mg/L	0,5 mg/L	Yok
32 mg/L	2 mg/L	Var
32 mg/L	1 mg/L	Yok
32 mg/L	0,5 mg/L	Yok
Tigesiklin ve polimiksin B kombinasyonu		
Tigesiklin konsantrasyonu	Polimiksin B konsantrasyonu	İnhibisyon
64 mg/L	2 mg/L	Var
64 mg/L	1 mg/L	Var
64 mg/L	0,5 mg/L	Var
32 mg/L	2 mg/L	Var
32 mg/L	1 mg/L	Var
32 mg/L	0,5 mg/L	Yok
16 mg/L	2 mg/L	Var
16 mg/L	1 mg/L	Var
16 mg/L	0,5 mg/L	Yok

Tablo 13. Polimiksin B'nin meropenem ve tigesiklinle kombinasyonlarının İzolat-1'in biyofilmi üzerine etkisi

	Polimiksin B 2 mg/L	Polimiksin B 1 mg/L	Polimiksin B 0,5 mg/L
Meropenem 128 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon var
Meropenem 64 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Meropenem 32 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Tigesiklin 64 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon var
Tigesiklin 32 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon yok
Tigesiklin 16 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon yok



Şekil 6. Polimiksin B'nin meropenem ve tigesiklin ile kombinasyonunda İzolat-1'in oluşturduğu biyofilmin gücüne etkisi.

İzolat-2 için tek başına kullanıldığında; meropenem 512 mg/L ve tigesiklin 256 mg/L konsantrasyonlarında biyofilm inhibe edilememekle birlikte biyofilm gücünde +3'ten +1'e azalma görülmüştür, polimiksin B ise tek başına kullanıldığında 128 mg/L konsantrasyonunda biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir. Meropenem ile polimiksin B kombinasyonunda; meropenem 512 mg/L, 256 mg/L ve 128 mg/L ile polimiksin B

128 mg/L konsantrasyonlarında kombine uygulandığında biyofilm inhibe edilememekle birlikte biyofilm gücü +3'ten +1'e azalmıştır. Meropenem 512 mg/L, 256 mg/L ve 128 mg/L ile polimiksin B 64 mg/L ve 32 mg/L konsantrasyonlarında kombine uygulandığında ise inhibisyon görülmemiştir. Tigesiklin ile polimiksin B kombinasyonunda; tigesiklin 256 mg/L, 128 mg/L ve 64 mg/L ile polimiksin B 128 mg/L konsantrasyonlarında kombine uygulandığında biyofilm gücü +3'ten +1'e azalmıştır. Tigesiklin 256 mg/L, 128 mg/L ve 64 mg/L ile polimiksin B 64 mg/L ve 32 mg/L konsantrasyonlarında kombine uygulandığında ise biyofilm inhibe edilememiştir (Tablo 14, Tablo 15 ve Şekil 7).

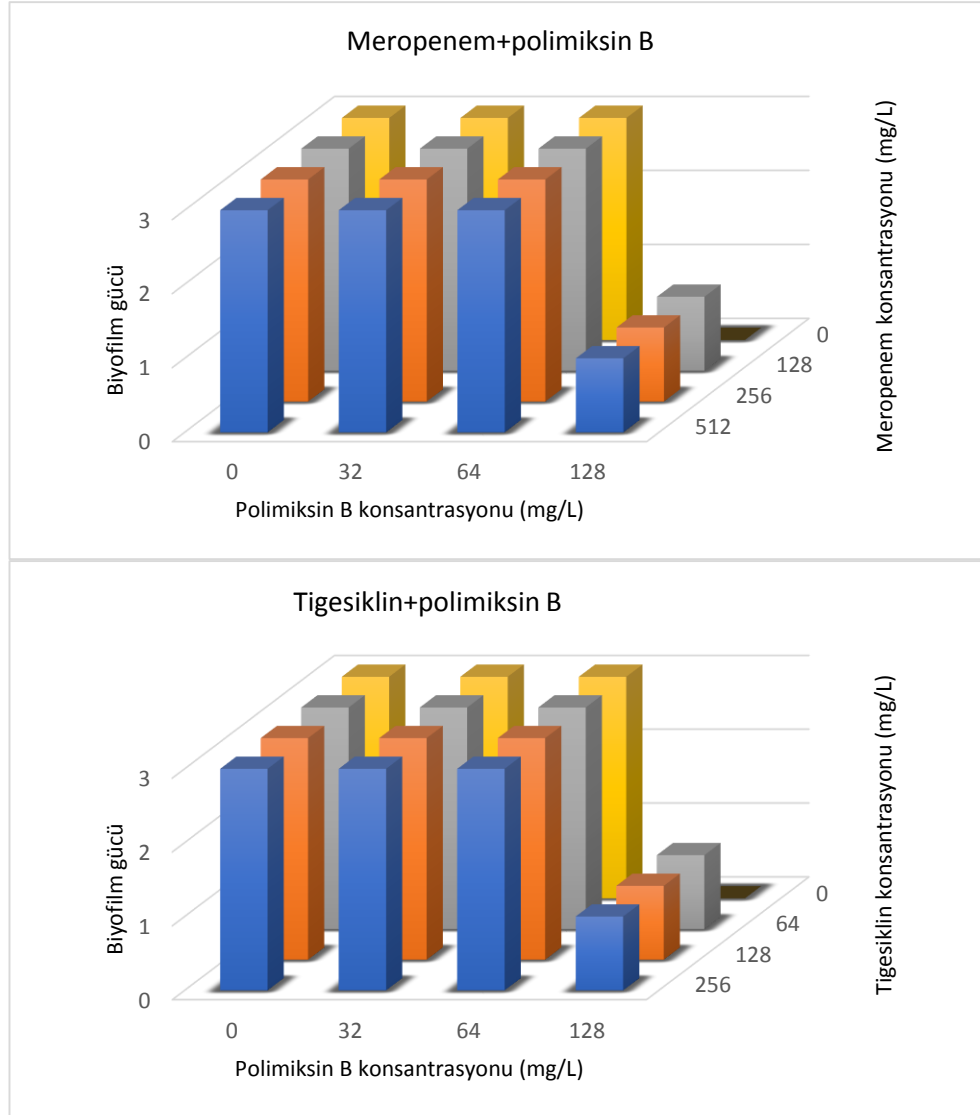
Tablo 14. İzolat-2'nin meropenem-polimiksin B ve tigesiklin-polimiksin B kombinasyonu ile biyofilm inhibisyonu çalışılan tüm antibiyotik konsantrasyonları ve biyofilm inhibisyonu sonuçları.

Antibiyotikler	MBİK	
Meropenem	>512 mg/L	
Polimiksin B	128 mg/L	
Tigesiklin	>256 mg/L	
Meropenem ve polimiksin B kombinasyonu		
Meropenem konsantrasyonu	Polimiksin B konsantrasyonu	İnhibisyon
512 mg/L	128 mg/L	Yok*
512 mg/L	64 mg/L	Yok
512 mg/L	32 mg/L	Yok
256 mg/L	128 mg/L	Yok*
256 mg/L	64 mg/L	Yok
256 mg/L	32 mg/L	Yok
128 mg/L	128 mg/L	Yok*
128 mg/L	64 mg/L	Yok
128 mg/L	32 mg/L	Yok
Tigesiklin ve polimiksin B kombinasyonu		
Tigesiklin konsantrasyonu	Polimiksin B konsantrasyonu	İnhibisyon
256 mg/L	128 mg/L	Yok*
256 mg/L	64 mg/L	Yok
256 mg/L	32 mg/L	Yok
128 mg/L	128 mg/L	Yok*
128 mg/L	64 mg/L	Yok
128 mg/L	32 mg/L	Yok
64 mg/L	128 mg/L	Yok*
64 mg/L	64 mg/L	Yok
64 mg/L	32 mg/L	Yok

*: Biyofilm inhibisyonu yok ancak biyofilm gücü +3'ten +1'e geriledi

Tablo 15. Polimiksin B'nin meropenem ve tigesiklinle kombinasyonlarının İzolat-2'nin biyofilmi üzerine etkisi.

	Polimiksin B 128 mg/L	Polimiksin B 64 mg/L	Polimiksin B 32 mg/L
Meropenem 512 mg/L	+3'ten +1'e azalma	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Meropenem 256 mg/L	+3'ten +1'e azalma	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Meropenem 128 mg/L	+3'ten +1'e azalma	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Tigesiklin 256 mg/L	+3'ten +1'e azalma	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Tigesiklin 128 mg/L	+3'ten +1'e azalma	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Tigesiklin 64 mg/L	+3'ten +1'e azalma	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok



Şekil 7. Polimiksin B'nin meropenem ve tigesiklin ile kombinasyonunda İzolat-2'nin oluşturduğu biyofilmin gücüne etkisi.

İzolat-3 için tek başına kullanıldığında biyofilm oluşumu, meropenem 512 mg/L ve altındaki konsantrasyonlarla inhibe edilememiştir. Polimiksin B 16 mg/L ve tigesiklin 32 mg/L konsantrasyonlarda uygulandığında ise biyofilm oluşumu inhibe edilmiştir. Meropenem ve polimiksin B kombinasyonunda; meropenem 512 mg/L ile polimiksin B 16 mg/L ve 8 mg/L konsantrasyonlarında kombine uygulandığında biyofilm oluşumu inhibe edilmiştir. Meropenem 512 mg/L ile polimiksin B 4 mg/L, meropenem 256 mg/L ile polimiksin B 16 mg/L ve 8 mg/L, meropenem 128 mg/L ile polimiksin B 16 mg/L konsantrasyonlarında kombine uygulandığında biyofilm inhibe edilememekle beraber biyofilm gücü +3'ten +1'e gerilemiştir. Meropenem 256 mg/L ile polimiksin B 4 mg/L, meropenem 128 mg/L ile polimiksin B 8 ve 4 mg/L konsantrasyonlarında kombine uygulandığında biyofilm gücü +3'ten +2'ye azalmıştır. Tigesiklin ile polimiksin B kombinasyonunda ise, tigesiklin 32 mg/L, 16 mg/L ve 8 mg/L ile polimiksin B 16 mg/L, 8 mg/L ve 4 mg/L konsantrasyonlarında kombine uygulandığında biyofilm inhibisyonu görülmüştür (Tablo 16, Tablo 17a ve Şekil 8a).

İlk çalışılan plakta biyofilm oluşumu görülemediğinden deney farklı bir günde her iki antibiyotiğin de daha düşük konsantrasyonları ile tekrarlanmıştır. Meropenem ile polimiksin B kombinasyonunda meropenem 64 mg/L , 32 mg/L ve 16 mg/L ile polimiksin B 2 mg/L ve 1 mg/L konsantrasyonlarında uygulandığında ise biyofilm gücü +3'ten +2'ye azalmıştır. Meropenem 64 mg/L, 32 mg/L ve 16 mg/L ile polimiksin B 0,5 mg/L konsantrasyonlarında kombine uygulandığında ise biyofilm inhibisyonu görülmemiştir. Tigesiklin ile polimiksin B kombinasyonunda ise tigesiklin 4 mg/L ve 2 mg/L ile polimiksin B 2 mg/L, 1 mg/L, 0,5 mg/L ve 0,25 mg/L konsantrasyonlarında kombine uygulandığında biyofilm inhibisyonu görülmüştür. Tigesiklin 1 mg/L ile polimiksin B 2 mg/L, 1 mg/L ve 0,5 mg/L konsantrasyonlarında kombine uygulandığında biyofilm inhibe edilememekle beraber biyofilm gücü +3'ten +1'e azalmıştır. Tigesiklin 1 mg/L ile polimiksin B 0,25 mg/L konsantrasyonlarında uygulandığında ise biyofilm gücü +3'ten +2'ye azalmıştır (Tablo 16, Tablo 17b ve Şekil 8b).

Tablo 16. İzolat-3'ün meropenem-polimiksin B ve tigesiklin-polimiksin B kombinasyonu ile biyofilm inhibisyonu çalışılan tüm antibiyotik konsantrasyonları ve biyofilm inhibisyonu sonuçları.

Antibiyotikler		MBİK
Meropenem		>512 mg/L
Polimiksin B		16 mg/L
Tigesiklin		32 mg/L
Meropenem ve polimiksin B kombinasyonu		
Meropenem konsantrasyonu	Polimiksin B konsantrasyonu	İnhibisyon
512 mg/L	16 mg/L	Var
512 mg/L	8 mg/L	Var
512 mg/L	4 mg/L	Yok*
256 mg/L	16 mg/L	Yok*
256 mg/L	8 mg/L	Yok*
256 mg/L	4 mg/L	Yok [§]
128 mg/L	16 mg/L	Yok*
128 mg/L	8 mg/L	Yok [§]
128 mg/L	4 mg/L	Yok [§]
64 mg/L	2 mg/L	Yok [§]
64 mg/L	1 mg/L	Yok [§]
64 mg/L	0,5 mg/L	Yok
32 mg/L	2 mg/L	Yok [§]
32 mg/L	1 mg/L	Yok [§]
32 mg/L	0,5 mg/L	Yok
16 mg/L	2 mg/L	Yok [§]
16 mg/L	1 mg/L	Yok [§]
16 mg/L	0,5 mg/L	Yok
Tigesiklin ve polimiksin B kombinasyonu		
Tigesiklin konsantrasyonu	Polimiksin B konsantrasyonu	İnhibisyon
32 mg/L	16 mg/L	Var
32 mg/L	8 mg/L	Var
32 mg/L	4 mg/L	Var
16 mg/L	16 mg/L	Var
16 mg/L	8 mg/L	Var
16 mg/L	4 mg/L	Var
8 mg/L	16 mg/L	Var
8 mg/L	8 mg/L	Var
8 mg/L	4 mg/L	Var

Tablo 16. Devam. İzolat-3'ün meropenem-polimiksin B ve tigesiklin-polimiksin B kombinasyonu ile biyofilm inhibisyonu çalışılan tüm antibiyotik konsantrasyonları ve biyofilm inhibisyonu sonuçları.

4 mg/L	2 mg/L	Var
4 mg/L	1 mg/L	Var
4 mg/L	0,5 mg/L	Var
4 mg/L	0,25 mg/L	Var
2 mg/L	2 mg/L	Var
2 mg/L	1 mg/L	Var
2 mg/L	0,5 mg/L	Var
2 mg/L	0,25 mg/L	Var
1 mg/L	2 mg/L	Yok*
1 mg/L	1 mg/L	Yok*
1 mg/L	0,5 mg/L	Yok*
1 mg/L	0,25 mg/L	Yok [§]

*: Biyofilm inhibisyonu yok ancak biyofilm gücü +3'ten +1'e geriledi

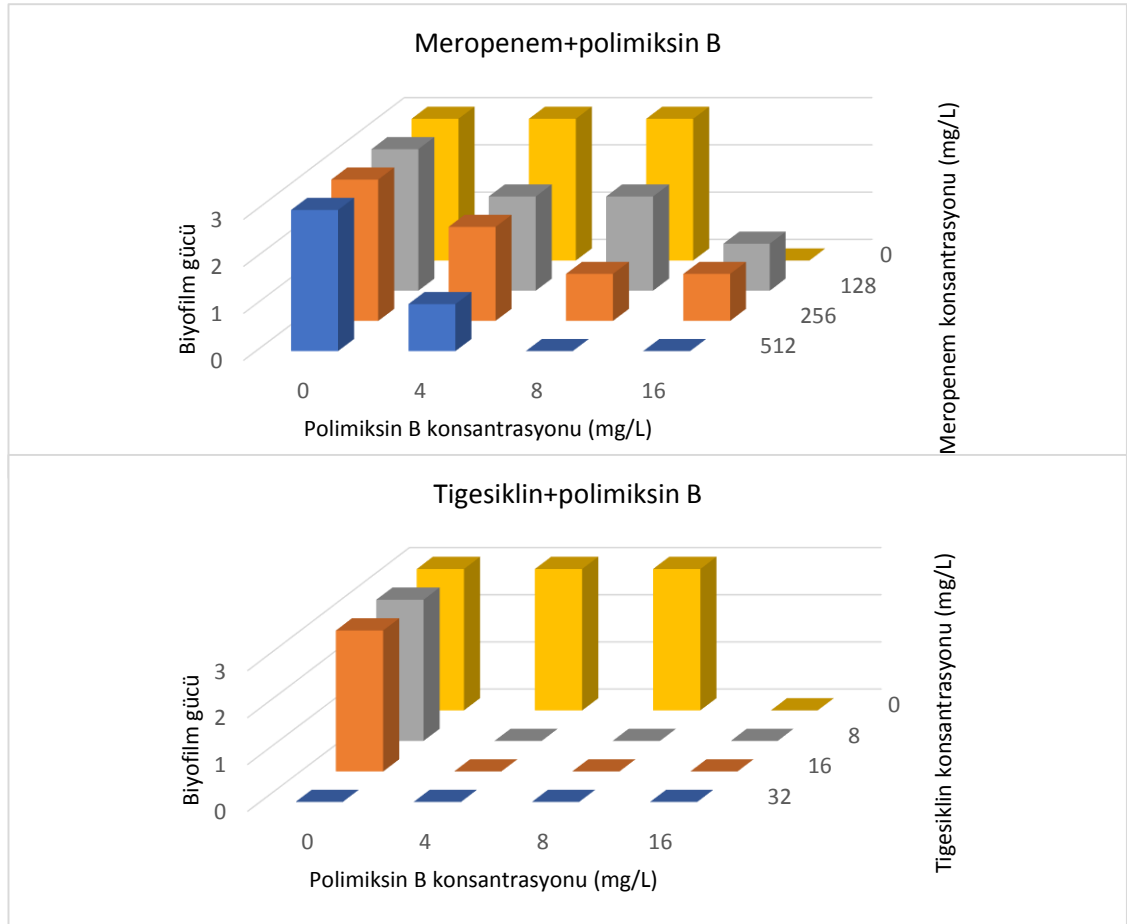
§: Biyofilm inhibisyonu yok ancak biyofilm gücü +3'ten +2'ye geriledi

Tablo 17a. Polimiksin B'nin meropenem ve tigesiklinle yüksek konsantrasyonda kombinasyonlarının İzolat-3'ün biyofilmi üzerine etkisi.

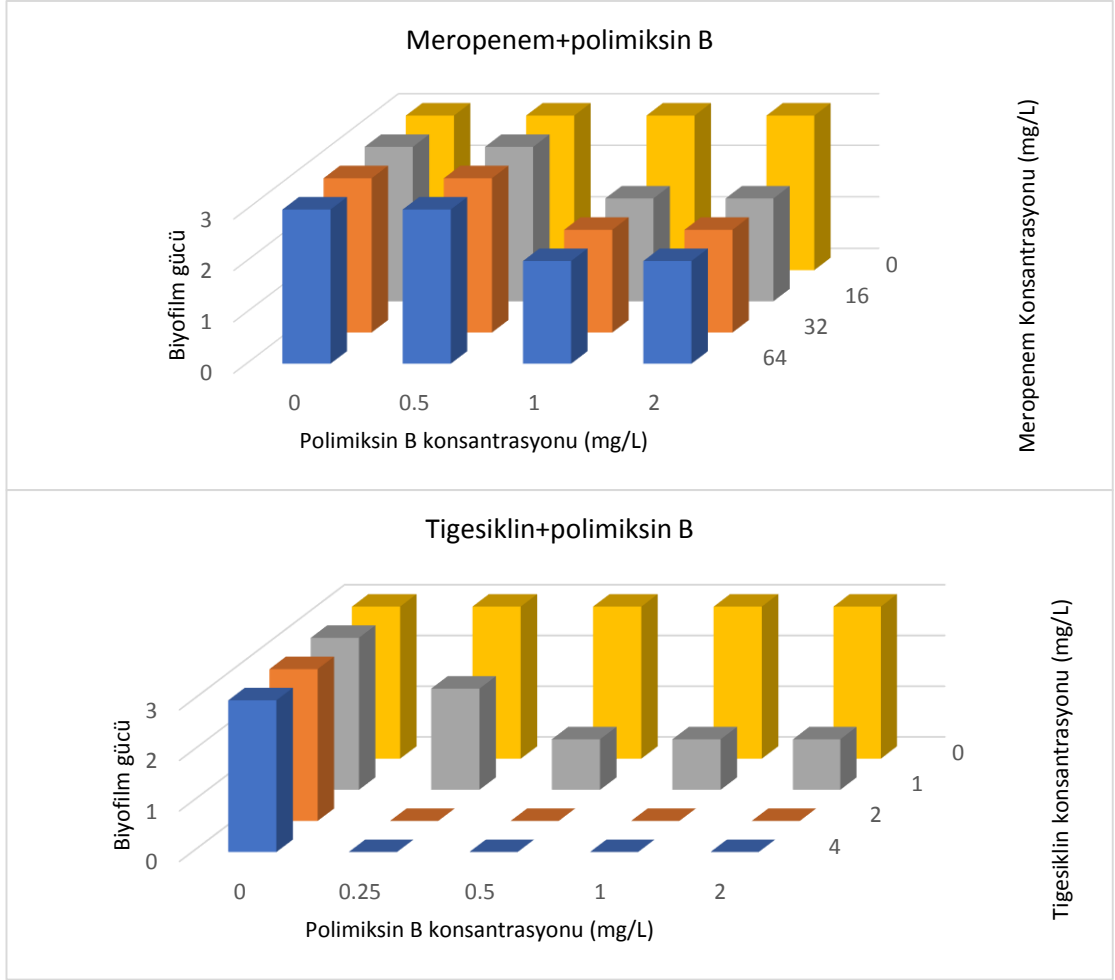
	Polimiksin B 16 mg/L	Polimiksin B 8 mg/L	Polimiksin B 4 mg/L
Meropenem 512 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon var	+3'ten +1'e azalma
Meropenem 256 mg/L	+3'ten +1'e azalma	+3'ten +1'e azalma	+3'ten +2'ye azalma
Meropenem 128 mg/L	+3'ten +1'e azalma	+3'ten +2'ye azalma	+3'ten +2'ye azalma
Tigesiklin 32 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon var
Tigesiklin 16 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon var
Tigesiklin 8 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon var

Tablo 17b. Polimiksin B'nin meropenem ve tigesiklinle düşük konsantrasyonda kombinasyonlarının İzolat-3'ün biyofilmi üzerine etkisi.

	Polimiksin B 2 mg/L	Polimiksin B 1 mg/L	Polimiksin B 0,5 mg/L	Polimiksin B 0,25 mg/L
Meropenem 64 mg/L	+3'ten +2'ye azalma	+3'ten +2'ye azalma	İnhibisyon yok	
Meropenem 32 mg/L	+3'ten +2'ye azalma	+3'ten +2'ye azalma	İnhibisyon yok	
Meropenem 16 mg/L	+3'ten +2'ye azalma	+3'ten +2'ye azalma	İnhibisyon yok	
Tigesiklin 4 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon var
Tigesiklin 2 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon var
Tigesiklin 1 mg/L	+3'ten +1'e azalma	+3'ten +1'e azalma	+3'ten +1'e azalma	+3'ten +2'ye azalma



Şekil 8a. Polimiksin B'nin meropenem ve tigesiklinin yüksek konsantrasyonları ile kombinasyonunda İzolat-3'ün oluşturduğu biyofilmin gücüne etkisi.



Şekil 8b. Polimiksin B'nin meropenem ve tigesiklinin düşük konsantrasyonları ile kombinasyonunda İzolat-3'ün oluşturduğu biyofilmin gücüne etkisi.

İzolat-4 için tek başına meropenem 512 mg/L ve tigesiklin 256 mg/L ve altındaki konsantrasyonlarda test edilmiş ancak biyofilm inhibisyonu görülmemiştir. Polimiksin B ise 8 mg/L konsantrasyonda biyofilmi inhibe etmiştir. Meropenem ve polimiksin B kombinasyonunda; meropenem 512 mg/L, 256 mg/L ve 128 mg/L ile polimiksin B 8 mg/L ve 4 mg/L konsantrasyonlarında kombine uygulandığında biyofilm inhibisyonu görülmüştür. Meropenem 512 mg/L, 256 mg/L ve 128 mg/L ile polimiksin B 2 mg/L kombinasyonunda ise biyofilm inhibisyonu görülmemiştir. Tigesiklin ile polimiksin B kombinasyonunda; tigesiklin 256 mg/L, 128 mg/L ve 64 mg/L ile polimiksin B 8 mg/L, 4 mg/L ve 2 mg/L konsantrasyonlarında biyofilm inhibisyonu görülmüştür (Tablo 18, Tablo 19a ve Şekil 9a).

Tigesiklin ile polimiksin B kombinasyonunda biyofilm oluşumu plağın tamamında inhibe edildiğinden farklı bir günde her iki antibiyotiğin daha düşük konsantrasyonları

ile tekrar test edilmiştir. Tigesiklin 32 mg/L, 16 mg/L ve 8 mg/L ile polimiksin B 1 mg/L, 0,5 mg/L ve 0,25 mg/L konsantrasyonlarında kombine uygulandığında ise biyofilm inhibisyonu görülmemiştir (Tablo 18, Tablo 19b ve Şekil 9b).

Tablo 18. İzolat-4'ün meropenem-polimiksin B ve tigesiklin-polimiksin B kombinasyonu ile biyofilm inhibisyonu çalışılan tüm antibiyotik konsantrasyonları ve biyofilm inhibisyonu sonuçları.

Antibiyotikler		MBİK
Meropenem		>512 mg/L
Polimiksin B		8 mg/L
Tigesiklin		>256 mg/L
Meropenem ve polimiksin B kombinasyonu		
Meropenem konsantrasyonu	Polimiksin B konsantrasyonu	İnhibisyon
512 mg/L	8 mg/L	Var
512 mg/L	4 mg/L	Var
512 mg/L	2 mg/L	Yok
256 mg/L	8 mg/L	Var
256 mg/L	4 mg/L	Var
256 mg/L	2 mg/L	Yok
128 mg/L	8 mg/L	Var
128 mg/L	4 mg/L	Var
128 mg/L	2 mg/L	Yok
Tigesiklin ve polimiksin B kombinasyonu		
Tigesiklin konsantrasyonu	Polimiksin B konsantrasyonu	İnhibisyon
256 mg/L	8 mg/L	Var
256 mg/L	4 mg/L	Var
256 mg/L	2 mg/L	Var
128 mg/L	8 mg/L	Var
128 mg/L	4 mg/L	Var
128 mg/L	2 mg/L	Var
64 mg/L	8 mg/L	Var
64 mg/L	4 mg/L	Var
64 mg/L	2 mg/L	Var

Tablo 18. Devam. İzolat-4'ün meropenem-polimiksin B ve tigesiklin-polimiksin B kombinasyonu ile biyofilm inhibisyonu çalışılan tüm antibiyotik konsantrasyonları ve biyofilm inhibisyonu sonuçları.

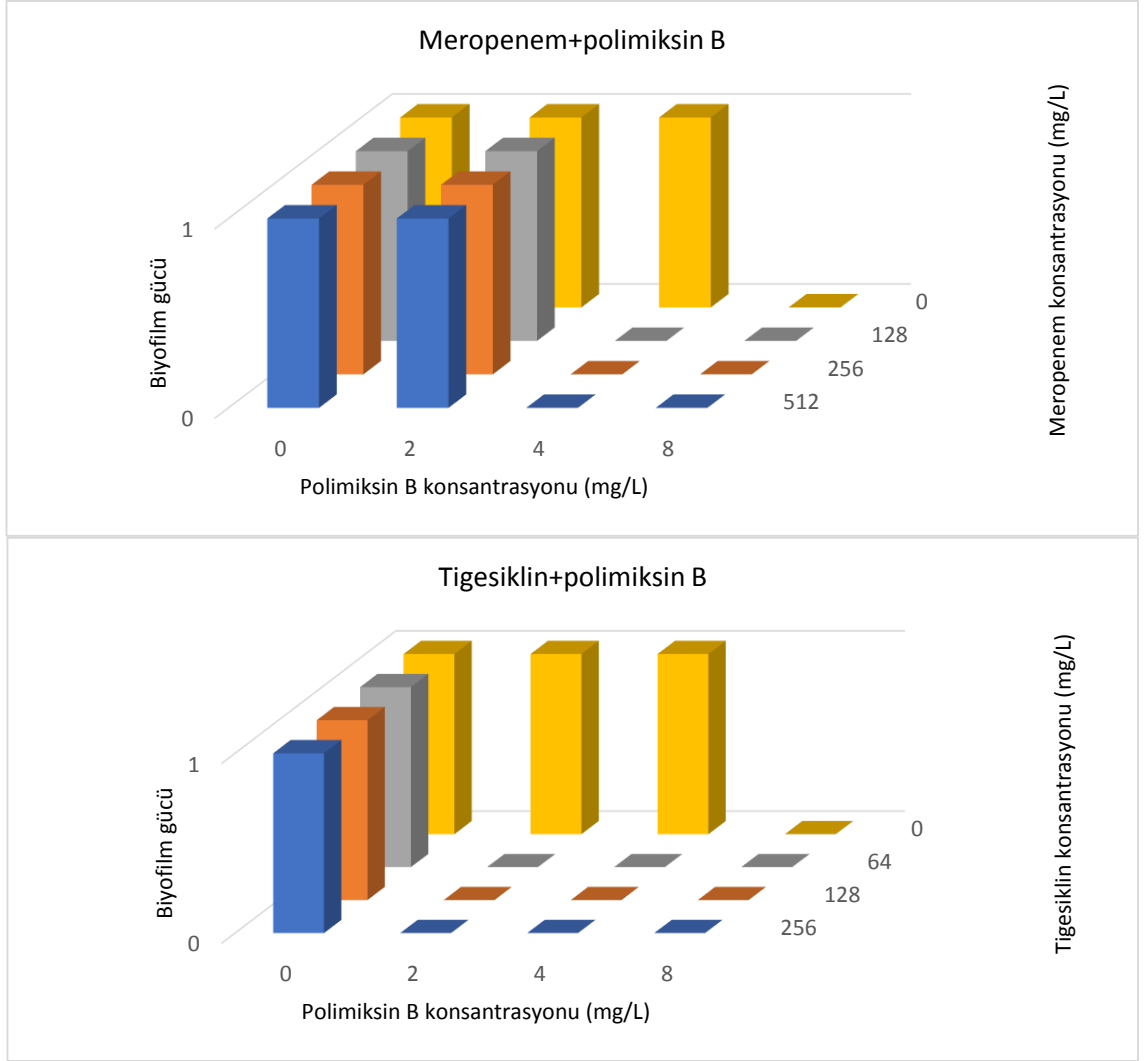
32 mg/L	1 mg/L	Yok
32 mg/L	0,5 mg/L	Yok
32 mg/L	0,25 mg/L	Yok
16 mg/L	1 mg/L	Yok
16 mg/L	0,5 mg/L	Yok
16 mg/L	0,25 mg/L	Yok
8 mg/L	1 mg/L	Yok
8 mg/L	0,5 mg/L	Yok
8 mg/L	0,25 mg/L	Yok

Tablo 19a. Polimiksin B'nin meropenem ile kombinasyonu ve tigesiklinle yüksek konsantrasyonda kombinasyonlarının İzolat-4'ün biyofilmi üzerine etkisi.

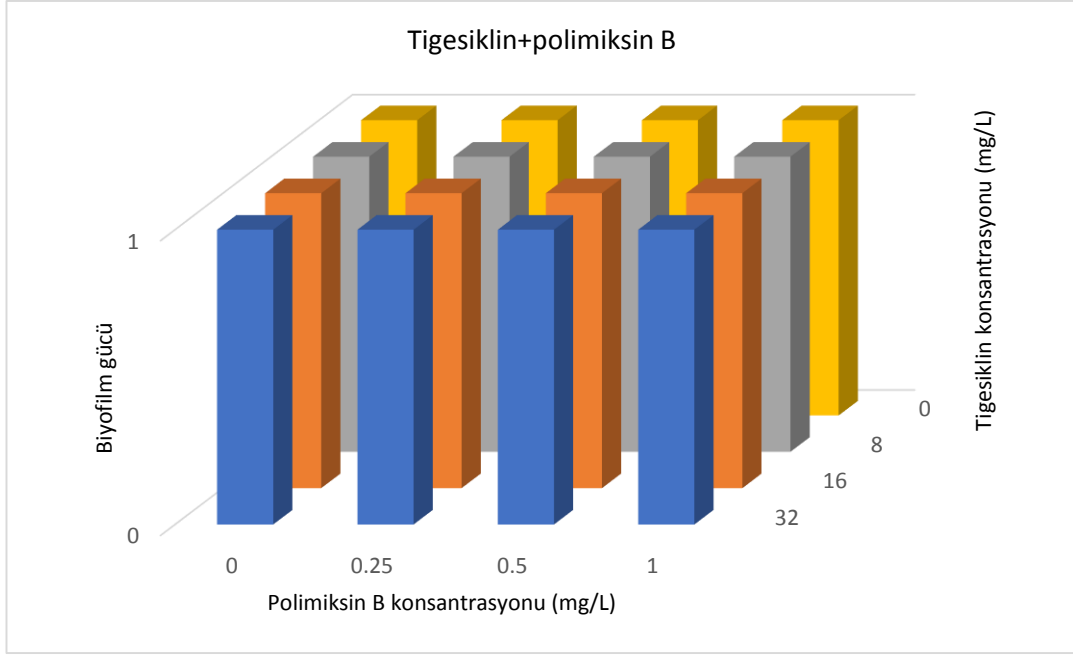
	Polimiksin B 8 mg/L	Polimiksin B 4 mg/L	Polimiksin B 2 mg/L
Meropenem 512 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon yok
Meropenem 256 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon yok
Meropenem 128 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon yok
Tigesiklin 256 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon var
Tigesiklin 128 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon var
Tigesiklin 64 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon var

Tablo 19b. Polimiksin B'nin tigesiklinle düşük konsantrasyonda kombinasyonlarının İzolat-4'ün biyofilmi üzerine etkisi.

	Polimiksin B 1 mg/L	Polimiksin B 0,5 mg/L	Polimiksin B 0,25 mg/L
Tigesiklin 32 mg/L	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Tigesiklin 16 mg/L	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Tigesiklin 8 mg/L	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok



Şekil 9a. Polimiksin B'nin meropenem ile ve tigesiklinin yüksek konsantrasyonları ile kombinasyonunda İzolat-4'ün oluşturduğu biyofilmin gücüne etkisi.



Şekil 9b. Polimiksin B'nin tigesiklinin düşük konsantrasyonları ile kombinasyonunda İzolat-4'ün oluşturduğu biyofilmin gücüne etkisi.

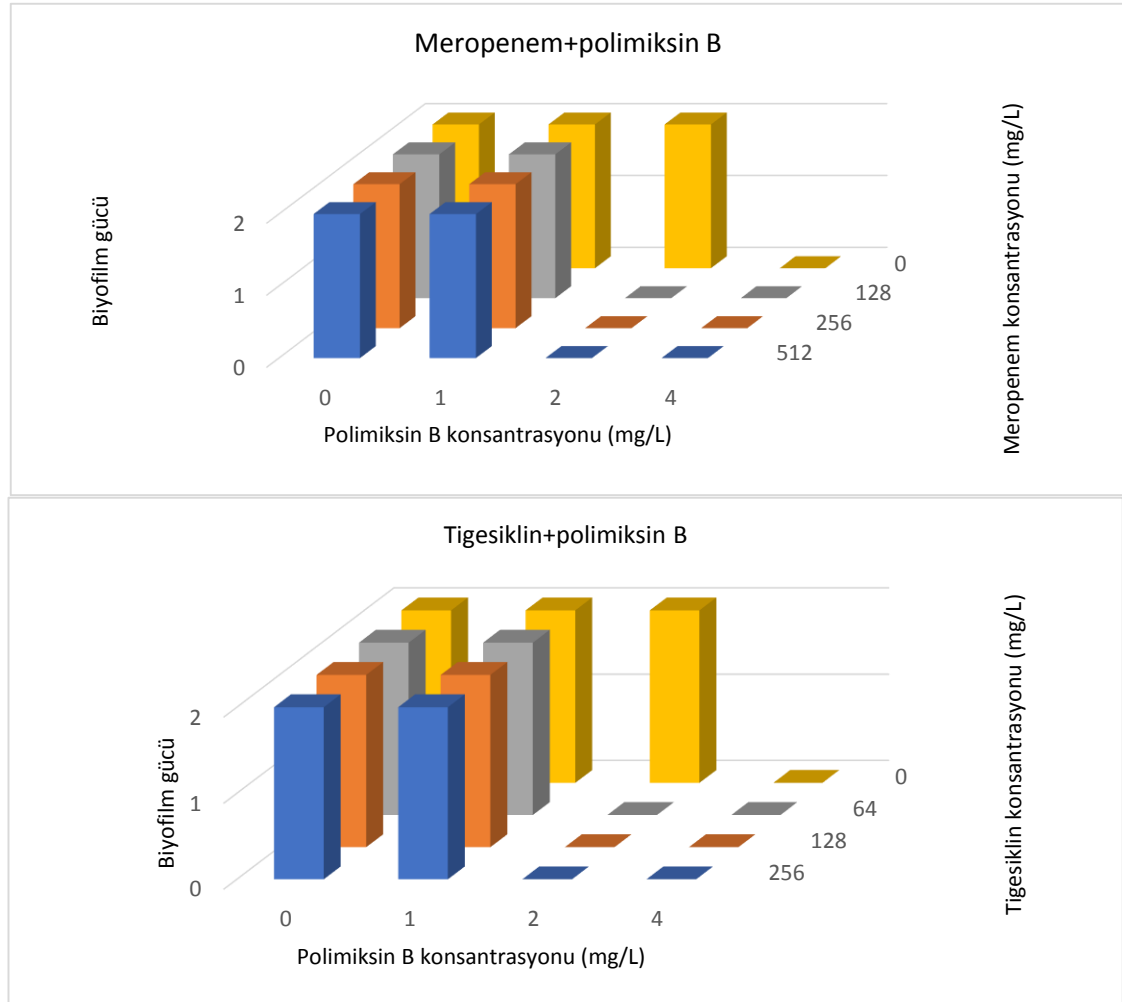
İzolat-5 için meropenem 512 mg/L ve tigesiklin 256 mg/L ve altındaki konsantrasyonlarda test edilmiş ancak biyofilm inhibisyonu görülmemiştir. Polimiksin B ise 4 mg/L konsantrasyonunda biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir. Meropenem ile polimiksin B kombinasyonunda; meropenem 512 mg/L, 256 mg/L ve 128 mg/L ile polimiksin B 4 mg/L ve 2 mg/L konsantrasyonlarında kombine uygulandığında biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir. Meropenem 512 mg/L, 256 mg/L ve 128 mg/L ile polimiksin B 1 mg/L konsantrasyonlarında uygulandığında ise biyofilm oluşumunu inhibe edememiştir. Tigesiklin ile polimiksin B kombinasyonunda; tigesiklin 256 mg/L, 128 mg/L ve 64 mg/L ile polimiksin B 4 mg/L ve 2 mg/L konsantrasyonlarında kombine uygulandığında biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir. Tigesiklin 256 mg/L, 128 mg/L ve 64 mg/L ile polimiksin B 1 mg/L konsantrasyonlarında kullanıldığında ise biyofilm inhibisyonu görülmemiştir (Tablo 20, Tablo 21 ve Şekil 10).

Tablo 20. İzolat-5'in meropenem-polimiksin B ve tigesiklin-polimiksin B kombinasyonu ile biyofilm inhibisyonu çalışılan tüm antibiyotik konsantrasyonları ve biyofilm inhibisyonu sonuçları.

Antibiyotikler		MBİK
Meropenem		>512 mg/L
Polimiksin B		4 mg/L
Tigesiklin		>256 mg/L
Meropenem ve polimiksin B kombinasyonu		
Meropenem konsantrasyonu	Polimiksin B konsantrasyonu	İnhibisyon
512 mg/L	4 mg/L	Var
512 mg/L	2 mg/L	Var
512 mg/L	1 mg/L	Yok
256 mg/L	4 mg/L	Var
256 mg/L	2 mg/L	Var
256 mg/L	1 mg/L	Yok
128 mg/L	4 mg/L	Var
128 mg/L	2 mg/L	Var
128 mg/L	1 mg/L	Yok
Tigesiklin ve polimiksin B kombinasyonu		
Tigesiklin konsantrasyonu	Polimiksin B konsantrasyonu	İnhibisyon
256 mg/L	4 mg/L	Var
256 mg/L	2 mg/L	Var
256 mg/L	1 mg/L	Yok
128 mg/L	4 mg/L	Var
128 mg/L	2 mg/L	Var
128 mg/L	1 mg/L	Yok
64 mg/L	4 mg/L	Var
64 mg/L	2 mg/L	Var
64 mg/L	1 mg/L	Yok

Tablo 21. Polimiksin B'nin meropenem ile kombinasyonu ve tigesiklinle kombinasyonlarının İzolat-5'in biyofilmi üzerine etkisi.

	Polimiksin B 4 mg/L	Polimiksin B 2 mg/L	Polimiksin B 1 mg/L
Meropenem 512 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon yok
Meropenem 256 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon yok
Meropenem 128 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon yok
Tigesiklin 256 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon yok
Tigesiklin 128 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon yok
Tigesiklin 64 mg/L	İnhibisyon var	İnhibisyon var	İnhibisyon yok



Şekil 10. Polimiksin B'nin meropenem ve tigesiklin ile kombinasyonunda İzolat-5'in oluşturduğu biyofilmin gücüne etkisi.

Tüm izolatların tek kullanımı ve kombinasyon kullanımında biyofilmi inhibe eden veya biyofilm gücünü azaltan en düşük konsantrasyonları Tablo 22’de özetlenmiştir, kombinasyonda biyofilm inhibisyonunu sağlayan konsantrasyonlar ile tek kullanımda biyofilm inhibisyonunu sağlayan konsantrasyonlar kullanılarak FİK indeksi hesaplandı ve sinerjistik etkileşim açısından değerlendirildi.

Tablo 22. Tüm izolatların tek kullanımında ve kombinasyon ile kullanımında biyofilm inhibe eden en düşük konsantrasyonları ve FİK indeksine göre yorumu.

İzolatlar		Meropenem+Polimiksin B			Tigesiklin+Polimiksin B		
		MEM konsantrasyonu	PMB konsantrasyonu	FİK İndeksi	TGC konsantrasyonu	PMB konsantrasyonu	FİK İndeksi
1	Monoterapi	128 mg/L	2 mg/L		64 mg/L	2 mg/L	
	Kombinasyon	128 mg/L	0,5 mg/L	İndiferens	16 mg/L	1 mg/L	Additif
32 mg/L		2 mg/L					
2	Monoterapi	>512 mg/L	128 mg/L		>256 mg/L	128 mg/L	
	Kombinasyon	128 mg/L*	128 mg/L*	İndiferens	64 mg/L*	128 mg/L*	İndiferens
3	Monoterapi	>512 mg/L	16 mg/L		32 mg/L	16 mg/L	
	Kombinasyon	512 mg/L	8 mg/L	Additif§	2 mg/L	0,25 mg/L	Sinerji§
		128 mg/L*	16 mg/L*		1 mg/L*	0,5 mg/L*	
		256 mg/L*	8 mg/L*				
512 mg/L*		4 mg/L*					
4	Monoterapi	>512 mg/L	8 mg/L		>256 mg/L	8 mg/L	
	Kombinasyon	128 mg/L	4 mg/L	Additif	64 mg/L	2 mg/L	Sinerji
5	Monoterapi	>512 mg/L	4 mg/L		>256 mg/L	4 mg/L	
	Kombinasyon	128 mg/L	2 mg/L	Additif	64 mg/L	2 mg/L	Additif

FİK: Fraksiyone inhibitör konsantrasyon, MEM: Meropenem, PMB: Polimiksin B, TGC: Tigesiklin.

*: Biyofilm inhibisyonu görülmedi ancak biyofilm gücünde +3’ten +1’e gerileme mevcut.

§: İzolat-3 kombinasyon tedavide sinerji değerlendirmesi inhibisyon olan konsantrasyonlar üzerinden hesaplandı.

Planktonik form ve biyofilmde sinerjistik etkileşimlerinin karşılaştırılması Tablo 23'te verilmiştir. Meropenem ve polimiksin B kombinasyonunda biyofilm üzerine additif etki görülen 3 izolattan birinde planktonik formda sinerji, birinde additif etki görülmüştür. Tigesiklin ile polimiksin B kombinasyonunda ise biyofilmde 2 izolatta sinerji, 2 izolatta additif etki görülmüştür. bu izolatlardan sinerji görülen izolatların birinde (İzolat-3) planktonik formda da sinerji görülmüştür. biyofilm oluşum kapasitesi güçlü (+3) olan ve MBİK değerleri diğer izolatlarla kıyasla daha yüksek olan İzolat-2 için planktonik formda da biyofilmde de sinerji görülmemiştir.

Tablo 23. Tüm izolatların planktonik formda ve biyofilmde sinerjistik etkilerinin karşılaştırılması ve sinerjistik etkileşim görülen antibiyotik kombinasyonları.

izolatlar	Meropenem-Polimiksin B		Tigesiklin-Polimiksin B	
	Planktonik form	Biyofilm	Planktonik form	Biyofilm
1	İndiferens	İndiferens	İndiferens	Additif TGC 64 mg/L + PMB 1 mg/L
2	İndiferens	İndiferens	İndiferens	İndiferens
3	Sinerji MEM 64 mg/L + PMB 0,5 mg/L ve MEM 32 mg/L + PMB 1 mg/L	Additif MEM 512 mg/L + PMB 8 mg/L	Additif TGC 2 mg/L + PMB 0,5 mg/L ve TGC 1 mg/L + PMB 1 mg/L	Sinerji TGC 2 mg/L + PMB 0,25 mg/L
4	Additif MEM 128 mg/L + PMB 0,125 mg/L	Additif MEM 128 mg/L + PMB 4 mg/L	İndiferens	Sinerji TGC 64 mg/L + PMB 2 mg/L
5	İndiferens	Additif MEM 128 mg/L + PMB 2 mg/L	İndiferens	Additif TGC 64 mg/L + PMB 2 mg/L

MEM: Meropenem, PMB: Polimiksin B, TGC:Tigesiklin.

5. TARTIŞMA

K.pneumoniae en önemli nozokomiyal enfeksiyon etkenlerindedir. Sıklıkla kan dolaşım enfeksiyonu, üriner sistem enfeksiyonu ve solunum yolu enfeksiyonlarına neden olur (5). Ülkemiz nozokomiyal enfeksiyon verilerine göre ise tüm enfeksiyonların %19,2'sinden *Klebsiella* spp., enfeksiyon odağı açısından bakıldığında ise kan dolaşım enfeksiyonlarının %18,7'sinden *Klebsiella* spp.'nın sorumlu olduğu görülmektedir (4). Bu çalışmada izolatlar, tedavide önemli bir problem olarak karşımıza çıkması nedeniyle, kan dolaşım enfeksiyonuna neden olan izolatlar arasından seçildi.

Antibiyotik direnci *K.pneumoniae*'nin etken olduğu enfeksiyonlarda önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. CAESAR 2020 verilerine göre Avrupa bölgelerinde *K.pneumoniae*'nin, ertapenem direnci %51, imipenem/meropenem direnci %39 saptanmıştır (5). Ülkemiz USHİESA verilerine göre ise *K.pneumoniae* meropenem direnci %61,9 ve kolistin direnci ise %30,4 saptanmıştır (4). ÇİD *K.pneumoniae* enfeksiyonları, uygun tedavi seçeneklerinin kısıtlı olması nedeniyle günümüzde önemli bir sağlık sorunudur. DSÖ tarafından yayınlanan bildiriye göre karbapenem dirençli *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* ile birlikte yeni antibiyotik üretimi için kritik öneme sahip bakteriler arasına dahil edilmiştir (104). 2021 yılında yayınlanan IDSA ve ESCMID rehberlerine göre, karbapenem dirençli GNB tedavisinde seftazidim-avibaktam, seftolozon-tazobaktam, meropenem-vaborbaktam, imipenem-silastatin-relebaktam, sefiderokol ve eravasiklin gibi son yıllarda üretilen antibiyotiklerin kullanılması önerilmektedir (45, 46). Bu antibiyotiklerin ülkemiz de dahil olmak üzere dünyanın çoğu bölgesinde ulaşılabilir olmaması hekimleri kombinasyon antibiyotik rejimlerini kullanmaya yönlendirmiştir.

K.pneumoniae'nin biyofilm oluşturma yeteneğinin de antimikrobiyal dirence katkı sağladığı bilinmektedir. Biyofilm; matriksi sayesinde antibiyotiklerin hücrelere ulaşmasına engel olur, biyofilm içinde oksijen ve besin kısıtlılığı olması hücrelerin metabolizmalarının yavaşlamasına ve persistan hücrelerin gelişimine sebep olur ve bu durum artan antibiyotik direnci ile sonuçlanır (6, 67). Bu çalışma ile kan dolaşım enfeksiyonuna neden olan karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatlarının

oluşturduğu biyofilm üzerine meropenem, tigesiklin, polimiksin B antibiyotiklerinin ve kombinasyonlarının etkinliği araştırılmıştır.

Çalışmamızda incelenen 125 karbapenem dirençli *K.pneumoniae* kan izolatından 11 tanesi (%8,8) biyofilm oluşturmuştur. İzolatlardan 2'si güçlü, 3'ü orta ve kalan 6 izolat zayıf biyofilm oluşturmuştur. Çalışmaya dahil edilen izolatların primer enfeksiyon odağına bakıldığında ise 3 izolatın üriner sistem enfeksiyonu ve diğer 2 izolatın intraabdominal enfeksiyon tanılı hastalara ait olduğu görülmüştür (Tablo 9).

Literatürdeki *K.pneumoniae*'nin biyofilm oluşturma oranlarına bakıldığında; bir çalışmada 3 *K.pneumoniae* idrar izolatından ikisinin güçlü, birinin orta derecede güçlü biyofilm oluşturduğunu bulunmuştur (105). Sadıç ve arkadaşlarının (106) VİP tanısı ile takip edilen hastaların solunum yolu örneklerini inceledikleri çalışmada 31 *K.pneumoniae* izolatının 29 tanesinin biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Vuotto ve arkadaşlarının (95) çalışmasında 120 *K.pneumoniae* izolatının %93,3'ü biyofilm oluşturmuş, bunların 95 (%79)'i güçlü, 17 (%14)'ü orta derecede güçlü biyofilm oluşturmuştur. Sanchez Jr ve arkadaşları (107), çalışmaya dahil edilen *K.pneumoniae* izolatlarının biyofilm oluşturma oranını %76 (41/54) bulmuştur. Seifi ve arkadaşlarının (108) çalışmasında çeşitli *K.pneumoniae* izolatlarında biyofilm oranı %93,6 saptanmıştır. Yang ve arkadaşlarının (109) çalışmasında ise *K.pneumoniae* izolatlarının %44,7'si biyofilm oluşturmuştur. Karimi ve arkadaşlarının (110) 2021'de yaptığı çalışmada, 83 *K.pneumoniae* izolatından 62 (%74,5) izolatın biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Bu çalışmalar ile karşılaştırıldığında bizim çalışmamızda daha düşük biyofilm oluşturma oranlarının görülmüştür. Bu farklılığın çalışmaya dahil edilen örnek türünün farklı olmasına ve biyofilm oluşumunu ölçmek için kullanılan yöntemlerin farklı olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir.

İzolatın türü ile biyofilm oluşturma kapasitesi açısından yapılan çalışmalar incelendiğinde; Sanchez Jr ve ark. çalışmasında; derin doku, kemik ve solunum örneklerinde biyofilm oluşturma oranı yüksek, idrar ve kan örneklerinde ise daha düşük saptanmıştır (107). Seifi ve ark. çalışmasında balgam ve cerrahi yara örneklerine daha yüksek, kan örneklerinde daha düşük biyofilm oluşturma gücü olduğu görülmüştür (108). Yang ve ark. çalışmasında izolat türü ile biyofilm gücü açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır (109). Karimi ve ark. çalışmasında biyofilm

oluşturma oranı trakeal aspirat ve balgam örneklerinde en yüksek, apse örneğinde ise en düşük olduğu görülmüştür (110). Literatürdeki diğer yayınlarda da görüldüğü üzere derin doku ve solunum örneklerinde biyofilm oluşturma oranları daha yüksektir. Kan izolatları ise biyofilm oluşturma kapasitesi en düşük olan örnek grubunu oluşturmaktadır.

Yaita ve arkadaşlarının (111) çalışmasında 9 hastaya ait 10 KDE bakteremi izolatu incelenmiş ve hepsinin biyofilm oluşturduğu görülmüştür ancak hastaların çoğunda (8/9) üriner kateter, santral kateter gibi bir yabancı cisim olduğu belirtilmiştir. Di Domenico ve arkadaşlarının (112) hematolojik malignitesi olan 96 bakteremi vakasını inceledikleri çalışmada; zayıf biyofilm oluşturan izolatların daha fazla olduğu, ancak mortalite açısından bakıldığında güçlü biyofilm oluşturan izolatların uç organ hasarı ve mortaliteye daha fazla neden olduğu bulunmuştur. Çalışmada bakteremi etkeni izolatların %63,5'ini GNB'ler oluşturmaktadır ve bunlardan 10 izolat (%10,4) *K.pneumoniae*'dir. Güçlü biyofilm oluşumu ise özellikle *P.aeruginosa* (93,7) ve *K.pneumoniae* (%50) virulansında diğer izolatlarla kıyasla daha önemlidir (112). Karimi ve ark. çalışmasında, çalışmaya dahil edilen altı *K.pneumoniae* kan izolatının %10 güçlü, %60 zayıf biyofilm oluşturduğu ve diğer örnek türleri ile kıyaslandığında daha zayıf biyofilm oluşturduğu görülmüştür (110). Çalışmamızda da biyofilm oluşturan 11 izolatın 6'sı (%54) zayıf biyofilm oluşturmaktadır, bu oran diğer çalışmalardaki kan örneklerinin biyofilm gücüne benzerdir. Zheng ve arkadaşlarının (113) çalışmasında bakteremi etkeni 250 *K.pneumoniae* izolatu biyofilm oluşumuna etki eden virulans faktörleri açısından incelenmiştir. Primer enfeksiyon odağı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamakla birlikte, uygun tedaviye rağmen 72 saatten fazla devam eden bakteremi vakalarında biyofilm oluşumunun daha fazla olduğu görülmüştür. K1 (*magA*), *rmpA*, *rmpA2*, *wcaG* virulans faktörleri pozitif izolatlarda daha sık biyofilm oluşmuştur. Hiper mukovisköz ya da K2 serotiple biyofilm arasında ise ilişki saptanmamıştır. Sonuç olarak bakteremi izolatlarının biyofilm gücünün; primer enfeksiyon odağı, tedaviye rağmen persistan bakteremi olup olmaması, o bölgede yaygın bulunan varyant ve bakterinin taşıdığı virulans faktörlerine bağlı olduğu görülmektedir.

İzolatların biyofilm oluşturma kapasitesi ile ilaç direnci arasında ilişki olduğu düşünülmektedir. Cepas ve arkadaşlarının (114) çalışmasında 117 *K.pneumoniae*

izolatının biyofilm oluşturma oranı %37,6 bulunmuştur. Kolistin dirençli izolatlarda biyofilm oluşturma oranı istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş, tigesiklin için de dirençli izolatlarda biyofilm oluşturma oranı daha yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı görülmüştür. ÇİD ile biyofilm oluşumu karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. Nirwati ve arkadaşlarının (115) çalışmasında 167 *K.pneumoniae* izolatından %85'inin biyofilm oluşturduğu ve izolatların %54,5'inin ÇİD olduğu görülmüştür. İzolatların ÇİD olup olmaması ve biyofilm oluşturma kapasitesi arasında ise istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır. Asati ve arkadaşlarının (116) çalışmasında yara örneklerinden izole edilen 31 *K.pneumoniae* izolatı ÇİD ve biyofilm oluşturma gücü açısından karşılaştırılmış ve ÇİD oranı biyofilm oluşturan grupta daha yüksek oranda bulunmuştur (%61,9'a %40). Shadkam ve arkadaşlarının (117) çalışmasında ise 100 *K.pneumoniae* izolatından ÇİD olanlarda güçlü biyofilm oluşturma oranı %29,8 iken ÇİD olmayan izolatlarda güçlü biyofilm oluşturma oranı %15,2 saptanmıştır. ÇİD olmayan izolatların %51,5'i biyofilm oluşturmazken, ÇİD izolatların sadece %11,9'unda biyofilm oluşmamıştır. Cusumano ve arkadaşlarının (118) çalışmasında 139 *K.pneumoniae* izolatı antimikrobiyal direnç ve biyofilm oluşturma gücü açısından karşılaştırılmış, ÇİD sıklığının (81 izolat) zayıf biyofilm oluşturan izolatlarda daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ek olarak karbapenem dirençli izolatların, zayıf biyofilm oluşturan grupta güçlü biyofilm oluşturan gruba kıyasla (%91,4'e %39,4) daha fazla olduğu bulunmuştur. Tigesiklin ve kolistin direnci açısından karşılaştırıldığında ise istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır. Vuotto ve arkadaşlarının (95) çalışmasına göre 120 idrar *K.pneumoniae* izolatı antimikrobiyal direnç ve biyofilm oluşturma gücü açısından incelenmiştir. İzolatlar antibiyotik direncine göre duyarlı, ÇİD ve XDR olarak sınıflandırılmış ve biyofilm oluşturma gücü açısından karşılaştırılmıştır. Duyarlı izolatların %70,8 (17/24) güçlü, %12,8 (3/24) orta derecede; ÇİD izolatların %67,5 (27/40) güçlü, %25 (10/40) orta derecede; XDR izolatların ise %91,1 (51/56) güçlü, %7,1 (4/56) orta derecede güçlü biyofilm oluşturduğu bulunmuştur. ÇİD ve XDR izolatlar karşılaştırıldığında anlamlı fark olmamakla birlikte, karbapenem direnci açısından karşılaştırıldığında karbapenem dirençli izolatların istatistiksel olarak anlamlı oranda biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Rahdar ve arkadaşlarının (119) çalışmasında 160 *K.pneumoniae*

izolatından karbapenem dirençli grupta güçlü biyofilm oranı %50 (46/92) iken karbapenem duyarlı grupta güçlü biyofilm oranı %33,6 (31/92) saptanmıştır. Sonuç olarak aksini gösteren çalışmalar da olmakla birlikte çalışmaların çoğunluğunda dirençli izolatların daha sık ve daha güçlü biyofilm oluşturduğu görülmektedir. Karbapenem direnci ile biyofilm gücü arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğu, tigesiklin veya kolistin ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı saptanmıştır. Çalışmamıza sadece karbapenem dirençli izolatlar dahil edilmiş olup, bu izolatlardan birinin 64 mg/L, diğer izolatların ise 256 mg/L ve 512 mg/L gibi yüksek meropenem MİK'ine sahip olduğu bulunmuştur (Tablo 9). İzolatlarımızın hepsi polimiksin B duyarlı, 3 izolat da tigesiklin duyarlı bulunmuştur. Çalışmaya dahil edilmeyen izolatların tigesiklin ve polimiksin B duyarlılığı bilinmemesi nedeniyle karşılaştırma yapılamamaktadır.

International Network for Optimal Resistance Monitoring (INFORM) küresel sürveyans programı dahilinde 18 Avrupa ülkesinin katılımı ile yapılan çalışmada 2012-2015 yılları arasında *Enterobacteriaceae* antimikrobiyal duyarlılığı değerlendirilmiştir. Çalışmada tüm *K.pneumoniae*'da (6719 izolat) meropenem, kolistin ve tigesiklin duyarlılığı sırasıyla %91,3, %95,6 ve %86,3; meropenem dirençli *K.pneumoniae*'da (11 izolat) kolistin ve tigesiklin duyarlılığı sırasıyla %90,9 ve %81,8 bulunmuştur (120). Vega ve arkadaşlarının (121) Latin Amerika'nın 11 yıllık süre ile tüm klinik örneklerinin incelendiği çalışmasında; 4032 *K.pneumoniae* izolatının GSBL oranı %36,3 ve tigesiklin, meropenem ve amikasinin (sırasıyla %95,7, 90,9 ve 86,9) duyarlılığı en yüksek antibiyotikler olduğu görülmüştür.

Aygar'ın (122) çalışmasında 3 yıl süre ile karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatlarında kolistin direnci araştırılmış ve yıllara göre sırasıyla %37,5, %30,8 ve %41,7 saptanmıştır. Tanrıverdi Çaycı ve arkadaşlarının (123) yaptığı çalışmada; %86,1'i karbapenem dirençli olan *K.pneumoniae* izolatlarının %29,7 si, Koçak ve arkadaşlarının çalışmasında (124) ise 81 karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatının %39,5'inin kolistin dirençli olduğu bulunmuştur. İdrar izolatlarında kolistin direnci %35, kan izolatlarında ise %56 bulunmuştur. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında; INFORM verileri 2012-2015 gibi daha eski tarihleri içermektedir ve bu nedenle karbapenem dirençli izolat sayısı nispeten daha azdır. Daha yakın tarihli çalışmalara bakıldığında karbapenem direnci ile birlikte kolistin direncinin de arttığı hatta tehlike

uyandıran boyutlarda olduğu görülmektedir. Çalışmamızda herhangi bir karbapenem dirençli olduğu görülen izolatlar seçildikten sonra meropenem, polimiksin B ve tigesiklin için antimikrobiyal duyarlılık çalışılmıştır. İzolatların meropenem MİK'leri 64 ile 512 arasındadır ve tamamı EUCAST kriterlerine göre meropenem dirençlidir (97). Polimiksin B MİK'leri 0,5 ile 2 arasındadır ve EUCAST kriterlerine göre hepsi polimiksin B duyarlıdır (97). Tigesiklin MİK'leri ise; 1 izolat için 0,25, 2 izolat için 2 ve diğer 2 izolat için 4'tür, FDA kriterlerine göre 3 izolat tigesiklin duyarlı, 2 izolat tigesiklin dirençlidir (98). Çalışmamıza dahil edilen karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatlarında polimiksin B direnci görülmemiştir, bu durumun örneklem sayımızın kısıtlı olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Biyofilm oluşumu da antimikrobiyal dirence katkı sağlar. Antibiyotiklerin biyofilm içindeki hücrelere yeterince penetre olamaması, biyofilm matriksi içinde antibiyotik etkisinde azalma, biyofilm hücrelerinin metabolizmasının yavaşlaması ve persistan hücreler biyofilmin antimikrobiyal dirence katkısını açıklamak için araştırılan mekanizmalardandır. Biyofilm içindeki bakterilere antibiyotiklerin etkinliğini göstermek için rutin uygulanan MİK testleri uygun değildir. Bu amaçla farklı yöntemler denenmektedir. Modifiye Christensen yöntemi (91, 92), iğneli polistrien plaklar ile MBİK ölçümü (125), zamana bağlı öldürme yöntemi ve in vitro dinamik biyofilm modelleri (126, 127) bu yöntemler arasında sayılabilir. Bizim çalışmamızda modifiye Christensen yöntemi kullanılmıştır.

Sato ve arkadaşlarının (128) yaptığı çalışmada 10 adet *A.baumannii* izolatı, bazı antibiyotiklerin MİK altındaki konsantrasyonlarında biyofilm oluşum inhibisyonuna etkisi açısından incelenmiştir. Planktonik formdaki hücrelerin MİK altındaki değerlerde kolistin ve polimiksin B'ye düşük duyarlılık gösterdikleri, tigesikline ise duyarlı oldukları görülmüştür. Biyofilm oluşum inhibisyonu deneyi için, bakteri süspansiyonuna kolistin veya polimiksin B uygulandığında, biyofilm oluşumunun kontrole eş veya kontrolden daha fazla olduğu, tigesiklinin ise MİK altındaki konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunu inhibe ettiği görülmüştür. Sonuç olarak bu çalışmaya göre; tigesiklin biyofilm oluşumunu inhibe edebilmektedir, polimiksin B ve kolistin ise MİK altındaki konsantrasyonlarda ortamda bulunması halinde biyofilm oluşumunu indükleyebilmektedir. Beganovic ve arkadaşlarının (129) çalışmasında, meropenem ve polimiksin B duyarlı 24 *A.baumannii* izolatı için MİK altındaki

konsantrasyonlarda antibiyotiklerin biyofilm inhibisyonuna etkisi değerlendirilmiştir. Polimiksin B %63 ve meropenem %58 oranında biyofilm oluşumunu önlemiştir. Song ve arkadaşlarının 3 farklı VIM-2 β -laktamaz üreten *A.baumannii* biyofilmi ile yaptıkları çalışmada (130) imipenem ve kolistin MİK değerlerinde tek başına kullanımda biyofilm oluşumunu yeterince inhibe edemediği, tigesiklinin ise MİK değerinde kullanıldığında biyofilm oluşumunu %90 inhibe ettiği görülmüştür. Naparstek ve arkadaşlarının KPC üreten 46 *K.pneumoniae* izolatu ile yaptıkları çalışmada (103) kolistin MİK altındaki konsantrasyonlarda biyofilm oluşumuna etkisi olmadığı görülmüştür ancak çalışılan izolatlar polimiksin dirençlidir. Bu çalışmalarda, bizim çalışmamızdan farklı olarak, antibiyotiklerin MİK altındaki konsantrasyonlarda biyofilm oluşumuna etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak bakterinin duyarlı olduğu antibiyotikler uygulandığında biyofilm oluşumunu inhibe edebildiği ancak duyarlı olsalar da MİK'i yüksek olan antibiyotiklerin MİK altındaki konsantrasyonları ile uygulandığında biyofilm oluşumunu inhibe edemediği görülmüştür. Bizim bu çalışmada amacımız ise; antibiyotiklerin oluşmuş biyofilm üzerine etkisini araştırmaktır. Bu nedenle bakteri süspansiyonu doku kültür plağında inkübe edildikten sonra antibiyotik uygulanmıştır.

Wickremasinghe ve arkadaşlarının (131) ikisi de polimiksin B dirençli, biri meropenem duyarlı iki *P.aeruginosa* izolatu ile yaptıkları çalışmada, iki izolat için de polimiksin B monoterapi ve meropenem dirençli izolat için meropenem monoterapisi inefektif bulunmuştur. Meropenem ya da polimiksin B'nin dirençli izolatların oluşturduğu biyofilme monoterapide etkisiz olduğu görülmüştür. Herrera ve arkadaşlarının (132) 2019 yılında yayınlanan çalışmasında 2 farklı polimiksin B duyarlı *K.pneumoniae* izolatu, antibiyotiklerin biyofilm oluşumuna ve oluşmuş biyofilm parçalanmasına etkisi açısından incelenmiştir. Sonuç olarak polimiksin B'nin MİK altındaki konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunu inhibe ettiği, MİK'e eşit ve üzerindeki konsantrasyonlarda ise oluşmuş biyofilmi parçaladığı gösterilmiştir. Ruiz ve arkadaşlarının (133) endotrakeal tüp içinde oluşturulan *K.pneumoniae* biyofilmi üzerine yaptığı çalışmada; MİK'in 2 katı konsantrasyonlarda tigesiklin için %74,2, meropenem için %65,5 ve kolistin için %56,7; MİK'e eşit konsantrasyonda uygulandığında tigesiklin için %64,2, meropenem için %58,4, kolistin için %46,4; MİK'in yarısı konsantrasyonlarda tigesiklin için %66,5, meropenem için %64,7,

kolistin için %50,4 oranında biyofilmi parçaladığı bulunmuştur. Sonuç olarak meropenem ve kolistine dirençli izolatlarda biyofilme etkisiz olduğu, duyarlı olan izolatlarda ise en iyi biyofilm aktivitesinin meropenem ile, en düşük aktivitenin de kolistin ile olduğu bulunmuştur. Mataracı-Kara ve arkadaşları (134) tarafından yapılan çalışmada, 5 farklı kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonu etkeni *K.pneumoniae* izolatu ile in vitro kateter model oluşturulup antibiyotiklerin biyofilm üzerine etkisi araştırılmıştır. Doripenemin tek başına biyofilm üzerine en etkili ajan olduğu, tigesiklin ve kolistinin kontrol gruba göre biyofilm içindeki bakteri dansitesini azaltmakla birlikte yeterli miktarda elimine edemediği ve tedavi sonrası tekrar büyüme ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. İzolatların antimikrobiyal duyarlılıklarına bakıldığında, bir izolatın doripenem ve tigesiklin dirençli, diğer izolatların iki antibiyotiğe de duyarlı olduğu ve tüm izolatların kolistin duyarlı olduğu görüldü. Sonuç olarak karbapenemler, duyarlı bakterilerin oluşturduğu biyofilm üzerine tigesiklin ve kolistinden daha etkilidir. Kolistin ve tigesiklin monoterapisinin, izolatlar duyarlı olsa da tedavi başarısızlığı ile ilişkili olduğu görülmektedir.

İzolatların meropenem MBİK değerlerine bakıldığında; 1 izolat için 128 mg/L, diğer 4 izolat için ise çalışılan en yüksek değer 512 mg/L üzerinde saptanmıştır. Meropenem MİK ile MBİK karşılaştırıldığında 2-8 kat artış olduğu görülmüştür. Polimiksin B MBİK değerleri 2-128 mg/L ölçülmüştür, MİK ve MBİK değerleri karşılaştırıldığında 2-128 kat artış olduğu görülmüştür. Tigesiklin için ise MBİK iki izolatta 32 mg/L ve 64 mg/L, diğer üç izolat için çalışılan en yüksek konsantrasyon olan 256 mg/L üzerinde saptanmıştır. Tigesiklin MİK ve MBİK değerleri karşılaştırıldığında 8-1024 kat artış olduğu görülmüştür (Tablo 10). Li ve arkadaşlarının (94) çalışmasında 9 *A.baumannii* izolatu için MİK ve MBİK konsantrasyonları karşılaştırıldığında meropenem için 16-1024 kat artış olduğu görülmüştür. Naparstek ve arkadaşlarının çalışmasında izolatların %69'unda kolistinin biyofilm eradike eden konsantrasyonunda MİK'e kıyasla 2-3 kat artış görülmüştür (103). Sadıç ve arkadaşlarının çalışmasında incelenen 6 VIP etkeni izolatta meropenem, siprofloksasin ve kolistinin MİK ve MBİK değerleri arasında en az 4 kat olmak üzere çoğu izolat için 1000 katın üzerinde fark olduğu bulunmuştur (106). Can ve arkadaşlarının (135) çalışmasında 59 *A.baumannii* izolatının planktonik ve biyofilmdeki hücreleri üzerine tigesiklinin etkisi araştırılmıştır. Biyofilm oluşumu ile MİK arasında anlamlı bir ilişki

saptanmamış olup biyofilmdeki hücrelerde planktonik hücrelere kıyasla MİK değerlerinde belirgin artış olduğu görülmüştür. *K.pneumoniae* ile yapılan çalışmalara bakıldığında ise; Aires ve arkadaşları (136), seftriakson için MBİK değerinin MİK'in 6250 katı olduğunu bulmuşlardır. Perez'in (137) çalışmasında 10 adet KPC-2 üreten *K.pneumoniae* izolatının %90'unda biyofilm içindeki hücrelerde polimiksin B direncinin 2-16 kat arttığı bulunmuştur. Chaudhary ve arkadaşları (138) 15 *K.pneumoniae* izolatının meropenem için MBİK konsantrasyonlarının MİK'in 8-32 katı olduğunu bulmuştur. Singla ve arkadaşlarının (139) çalışmasında ise amikasin, siprofloksasin ve piperasilinin planktonik form ve biyofilmde MİK ve MBK konsantrasyonları karşılaştırılmış; biyofilmdeki hücrelerin MİK değerlerinde 2-8 kat, MBK'da 1024 kata kadar artış olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde antibiyotiklerin MBİK değerleri, MİK değerlerinden 2-1024 kat daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan izolatlardan biri (İzolat-2) için MBİK ile MİK değerleri arasındaki fark diğer izolatlarla kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bu durumun izolatın güçlü biyofilm oluşturması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Karbapenem ve geniş spektrumlu diğer beta laktamlara direnç oranları gün geçtikçe artmaktadır. Bu amaçla üretilen antibiyotiklerin dünyanın çoğu bölgesinde ulaşılabilir olmaması ve artık bu antibiyotiklere dirençli izolatlarla da klinikte karşılaşılması, araştırmacıları klinik kullanımda olan antibiyotiklerin sinerjistik etkileşimlerini araştırmaya yönlendirmektedir. Çoğu çalışmada ciddi sepsis, septik şokta etkene yönelik kombinasyon tedavi monoterapiden üstün bulunmuştur. Ek olarak karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* ve β -laktamların kullanılmadığı *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* enfeksiyonlarında da kombinasyon tedavi üstün bulunmuştur (47).

Kombinasyon tedavide sinerjistik etkileşimi değerlendirmek için uygulanan birkaç farklı yöntem vardır. Zamana bağlı öldürme yönteminde antibiyotiğin tek kullanımına kıyasla $2 \log_{10}$ cfu azalma olması sinerji olarak değerlendirilir (100). Bizim çalışmamızda kullanılan yöntem olan dama tahtası yönteminde ise FİK indeksi hesaplanır. FİK indeksi $\leq 0,5$ olması sinerji, $0,5$ ile ≤ 1 arası additif etki 1 ile ≤ 4 arası indifferens, >4 ise antagonizma olarak değerlendirilmiştir (68, 102).

Wang ve arkadaşları (140) tarafından *A.baumannii* izolatlarında kombinasyon tedavilerin sinerjistik etkilerinin araştırıldığı çalışmada, kolistin MİK altındaki konsantrasyonları ile yapılan kombinasyonlarda diğer antibiyotiklerin MİK'lerinde 2-128 kat azalma görülmüştür. Meropenem ile kombinasyonunda %52 (13/25) sinerji görülmüştür. Laishram ve arkadaşlarının (141) çalışmasında 50 karbapenem dirençli *K.pneumoniae* kan izolatu meropenem ve kolistin sinerjisi açısından araştırılmış ve kolistin dirençli grupta (8/50) sinerjinin %50, kolistin duyarlı grupta %45,2 olduğu saptanmış ve aralarında istatistiksel anlamlı farklılık olmadığı görülmüştür. Dosler ve arkadaşlarının (142) 15 *K.pneumoniae* izolatu içeren çalışmasında izolatların %54'ünde kolistin ile imipenem kombinasyonunda sinerji görülmüştür. Dündar ve arkadaşlarının (143) çalışmasında 25 KDE izolatında dama tahtası yöntemi ile sinerjistik etkileşimler değerlendirilmiştir. İzolatlardan 5'i kolistin, 5'i tigesiklin dirençlidir. İmipenem+kolistin kombinasyonu %40 sinerjik etkili bulunmuştur. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında karbapenemler ile polimiksinlerin sinerjik etkili olabildiği görülmektedir. Özellikle karbapenem dirençli izolatlarda, kolistin monoterapi inefektif olmakla birlikte kombinasyonda sinerji görülmektedir. Sinerji deneylerinde çoğunlukla polimiksinlerden kolistin kullanılmıştır, polimiksin B'nin kullanıldığı çalışmalar ise daha kısıtlı sayıdadır. Polimiksin B içeren kombinasyonlarla kolistin içeren kombinasyonların sinerjik etkileri karşılaştırıldığında ise literatürde farklı oranlar ile karşılaşılmaktadır. Meng ve arkadaşlarının (144) 2022'de yayınlanan 9 XDR *A.baumannii* izolatu ile yaptıkları çalışmada; imipenem, meropenem, tigesiklin, polimiksin B ve polimiksin E'nin MİK, MBİK ve sinerjistik etkileşimleri araştırılmıştır. Planktonik hücrelerde polimiksin B ve E ile imipenem kombinasyonunda %100, meropenem ile kombinasyonlarında sırasıyla %33 ve %78 sinerji görülmüştür. Urban ve arkadaşlarının (145) çalışmasında polimiksin B ile doripenem kombinasyonu, MİKx1/4 konsantrasyonlarda %30 (1/5 *K.pneumoniae*, 1/5 *A.baumannii*, 1/5 *P.aeruginosa*) bakterisidal etkili bulunmuştur. Diep ve arkadaşlarının (127) çalışmasında ise 2 farklı KPC üreten *K.pneumoniae* izolatu kullanılmış, polimiksin B dirençli olan izolatta monoterapi inefektif bulunmuş, tedavinin 24. saatinden itibaren tekrar büyüme görülmüş ve polimiksin B duyarlı olan izolatta ise daha düşük konsantrasyonlarda sinerji görülmüştür. Zusman ve arkadaşlarının yaptığı meta-analizde (101) 146 *K.pneumoniae* izolatu karbapenem ve

polimiksin sinerjisi açısından değerlendirilmiş ve sinerji oranı %44 bulunmuştur. Polimiksin B kullanılan 3 çalışmada sinerji oranı %64, kolistin kullanılan çalışmalarda ise sinerji oranı %40 bulunmuştur. Hem karbapenem hem de polimiksin dirençli *K.pneumoniae* izolatlarında monoterapide bakterisidal etki %9'unda görülürken, kombinasyon tedavide %70'e çıkmaktadır. Bizim çalışmamızda ise meropenem +polimiksin B kombinasyonunda planktonik formda %20 (1/5) sinerji, %20 (1/5) additif etki görülmüştür. İzolatların tamamı meropenem dirençli, polimiksin B duyarlıdır. Literatürdeki KDE enfeksiyonlarında meropenem+polimiksin B sinerji oranlarına göre daha düşük oranlarda sinerji görülmüştür.

Meng ve arkadaşlarının çalışmasında, *A.baumannii*'nin planktonik formuna polimiksin B veya E ile tigesiklin kombinasyonu uygulandığında ise sinerji görülmemiştir (144). Ku ve arkadaşlarının (146) çalışmasında 5'i karbapenem dirençli 9 GSBL üreten *K.pneumoniae* izolatı üzerinde; kolistin, fosfomisin ve tigesiklinin sinerjistik etkileri araştırılmıştır. Tigesiklin ile kolistin kombinasyonu, en yüksek sinerji (%81,8) görülen ve 24 saatin üzerinde bakterisidal etkinin devam ettiği (%90,9) kombinasyon olarak bulunmuştur. Sinerji görülmeyen tek izolatın hem kolistin hem de tigesiklin dirençli olduğu görülmüştür. Stein ve arkadaşlarının (147) 16'sı karbapenem dirençli 20 *K.pneumoniae* izolatı ile dama tahtası yöntemi kullanılarak yaptıkları çalışmada, 2 izolat hariç meropenem ile tigesiklin kombinasyonunda sinerji görülmemiş, 6 izolatta meropenem ile kolistin kombinasyonunda, 6 izolatta tigesiklin ile kolistin kombinasyonunda sinerji görülmüştür, iki grupta da 5 izolat ortaktır. Tuon ve arkadaşlarının (148) çalışmasında karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae*'nin etken olduğu 112 VİP hastası (102'si *K.pneumoniae*) incelenmiş; mortalite, kombinasyon tedavi alanlarda monoterapiye göre daha düşük bulunmuştur. Ek olarak kombinasyon rejimi uygulanan 17 hasta incelendiğinde en etkili rejimin 8 hasta ile tigesiklin+kolistin kombinasyonu olduğu görülmüştür. Dündar ve arkadaşlarının çalışmasında tigesiklin+kolistin kombinasyonunda %36 sinerji görülmüş ve *Klebsiella* spp. için incelendiğinde ise %70 sinerji ile en etkili kombinasyon rejimi olduğu görülmüştür (143). Sonuç olarak karbapenem dirençli izolatların etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde kolistin bazlı rejimlerin etkili olduğu görülmüştür. Özellikle de hem karbapenem hem de kolistin dirençli izolatlarda kolistin bazlı kombinasyonların, özellikle de kolistin ve tigesiklin kombinasyonunun daha etkili

olduğu görülmektedir. Polimiksin B ile tigesiklin kombinasyonunun araştırıldığı çalışmalar ise çok daha kısıtlı sayıdadır. Bizim çalışmamızda da planktonik hücreler üzerine tigesiklin+polimiksin B kombinasyonunda ise sinerji görülmemekle beraber bir izolatta additif etki görülmüştür. Literatür ile karşılaştırıldığında çalışmamızda daha düşük oranlarda sinerji görülmüştür. Kolistin dirençli izolatların dahil edildiği çalışmalarda daha yüksek sinerji oranları görülmüştür. Çalışmamızda ise izolatların tamamı polimiksin B duyarlıdır, bu nedenle daha düşük sinerji oranları görülmüş olabilir. Ek olarak, kullanılan in vitro sinerji testinin farklı olması ya da sinerji testlerinin farklı yorumlanması gibi sebeplere bağlı olarak da farklı sinerji oranları görülmüş olabilir. Pankey ve arkadaşlarının (149) karbapenemaz üreten 14 *K.pneumoniae* izolatu ile yaptıkları çalışmada, polimiksin B'nin meropenem ve rifampin ile kombinasyonunun sinerjistik etkileşimi Etest ve zamana bağlı öldürme yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Polimiksin B+meropenem kombinasyonunda sinerji ya da additif etki gösteren izolat sayısı Etest'e göre %71 (10/14), zamana bağlı öldürme yöntemine göre %79 (11/14) bulunmuştur. Gaibani ve arkadaşlarının (150) çalışmasında tamamı KPC üreten 9'u kolistin duyarlı, 8'i kolistin dirençli toplam 17 kan *K.pneumoniae* izolatu; Etest, dama tahtası ve zamana bağlı öldürme yöntemleri ile sinerjistik etki açısından değerlendirilmiştir. Kolistin duyarlı izolatlarda hem Etest'te hem de dama tahtası yönteminde sinerji görülmemiştir. Kolistin dirençli izolatlarda Etest yönteminde %25 (2/8) kolistin+tigesiklin, %12,5 (1/8) kolistin+meropenem kombinasyonunda sinerji görülmüştür. Dama tahtası yönteminde ise 6/8 kolistin+tigesiklin, 3/8 kolistin+meropenem kombinasyonu sinerjistik etkili bulunmuştur. Zamana bağlı öldürme yönteminde ise benzer şekilde kolistin+tigesiklin kombinasyonunda sinerji görülmüş, kolistin+meropenem kombinasyonunda sinerji görülmemiştir. Sonuç olarak literatüre bakıldığında sinerji için uygulanan yöntemler karşılaştırıldığında farklı sonuçlara ulaşılmaktadır. Zamana bağlı öldürme yöntemi, in-vivo sinerjiyi tahmin etmede daha etkili görünse de daha az antibiyotik konsantrasyonu test edilebilmesi, bakterinin inokulum miktarından etkilenmesi ve diğer yöntemlere kıyasla daha fazla zaman alması nedeniyle uygulanması zor bir yöntemdir. Etest yöntemi ise bazı çalışmalarda dama tahtası yöntemi, bazı çalışmalarda ise zamana bağlı öldürme yöntemi ile uyumlu görülmektedir (151).

Dirençli enfeksiyonlarda antibiyotiklerin sinerjistik etkileşimlerini bilmek özellikle de etkene duyarlı antibiyotik olmadığına tedavi planlamak için gereklidir. Biyofilmin antimikrobiyal direncine katkısı olduğu ve antibiyotiklerin MBİK değerlerinin MİK'e kıyasla çok daha yüksek olduğu bilinmektedir. Biyofilm ilişkili enfeksiyonlarda planktonik forma kıyasla farklı kombinasyonlarda veya farklı konsantrasyonlarda sinerjistik etkileşimler görülebilmektedir bu nedenle antibiyotiklerin biyofilmde sinerjistik etkileşimleri üzerine çalışmalar yapmak gereklidir. Bu amaçla da literatürde farklı yöntemleri kullanan çalışmalar vardır ancak bu yöntemler zor ve maliyeti yüksek yöntemler olmaları nedeniyle, bu konuda çalışmaların sayısı kısıtlıdır. Sadıç ve arkadaşlarının çalışmasında (106) biri *K.pneumoniae* olan 3 farklı VIP etkeni dama tahtası yöntemi ve zamana bağlı öldürme yöntemi ile meropenem+kolistin sinerjisi açısından değerlendirilmiştir. Dama tahtası yönteminde diğer iki izolatta (*P.aeruginosa* ve *A.baumannii*) sinerji görülürken *K.pneumoniae*'de etkileşim görülmemiştir, zamana bağlı öldürme yönteminde de *K.pneumoniae* ve *A.baumannii* için indifferens, *P.aeruginosa* için bakterisidal etki görülmüştür. Her üç izolat için de planktonik formda sinerji görülmemiştir. Geladari ve arkadaşlarının (152) karbapenem dirençli ve biyofilm oluşturan 4 *K.pneumoniae* izolatı ile yaptıkları çalışmada; biyofilm etkinliği en düşük olan antibiyotiğin meropenem olduğu, kolistinin %75 ile biyofilme en etkili antibiyotik olduğu ve tigesiklinin dirençli olsa da yüksek konsantrasyonlarında biyofilmin %25'ini inhibe ettiği görülmüştür. Ek olarak meropenem dirençli olsa da meropenem+kolistin kombinasyonunda, kolistinin yüksek meropenemin ise düşük olduğu konsantrasyonlarda sinerji görülmüştür. Manyalı ve arkadaşlarının (153) çalışmasında 15 adet biyofilm oluşturan *K.pneumoniae* kan dolaşım izolatının meropenem, kolistin, tigesiklin, rifampisin tek başına ve kombinasyonda kullanımda biyofilm üzerine etkileri iğneli polistrien plak yöntemiyle araştırılmıştır. Planktonik formda kolistin+rifampisin, biyofilmde ise kolistin+meropenem kombinasyonunun, en etkili kombinasyon olduğu görülmüştür. Ek olarak planktonik form ile karşılaştırıldığında biyofilmde daha az sinerji olduğu görülmüştür. Wickremasinghe ve arkadaşlarının (131) çalışmasında meropenem ve polimiksin B dirençli *K.pneumoniae* izolatı için kombinasyonda çalışmanın 4. saatinde 3 log₁₀ cfu/mL azalma görülmekle birlikte biyofilm tamamen inhibe edilememiştir. Meropenem duyarlı ve polimiksin B dirençli izolat için ise hem planktonik formda

hem de biyofilmde üreme meropenem monoterapisine benzer şekilde inhibe edilmiştir. Bizim çalışmamızda da biyofilm üzerine meropenem ile polimiksin B kombinasyonu uygulandığında 3 izolatta additif etki görülmüştür. Additif etki görülen izolatlardan birinde planktonik formda sinerji, bir izolatta additif etki görülürken diğer izolatta ise etkileşim görülmemiştir (Tablo 22 ve 23). Manyalı ve arkadaşlarının çalışmasının aksine, çalışmamızda biyofilmde sinerji oranları daha yüksektir.

Corvec ve arkadaşlarının (154) GSBL üreten *E.coli* izolatu ile yaptığı çalışmada kolorimetrik olarak değerlendirildiğinde; tigesiklin ve kolistin yüksek konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunu inhibe ettiği görülmüştür. Zamana bağlı öldürme deneyinde kolistin tek başına kullanıldığı durumlarda, tedavinin 24. saatinden itibaren tekrar büyüme olduğu görülmüştür. Meng ve arkadaşlarının çalışmasında; *A.baumannii* biyofilmine polimiksin B ve E, meropenem ile beraber uygulandığında sırayla %33 ve %44 oranında sinerji görülmüştür, polimiksin B ve E'nin tigesiklin ile kombinasyonunda ise her iki kombinasyon için de %67 sinerji görülmüştür (144). Moshynets ve arkadaşlarının (155) çalışmasında kolistin tek başına *K.pneumoniae*'nin planktonik formuna etkili olmadığı ancak azitromisin ile beraber uygulandığında planktonik form üzerine sinerjistik etkili olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde biyofilmde de azitromisin, kolistin biyofilm inhibisyonu üzerine etkisini artırmaktadır. Ribera ve arkadaşları (126) tarafından iki adet GSBL üreten *K.pneumoniae* izolatu ile oluşturan biyofilm modelde, kolistin duyarlı olsa da tek başına etkisiz olduğu, meropenem ve kolistin kombinasyonunu ise meropenem ile benzer etkili olduğu bulunmuştur. Geladari ve arkadaşlarının çalışmasında tigesiklinin dirençli olsa da yüksek konsantrasyonlarında biyofilmin %25'ini inhibe ettiği ve kolistin+tigesiklin kombinasyonunun her iki antibiyotiğin yüksek konsantrasyonlarında biyofilm oluşumunu inhibe ettiği görülmüştür (152). Bizim çalışmamızda ise; tigesiklin ve polimiksin B kombinasyonunda ise biyofilme karşı iki izolat için sinerji, iki izolat için additif etki görülmüştür. Planktonik formda ise additif etki görülen izolatların ikisi de indifferens, sinerjik etki gösteren izolatların biri additif diğeri indifferenstir (Tablo 22 ve 23). Sonuç olarak; planktonik formda meropenem+polimiksin B kombinasyonunda daha fazla sinerjistik etkileşim görülürken, biyofilmde tigesiklin+polimiksin B kombinasyonunda daha fazla sinerjistik etkileşim görüldü. Planktonik formda sinerji görülen konsantrasyonlar

MİK'e daha yakın değerlerde iken biyofilmde sinerji görülen konsantrasyonlar meropenem ve tigesiklin için MİK'ten çok daha yüksek konsantrasyonlarda idi. MİK'e yakın konsantrasyonlarda sinerjiye, antibiyotiklerin standart ya da yüksek doz- uzun infüzyon süreli uygulanması ile ulaşılabilecekken, MİK'in üzerindeki konsantrasyonlara standart antibiyotik uygulamaları ile ulaşılması mümkün görülmemektedir, bu konuda ileri çalışmalar yapılması gereklidir.

Clock ve arkadaşlarının (156) çalışmasında tamamı doripenem dirençli 48 *K.pneumoniae* izolatı sinerji açısından dama tahtası yöntemiyle değerlendirilmiştir. Doripenem+polimiksin B kombinasyonunda %8,3 (4/48) görülmekle beraber, sinerji görülen konsantrasyonlar farmakodinamik çalışmalara göre ulaşılabilecek konsantrasyonların üzerinde olduğu görülmüştür. Doripenem+tigesiklin kombinasyonunda ise sinerji görülmemiştir. Ek olarak doripenemin, amikasin, polimiksin B ve rifampinin MİK değerini 4-32 kat düşürdüğü görülmüştür. Singla ve arkadaşlarının (139) çalışmasında bakterinin logaritmik büyüme fazı, durağan fazı ve olgun biyofilm oluşturmuş hücrelerde amikasin, siprofloksasin ve piperasilinin MİK ve MBK değerleri karşılaştırılmış, sadece amikasinin, ulaşılabilir serum konsantrasyonlarında erken biyofilm hücrelerine etkili olabildiği görülmüştür. Piperasilinin biyofilme etkisiz olduğu, diğer iki antibiyotiğin de matur biyofilme etkili konsantrasyonlarının, ulaşılabilir serum konsantrasyonunun 2 katından daha yüksek olduğu bulunmuştur. İn-vitro çalışmalarda sinerji görülse de sonuçlar antibiyotiklerin farmakodinamik etkileri de düşünülerek değerlendirilmelidir.

Literatürdeki in-vivo çalışmalara bakıldığında; Chen ve arkadaşlarının (157) çalışmasında imipenemin biyofilmi eradike ettiği görüldükten sonra 12 tavşanın kulağında biyofilm ilişkili yara enfeksiyon modeli oluşturulmuştur. 4. günde planktonik hücreler topikal siprofloksasin ile uzaklaştırılmış, 6. Günden itibaren imipenem uygulanmaya başlanmıştır. 12. Günde canlı bakteri sayısı, epitel ve granülasyon doku oluşumu açısından incelenmiştir. Yüksek konsantrasyonda imipenem uygulanan grupta bakteriyel yükte ciddi bir azalma (4 log) görülmüştür. Corvec ve arkadaşlarının çalışmasında da in-vitro deneylerden sonra ginepigler ile hayvan deneyi modeli oluşturulmuştur, biyofilme tek başına sadece %17 başarı oranı ile fosfomisin etkili olduğu ve kolistin+tigesiklin kombinasyonunda %50 tedavi başarısı olduğu görülmüştür (154). Benthall ve arkadaşlarının (158) çalışmasında in-

vivo antibiyotik etkinliğini değerlendirmek için *Galleria mellonella* larvaları ile enfeksiyon modeli kullanılmıştır. Karbapenem ile tedavi sonrası, karbapenemaz üreten *K.pneumoniae* ile enfekte *Galleria*'lar da dahil olmak üzere mortalite görülmemiştir. Enfeksiyon etkeni izolatlar kolistine in-vitro duyarlı görülseler bile *Galleria* mortalitesi ile karşılaşılmıştır (%80'den fazlası canlı) ve canlı *Galleria*'larda tedavi sonrası tekrar büyüme görülmüştür. Biyofilm model oluşturulup amikasin ve siprofloksasin ile tedavi edildiğinde ise planktonik enfeksiyon modeline kıyasla daha yüksek mortalite görülmüştür. İn-vivo biyofilm ilişkili enfeksiyon modellerinin, in-vitro çalışmalara göre farklı sonuçlanabildiği bilinmektedir. Bu nedenle biyofilm modeller ve biyofilme antimikrobiyallerin etkinliği ile ilgili ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak bizim çalışmamızla da desteklendiği üzere; biyofilm içindeki bakterilerin antimikrobiyal duyarlılığı planktonik forma göre azalmaktadır. Planktonik formda ve biyofilimde görülen sinerji sonuçları arasında da farklılıklar mevcuttur. Planktonik formda sinerji görülmeyen konsantrasyonlarda biyofilm hücrelerinde sinerji görülebilmektedir. Biyofilimde antimikrobiyal duyarlılık ve sinerji testleri için birçok farklı yöntem uygulanmaktadır ancak bu yöntemler, standardize edilmemiş ve uygulanması zor yöntemlerdir, bu konuda altın standart yeni yöntemlerin geliştirilmesi gereklidir. Ek olarak in-vitro sinerji gösterilen konsantrasyonların klinik olarak kullanılan dozlarda ulaşılabilir olup olmaması, tedavi seçiminde de yol gösterici olması nedeniyle mutlaka araştırılmalıdır. Biyofilm oluşumunda da in-vitro ve in-vivo deneyler arasında farklılıklar bulunmaktadır. Farklı kombinasyon rejimleri ve daha yüksek izolat sayıları ile, ileri, in-vitro ve in-vivo çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

Günümüzde özellikle nozokomiyal enfeksiyonlarda sık karşılaşılan etkenlerden biri olan *K.pneumoniae*'nin hızla artan antimikrobiyal direnci, önemli sağlık problemlerinden biridir. Karbapenem dirençli izolatlarla sık karşılaşılrken son çare antibiyotikler olarak bilinen polimiksinlere direnç de hızla artmaktadır. IDSA ve ESCMID gibi rehberlerde önerilen yeni β -laktam- β -laktamaz inhibitörlerine ulaşamayan bölgelerde polimiksinler, karbapenemler, aminoglikozitler ve tigesiklin gibi uzun süredir klinik kullanımda olan antibiyotikler, farklı kombinasyon rejimleri ile sinerjistik etkiler açısından araştırılmaktadır. Ancak mikrobiyoloji laboratuvarında rutin uygulanan kültür ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinde bakterilerin sadece planktonik formu üzerinde çalışılmaktadır, günümüzde bakterilerin baskın yaşam formu olduğu bilinen biyofilm toplulukları üzerine etkileri bilinmemektedir. Biyofilm yapısı birçok farklı mekanizma ile antimikrobiyal dirence katkı sağlayan önemli bir virulans faktörüdür.

Bu çalışma ile kan dolaşım enfeksiyonu etkeni olan 5 adet karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatının oluşturduğu biyofilme meropenem, polimiksin B ve tigesiklin monoterapide etkinliği ve meropenem+polimiksin B ile tigesiklin+polimiksin B kombinasyonunun planktonik form ve biyofilm üzerinde sinerjistik etkileşimlerinin karşılaştırılması amaçlandı. Sonuç olarak;

1. Kan dolaşım enfeksiyonu etkeni olan karbapenem dirençli 125 *K.pneumoniae* izolatının 11 tanesinin (%8,8) biyofilm oluşturduğu ve 2 izolatın güçlü, 3 izolatın orta derecede ve kalan 6 izolatın zayıf biyofilm oluşturduğu görüldü.
2. İzolatların primer enfeksiyon odağı intraabdominal apse ve üriner sistem enfeksiyonu idi
3. İzolatların MİK ve MBİK değerleri karşılaştırıldığında meropenem için 8 kat, polimiksin B için 128 kat ve tigesiklin için 1024 kat ve üzerinde artış görüldü.
4. Güçlü biyofilm oluşturan bir izolat için polimiksin B ve tigesiklin duyarlı olsalar da MBİK değerlerinde MİK'e göre sırasıyla 128 ve >1024 kat artış görüldü.

5. Planktonik formda meropenem+polimiksin B kombinasyonunda daha fazla sinerji görülürken, biyofilmde tigesiklin+polimiksin B kombinasyonunda daha fazla sinerji görüldü.

6. Planktonik formda meropenem+polimiksin B ve tigesiklin+polimiksin B kombinasyonlarında sinerjistik etkileşim görülen izolatlardan biri ortak idi. Biyofilmde ise her iki kombinasyonda 3 izolat ortak idi.

7. Her iki kombinasyonda da planktonik formda MİK'e daha yakın konsantrasyonlarda sinerji görülürken, biyofilmde sinerji görülen konsantrasyonlar meropenem için 128 ve 512 mg/L gibi ve tigesiklin için bir izolat hariç 64 mg/L gibi MİK'in üzerinde değerlerde idi. Bu konsantrasyonlar, klinikte standart ya da yüksek doz kullanım ile ulaşılabilecek konsantrasyonların üzerinde olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızın kısıtlılıkları arasında, az sayıda izolatla yapılmış olması ve in-vivo etkileşimin değerlendirilememiş olması sayılabilir. Literatürde biyofilm ile ilgili çalışmalar kısıtlı sayıdadır, birçok farklı yöntem uygulanmaktadır ve aynı kombinasyon rejimlerinde farklı sonuçlara ulaşılabilmektedir. Kombinasyonda sinerji görülen antibiyotiklerin in-vivo etkileşimleri de bilinmemektedir. Bu nedenle biyofilmdeki hücrelerin antimikrobiyal duyarlılığı ve sinerjistik etkileşimlerin araştırılması için standardize edilmiş yöntemlerin geliştirilmesi ve sinerjistik etkileşim görülen kombinasyonlarla in-vivo deneyler yapılması gereklidir.

7. KAYNAKLAR

1. Nelson GE, Greene MH. Enterobacteriaceae. In: Bennet JE, Dolin R, Blaser JM, editors. Mandell, Douglas, And Bennett's Principles And Practice Of Infectious Diseases, Ninth Edition: Elsevier; 2020. p. 2680-1.
2. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. Klebsiella pneumoniae: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 2017;41(3):252-75.
3. Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998;11(4):589-603.
4. Hekimoğlu CH, Batır E, Yıldırım Gözel E, Altun D. Ulusal sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlar sörveyans ağı (USHİESA) etken dağılımı ve antibiyotik direnç raporu 2020, Ankara 2021.
5. World Health Organization. Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance. Annual report 2020 [Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2020>].
6. Temel A, Eraç B. Bakteriyel biyofilmler: saptama yöntemleri ve antibiyotik direncindeki rolü. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2018;48(1):1-13.
7. Silva A, Sousa AM, Alves D, Lourenço A, Pereira MO. Heteroresistance to colistin in Klebsiella pneumoniae is triggered by small colony variants sub-populations within biofilms. *Pathog Dis*. 2016;74(5).
8. Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW. Tobramycin resistance of Pseudomonas aeruginosa cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985;27(4):619-24.
9. Veerachamy S, Yarlagağda T, Manivasagam G, Yarlagağda PK. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. *Proc Inst Mech Eng H*. 2014;228(10):1083-99.
10. Yousif A, Jamal MA, Raad I. Biofilm-based central line-associated bloodstream infections. *Adv Exp Med Biol*. 2015;830:157-79.
11. Yu WL, Chuang YC. Clinical features, diagnosis, and treatment of Klebsiella pneumoniae infection [Available from:

<https://www.uptodate.com/contents/clinical-features-diagnosis-and-treatment-of-klebsiella-pneumoniae-infection>.

12. Lin YT, Siu LK, Lin JC, et al. Seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae* colonizing the intestinal tract of healthy Chinese and overseas Chinese adults in Asian countries. *BMC Microbiol.* 2012;12:13.
13. Günaydın M. Gram-negatif bakteri infeksiyonlarında mikrobiyolojik tanı In: Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D, editors. Gram-negatif bakteri infeksiyonları Ankara: Bilimsel tıp; 2012. p. 49-50.
14. Zarakolu Köşker P. Gram-negatif bakterilerin temel mikrobiyolojik özellikleri ve sınıflandırması In: Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D, editors. Önemli ve Sorunlu Gram Negatif Bakteri İnfeksiyonları. Ankara: Bilimsel tıp; 2012 p. 2-10.
15. Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiology.* 2014;9(9):1071-81.
16. Clegg S, Murphy CN, Mulvey MA, Stapleton AE, Klumpp DJ. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology Spectrum.* 2016;4(1):4.1.06.
17. Yu WL, Chuang YC. Microbiology and pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae* infection [Available from: <https://www.uptodate.com/contents/microbiology-and-pathogenesis-of-klebsiella-pneumoniae-infection>].
18. Lin JC, Chang FY, Fung CP, et al. High prevalence of phagocytic-resistant capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae* in liver abscess. *Microbes Infect.* 2004;6(13):1191-8.
19. Chung PY. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters.* 2016;363(20).
20. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, et al. Association between *rmpA* and *magA* genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin Infect Dis.* 2006;42(10):1351-8.
21. Albertí S, Marqués G, Camprubí S, et al. C1q binding and activation of the complement classical pathway by *Klebsiella pneumoniae* outer membrane proteins. *Infection and immunity.* 1993;61(3):852-60.

22. Tomás JM, Benedí VJ, Ciurana B, Jofre J. Role of capsule and O antigen in resistance of *Klebsiella pneumoniae* to serum bactericidal activity. *Infect Immun*. 1986;54(1):85-9.
23. Cortés G, Borrell N, de Astorza B, Gómez C, Sauleda J, Albertí S. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infection and immunity*. 2002;70(5):2583-90.
24. Jones CH, Pinkner JS, Roth R, et al. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(6):2081-5.
25. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, et al. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis*. 2016;63(5):e61-e111.
26. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis*. 2007;44 Suppl 2(Suppl 2):S27-72.
27. Meatherall BL, Gregson D, Ross T, Pitout JD, Laupland KB. Incidence, risk factors, and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Am J Med*. 2009;122(9):866-73.
28. Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P, et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011;17(12):1798-803.
29. Chang SW, Yen DH, Fung CP, et al. *Klebsiella pneumoniae* renal abscess. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)*. 2000;63(10):721-8.
30. Fang CT, Lai SY, Yi WC, Hsueh PR, Liu KL, Chang SC. *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess. *Clin Infect Dis*. 2007;45(3):284-93.

31. Cheng NC, Yu YC, Tai HC, et al. Recent trend of necrotizing fasciitis in Taiwan: focus on monomicrobial *Klebsiella pneumoniae* necrotizing fasciitis. *Clin Infect Dis*. 2012;55(7):930-9.
32. Pontefract BA, Ho HT, Crain A, Kharel MK, Nybo SE. Drugs for Gram-Negative Bugs From 2010–2019: A Decade in Review. *Open Forum Infectious Diseases*. 2020;7(7).
33. Rodríguez-Baño J, Gutiérrez-Gutiérrez B, Machuca I, Pascual A. Treatment of infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-, AmpC-, and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical microbiology reviews*. 2018;31(2):e00079-17.
34. Doi Y. Ertapenem, imipenem, meropenem, doripenem, and aztreonam. In: Bennet JE, Dolin R, Blaser JM, editors. *Mandell, Douglas, And Bennett's Principles And Practice Of Infectious Diseases*, Ninth Edition: Elsevier; 2020. p. 285-8.
35. Kaye KS, Pogue JM, Kaye D. Polymyxins (pymyxin B and colistin). In: Bennet JE, Dolin R, Blaser JM, editors. *Mandell, Douglas, And Bennett's Principles And Practice Of Infectious Diseases*, Ninth Edition: Elsevier; 2020. p. 405-9.
36. Gutiérrez-Gutiérrez B, Salamanca E, De Cueto M, et al. Effect of appropriate combination therapy on mortality of patients with bloodstream infections due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (INCREMENT): a retrospective cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2017;17(7):726-34.
37. Zusman O, Altunin S, Koppel F, Dishon Benattar Y, Gedik H, Paul M. Polymyxin monotherapy or in combination against carbapenem-resistant bacteria: systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;72(1):29-39.
38. Moffa M, Brook I. Tetracyclines, glycyclines and chloramphenicol. In: Bennet JE, Dolin R, Blaser JM, editors. *Mandell, Douglas, And Bennett's Principles And Practice Of Infectious Diseases*, Ninth Edition: Elsevier; 2020. p. 326-31.
39. Fritsche TR, Strabala PA, Sader HS, Dowzicky MJ, Jones RN. Activity of tigecycline tested against a global collection of Enterobacteriaceae, including tetracycline-resistant isolates. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2005;52(3):209-13.

40. Gardiner D, Dukart G, Cooper A, Babinchak T. Safety and efficacy of intravenous tigecycline in subjects with secondary bacteremia: pooled results from 8 phase III clinical trials. *Clin Infect Dis*. 2010;50(2):229-38.
41. Aslam S, Trautner BW, Ramanathan V, Darouiche RO. Pilot Trial of N-acetylcysteine and Tigecycline as a Catheter-Lock Solution for Treatment of Hemodialysis Catheter-Associated Bacteremia. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2008;29(9):894-7.
42. Barber GR. Unique antibacterial agents. In: Bennet JE, Dolin R, Blaser JM, editors. *Mandell, Douglas, And Bennett's Principles And Practice Of Infectious Diseases*, Ninth Edition: Elsevier; 2020. p. 449-59.
43. Karakostas S, Kritsotakis EI, Gikas A. Treatment options for *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* co-resistant to carbapenems, aminoglycosides, polymyxins and tigecycline: an approach based on the mechanisms of resistance to carbapenems. *Infection*. 2020;48(6):835-51.
44. Ito-Horiyama T, Ishii Y, Ito A, et al. Stability of novel siderophore cephalosporin S-649266 against clinically relevant carbapenemases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(7):4384-6.
45. Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, van Duin D, Clancy CJ. Infectious Diseases Society of America Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β -lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-*P. aeruginosa*). *Clin Infect Dis*. 2021;72(7):e169-e83.
46. Paul M, Carrara E, Retamar P, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (endorsed by European society of intensive care medicine). *Clinical Microbiology and Infection*. 2022;28(4):521-47.
47. Tängdén T. Combination antibiotic therapy for multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Ups J Med Sci*. 2014;119(2):149-53.
48. Bassetti M, Righi E, Carnelutti A, Graziano E, Russo A. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: challenges for treatment, prevention and infection control. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018;16(10):749-61.

49. Karakonstantis S, Kritsotakis EI, Gikas A. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: a systematic review of current epidemiology, prognosis and treatment options. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(2):271-82.
50. Piperaki ET, Syrogiannopoulos GA, Tzouvelekis LS, Daikos GL. Klebsiella pneumoniae: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. *Pediatr Infect Dis J.* 2017;36(10):1002-5.
51. Gür D. Gram negatif bakterilerde antibakteriyel direnç mekanizmaları. In: Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D, editors. Önemli ve Sorunlu Gram Negatif Bakteri İnfeksiyonları. Ankara: Bilimsel tıp yayınevi; 2012. p. 69-78.
52. Bush K, Bradford PA. Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens. *Clinical microbiology reviews.* 2020;33(2):e00047-19.
53. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of Klebsiella pneumoniae. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(17).
54. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents and Chemother.* 2010;54(3):969-76.
55. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Journal of intensive care.* 2020;8(1):1-13.
56. Opal SM, Pop-Vicas A. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In: Bennet JE, Dolin R, Blaser JM, editors. Mandell, Douglas, And Bennett's Principles And Practice Of Infectious Diseases, Ninth Edition: Elsevier; 2020. p. 225-31.
57. Gülşay Z. İndüklenebilir beta-laktamazlar. In: Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D, editors. Önemli ve Sorunlu Gram Negatif Bakteri İnfeksiyonları. Ankara: Bilimsel tıp yayınevi; 2012. p. 92-103.
58. Kılıç Ü, Demiray T, Altındış M. Karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae izolatlarının saptanmasında fenotipik ve genotipik metotlar. *Ankem Derg.* 2016;30(2):62-75.
59. Logan LK, Weinstein RA. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. *The Journal of Infectious Diseases.* 2017;215(suppl_1):S28-S36.

60. Karampatakis T, Antachopoulos C, Iosifidis E, Tsakris A, Roilides E. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Greece. *Future Microbiol.* 2016;11:809-23.
61. Lindsay D, von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect.* 2006;64(4):313-25.
62. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med Chem.* 2015;7(4):493-512.
63. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999;284(5418):1318-22.
64. Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *International Journal of Oral Science.* 2011;3(2):55-65.
65. Yin W, Wang Y, Liu L, He J. Biofilms: The Microbial "Protective Clothing" in Extreme Environments. *Int J Mol Sci.* 2019;20(14).
66. Del Pozo JL. Biofilm-related disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2018;16(1):51-65.
67. Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(3):276-301.
68. Kırmusaoğlu S. The methods for detection of biofilm and screening antibiofilm activity of agents. Antimicrobials, antibiotic resistance, antibiofilm strategies and activity methods. 2019:1-17.
69. Luppens SB, Reij MW, van der Heijden RW, Rombouts FM, Abee T. Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(9):4194-200.
70. Stone G, Wood P, Dixon L, Keyhan M, Matin A. Tetracycline rapidly reaches all the constituent cells of uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(8):2458-61.
71. Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(7):1818-24.

72. Jefferson KK, Goldmann DA, Pier GB. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(6):2467-73.
73. Walters MC, 3rd, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(1):317-23.
74. Tseng BS, Zhang W, Harrison JJ, et al. The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. *Environ Microbiol.* 2013;15(10):2865-78.
75. Billings N, Ramirez Millan M, Caldara M, et al. The Extracellular Matrix Component Psl Provides Fast-Acting Antibiotic Defense in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLOS Pathogens.* 2013;9(8):e1003526.
76. Colvin KM, Irie Y, Tart CS, et al. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ Microbiol.* 2012;14(8):1913-28.
77. Chiang WC, Nilsson M, Jensen P, et al. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(5):2352-61.
78. Kaplan JB, Izano EA, Gopal P, et al. Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *mBio.* 2012;3(4):e00198-12.
79. Doroshenko N, Tseng BS, Howlin RP, et al. Extracellular DNA impedes the transport of vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* biofilms preexposed to subinhibitory concentrations of vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(12):7273-82.
80. Wilton M, Charron-Mazenod L, Moore R, Lewenza S. Extracellular DNA Acidifies Biofilms and Induces Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(1):544-53.
81. Bowler LL, Zhanel GG, Ball TB, Saward LL. Mature *Pseudomonas aeruginosa* biofilms prevail compared to young biofilms in the presence of ceftazidime. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(9):4976-9.

82. Werner E, Roe F, Bugnicourt A, et al. Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(10):6188-96.
83. Haagenen JA, Klausen M, Ernst RK, et al. Differentiation and distribution of colistin- and sodium dodecyl sulfate-tolerant cells in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol.* 2007;189(1):28-37.
84. Savage VJ, Chopra I, O'Neill AJ. Staphylococcus aureus biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(4):1968-70.
85. Bigger JW. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *The Lancet.* 1944;244(6320):497-500.
86. Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2014;78(3):510-43.
87. Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clinical Microbiology and Infection.* 2015;21:S1-S25.
88. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence.* 2018;9(1):522-54.
89. Stewart PS, Camper AK, Handran S, Huang C-T, Warnecke M. Spatial distribution and coexistence of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Microbial ecology.* 1997;33(1):2-10.
90. Skillman L, Sutherland I, Jones M. The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development. *J of Appl Microbiol.* 1998;85(S1):13S-8S.
91. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology.* 1985;22(6):996-1006.
92. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 2007;115(8):891-9.

93. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000;40(2):175-9.
94. Li Z, Ding Z, Liu Y, et al. Phenotypic and Genotypic Characteristics of Biofilm Formation in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Infect Drug Resist*. 2021;14:2613-24.
95. Vuotto C, Longo F, Pascolini C, et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *J Appl Microbiol*. 2017;123(4):1003-18.
96. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-Ed32. 2022 [Available from: <https://clsi.org/standards/products/free-resources/access-our-free-resources/>].
97. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0. 2022 [Available from: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/].
98. Food and Drug Administration. Recognized Antimicrobial Susceptibility Test Interpretive Criteria [Available from: <https://www.fda.gov/drugs/development-resources/tigecycline-injection-products>].
99. Norden CW, Wentzel H, Keleti E. Comparison of techniques for measurement of in vitro antibiotic synergism. *Journal of Infectious Diseases*. 1979;140(4):629-33.
100. Zuo G-Y, Li Y, Wang T, et al. Synergistic Antibacterial and Antibiotic Effects of Bisbenzylisoquinoline Alkaloids on Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA). *Molecules*. 2011;16(12):9819-26.
101. Zusman O, Avni T, Leibovici L, et al. Systematic review and meta-analysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(10):5104-11.
102. Lin F, Yu B, Wang Q, Yuan M, Ling B. Combination inhibition activity of chlorhexidine and antibiotics on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in vitro. *BMC Infectious Diseases*. 2021;21(1):1-5.
103. Naparstek L, Carmeli Y, Navon-Venezia S, Banin E. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-

- producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(4):1027-34.
104. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(3):318-27.
 105. Saeed EA, Bnyan IA, Saadi M. Quorum sensing and biofilm formation by bacterial isolates from hemodialysis patients. *Res Pharm.* 2013;3(2):33-40.
 106. Sadıç B. Ventilatörle İlişkili Pnömonilere Neden Olan Etkenlerde Biyofilm Oluşumunun ve Biyofilm Tabakalarına Etkili Antibiyotiklerin Araştırılması [Uzmanlık Tezi]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; 2017.
 107. Sanchez CJ, Jr., Mende K, Beckius ML, et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect Dis.* 2013;13:47.
 108. Seifi K, Kazemian H, Heidari H, et al. Evaluation of biofilm formation among *Klebsiella pneumoniae* isolates and molecular characterization by ERIC-PCR. *Jundishapur journal of microbiology.* 2016;9(1).
 109. Yang D, Zhang Z. Biofilm-forming *Klebsiella pneumoniae* strains have greater likelihood of producing extended-spectrum beta-lactamases. *J Hosp Infect.* 2008;68(4):369-71.
 110. Karimi K, Zarei O, Sedighi P, Taheri M, Doosti-Irani A, Shokoohizadeh L. Investigation of Antibiotic Resistance and Biofilm Formation in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Microbiol.* 2021;2021:5573388.
 111. Yaita K, Gotoh K, Nakano R, et al. Biofilm-Forming by Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae May Contribute to the Blood Stream Infection. *Int J Mol Sci.* 2019;20(23).
 112. Di Domenico EG, Marchesi F, Cavallo I, et al. The Impact of Bacterial Biofilms on End-Organ Disease and Mortality in Patients with Hematologic Malignancies Developing a Bloodstream Infection. *Microbiol Spectr.* 2021;9(1):e0055021.
 113. Zheng JX, Lin ZW, Chen C, et al. Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia Strains Was Found to be Associated with CC23 and the Presence of *wcaG*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:21.

114. Cepas V, López Y, Muñoz E, et al. Relationship Between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Microb Drug Resist.* 2019;25(1):72-9.
115. Nirwati H, Sinanjung K, Fahrnunissa F, et al. Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. *BMC Proc.* 2019;13(Suppl 11):20.
116. Asati S, Chaudhary U. Prevalence of biofilm producing aerobic bacterial isolates in burn wound infections at a tertiary care hospital in northern India. *Ann Burns Fire Disasters.* 2017;30(1):39-42.
117. Shadkam S, Goli HR, Mirzaei B, Gholami M, Ahanjan M. Correlation between antimicrobial resistance and biofilm formation capability among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients in Iran. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2021;20(1):13.
118. Cusumano JA, Caffrey AR, Daffinee KE, Luther MK, Lopes V, LaPlante KL. Weak biofilm formation among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019;95(4):114877.
119. Rahdar HA, Malekabad ES, Dadashi AR, et al. Correlation between biofilm formation and carbapenem resistance among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Ethiop J Health Sci.* 2019;29(6):745-50.
120. Kazmierczak KM, de Jonge BL, Stone GG, Sahm DF. In vitro activity of ceftazidime/avibactam against isolates of Enterobacteriaceae collected in European countries: INFORM global surveillance 2012–15. *J of Antimicrobial Chemother.* 2018;73(10):2782-8.
121. Vega S, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility among Gram-positive and Gram-negative organisms collected from the Latin American region between 2004 and 2015 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2017;16(1):50.
122. Aygar İS. Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* Kökenlerinde Yıllar İçerisinde Kolistin MİK Değerindeki Artışın İn Vitro Değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyoloji Cem Derg.* 2020;50(3):164-71.

123. Tanrıverdi Çaycı Y, Bıyık İ, Çınar C, Birinci A. Karbapeneme dirençli Enterobacteriaceae izolatlarının 2015-2018 yılları arasındaki antibiyotik direnci. *Türk Mikrobiyoloji Cem Derg.* 2020;50(3):134-40.
124. Özkul Koçak C, Hazırolan G. Karbapeneme Dirençli Klebsiella pneumoniae Klinik İzolatlarında Kolistin Direnci. *Türk Mikrobiyoloji Cem Derg.* 2019;49(1).
125. Kart D, Reçber T, Nemutlu E, Sagioglu M. Sub-Inhibitory Concentrations of Ciprofloxacin Alone and Combinations with Plant-Derived Compounds against P. aeruginosa Biofilms and Their Effects on the Metabolomic Profile of P. aeruginosa Biofilms. *Antibiotics.* 2021;10:414.
126. Ribera A, Benavent E, El-Haj C, et al. Comparative Antibiofilm Efficacy of Meropenem Alone and in Combination with Colistin in an In Vitro Pharmacodynamic Model by Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Klebsiella pneumoniae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(11):e01230-19.
127. Diep JK, Jacobs DM, Sharma R, et al. Polymyxin B in Combination with Rifampin and Meropenem against Polymyxin B-Resistant KPC-Producing Klebsiella pneumoniae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(2):e02121-16.
128. Sato Y, Unno Y, Ubagai T, Ono Y. Sub-minimum inhibitory concentrations of colistin and polymyxin B promote Acinetobacter baumannii biofilm formation. *PLOS ONE.* 2018;13(3):e0194556.
129. Beganovic M, Luther MK, Daffinee KE, LaPlante KL. Biofilm prevention concentrations (BPC) of minocycline compared to polymyxin B, meropenem, and amikacin against Acinetobacter baumannii. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2019;94(3):223-6.
130. Song JY, Cheong HJ, Noh JY, Kim WJ. In vitro Comparison of Anti-Biofilm Effects against Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii: Imipenem, Colistin, Tigecycline, Rifampicin and Combinations. *Infect Chemother.* 2015;47(1):27-32.
131. Wickremasinghe H, Yu HH, Azad MAK, et al. Clinically Relevant Concentrations of Polymyxin B and Meropenem Synergistically Kill Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa and Minimize Biofilm Formation. *Antibiotics.* 2021;10(4):405.

132. Herrera KMS, Silva FKd, Oliveira MEd, Paiva MCd, Soares AC, Siqueira Ferreira JM. First report of polymyxin B activity in *Klebsiella pneumoniae* biofilm. *J Chemother.* 2019;31(3):127-31.
133. Ruiz J, Sanjuan E, Amaro C, et al. In vitro study of antimicrobial activity on *Klebsiella Pneumoniae* biofilms in endotracheal tubes. *J Chemother.* 2019;31(4):202-8.
134. Mataraci Kara E, Ozbek Celik B. Investigation of the effects of various antibiotics against *Klebsiella pneumoniae* biofilms on in vitro catheter model. *J Chemother.* 2018;30(2):82-8.
135. Can F, Kaya M, Bilman BF, Uncu H, Demirbilek M, Yazıcı AC. Tigesiklinin *Acinetobacter baumannii* planktonik ve biyofilm hücrelerine etkisi. *Mikrobiyol Bul.* 2009;43(4):587-95.
136. Aires CP, Batista MJA, Pitondo-Silva A. Decrease of ceftriaxone susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* according to biofilm maturation. *Journal of Global Antimicrobial Resistance.* 2017;9:126-7.
137. Perez LRR. Equal, but different: Fluctuant biofilm formation and its impact on polymyxin B susceptibility among a clonal spreading of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2019;40(8):954-5.
138. Chaudhary M, Payasi A. Role of EDTA and CSE1034 in curli formation and biofilm eradication of *Klebsiella pneumoniae*: a comparison with other drugs. *J Antibiot (Tokyo).* 2012;65(12):631-3.
139. Singla S, Harjai K, Chhibber S. Susceptibility of different phases of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* to three different antibiotics. *The Journal of Antibiotics.* 2013;66(2):61-6.
140. Wang Y, Li H, Xie X, et al. In vitro and in vivo assessment of the antibacterial activity of colistin alone and in combination with other antibiotics against *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance.* 2020;20:351-9.
141. Laishram S, Anandan S, Devi BY, et al. Determination of synergy between sulbactam, meropenem and colistin in carbapenem-resistant *Klebsiella*

- pneumoniae and *Acinetobacter baumannii* isolates and correlation with the molecular mechanism of resistance. *J Chemother.* 2016;28(4):297-303.
142. Dosler S, Karaaslan E, Alev Gerceker A. Antibacterial and anti-biofilm activities of melittin and colistin, alone and in combination with antibiotics against Gram-negative bacteria. *J Chemother.* 2016;28(2):95-103.
 143. Dunder D, Duymaz Z, Genc S, Er DK, İrvem A, Kandemir N. In-vitro activities of imipenem–colistin, imipenem–tigecycline, and tigecycline–colistin combinations against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Chemother.* 2018;30(6-8):342-7.
 144. Meng Q, Lin F, Ling B. In Vitro Activity of Peptide Antibiotics in Combination With Other Antimicrobials on Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in the Planktonic and Biofilm Cell. *Front Pharmacol.* 2022;13:890955.
 145. Urban C, Mariano N, Rahal JJ. In vitro double and triple bactericidal activities of doripenem, polymyxin B, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(6):2732-4.
 146. Ku YH, Chen CC, Lee MF, Chuang YC, Tang HJ, Yu WL. Comparison of synergism between colistin, fosfomycin and tigecycline against extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates or with carbapenem resistance. *J Microbiol Immunol Infect.* 2017;50(6):931-9.
 147. Stein C, Makarewicz O, Bohnert JA, et al. Three Dimensional Checkerboard Synergy Analysis of Colistin, Meropenem, Tigecycline against Multidrug-Resistant Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *PLOS ONE.* 2015;10(6):e0126479.
 148. Tuon FF, Graf ME, Merlini A, et al. Risk factors for mortality in patients with ventilator-associated pneumonia caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 2017;21:1-6.
 149. Pankey GA, Ashcraft DS. Detection of synergy using the combination of polymyxin B with either meropenem or rifampin against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2011;70(4):561-4.

150. Gaibani P, Lombardo D, Lewis RE, et al. In vitro activity and post-antibiotic effects of colistin in combination with other antimicrobials against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(7):1856-65.
151. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(8):1914-8.
152. Geladari A, Simitsopoulou M, Antachopoulos C, Roilides E. Dose-Dependent Synergistic Interactions of Colistin with Rifampin, Meropenem, and Tigecycline against Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(3).
153. Manyalı GD. Kan kültürlerinde üreyen biyofilm oluşturan ve oluşturmeyen *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında in-vitro antimikrobiyal etkileşimlerin gösterilmesi [Uzmanlık tezi]. İzmir: İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; 2022.
154. Corvec S, Tabin UF, Betrisey B, Borens O, Trampuz A. Activities of Fosfomicin, Tigecycline, Colistin, and Gentamicin against Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in a Foreign-Body Infection Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(3):1421-7.
155. Moshynets OV, Baranovskyi TP, Cameron S, et al. Azithromycin possesses biofilm-inhibitory activity and potentiates non-bactericidal colistin methanesulfonate (CMS) and polymyxin B against *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One.* 2022;17(7):e0270983.
156. Clock SA, Tabibi S, Alba L, Kubin CJ, Whittier S, Saiman L. In vitro activity of doripenem alone and in multi-agent combinations against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;76(3):343-6.
157. Chen P, Seth AK, Abercrombie JJ, Mustoe TA, Leung KP. Activity of imipenem against *Klebsiella pneumoniae* biofilms in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(2):1208-13.
158. Benthall G, Touzel RE, Hind CK, et al. Evaluation of antibiotic efficacy against infections caused by planktonic or biofilm cultures of *Pseudomonas aeruginosa*

and *Klebsiella pneumoniae* in *Galleria mellonella*. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;46(5):538-45.

8. EKLER

Ek 1. Klinik Araştırmalar etik kurulu



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/776-793-501

01.08.2022

Sayın Doç. Dr. İlkey BOZKURT

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz Kan dolaşım infeksiyonuna neden olan karbapenem dirençli Klebsiella pneumoniae izolatlarında çeşitli antibiyotiklerin biyofilm üzerine etkisinin araştırılması başlıklı OMÜ KAEK 2021/567 Karar nolu Mikrobiyoloji çalışması nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları açısından Klinik Araştırmalar Etik Kurulu yönergesine göre incelenmiş ve etik açıdan bir sakınca olmadığına, çalışmanın süresi 6 ayı geçerse 6 aylık bildirimlerinin yapılmasına, çalışma tamamlandıktan sonra sonucunun tarafımıza en geç üç(3) ay içerisinde bildirilmesine 08.12.2021 tarihli Etik kurulumuzda oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

Ek 2. Originality Report

tez

ORIGINALITY REPORT

9%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	envgis.ies.hro.or.jp Internet	336 words — 1%
2	acikbilim.yok.gov.tr Internet	295 words — 1%
3	wordnet.com.au Internet	136 words — 1%
4	www.Canada.ca Internet	84 words — < 1%
5	idoc.pub Internet	77 words — < 1%
6	"Posters", Clinical Microbiology and Infection, 5/2008 Crossref	71 words — < 1%
7	J. Ruiz, L. Mensa, M. J. Pons, J. Vila, J. Gascon. "Development of Escherichia coli rifaximin- resistant mutants: frequency of selection and stability", Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008 Crossref	68 words — < 1%
8	jac.oxfordjournals.org Internet	56 words — < 1%