



T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

ŞİŞLİ HAMİDİYE ETFAL

EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARI

GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ ÜRETEN VE/VEYA KARBAPENEM DİRENÇLİ ENTEROBACTERALES İZOLATLARINDA FOSFOMİSİN DUYARLILIĞININ AGAR DİLÜSYON VE OTOMATİZE SİSTEMLER İLE SAPTANMASI

Dr. Eyyüb Karacan

İSTANBUL/2021





T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

ŞİŞLİ HAMİDİYE ETFAL

EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARI

GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ ÜRETEN VE/VEYA KARBAPENEM DİRENÇLİ ENTEROBACTERALES İZOLATLARINDA FOSFOMİSİN DUYARLILIĞININ AGAR DİLÜSYON VE OTOMATİZE SİSTEMLER İLE SAPTANMASI

Dr. Eyyüb Karacan

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Elif Aktaş Sepetci

Yardımcı Tez Danışmanı: Uzm. Dr. Ayşe Barış

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL/2021

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince bilgi birikimi ve tecrübesiyle her zaman destekçim olan, tez konumun belirlenmesinden tezimin yüklenme anına kadar bana yol gösteren danışman hocam kıymetli Doç. Dr. Elif Aktaş Sepetci'ye, asistanlık eğitimimin en başından beri birçok bilgi ve deneyimini benimle paylaşan, aktaran ve yol gösteren değerli hocam Doç. Dr. Banu Bayraktar'a, tez sürecim boyunca yardımlarını ve desteğini her an yanımda hissettiğim Uzm.Dr. Ayşe Barış'a, uzmanlık eğitimi süresince yapmış oldukları katkılarından dolayı Uzm.Dr. Emin Bulut'a, Uzm.Dr. Murat Öcal'a, Uzm. Dr. Süleyman Pelit'e birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım asistan arkadaşlarıma, laboratuvarımızın tüm teknisyenlerine, personellerine ve sekreterine, hayatımın her döneminde desteklerini, sevgilerini hissettiğim, her zaman yanımda olan bu dünyadaki en güzel varlıklarım babam Mehmet Karacan ve annem Fatma Karacan olmak üzere tüm aileme çok teşekkür eder şükranlarımı sunarım.

Eyyüb KARACAN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ii

SİMGELER VE KISALTMALAR vi

TABLOLAR viii

ŞEKİLLER ix

ÖZET x

ABSTRACT xii

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER 1

2.1 Enterobacterales Üyelerinde Antimikrobiyal Direnç 3

2.2 Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten Enterobacterales 4

2.3 Karbapenem Dirençli Enterobacterales 5

2.4 GSBL üreten ve/veya Karbapenem Dirençli Enterobacterales Enfeksiyonlarında Tedavi 6

2.4.1 Beta-Laktamlar 6

2.4.2 Kolistin 7

2.4.3 Tigesiklin 8

2.4.4 Fosfomisin 9

2.5 Fosfomisin ile İlgili Genel Bilgiler 9

2.5.1 Fosfomisin Etki Mekanizması……10

2.5.2 Fosfomisinin Farmakodinamik ve Farmakokinetik Özellikleri 12

2.5.3 Fosfomisine Karşı Direnç Mekanizmaları……...12

2.5.4 Fosfomisinin Etki Spektrumu…….....….14

2.6 Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri…….....15

2.6.1 Disk Difüzyon Yöntemi……..…15

2.6.2 Gradiyent Difüzyon Yöntemi……..16

2.6.3 Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi……...16

2.6.4 Otomatize Sistemler……17

2.6.5 Agar Dilüsyon Yöntemi……..17

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER……18

3.1 Bakteriyel İzolatlar……....18

3.2 İzolatların Tür Tanımı……...18

3.3 Otomatize Sistemlerle Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri……19

3.3.1 GSBL ve Karbapenemaz Tespitinde Kullanılan Yöntemler……..19

3.4 Agar Dilüsyon Yöntemiyle Fosfomisin Duyarlılığının Saptanması …20

3.4.1 Fosfomisin Stok ve Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması……...20

3.4.2 Fosfomisin Agar Dilüsyon Plaklarının Hazırlanması 20

3.4.3 İzolatların Hazırlanması .. ..….21

3.4.4 İzolatların Fosfomisin Agar Dilüsyon Plaklarına Ekimi ve Sonuçların Değerlendirilmesi……..21

3.4.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Direnç Genlerinin Tespiti……...23

3.4.6 İstatistiksel Analizler……...24

4. BULGULAR……...26

4.1 Bakteriyel İzolatlar ……...26

4.2 İzolatların Tür Tanımı …… ….27

4.3 Otomatize Sistemler ile Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları……28

4.3.1 Otomatize Sistemler ile Fosfomisin Duyarlılık Sonuçları…… 32

4.4 Agar Dilüsyon Yöntemiyle Fosfomisin Duyarlılık Sonuçları…… ….32

4.5 Otomatize Sistemler ile Fosfomisin Duyarlılık Sonuçlarının Agar Dilüsyon Testi Sonuçlarıyla Karşılaştırılması ……...34

4.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları……...35

5. TARTIŞMA……...41

6. SONUÇLAR……...49

7. KAYNAKLAR.....50

8. ÖZGEÇMİŞ 59

9. EKLER.....62

SİMGELER VE KISALTMALAR

BH: Büyük hata

BOS: Beyin omurilik sıvısı

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

KDE: Karbapenem dirençli Enterobacterales

ÇBH: Çok büyük hata

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FDA: Food and Drug Administration

GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta- laktamaz

İYE: İdrar yolu enfeksiyonları

İV: İntravenöz

KOB: Koloni oluşturan birim

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenamase

KU: Kategorik uyum

MALDI-TOF MS: Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (Matriks Aracılı Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi

MCR: Mobile colistin resistance

MHA: Mueller Hinton agar

MİK: Minimal inhibitör konsantrasyon

MRSA: Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*

MSSA: Metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus*

OXA: Oksasilin

PEP: Fosfoenolpiruvat

TEM: Temonier

TMP/SMZ: Trimetoprim-Sulfametoksazol

VRE: Vankomisine dirençli Enterokok

TABLOLAR

Tablo 1: Direnç genlerinin tespitinde kullanılan primerler.....24
Tablo 2: İzolatların elde edildiği örneklerin dağılımı.....26
Tablo 3: İzolatların kliniklere göre dağılımı……...27
Tablo 4: İzolatların direnç profilleri……....28
Tablo 5: Tüm izolatların otomatize sistemler ile elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları……..29
Tablo 6: *E. coli* izolatlarının otomatize sistemler ile elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları. 30
Tablo 7: *K. pneumoniae* izolatlarının otomatize sistemler ile elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları 31
Tablo 8: İzolatların agar dilüsyon yöntemiyle tespit edilen fosfomisin MİK dağılımı……..….34
Tablo 9: Otomatize sistemlerin fosfomisin duyarlılık sonuçlarının altın standart yöntem duyarlılık sonuçları ile karşılaştırılması…… 35
Tablo 10: Fosfomisin dirençli 21 izolatın fenotipik ve genotipik özellikleri …….40

ŞEKİLLER

Şekil 1: Fosfomisinin hücre içine alımında rol oynayan transport sistemleri……11
Şekil 2: Fosfomisin sentezindeki MurA basamağı 11
Şekil 3: Fosfomisin için disk difüzyon testi 16
Şekil 4: Agar dilüsyon plaklarının hazırlanma aşamaları 22
Şekil 5: Agar dilüsyon plaklarının değerlendirilmesi 23
Şekil 6: İzolatların tür dağılım yüzdesi (sayı) 30
Şekil 7: *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatları için otomatize sistemlerle elde edilen fosfomisine duyarlılık oranları 32
Şekil 8: *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarının agar dilüsyon yöntemiyle belirlenen fosfomisine duyarlı-dirençli izolat sayısı. 34
Şekil 9: *FosA* direnç geni saptanan izolatların agaroz jel elektroforez görüntüsü….36
Şekil 10: OXA-48 ve KPC karbapenemazının varlığını gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü…….37
Şekil 11: *bla*TEM PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü……..…….38
Şekil 12: *bla*CTX-M PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü……...39

GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ ÜRETEN VE/VEYA KARBAPENEM DİRENÇLİ ENTEROBACTERALES İZOLATLARINDA FOSFOMİSİN DUYARLILIĞININ AGAR DİLÜSYON VE OTOMATİZE SİSTEMLER İLE SAPTANMASI

ÖZET

Amaç: Enterobacterales izolatlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimi ve/veya karbapenem direnci tüm dünyada önemli bir sorundur. Çoklu ilaca dirençli patojenler için alternatif tedavilerden biri son dönemde yeniden gündeme gelen fosfomisindir. Bu çalışmanın amacı, çeşitli klinik örneklerden elde edilen GSBL üreten ve/veya karbapenem dirençli Enterobacterales izolatlarında fosfomisin duyarlılığını altın standart yöntem olan agar dilüsyonla ortaya koymak ve otomatize sistemlerle elde edilen fosfomisin duyarlılık sonuçlarını agar dilüsyon ile karşılaştırmaktır. Ayrıca fosfomisin dirençli izolatlarda çeşitli fosfomisin modifiye edici enzimler ile çeşitli GSBL ve karbapenemaz enzimlerini kodlayan genlerin tespiti hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 01 Ağustos 2020 – 01 Mart 2021 tarihleri arasında Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen GSBL üreten ve/veya karbapenem dirençli toplam 323 Enterobacterales izolatı dahil edilmiştir. İzolatların tür tanımı matriks aracılı lazer dezorbsiyon iyonizasyon-uçuş zamanlı kütle spektrometre (MALDI-TOF MS) ile, antibiyotik duyarlılık testleri ise otomatize sistemler Phoenix (Becton Dickinson, USA) ve Vitek-2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) ile yapılmıştır. İzolatların fosfomisin duyarlılığı için altın standart yöntem agar dilüsyon testi uygulanmış ve otomatize

sistem fosfomisin duyarlılık sonuçları ile agar dilüsyon duyarlılık sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Fosfomisin dirençli izolatlara, çeşitli fosfomisin modifiye edici enzimler (fosA, fosA3, fosC2) yanında çeşitli GSBL enzimleri (TEM, SHV, CTX-M) ve karbapenemaz enzimlerini (OXA-48, VIM, NDM, KPC, IMP) kodlayan genlerin tespiti için Polimeraz Zincir Reaksiyonu uygulanmıştır.

Bulgular: Çalışmaya 188 *E. coli*, 121 *K. pneumoniae* ve 14 diğer Enterobacterales izolatı dahil edilmiştir. Altın standart olan agar dilüsyon yöntemiyle *E. coli* izolatlarının 185 (%98,4)'i, *K. pneumoniae* izolatlarının 104 (%86)'ü ve tüm Enterobacterales izolatlarının 302 (%93,5)'si fosfomisine duyarlı olarak saptanmıştır. Otomatize sistemlerde yapılan fosfomisin duyarlılık testinde *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatları için çok büyük hata saptanmamıştır. *E. coli* izolatları için Phoenix otomatize sistemiyle %1,3 oranında büyük hata (BH) saptanırken, Vitek-2 otomatize sistemiyle BH saptanmamış; *K. pneumoniae* izolatları için ise Phoenix otomatize sistemiyle %5,4, Vitek-2 otomatize sistemiyle %12 oranında BH saptanmıştır. Fosfomisin dirençli 21 izolatın ikisinde *fosA* geni, beşinde karbapenemaz geni (üç *bla*OXA-48, iki *bla*KPC), 18'inde GSBL geni (5 *bla*CTX-M, 3 *bla*TEM ve 10 *bla*CTX-M+*bla*TEM) tespit edilmiştir.

Sonuç: Dirençli Enterobacterales izolatlarında fosfomisin duyarlılığı, altın standart yöntem olan agar dilüsyon yöntemiyle yüksek olarak (%93,5) saptanmıştır. *E. coli* izolatları için otomatize sistem sonuçları ile altın standart yöntem sonuçları arasında yüksek uyum gözlemlenmiştir. *K pneumoniae* izolatları için büyük hata oranının her iki sistemde de >%3'ün üzerinde olması, sonuçların altın standart yöntem ile doğrulanması gerektiğini düşündürmüştür. Çalışmada, *fosA* geni tespit edilen izolatların *bla*CTX-M ve *bla*CTX-M+*bla*TEM genleri ile birlikteliği gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: GSBL, Karbapenem dirençli, Enterobacterales, Fosfomisin, Agar dilüsyon, Otomatize Sistemler, *fosA*

DETERMINATION OF FOSFOMYCIN SUSCEPTIBILITY IN EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE PRODUCING AND/OR CARBAPENEM RESISTANT ENTEROBACTERALES ISOLATES WITH AGAR DILUTION AND AUTOMATED SYSTEMS

ABSTRACT

Aim: Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production and/or carbapenem resistance is an important problem in Enterobacterales isolates worldwide. One of the alternative treatments for multi-drug resistant pathogens is fosfomycin, which has recently come to the fore. The aim of this study is to determine the susceptibility of ESBL-producing and/or carbapenem-resistant Enterobacterales isolates obtained from various clinical samples with agar dilution, which is the gold standard method, and to compare the susceptibility results of fosfomycin obtained by automated systems with those by agar dilution. Additionaly, we aimed to detect various genes encoding fosfomycin modifying enzymes, ESBL and carbapenemase enzymes, in fosfomycin resistant isolates.

Materials and Methods: A total of 323 ESBL producing and/or carbapenem resistant Enterobacterales isolates, which were isolated from various clinical specimens sent to Health Sciences University Şişli Hamidiye Etfal Training and Research Hospital Medical Microbiology Laboratory between 01 August 2020 – 01 March 2021 were included in the study. Species identification of the isolates was performed with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), and antibiotic susceptibility tests were performed with automated systems (Phoenix (Becton Dickinson, USA) and Vitek-2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)). Fosfomycin susceptibility of the isolates was tested by the gold standard agar dilution method and fosfomycin susceptibility results obtained by the automated systems were compared with the agar dilution susceptibility results. For fosfomycin resistant isolates, polymerase chain reaction was done for the detection of

genes encoding some fosfomycin-modifying enzymes (fosA, fosA3, fosC2) and some ESBL enzymes (TEM, SHV, CTX-M) and carbapenemase enzymes (OXA-48, VIM, NDM, KPC, IMP).

Results: 188 *E. coli*, 121 *K. pneumoniae* and 14 other Enterobacterales isolates were included in this study. 185 (98.4%) of *E. coli* isolates, 104 (86%) of *K. pneumoniae* isolates and 302 (93.5%) of all Enterobacterales isolates were found to be susceptible to fosfomycin by the gold standard agar dilution method. No very major errors were detected for fosfomycin susceptibility tests performed by automated systems for *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates. For *E. coli* isolates, 1.3% major error (ME) rates were detected with the Phoenix automated system, but no ME was detected with the Vitek-2 automated system; for *K. pneumoniae* isolates, 5,4% and 12% ME rates were observed with the Phoenix and the Vitek-2 automated systems, respectively. Among the 21 fosfomycin resistant isolates, *fosA* gene was found in two isolates while carbapenemase genes (three *bla*OXA-48, two *bla*KPC) and 18 ESBL genes (5 *bla*CTX-M, 3 *bla*TEM ve 10 *bla*CTX-M+*bla*TEM) were also detected.

Conclusions: The susceptibility of fosfomycin in resistant Enterobacterales isolates was found to be high (93.5%) with the gold standard agar dilution method. A high agreement was observed between susceptibility results obtained by the automated systems and the gold standard method for *E. coli* isolates. The fact that the the major error rates for *K. pneumoniae* isolates were >3% in both systems suggested that the results must be confirmed with the gold standard method. In this study, the isolates, in which *fosA* genes were found, showed coexistence with *bla*CTX-M and *bla*CTX-M+*bla*TEM genes .

Keywords: ESBL, Carbapenem resistance, Enterobacterales, Fosfomycin, Agar dilution, Automated systems, *fosA*

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüm dünyada artan antimikrobiyal direnç (AMD) halk sağlığı açısından büyük tehdit oluşturmaktadır (1). Yeni kullanıma giren antibiyotiklere dahi gün geçtikçe değişen oranlarda direnç tespit edilmektedir (1). AMD gelişimi; tedavisi zor enfeksiyonlar, enfeksiyonların yayılma riskinde artış, hastanede yatış sürelerinin uzaması, mortalite artışı ve ekonomik yük anlamına gelmektedir. Dirençli enfeksiyonlara karşı yeni tedavi seçeneklerine ihtiyaç artmıştır (2,3).

Enterobacterales üyelerinin neden olduğu ciddi enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan antibiyotiklere direnç son yıllarda dünya çapında artmakta ve dünyanın birçok bölgesinde yüksek oranlara ulaşmaktadır (4). Tüm dünyada var olan dirençli bakteriler için karbapenemler veya kolistin kullanımı son basamak tedavi olarak görülmekte fakat bu ilaçlara dirençli izolatların sayısı da dramatik şekilde artmaktadır (5). Yeni ilaç geliştirilmesindeki zorluklar ve ekonomik kısıtlılıklar, fosfomisin gibi eski antimikrobiyallere olan ilgiyi arttırmıştır (6). Komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonları için çoğunlukla oral tedavide kullanılan fosfomisin, özellikle son dönemlerde çoklu ilaç dirençli patojenlere karşı bildirilen aktivitesiyle tekli ya da kombinasyon rejimlerinde intravenöz (iv) kullanımı ile faydalı bir seçenek olabilir (7). Ancak fosfomisinin özellikle iv kullanımı için yeterince veri bulunmamaktadır (5).

Fosfomisin duyarlılığının saptanmasında kullanılan yöntemler arasında uyumsuzluklar bildirilmiştir. Antibiyotik duyarlılık test rehberlerinden EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) ve CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute) tarafından duyarlılık saptanmasında birçok antibiyotik için altın standart yöntem olarak sıvı mikrodilüsyon testini önerirken, fosfomisin için (glukoz-6-fosfat eklenen Mueller Hinton agar ile) agar dilüsyon testini önermektedir. Ayrıca rehberler sadece *E. coli* üriner sistem izolatları için glukoz-6-fosfat (G6P) içeren disklerin agar dilüsyon testiyle korele sonuçlar verdiğini ve kullanılabileceğini belirtirken diğer bakteriler için fosfomisin disk difüzyon testini önermemektedir (8,9). Agar dilüsyonun rutin laboratuvarlarda sık yapılamayan zahmetli ve zaman alıcı bir test olması, fosfomisinin diğer antibiyotiklerle beraber

raporlanmasını ve klinik kullanımını sınırlandırmaktadır. EUCAST, fosfomisin için otomatize sistem sonuçlarının doğruluğunun üretici firmanın sorumluluğunda olduğunu bildirmiştir (8). Otomatize sistemlerin fosfomisin duyarlılık sonuçları ile agar dilüsyon testinin uyumunu araştıran sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Fosfomisin duyarlılığının tespitinde otomatize sistemlerin kullanılabilirliğinin ortaya konması laboratuvarlarda rutin raporlama ve tedavinin yönlendirilmesindeki rolü nedeniyle önem taşımaktadır (7).

Bugüne kadar, *E. coli*'deki fosfomisin direncinin öncelikle kromozomal olarak kodlanmış taşıyıcılardaki mutasyonlar ve plazmid aracılı glutatyon s-transferazları enzimatik olarak inaktive eden fosA3, fosA4 ve fosC2 gibi plazmid aracılı enzimler ile olduğu belirtilmiştir (10). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu genlerin karbapenemaz veya GSBL genleri ile birlikteliği büyük ilgi uyandırmıştır (10).

Bu çalışmanın amacı, çeşitli klinik örneklerden elde edilen GSBL üreten ve/veya karbapenem dirençli Enterobacterales (KDE) izolatlarında fosfomisin duyarlılığını altın standart yöntem agar dilüsyonla ortaya koymak ve otomatize sistemlerle elde edilen fosfomisin duyarlılık sonuçlarını agar dilüsyon ile karşılaştırmaktır. Ayrıca fosfomisin dirençli izolatlarda çeşitli fosfomisin modifiye edici enzimler ile çeşitli GSBL ve karbapenemaz enzimlerini kodlayan genlerin tespiti hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Enterobacterales Üyelerinde Antimikrobiyal Direnç

Antimikrobiyal direnç tüm dünyada ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak artmaktadır (11). Enterobacterales üyeleri, idrar yolu enfeksiyonları (İYE), sepsis, yumuşak doku enfeksiyonları, sağlık hizmeti ile ilişkili pnömoniler ve çeşitli karın içi enfeksiyonlarının önemli etkenlerindendir. Enterobacterales üyeleri birçok farklı enfeksiyona sebep olabildiğinden artan antimikrobiyal direnç acil çözüm gerektiren önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (12).

Mikroorganizmalar, antibiyotiklerin etkisinden kaçmak için direnç mekanizmalarını sürekli değiştirmekte ve geliştirmektedir (13). Gram negatif bakteriler zamanla beta-laktam antibiyotikler gibi birçok antibiyotiğe karşı farklı direnç mekanizmaları geliştirerek direnç kazanmıştır. Bu direnç mekanizmalarından biri de beta-laktamları yıkan beta-laktamaz enzimleridir (14). Enterobacterales üyelerindeki beta-laktamaz enzimleri arasında olan en önemli grup GSBL ve/veya karbapenemaz enzimleridir (15).

GSBL pozitifliği, beta-laktamaz enzimi üreten Enterobacterales üyeleri ile oluşan enfeksiyonlarda önemli bir sorun olup GSBL varlığının tespiti ve bu türlere ait antibiyotik duyarlılıklarının ortaya konulması tedavinin başarı ile sonuçlanması yönünden büyük önem taşımaktadır. GSBL üreten izolatlar sadece hastane kaynaklı değil aynı zamanda toplum kaynaklı enfeksiyonlarda da etken olarak görülebilmekte ve hastane yatışına ihtiyaç olabilmektedir (16).

Karbapenemaz pozitifliği, Enterobacterales üyelerinde görülen karbapenem direncinden en sık sorumlu olan direnç mekanizmasıdır. Bu enzimler genellikle plazmidler üzerinde bulunan genler tarafından kodlanır ve kolayca aktarılabilir. Ayrıca, karbapenemaz üreten izolatlarda sıklıkla aminoglikozitler, florokinolonlar ve trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SXT) gibi birçok antimikrobiyal ajana karşı da direnç görülebilmektedir. Karbapenemlere duyarlılığın azalması ayrıca; GSBL'lerin

veya AmpC enzimlerinin aşırı üretilmesi veya geçirgenliğin azalmasından kaynaklanabilir (13).

2.2 Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten Enterobacterales

Beta-laktamaz enzimi, Gram negatif bakterilerin beta-laktam direncindeki en yaygın direnç mekanizmasıdır. Beta-laktamazların sınıflandırılması enzimlerin fonksiyonel özelliklerine veya kimyasal yapılarına dayanmaktadır. ilk kez 1980 yılında Ambler tarafından Sınıf A ve Sınıf B olarak beta laktamazları kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmış ayrıca Sınıf C ve Sınıf D sonradan eklenerek dört moleküler sınıf oluşturulmuştur. 1995 yılında ise Bush, Jacoby ve Mederios beta-laktamazlar fonksiyonel olarak Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'ten oluşan 4 gruba ayıran sınıflma oluşturmuştur.. GSBL'ler, enzimin aktif bölgesi etrafındaki amino asit konfigürasyonunu değiştiren mutasyonlar ile dar spektrumlu beta-laktamaz genlerinden (TEM-1, TEM-2 veya SHV-1) türetilir. Tipik olarak, bakteri türleri arasında kolayca değiştirilebilen plazmitler tarafından kodlanırlar ve bu enzimler en sık Enterobacterales üyeleri, özellikle *E. coli* ve *Klebsiella* tarafından üretilir. Bugüne kadar, amino asit dizilimi karşılaştırılarak OXA, CTX-M, SHV, VEB, TEM, PER, GES, BES, TLA gibi dokuz farklı yapısal ve evrimsel aileye sınıflandırılmış 350'den fazla farklı doğal GSBL varyantı bilinmektedir (17,18). En sık karşılaşılan GSBL çeşitleri CTX-M, SHV ve TEM ailelerine aittir. Türkiye'de en sık görülen GSBL çeşidi CTX-M'dir ve bunu TEM ile SHV izlemektedir. TEM, SHV ve CTX-M tipi GSBL'lerin çeşitliliği ve artan prevalansı, ciddi enfeksiyonların tedavisinde üçüncü nesil sefalosporinlerin klinik kullanımı için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (19).

GSBL enzimleri, penisilinler ve sefalosporinler de dahil olmak üzere yaygın olarak kullanılan bazı antibiyotikleri parçalar ve bu ilaçları enfeksiyonların tedavisinde etkisiz hale getirir. GSBL enzimleri oksimino-sefalosporinler ve monobaktamları hidrolize edebilirken, sefamisinler ve karbapenemleri hidrolize edemezler (20). Bu yüzden GSBL üreten Enterobacterales enfeksiyonlarının tedavisinde daha az

antibiyotik seçeneği bulunmaktadır. Bu tür enfeksiyonlarda genellikle daha karmaşık tedaviler gerekmektedir. Tedavide oral antibiyotikler yerine, intravenöz (iv) antibiyotiklere ihtiyaç duyulabilir (21).

E. coli ve *K. pneumoniae* en sık GSBL üreten Enterobacterales üyeleridir. Kinik açıdan önemli diğer birçok Enterobacterales türü de GSBL üretebilmektedir. GSBL prevalansı birçok faktörden etkilendiği için (coğrafya, hastane, hasta özellikleri, enfeksiyon tipi vb.) çalışmalarda farklılıklar gösterir (22).

2.3 Karbapenem Dirençli Enterobacterales

KDE, tedavisi zor olan enfeksiyonlarda son çare olarak kabul edilen karbapenem sınıfı antibiyotiklere karşı dirençli olan Enterobacterales üyeleridir. Doğru ve etkin bir tedavi için KDE enfeksiyonlarını zamanında tanımlamak büyük önem taşımaktadır. KDE enfeksiyonlarında özellikle karbapenem hidroliz edici enzimlerin plazmidlerle kolay yayılabilmesi direncin artmasına neden olmaktadır (23).

KDE enfeksiyonları ve karbapenemaz enzimlerinin dağılımı büyük ölçüde coğrafyaya bağlıdır. Özellikle *K. pneumoniae*'da diğer Enterobacterales üyelerine göre bu türlerin dağılımında farklılıklar görülmektedir. KPC, NDM ve OXA-48 epidemiyolojik ve klinik önemi olan üç ana karbapenemaz enzimi olarak kabul edilmektedir. KPC enzimi ABD, Avrupa (İtalya, Yunanistan), Çin'de; NDM enzimi Hindistan ve bazı Balkan ülkelerinde görülen Enterobacterales türlerindeki en yaygın saptanan karbapenemazlardır (23). Ülkemizde ise OXA-48 en sık görülen karbapenemaz olup NDM üreten türlerin oranı da giderek artmaktadır (24,25).

Özellikle *K. pneumoniae*'nın neden olduğu sağlık bakımı ile ilişkili enfeksiyonlardaki artan karbapenem direnci dünyada önemli bir sorundur. Centers for Disease Control and Prevention (CDC)'ın 2013 yılından 2019'a kadar küresel tehditlere sebep olan mikroorganizmaları önlemeye karşı aldığı tedbirlere rağmen karbapenem dirençli Enterobacterales prevelansında herhangi bir azalma olmamıştır (26).

Enterobacterales izolatlarında karbapenemazların varlığını belirlemek için fenotipik ve genotipik çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Modifiye Hodge testi, karbapenem inaktivasyon metodu (CIM), MALDI-TOF MS ve Karba NP testleri fenotipik testlerdendir ancak bu testler spesifik karbapenemaz grubu ile ilgili herhangi bilgi vermezler. Genotipik testlerden konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ve sekanslama yöntemleri karbapenemazların saptanmasında kullanılan moleküler bazlı testlerdir. Genomik DNA üzerinde yapılan bir konvansiyonel PZR tekniği 4-6 saat içinde sonuç verebilir, karbapenemaz grubu (örneğin VİM, KPC, NDM ve OXA vb.) kesin olarak tanımlanabilir (20,23)**.**

2.4 GSBL üreten ve/veya Karbapenem Dirençli Enterobacterales Enfeksiyonlarında Tedavi

Karbapenemler, GSBL üreten mikroorganizmaların tedavilerinde kullanılan birkaç antibiyotikten biridir ancak karbepenemlerin yaygın kullanımı karbapenem direncinde de artışa neden olmaktadır (27). KDE izolatlarında karbapenem direncinin artmasıyla eski ajanların ve kombinasyon rejimlerinin tedavilerde kullanımı gündeme gelmiştir (28). Tedavide karbapenem içeren kombinasyon rejimlerinin (kolistin, fosfomisin, tigesiklin veya gentamisin gibi) etkili olduğu kısıtlı sayıda çalışmayla gösterilmiştir (29). GSBL üreten ve/veya karbapenem dirençli Enterobacterales enfeksiyonlarında kullanılan bazı antibiyotikler aşağıda belirtilmiştir.

2.4.1 Beta-Laktamlar

Beta-laktam grubu antibiyotikler bakterilerin hücre duvarı sentezini engelleyerek bakterisidal etki gösteren geniş spektrumlu bir antibiyotik grubudur. Hücre duvar sentezinin transpeptidasyon basamağında yer alan transpeptidaz ve karboksipeptidaz (PBP) enzimlerine bağlanarak etki ederler. Beta-laktamlar penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve monobaktamlar olarak 4 gruba ayrılmaktadır (30). Beta-laktam grubu antibiyotikler, Enterobacterales üyelerinin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için en çok reçete edilen antibiyotikler

arasındadır. Antibiyotiklerin yaygın kullanımı Enterobacterales üyelerinde direncin artmasına ve yaygınlaşmasına neden olmuştur (31). Beta-laktam antibiyotiklere karşı klinikte en sık görülen direnç mekanizması, bakterilerin bu antibiyotikleri yıkan beta-laktamaz enzimlerini üretmesidir (32). Beta–laktamaz enzimleri kromozomlar, plazmidler ya da transpozonlar aracılığı ile sentezlenmektedir (33).

Özellikle beta-laktamaz gruplarından biri olan karbapenemazlar penisilinler, sefalosporinler ve karbapenemler dahil olmak üzere hemen hemen tüm beta-laktamazları hidrolize ederek etkisizleştirmektedir. Karbapenemler, genellikle daha dar spektrumlu beta-laktamlara dirençli enfeksiyonlar için son basamak tedavi seçeneği olarak kullanılan çok önemli bir beta-laktam sınıfıdır (34).

Yeni beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörleri, karbapenemaz üreten Enterobacterales için yeni tedavi seçeneklerindendir. Seftazidim-avibaktam, meropenem-vaborbaktam ve imipenem-relebaktam dirençli enfeksiyonlarda klinisyenlere alternatif tedavi seçenekleri olarak kullanıma girmiştir. Bu ilaçların tedavi etkinliğinin farklı karbapenemaz tiplerine göre değişmesi önemlidir. Örneğin meropenem-vaborbaktam ve imipenem-relebaktam kombinasyonlarının OXA tip karbapenemazlara etkisiz olduğu gösterilmişken, KPC tip karbapenemazlara oldukça etkili olduğu gösterilmiştir (35).

2.4.2 Kolistin

Kolistin, çoklu ilaç dirençli gram negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için ‘son basamak’ olarak kullanılan eski bir antibiyotiktir. Önceleri nefrotoksisite ve nörotoksisite yan etkileri nedeniyle kullanımı terk edilmiş olup günümüzde dirençli bakterilere karşı kullanılabilen sınırlı sayıda antibiyotikten biridir (36).

Kolistin, gram negatif bakterilerin dış membranındaki magnezyum (Mg^{+2}) ve kalsiyum (Ca^{+2}) iyonlarının yerine geçerek dış zarın stabilitesini bozar ve membran hasarına neden olur. Böylece, hücre zarının geçirgenliği artar ve hücre ölümü gerçekleşir (36). Kolistine dirençte en yaygın mekanizma, membran

lipopolisakkaritlerinde değişiklik yapılarak bakteriyel dış zarın modifikasyonlarıdır. Diğer mekanizmalar atım pompasının aşırı ekspresyonu ve kapsül polisakkaritlerinin aşırı üretilmesidir (37). Kolistin direncine neden olan *mcr* geni transfer edilebilir bir plazmid üzerinde kodlanarak tüm dünyada yayılmaktadır (38). Bir fosfoetanolamin transferaz olan Mcr-1 enzimi, lipopolisakkaritleri modifiye eder ve polimiksin direncine sebep olur (39). Kolistin monoterapisi ile kolistine dirençli alt popülasyonların hızlı arttığının gözlenmesi nedeniyle, kolistine direnç gelişimini önlemek ve etkinliğini artırmak için kombinasyon tedavileri önerilmektedir (40).

K. pneumoniae izolatlarında kolistin direnci artmaya devam ederek büyük bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Kolistinle birlikte karbapenem, fosfomisin, tigesiklin kombinasyonları çeşitli çalışmalarda denenmektedir. Özellikle karbapenemlerle kolistin kombinasyonunun in vitro sinerjik etki gösterdiği bildirilmiştir (41).

2.4.3 Tigesiklin

Tigesiklin; gram pozitif, gram negatif, atipik ve anaerop bakteriler dahil olmak üzere birçok bakteri için tedavide kullanılan geniş spektruma sahip bir antibiyotiktir. GSBL üreten Enterobacterales, vankomisine dirençli enterokok, penisiline dirençli *Streptococcus pneumoniae*, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* gibi çoklu ilaç dirençli bakterilere karşı etki gösterebilir (42).

Tigesiklin, bakterilerin 30S ribozomal alt birimine bağlanır ve aminoaçil-tRNA'nın ribozomun A bölgesi ile etkileşimini bloke ederek protein sentezini inhibe etmektedir. Tigesiklin ribozama geri dönüşümlü olarak bağlanmakta, bakteriyostatik etki göstermektedir (43). Tigesiklin duyarlılığının araştırıldığı meta-analiz çalışmalarında dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında (n:3046 izolat) tigesiklin duyarlılığı %91,2 olarak bulunmuştur. Başka bir meta-analiz çalışmasında ise dirençli *E. coli* izolatlarında (n:1936 izolat) tigesiklin duyarlılığı %99,6 olarak saptanmıştır (44).

2.4.4 Fosfomisin

Fosfomisin, hücre duvarı sentezinin ilk basamağını inhibe ederek hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere bakterisidal etkili bir antibiyotiktir. Özgün etki mekanizması ile beta-laktamlar, aminoglikozitler ve florokinolonlar dahil olmak üzere diğer antibiyotiklerle sinerjik etki sağlayabilir. Fosfomisin duyarlılığı için yapılan birçok çalışmada dirençli Enterobacterales izolatlarına karşı etkili olduğu gösterilmiştir (45).

2.5 Fosfomisin ile İlgili Genel Bilgiler

Başlangıçta fosfonomisin olarak adlandırılan ve fosfoenolpiruvat (PEP) analoğu olan fosfomisin ($C_3H_7O_4P$), ilk olarak İspanya'da *Streptomyces fradiae* (ATCC 21096) fermantasyon ürünlerinde keşfedilen geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (46,47). Günümüzde var olan antibiyotikler arasında en küçük moleküler ağırlığa sahip olan antibiyotiklerden biri olan fosfomisinin dokulara dağılımı oldukça iyidir (48).

Fosfomisinin iki oral formülasyonu mevcuttur. Bunlar sentetik olarak hazırlanıp biyoyararlanımı iyileştirilmiş olan fosfomisin trometamin (trometamol) ve fosfomisin kalsiyumdur. Fosfomisin trometamin, fosfomisin kalsiyuma kıyasla kana daha kolay geçebildiği için oral uygulama için tercih edilen formülasyondur. Ayrıca intravenöz formülasyon olarak fosfomisin disodyum mevcuttur (48).

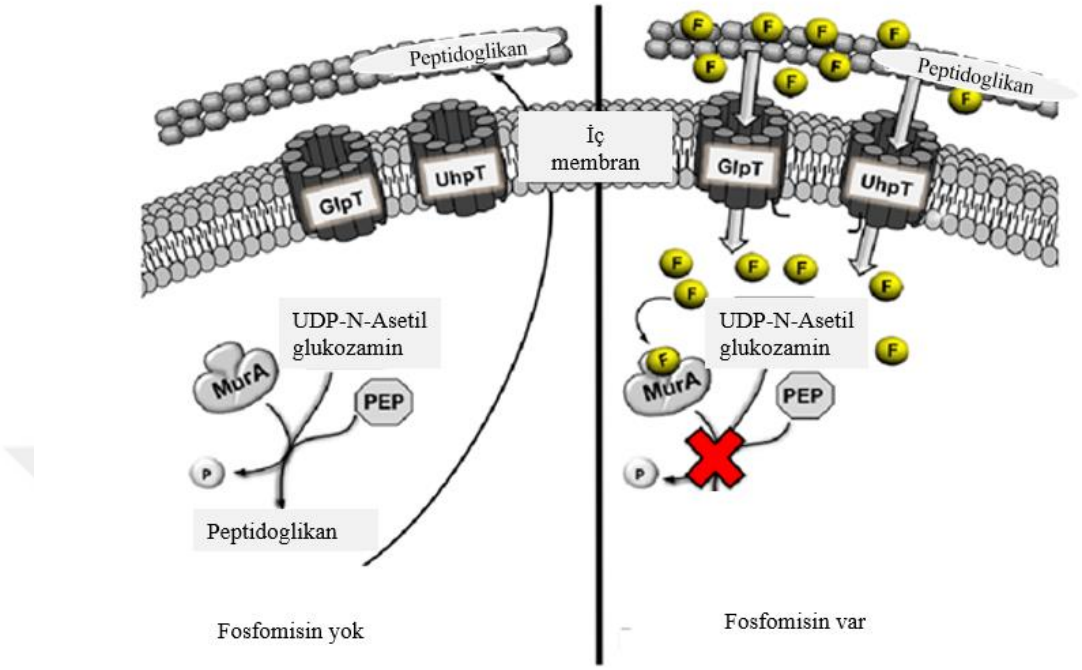
Fosfomisin trometamol, başta idrar yolu enfeksiyonları olmak üzere birçok farklı enfeksiyonun tedavisinde kullanılmasına rağmen *E. coli* izolatlarındaki direncin oldukça az görüldüğü (yaklaşık %1) nadir antibiyotiklerden biridir. Fosfomisinin birçok önemli klinik, farmakokinetik ve farmakodinamik avantajları mevcuttur; in vivo aktivitesi yüksek, güvenilir, klinik olarak etkin ve yüksek düzeyde tolere edilebilir bi antibiyotiktir (49). Fosfomisin gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı geniş bir aktivite spektrumuna sahiptir ancak dirençli mutantların hızlı seçimini en aza indirmek için başka bir antibiyotik ile kombine kullanılması önerilmektedir (50).

Son yıllarda çoklu ilaca dirençli mikroorganizmaların artması, bu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotik rejimlerinin tekrar gözden geçirilmesini gündeme getirmiştir. Fosfomisin, dirençli enfeksiyonlarda tedavide alternatif bir ilaç olabileceğinden yeniden gündeme gelmiştir (51).

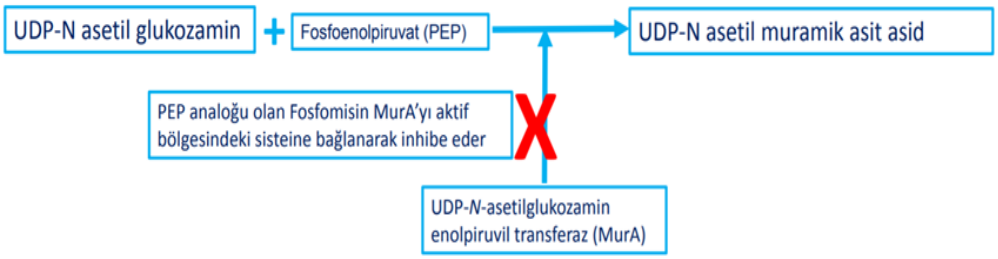
Kolistin ve fosfomisin gibi eski antibiyotiklerin birçok enfeksiyonda etkili olması nedeniyle GSBL üreten ve/veya karbapenem dirençli bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde kullanımı gündemdedir (52). Fosfomisinin dirençli enfeksiyonların tedavisinde monoterapi olarak veya kombine rejimlerde etkin ve güvenilir olduğu birçok yayında gösterilmiştir (53).

2.5.1 Fosfomisin Etki Mekanizması

Fosfomisin, peptidoglikan sentezinin ilk aşamasını engelleyen bakterisidal etkili bir antibiyotiktir. Fosfomisinin bakterinin iç kısmına taşınması gliserol-3- fosfat taşıyıcı (GlpT) ve glikoz-6-fosfat taşıyıcı (UhpT) permeazlarla gerçekleştirilir (Şekil 1). Bakteri hücre duvarını oluşturan peptidoglikan tabakası, N-asetilglikozamin (NAGA) ve N-asetilmuramik asidin (NAMA) birbirini takip eden birimlerinin pentapeptid çapraz bağları ile bağlanması sonucu oluşmaktadır. Hücre duvarı sentezi bakterilerde ilk basamak olarak sitoplazmada gerçekleşmekte ve bu basamak, üridin difosfat (UDP)-NAG'ın 3'-hidroksil grubundan inorganik fosfatın ayrılması ile fosfoenolpirüvattan gelen enolpirüvatın UDP-NAG'a eklenmesi ile olmaktadır. UDP-NAG enol pirüvil transferaz (MurA) enzimi, bu reaksiyonları *E. coli* gibi bakterilerde katalize eder. Fosfomisin, MurA enziminin 115. sistein amino asidine kovalent bağlarla geri dönüşümsüz olarak bağlanarak MurA enzimini yıkar (Şekil 2). Böylece fosfomisin UDP-NAMA oluşumunu baskılar ve peptidoglikan tabakasının yapımını baskılayarak antibakteriyel etkinliğini sağlar. Fosfomisin ayrıca penisilin bağlayıcı proteinleri de azaltır (48,51).



Şekil 1: Fosfomisinin hücre içine alımında rol oynayan transport sistemleri. Fosfomisinin sitoplazmadan geçişi transport sistemleri ile olmaktadır (54).



Şekil 2: Fosfomisin sentezindeki MurA basamağı. Fosfomisin hücre duvar sentezinin ilk basamağında yer alan MurA enzimini inhibe ederek etki eder (55).

2.5.2 Fosfomisinin Farmakodinamik ve Farmakokinetik Özellikleri

Fosfomisin disodyum hidrofilik bir maddedir (56). Serum yarı ömrü 5,7 saattir ve idrar atılımı glomerüler filtrasyon ile yapılır (57). Karaciğerde metabolize edilmez, antibiyotik serum proteinlerine bağlanmaz ve serum proteinlerinden etkilenmez (57). Biyoaktif formların yarısı 3-4 saat içinde glomerüler filtrasyon ile atılmaktadır. Sanal dağılım hacmi büyüktür. Düşük moleküler ağırlığı sayesinde böbrek, mesane, prostat, akciğer, göz, kemik, deri lezyonlarındaki sekresyonlara, beyin omurilik sıvısı ve safra sıvısına yüksek düzeyde difüze olabildiği gösterilmiştir (51,58). Bu nedenle, fosfomisinin farmakolojik özellikleri, düşük toksisitesi ile birlikte, bu açıdan diğer yan etkileri az olan antibiyotiklerle karşılaştırılabilir hale gelmiştir (59).

2.5.3 Fosfomisine Karşı Direnç Mekanizmaları

Fosfomisinin moleküler özelliği ve etki ettiği bölgelerin farklılığı sebebiyle diğer antibiyotikler ile arasında çapraz direnç nadiren ortaya çıkmaktadır. Birçok ülkede klinik kullanımda olmasına rağmen fosfomisin direnci bakterilerde hala nadir görülmektedir (49). Direnç mekanizması en sık olarak kromozomal kaynaklı veya nadiren plazmid aracılıdır. Fosfomisin direnci 3 yol ile oluşur:

1- MurA mutasyonları

2- Fosfomisine azalmış geçirgenlik

3- Antibiyotik modifikasyonları (enzimatik inaktivasyon)

Fosfomisin, MurA enziminin 115. sistein amino asidine geri dönüşümsüz olarak bağlanmaktadır. MurA'ya fosfomisinin bağlanmasını önleyen, aktif MurA bölgesinde sistein ve aspartatın yer değiştirmesi fosfomisine direnç kazandırır (MurA mutasyon). Fosfomisin taşıyıcılarını kodlayan kromozomal *glpT* ve *uhpT* genlerindeki mutasyonlar, fosfomisin alımının engellenmesine veya azalmasına neden olur. Bakterilerin içine fosfomisinin girişini sağlayan alım sistemlerinde mutasyonlar meydana geldiğinde direnç gelişir. Ayrıca fosfomisin bakterilerde fimbriaların üretimini baskılayarak hem gram pozitif hem de gram negatif üropatojenlerin üriner

sistem epiteline yapışmasını engellemekte, antiadezif etki oluşturabilmektedir. Enzimatik inaktivasyon, fosfomisinin epoksit halkasının enzimatik bölünmesiyle ya da fosfonat grubunun fosforilasyonuyla etkisizleştirilmesine dayanmaktadır (60).

Kovalent modifikasyonlarla fosfomisini inaktive eden çeşitli metalloenzimler; fosfonatkinazlar (FomA ve FomB), tiyol transferazlar, glutatyon fosfomisin (FosA), L-sistein-fosfomisin (FosB), ATP fosfomisin (FosC) ve su-fosfomisin (FosX)'dir. Enterobacterales ve *Pseudomonas* spp. üyeleri arasında *fosA*; *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* gibi gram pozitif bakterilerde *fosB*; *Mesorhizobium loti ve Listeria monocytogenes* gibi bakterilerde ise *fosX* genleri saptanmıştır (61). *FosA* geninin *fosA2, fosA3, fosA4, fosA5, fosA6, fosA7, fosA8* gibi çeşitli homolog genleri, *E. coli* izolatlarında ve karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* suşlarında saptanmıştır. FosA3, dünya çapında en sık bulunan fosfomisin modifiye edici enzimdir (62).

GSBL üreten ve/veya karbapenemaz üreticisi olan fosfomisin dirençli *E. coli ve Klebsiella* izolatlarında *fosA3* geni sıklıkla bulunmuş ve *bla*CTX-M ile birlikteliği dikkat çekmiştir (63). *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında bulunan *fosA3*, *bla*KPC-2, *bla*CTX–M-65, *bla*SHV-12 ve *rmtB* genleri (IncR-F33:A-:B- Pkp1034 plazmidi ile taşınarak) fosfomisin, penisilin, sefalosporin ve aminoglikozitlere çoklu dirence neden olmaktadır (64). *FosA3* taşıdığı ilk bildirilen klinik *E. coli* izolatı Japonya'da 2006'da tanımlanmıştır ancak *fosA3* taşıyan ilk çevresel *E. coli* izolatı 2004 yılında Çin'deki domuzlarda tanımlanmıştır (51). Yan Jiang ve ark. 2010-2013 yılları arasında izole edilen 278 KPC tipinde karbapenemaz üreten ve 80 GSBL üreten (karbapenemaz üretmeyen) *K. pneumoniae* izolatını değerlendirmiştir. KPC üreticisi *K. pneumoniae* izolatlarındaki fosfomisin direnç oranı GSBL üreticisi *K. pneumoniae* izolatlarından yüksek olarak saptanmıştır. Ek olarak 94 KPC üreten *K. pneumoniae* izolatı *fosA3* pozitif saptanmış ve çoğu klonal olarak ilişkili bulunmuştur. Çin'de karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* izolatlarında fosfomisin direncinin yüksek oranda olmasının, *fosA3* ve *bla*KPC genlerini birlikte içeren plazmidle ilişkili olduğu saptanmıştır.

2.5.4 Fosfomisinin Etki Spektrumu

Fosfomisin, genelde alt idrar yolu enfeksiyonlarında kullanılan karakteristik farmakolojik özellikleri ile geniş spektruma sahip özgül bir antibiyotiktir. Dirençli Enterobacterales üyeleri (*E. coli, Klebsiella, Enterobacter, Proteus* gibi) MSSA, MRSA, dirençli enterokok türleri gibi birçok gram negatif ve gram pozitif mikroorganizmaya karşı bakterisidal etkilidir. Enterobacterales üyeleri gibi gram negatif bakterilere gram pozitiflerden daha etkilidir. Fosfomisin ile beta-laktamlar, aminoglikozidler, karbapenemler ve diğer bazı antibiyotiklerle kombinasyon yapılan in vitro çalışmalarda solunum, dolaşım ve üriner sistem enfeksiyonlarında sinerjistik antibakteriyel etkinliği olduğu gösterilmiştir. Fosfomisin tek başına *A. baumannii* izolatlarında etkisiz görünmektedir. *Morganella morganii* izolatlarının %80'i ve *Staphylococcus saprophyticus* izolatlarının ise %20'sinin fosfomisine karşı dirençli olduğu saptanmıştır (49). Enterobacterales izolatları genelde fosfomisine duyarlı, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* izolatları ise genelde fosfomisine dirençli olarak saptanmaktadır. (56,66). Fosfomisin-kolistin kombinasyonu kullanıldığında, monoterapi olarak kolistin kullanımına göre daha düşük bir direnç oranı gözlenmiştir (59). Bu sinerjik etki, kolistinin fosfomisinin bakterilerin içine girmesini kolaylaştırması ve böylece aktif bölgedeki fosfomisinin konsantrasyonunu arttırması nedeniyle ortaya çıkmaktadır (67). Beta-laktam antibiyotiklerinden seftolozan-tazobaktamın fosfomisin ile kombinasyonu halinde, çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde yararlı olabileceği in vitro sinerji ile gösterilmiştir. Benzer şekilde *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında fosfomisin-meropenem kombinasyonu bakterisidal etkiyi arttırmış ve dirençli mutantların ortaya çıkmasını önlemiştir (68).

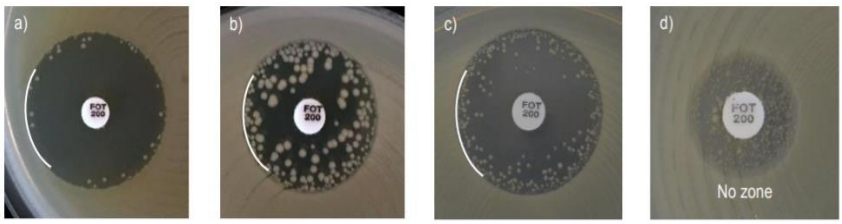
Gram pozitif mikroorganizmaların neden olduğu metisiline hassas *S. aureus* ve metisiline dirençli *S. aureus* enfeksiyonlarının zaman öldürme eğrilerinin sonuçlarını değerlendiren yakın tarihli bir derlemede, fosfomisin-daptomisin kombinasyonun çok etkili olduğu gösterilmiştir (69). Yapılan çalışmalarda dirençli enterokok türlerine karşı da fosfomisinin alternatif bir seçenek olabileceği gösterilmiştir (70).

2.6 Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri

2.6.1 Disk Difüzyon Yöntemi

Disk difüzyon yöntemi, birçok antibiyotik için düşük maliyetli, zahmetsiz, hızlı ve uygulaması basit bir yöntem olduğundan sık kullanılan bir antibiyotik duyarlılık testidir. Belirli tek bir konsantrasyondaki antimikrobiyal ajan emdirilen kurutulmuş filtre kağıdı diskleri, test organizması ile yayılan agar ortamının yüzeyine koyulur ve ilaç agarda dağılır. İlacın konsantrasyonunun inhibe edici olduğu bölgelerde, her diskin etrafında bir inhibisyon bölgesi oluşur ve bakteriyel üreme meydana gelmez. EUCAST sadece *E. coli* üriner sistem izolatları için içeriğinde 50 µg/ml G6P içeren 200 µg'lık fosfomisin trometamin diskleri ile testin yapılabileceğini belirtirken diğer bakteriler için fosfomisin disk difüzyon testini önermemektedir. CLSI ayrıca *E. faecalis* için de disk difüzyon sınır değeri belirlemiştir. Disk içeriğinde G6P bulunmayan disklerin kullanımı uygun değildir (8,9).

Fosfomisin için disk difüzyon sonucu değerlendirilirken bazı farklılıklar mevcuttur. Disk difüzyon sonuçları değerlendirilirken inhibisyon zonunun içindeki koloniler göz ardı edilmelidir. Fosfomisinin 200 µg'lık diskinde *E. coli* için inhibisyon zonu örnekleri verilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3: Fosfomisin için disk difüzyon testi. a, b, c: Fosfomisine duyarlı izolat; d: Fosfomisine dirençli izolat. Bu test *E. coli* izolatları için yapılmalı ve inhibisyon zonu içindeki üremeler dikkate alınmamalıdır.

2.6.2 Gradiyent Difüzyon Yöntemi

Gradiyent difüzyon yöntemi, agar yüzeyine yerleştirilen, antimikrobiyal madde ile doyurulmuş şeritlerden oluşur ve disk difüzyon testi ile benzer prensipleri kullanır. Antibiyotiğin düzenli olarak azalan (gradiyent) konsantrasyonları şeride uygulanır ve MİK değerleri elde edilir. Şeridin inoküle edilen besiyeri üzerine konması antibiyotiğin, şeridi çevreleyen bölgede, bir uçtaki yüksek miktardan diğer uçtaki düşük konsantrasyona doğru difüze olmasına yol açar. MİK tespit edilirken şerit etrafında oluşan inhibisyon elipsinin şerit üzerindeki ölçekle kesiştiği nokta olarak değerledirilir.

Özellikle *K. pneumoniae, E. coli* ve diğer gram negatif bakteriler için yapılan fosfomisin agar dilüsyon testi ile gradiyent difüzyon testinin karşılaştırıldığı birçok çalışmada uyumsuz sonuçlar gösterilmiştir (7). Bu yüzden EUCAST ve CLSI gradiyent testini önermemektedir (71).

2.6.3 Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Bu yöntem, antimikrobiyal ajanın bakteriyel izolata karşı in vitro aktivitesini ölçmek için kullanılır. Çeşitli konsantrasyonlarda antimikrobiyal ajanlar içeren steril plastik plaka içindeki mikrokuyucuklar, standart sayıda test bakterisi ile inoküle edilir. 35-37 °C'de bir gece inkübasyondan sonra bakterinin görünür üremesini önleyen en düşük ilaç konsantrasyonu olan MİK değeri elde edilir.

2016 yılına kadar fosfomisin için duyarlılık saptanmasında EUCAST tarafından herhangi altın standart yöntem belirtilmemiştir. EUCAST 2016 yılında fosfomisin duyarlılığının saptanmasında hem agar dilüsyon hem sıvı mikrodilüsyon testini altın standart yöntem olarak belirtmiş, 2016 yılından sonra ise G6P bileşiğinin agarda daha iyi difüze olmasından dolayı agar dilüsyon testini altın standart yöntem olarak kabul edilmiştir (8).

Hem EUCAST hem de CLSI tarafından genelde antimikrobiyaller için altın standart yöntem olarak önerilen sıvı mikrodilüsyon testinin fosfomisin için hatalı

sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Bu yüzden EUCAST ve CLSI fosfomisin için sıvı mikrodilüsyon testini önermemektedir (72)

2.6.4 Otomatize Sistemler

Otomatize sistemler işgücü tasarrufu, test standardizasyonu, tekrarlanabilirlik ve uzman yazılımlar ile daha iyi veri yönetimi sağlar ve genelde laboratuvarlar tarafından tercih edilir. Otomatize sistemlerde antibiyotik duyarlılık testleri, panel veya kartlarda bulunan mikrokuyucuklar içinde test edilen antimikrobiyal maddenin çeşitli konsantrasyonlarıyla birlikte bakteriyel üremenin saptanması yoluyla gerçekleştirilir.

EUCAST, otomatize sistemlerin fosfomisin duyarlılık sonuçlarının üretici firmanın sorumluluğunda olduğunu bildirmiştir (8).

2.6.5 Agar Dilüsyon Yöntemi

Antimikrobiyal duyarlılığının saptanmasında agar dilüsyon testi yerleşmiş bir yöntemdir. Sıvı mikrodilüsyon ile agar dilüsyon testlerinin çalışma prensipleri benzerdir. Antibiyotik, her plak farklı konsantrasyonda antibiyotik içerecek şekilde agar besiyerine karıştırılır. Böylece her plakta antibiyotiğin istenilen farklı konsantrasyonları elde edilir. İnokülumlar eş zamanlı olarak ve hızla plakların agar yüzeyine bırakılır.

Hem EUCAST hem CLSI, fosfomisin duyarlılık testi için referans yöntem olarak Mueller-Hinton agara G6P ile takviye edilmiş agar dilüsyon testini altın standart yöntem olarak önermektedir. Bununla birlikte, bu yöntem çoğu klinik mikrobiyoloji laboratuvarı için hem ciddi emek ve hem de zaman aldığından kullanımı sınırlı kalmaktadır (72).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın tasarımı, Microbiology Investigation Criteria for Reporting Objectively (MICRO) kılavuzuna uygun olarak yapılmıştır (MICRO, The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) kılavuzunun modifikasyonudur) (73,74).

Uluslararası etik kurallarına uyulmuş olup Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulundan 19.02.2020 tarihli E.6680 sayılı karar ile etik kurul onayı alınmıştır.

Araştırma, prospektif ve tanımlayıcı bir çalışma olarak planlanmıştır.

3.1 Bakteriyel İzolatlar

Çalışmaya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 01 Ağustos 2020 – 01 Mart 2021 tarihleri arasında gönderilen, çeşitli klinik örneklerden elde edilmiş GSBL üreten ve/veya karbapenem dirençli olan 323 Enterobacterales izolatı dahil edilmiştir.

Çalışma döneminde laboratuvarımıza gönderilen 2251 örnekten 2397 Enterobacterales izolatı elde edilmiş ve bunlardan 323 izolat çalışmaya dahil edilme kriterlerini karşılamıştır.

Hasta örnekleri değerlendirilirken yaş ve cinsiyet farkı gözetilmeden, tüm servis ve polikliniklerden izole edilen Enterobacterales izolatları incelenmiş, aynı hastadan tekrarlayan üremeler olduğunda sadece ilk izolat çalışmaya alınmıştır.

3.2 İzolatların Tür Tanımı

İzolatların tür tanımı matriks aracılı lazer dezorbsiyon iyonizasyon-uçuş zamanlı kütle spektrometre (MALDI-TOF MS) sistemleri Bruker Biotyper (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) ve Vitek MS (*bioMérieux*, Marcy l'Etoile, France) kullanılarak yapılmıştır. 01.08.2020 - 01.11.2020 tarihleri arasında 145

izolatın tanımlanmasında Bruker biotyper sistemi, 01.11.2020 - 01.03.2021 tarihleri arasında 178 izolatın tanımlanmasında Vitek MS sistemi kullanılmıştır.

3.3 Otomatize Sistemlerle Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık testleri 01.08.2020 - 01.11.2020 tarihleri arasında NMIC ve UNMIC panelleriyle Phoenix (Becton Dickinson, USA) sistemiyle, 20.10.2020-01.03.2021 tarihleri arasında ise AST N325 ve N327 kartlarıyla Vitek-2 (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) sistemiyle yapılmıştır. Tüm paneller/kartlar; 35,5 ± 1˚C'de cihazın inkübatöründe inkübe edilmiş ve en geç 18 saat içinde sonuç alınmıştır. Antimikrobiyal duyarlılık testleri iki tekrar halinde çalışılmış, uyumsuzluk görülen izolatlarda testler üçüncü kez tekrar edilmiştir. Duyarlılık test sonuçlarının değerlendirilmesinde EUCAST v10.0 kriterleri kullanılmıştır (8). Phoenix ve Vitek-2 sistemleri idrar izolatları için fosfomisin duyarlılık test sonucu vermektedir.

Otomatize sistemle fosfomisin duyarlılık sonucu verilmiş olan 240 idrar örneğinden izole edilen Enterobacterales izolatınının 01.08.2021 - 01.11.2020 tarihleri arasında 119'u Phoenix sistemiyle 20.10.2020 - 01.03.2021 tarihleri arasında 121'i Vitek-2 sistemiyle çalışılmıştır.

Çalışmalarda kalite kontrol amacıyla fosfomisine duyarlı olan *E. coli* ATCC 25922 suşu ile Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'ndan temin edilmiş fosfomisine dirençli bir izolat kullanılmıştır.

3.3.1 GSBL ve Karbapenemaz Tespitinde Kullanılan Yöntemler

GSBL doğrulaması için EUCAST önerileri doğrultusunda için çift disk sinerji testi yapılmıştır (20). Karbapenemaz üretiminin tespiti modifiye karbapenem inaktivasyon metodu (mCIM) testi ve/veya Carba NP testi ile yapılmıştır (20).

3.4 Agar Dilüsyon Yöntemi ile Fosfomisin Duyarlılığın Saptanması

Fosfomisin duyarlılık testi için EUCAST ve CLSI rehberlerinin referans yöntem olarak belirlediği agar dilüsyon yöntemi kullanılmış ve haftalık olarak uygulanmıştır (8,9).

3.4.1 Fosfomisin Stok ve Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması

1. İzolatların fosfomisin duyarlılıklarının belirlenmesinde fosfomisin disodyum salt hidrat (Koçak Farma, Türkiye) kullanılmıştır (Şekil 4a).

2. V= w x P / c formülü uyarınca 0,0130 gr, 993 potense sahip fosfomisin disodyum salt hidrat 2.5 ml distile su ile homojenize edilerek 5120 mg/l stok çözeltisi elde edilmiştir (V: Sulandırıcı, w: Antibiyotik ağırlığı, P: Antibiyotik potensi, c: Hedef konsantrasyon).

3. Seri dilüsyon amacıyla 10 adet tüp içerisine 1.2 ml steril distile su eklenmiş ve stok solüsyondan aynı hacimde alınıp ilk tüpe aktarılarak 2560 mg/l konsantrasyonda fosfomisin solüsyonu elde edilmiştir.

4. Son konsantrasyon tüpüne (10. tüp) kadar aynı şekilde iki kat dilüsyonlar olacak şekilde seyreltme yapılarak 5-5120 mg/l arasındaki konsantrasyonlarda fosfomisin solüsyonları elde edilmiştir.

3.4.2 Fosfomisin Agar Dilüsyon Plaklarının Hazırlanması

1. Katyon ayarlı Mueller Hinton Agar (Merck, ABD) tozundan önerilen miktarda tartılarak distile suda eritilmiş, otoklavda sterilize edildikten sonra 50-55°C'ye soğutulmuş ve içerisine 25 mg/l konsantrasyonda olacak şekilde glukoz-6-fosfat (Sigma-Aldrich, USA) ilave edilmiştir.

2. Her plağa 19 ml KA-MHA ve 1 ml antibiyotik çözeltisi eklenerek hafifçe karıştırılmış ve 0.25-256 mg/l arasında fosfomisin konsantrasyonuna sahip 11 plak hazırlanmıştır.

3. Her bir plağın altı, 20-22 adet test izolatı ve iki adet kontrol suşu olacak şekilde, çizilerek ekim alanları belirlenmiştir (Şekil 4b).

3.4.3 İzolatların Hazırlanması

1. Saf olduğu bilinen kolonilerden kanlı agara taze pasaj alınarak 35˚C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir.

2. PhoenixSpec Nephelometer (Becton Dickinson, USA) veya Densichek (BioMerieux, Fransa) optik okuyucuları kullanılarak, 4 ml serum fizyolojik çözeltisi içerisinde 0.5 McFarland bulanıklığında ($2x10^8$ KOB/ml) bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır.

3. 0,5 McFarland bulanıklığa sahip bakteri süspansiyonu ise serum fizyolojik ile 1/10 oranında seyreltilmiş ve $2x10^7$ KOB/ml bakteri süspansiyonu elde elde edilmiştir (Şekil 4c).

3.4.4 İzolatların Fosfomisin Agar Dilüsyon Plaklarına Ekimi ve Sonuçların Değerlendirilmesi

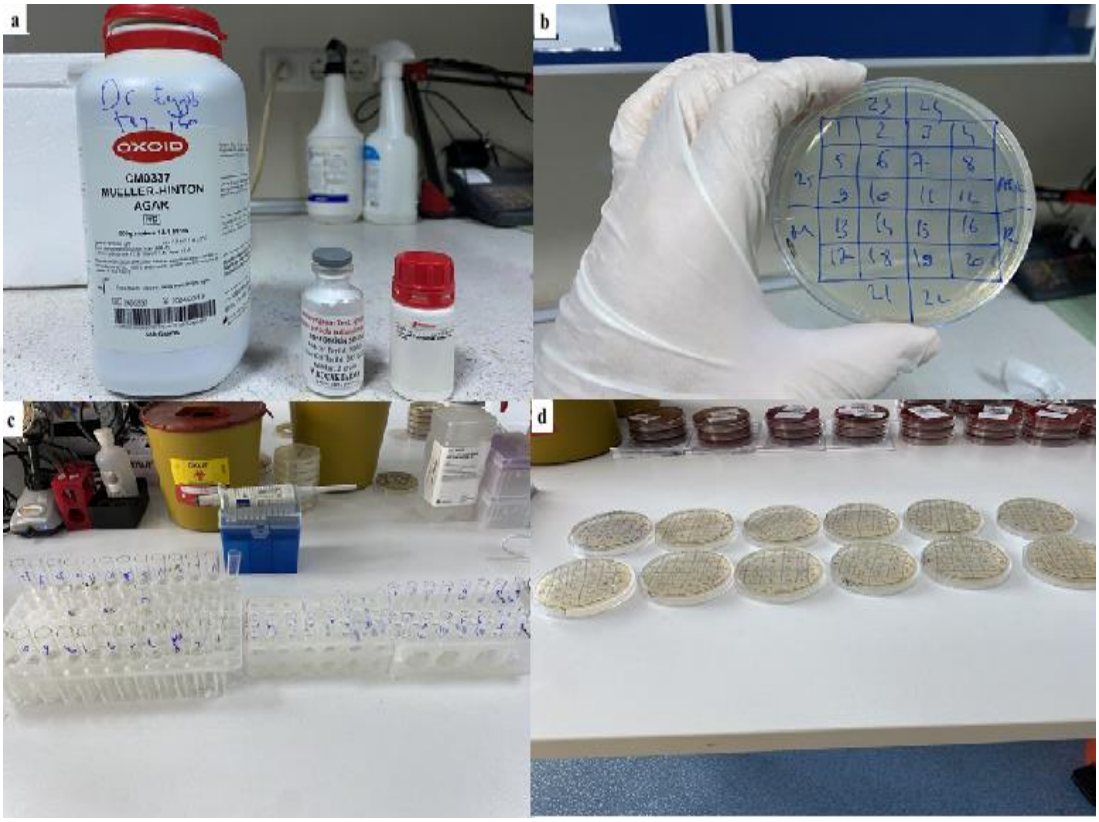
1. Ekim öncesi tüm plaklar oda ısısına getirilmiş ve agar yüzeyinin kuru olmasına dikkat edilmiştir.

2. En düşük fosfomisin konsantrasyonu içeren plaktan başlanarak belirlenen alanlara inokülüm süspansiyonundan 2 µl eklenmiş (final konsantrasyon 10^4 KOB/ml) ve plaklar 37 °C etüvde 18-24 saat inkübe edilmiştir (Şekil 4d).

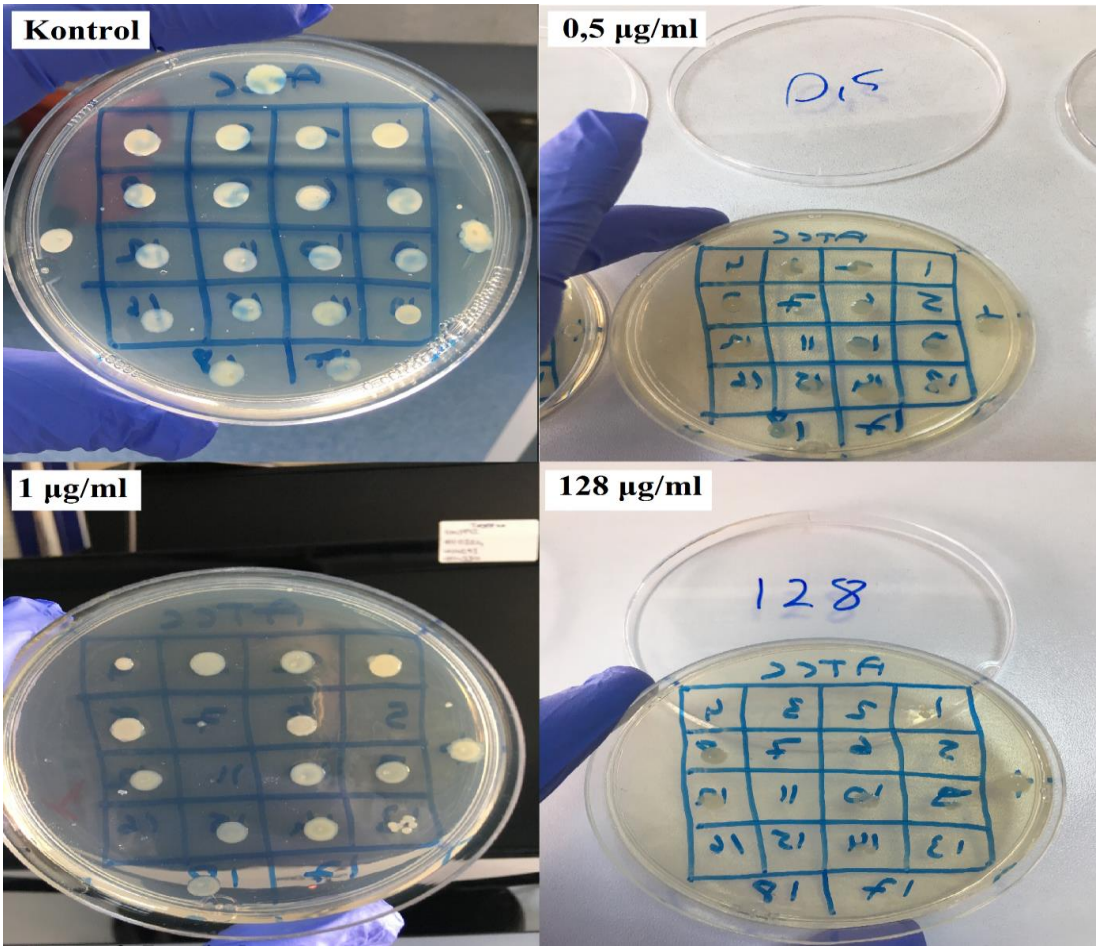
3. İnkübasyon sonunda kontrol suşlarının MİK değerlerinin beklenen aralıklarda *(E. coli* ATCC 25922 için 0,25 –2 mg/l, THSK suşu için >256) bulunması durumunda test geçerli kabul edilmiş ve plaklar değerlendirmeye alınmıştır.

4. Agar plakta ekim noktalarında gözle görülür üremeler değerlendirilmiş, küçük ve tek koloni şeklindeki üremeler ihmal edilmiştir. Üremenin olmadığı ilk plak konsantrasyonu o izolat için fosfomisin MİK değeri olarak saptanmış, sonuçlar ''Excel'' tabloları halinde kaydedilmiştir.

5. Duyarlılık kategorilerinin belirlenmesinde EUCAST v10.0'da belirtilen sınır değerleri göz önüne alınarak MİK ≤ 32 mg/l saptanan izolatlar fosfomisine duyarlı kabul edilmiştir (Şekil 5).



Şekil 4: Agar dilüsyon plaklarının hazırlanma aşamaları. a: Kullanılan malzemeler, b: Petrilerin alanlara bölünmesi, c: Stok ve çalışma solüsyonları, d: Farklı antibiyotik konsantrasyonlardaki petriler



Şekil 5: Agar dilüsyon plaklarının değerlendirilmesi.

3.4.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Direnç Genlerinin Tespiti

Fosfomisin dirençli izolatlara çeşitli fosfomisin modifiye edici enzimler (*fosA, fosA3, fosC2*) ile çeşitli GSBL enzimleri (TEM, SHV, CTX-M) ve karbapenemaz enzimlerini (OXA-48, VIM, NDM, KPC, IMP) kodlayan genlerin tespiti için Polimeraz Zincir Reaksiyonu uygulanmıştır. Fosfomisin direnç genlerinin tespiti için Sato ve ark., karbapenemaz genlerinin tespiti için Poirel ve ark. ve GSBL direnç genlerinin tespiti için Kiratisin ve ark.'ın tanımladığı yöntemler kullanılmıştır (10, 75, 76). PZR için kulanılan primerler Tablo 1'de verilmiştir. PZR çalışmaları İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1: **Direnç genlerinin tespitinde kullanılan primerler.**

Gen	Kullanılan primerler
FosA3	F- 5'-GGC ATT TTA TCA GCA GT-3' R-5'-AGA CCA TCC CCT TGT AG-3'
FosA	F-5'-ATC TGT GGG TCT GCC TGT CGT-3' R-5'-ATG CCC GCA TAG GGC TTCT-3'
FosC2	F- 5'-CGA GCC AAG ATT ACT GT-3' R-5'-AAC GAT TCC AAA CGA CT-3'
*bla*CTX-M	F-5'-TCTTCCAGAATAAGGAATCCC-3' R- 5'- CCGTTTCCGCTATTACAAAC-3'
blaTEM	F-5'-AAAATTCTTGAAGACG-3' R- 5'- TTACCAATGCTTAATCA-3'
*bla*SHV	F-5'-TTAACTCCCTGTTAGCCA-3' R- 5'- GATTTGCTGATTTCGCCC-3'
IMP	F-5'-GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC-3' R- 5'-GGTTTAAYAAAACAACCACC-3'
VIM	F-5'-GATGGTGTTTGGTCGCATA-3' R- 5'-CGAATGCGCAGCACCAG-3'
KPC	F-5'-CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG-3' R- 5'-CTTGTCATCCTTGTTAGGCG-3'
OXA-48	F-5'-GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3' R- 5'-CATCAAGTTCAACCCAACCG-3'
NDM	F-5'-GGTTTGGCGATCTGGTTTTC-3' R- 5'-CGGAATGGCTCATCACGATC-3'

3.4.6 İstatistiksel Analiz

Bir yıllık süreçte 1885 kişilik hasta evreni görülerek %5 hata payı ile %90-%99 güven seviyeleri aralığında hasta örneklem büyüklükleri hesaplanmıştır. Çalışmaya %95 güven seviyesini karşılayacak şekilde yaklaşık 320 izolat dahil edilmesi planlanmıştır.

İstatistiksel analiz için SPSS 15.0 for Windows programı kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler; kategorik değişkenler için sayı ve yüzde olarak verilmiştir. Bağımlı gruplarda oranlar McNemar Testi ile karşılaştırılmıştır. Uyumlar Kappa Değeri ile incelenmiştir. Gruplarda oranlar Ki Kare testi ile karşılaştırılmıştır. Fisher's Exact Test sonucu ile yorumlanmıştır. İstatistiksel alfa anlamlılık seviyesi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

Kategorik uyum, referans yönteme göre aynı kategori sonucunu (duyarlı, orta duyarlı, dirençli) saptayan izolatların yüzdesidir. Altın standart yöntemle karşılaştırıldığında >%90 kategorik uyum saptanması halinde uyumlu kabul edilmiştir. Kategorik olarak uyumsuz saptanan izolatlardaki hata tanımlaması şu şekilde yapılmıştır:

Çok büyük hata (ÇBH) otomatize sistemde yanlış duyarlı olarak saptanan izolat; büyük hata (BH) otomatize sistemde yanlış dirençli olarak saptanan izolat; küçük hata (KH) bir sistemde orta duyarlı olarak saptanan izolatın diğer sistemde duyarlı ya da dirençli saptanmasıdır. Değerlendirmede FDA'da belirtilen ÇBH, BH veya KH kabul edilebilir hata oranları sırasıyla ≤ %1.5, ≤ %3 ve ≤ %10 olarak kabul edilmiştir (68).

4. BULGULAR

4.1 Bakteriyel İzolatlar

S.B.Ü. Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 01 Ağustos 2020 - 01 Mart 2021 tarihleri arasında gönderilen 2252 örnekte üreyen 2397 Enterobacterales izolatı değerlendirilmiştir. Bunlardan 323 Enterobacterales izolatı çalışmaya dahil edilme kriterlerini karşılamıştır. Enterobacterales izolatları için GSBL oranı %24,4 ve CRE oranı %11,6 olarak saptanmıştır. Yoğun bakım izolatları söz konusu olduğunda bu oranlar GSBL için %42,7 ve CRE için %25,2'e yükselmiştir. Çalışmaya dahil edilen izolatların elde edildiği örneklerin dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir. İzolatların 170'i (%52,6) kadın, 153'ü (%47,4) erkek hastalardan elde edilmiştir. Hastaların yaş ortalaması 17,9 yıl, yaş aralığı ise 0-92 yıl olarak saptanmıştır. İzolatların kliniklere göre dağılımı Tablo 2' de gösterilmiştir.

Tablo 2: **İzolatların elde edildiği örneklerin dağılımı.**

Klinik Örnek	n	%
Apse	10	3,1
Biyopsi	5	1,5
Steril Vücut Sıvısı	2	0,6
İdrar	240	74,3
Kan-kateter	25	7,7
Yara	14	4,3
Trakeal	27	8,4
Toplam	**323**	**100**

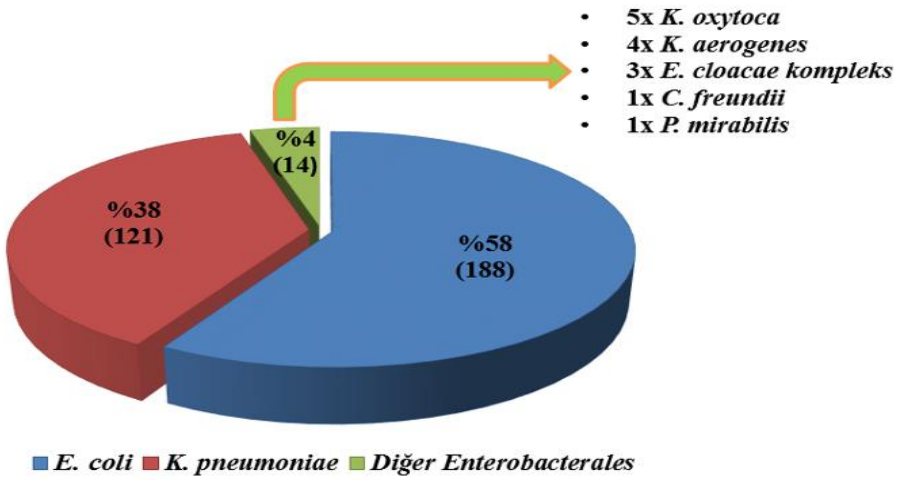
Tablo 3: İzolatların kliniklere göre dağılımı.

Bölümler	n	%
Dahili klinikleri	48	14,9
Cerrahi klinikleri	18	5,6
Acil servis	50	15,5
Yoğun bakımlar	66	20,4
Poliklinikler	141	43,6
Toplam	**323**	**100**

4.2 İzolatların Tür Tanımı

Çalışmaya dahil edilen 323 Enterobacterales izolatının 188'i *E. coli*, 121'i *K. pneumoniae*, beşi *K. oxytoca*, dördü *K. aerogenes*, üçü *E. cloacae* kompleks, biri *C. freundii*, biri *P. mirabilis* olarak tanımlanmıştır. Çalışmadaki izolatların tür dağılımı yüzdeleri Şekil 7'de, direnç profilleri Tablo 4'te gösterilmiştir.

Otomatize sistem ile izolatların 14'ü CRE, 46'sı ise CRE+GSBL olarak değerlendirilmiş ve toplam 60 CRE izolatın 51'inde (%85) CIM ve/veya Karba NP ile karbapenemaz varlığı gösterilmiştir. Karbapenem dirençli tüm izolatların karbapenem direnci disk difüzyon yöntemi ile doğrulanmıştır.



Şekil 6: İzolatların tür dağılım yüzdesi (sayı) .

Tablo 4: İzolatların direnç profilleri

	E. coli	*K. pneumoniae*	Diğer Enterobacterales	Toplam
GSBL	182	72	9	263
KDE	1	9	4	14
GSBL+KDE	5	40	1	46
Toplam	188	121	14	323

4.3 Otomatize Sistemler ile Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 323 Enterobacterales üyesi izolatın otomatize sistemlerle yapılan antibiyotik duyarlılık test sonuçları Tablo 5' de gösterilmiştir. *E. coli* ve *K. pneumoniae* için duyarlılık test sonuçları sırasıyla Tablo 6 ve Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 5: Tüm izolatların otomatize sistemler ile elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları.

Antibiyotik (n)	Duyarlı n (%)	Orta n (%)	Dirençli n (%)
Amikasin (323)	268 (%83)	19 (%5,9)	36 (%11,1)
Gentamisin (320)	206 (%64,4)	3 (%0,9)	111 (%34,7)
Seftazidim (307)	9 (%2,9)	18 (%5,9)	280 (%91.2)
Seftriakson (312)	24 (%7,7)	1 (%0,3)	287 (%92)
Meropenem (318)	274 (%86,2)	1 (%0,3)	43 (%13,5)
Siprofloksasin (323)	65 (%20,1)	29 (%9)	229 (%70,9)
Nitrofurantoin (216)	179 (%82,9)	-	37 (%17,1)
Trimetoprim / Sulfametoksazol (303)	113 (%37,3)	1 (%0,3)	189 (%62,4)
Ertapenem (322)	257 (%79.8)	-	65 (%20,2)
Piperasilin / Tazobaktam (310)	154 (%49,7)	19 (%6,1)	137 (%44,2)
İmipenem (321)	272 (%84,7)	9 (%2,8)	40 (%12,5)
Fosfomisin (240)	217 (%90,4)	-	23 (%9,6)

Tablo 6: ***E. coli*** **izolatlarının otomatize sistemler ile elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları.**

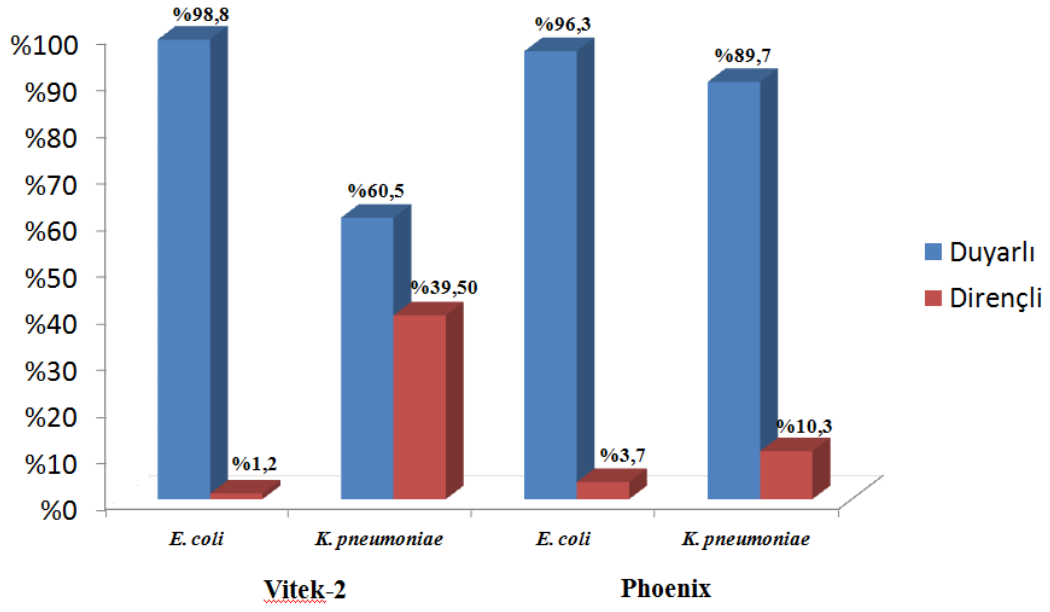
Antibiyotik (n)	**Duyarlı n(%)**	**Orta n(%)**	**Dirençli n(%)**
Amikasin (188)	172 (%91,5)	12 (%6,4)	4 (%2,1)
Gentamisin (187)	130 (%69,5)	1 (%0,5)	56 (%29,9)
Seftazidim (177)	5 (%2,8)	13 (%7,3)	159 (%89,8)
Seftriakson (180)	16 (%8,9)	-	164 (%91,1)
Meropenem (187)	185 (%98,9)	-	2 (%1,1)
Siprofloksasin (188)	40 (%21,2)	20 (%10,6)	128 (%68,1)
Nitrofurantoin (168)	155 (%92,3)	-	13 (%7,7)
Trimetoprim / Sulfametoksazol (179)	74 (%41,3)	1 (%0,6)	104 (%58,1)
Ertapenem (187)	181 (%96,8)	-	6 (%3,2)
Piperasilin / Tazobaktam (175)	83 (%47,4)	12 (%6,9)	80 (%45,7)
İmipenem (187)	184 (%98,3)	1 (%0,5)	2 (%1,1)
Fosfomisin (163)	159 (%97,5)	-	4 (%2,5)

Tablo 7: *K. pneumoniae* izolatlarının otomatize sistemler ile elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları.

Antibiyotik (n)	Duyarlı n (%)	Orta n (%)	Dirençli n (%)
Amikasin (121)	83 (%68,6)	7 (%5,8)	31 (%25,6)
Gentamisin (119)	67 (%56,3)	2 (%1,7)	50 (%42)
Seftazidim (116)	4 (%3,4)	4 (%3,4)	108 (%93,1)
Seftriakson (118)	8 (%6,8)	1 (%0,9)	109 (%92,3)
Meropenem (121)	77 (%63,6)	4 (%3,3)	40 (%33)
Siprofloksasin (121)	19 (%15,7)	9 (%7,4)	93 (%76,9)
Nitrofurantoin (45)	21 (%46,7)	-	24 (%53,3)
Trimetoprim / Sulfametoksazol (113)	37 (%32,7)	1 (%0,9)	75 (%66,3)
Ertapenem (121)	64 (%52,9)	-	57 (%47,1)
Piperasilin / Tazobaktam (121)	65 (%53,7)	5 (%4,1)	51 (%42,1)
İmipenem (121)	77 (%63,6)	7 (%5,8)	37 (%30,6)
Fosfomisin (77)	58 (%75,3)	-	19 (%24,7)

4.3.1 Otomatize Sistemler ile Fosfomisin Duyarlılık Sonuçları

Vitek-2 sistemiyle 81 *E. coli* izolatının 80'i duyarlı ve 1'i dirençli saptanırken, *K. pneumoniae* izolatlarında ise 38 izolattan 23'ü duyarlı ve 15'i dirençli olarak saptanmıştır. Phoenix sistemiyle 82 *E. coli* izolatının 79'u duyarlı ve 3'ü dirençli olarak saptanırken, *K. pneumoniae* izolatlarında ise 39 izolattan 35'i duyarlı ve 4'ü dirençli olarak saptanmıştır. Otomatize sistemlerle elde edilen fosfomisin duyarlılık oranları Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7: *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatları için otomatize sistemlerle elde edilen fosfomisine duyarlılık oranları

4.4 Agar Dilüsyon Yöntemiyle Fosfomisin Duyarlılık Sonuçları

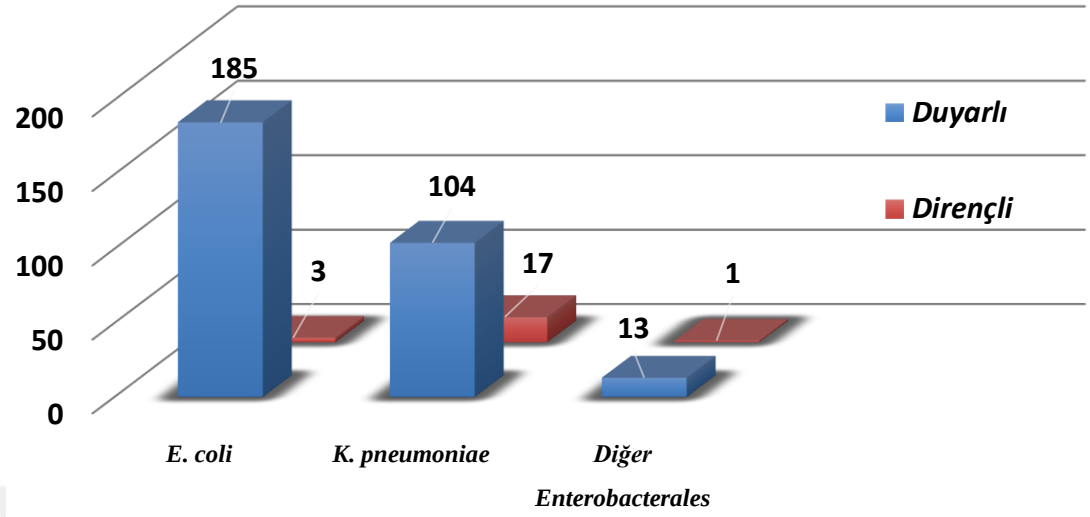
Agar dilüsyon yöntemi ile tüm Enterobacterales izolatlarında fosfomisine duyarlılık oranı %93.5 iken, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve diğer Enterobacterales izolatları için sırasıyla %98,4, %86 ve %92,9 olarak belirlenmiştir (Şekil 8). Enterobacterales izolatlarının agar dilüsyon yöntemiyle elde edilen fosfomisin MİK dağılımları Tablo 8'de gösterilmiştir. *K. pneumoniae* izolatlarında MİK50-MİK90 değerleri diğer türlere göre daha yüksek bulunmuştur.

Direnç paternlerine göre değerlendirildiğinde, GSBL üreten 263 Enterobacterales izolatından 249'u (%94,7) agar dilüsyon yöntemiyle fosfomisine duyarlı olarak saptanmıştır. Dirençli izolatların, 10'u *K. pneumoniae*, üçü *E. coli* ve biri *K. oxytoca*'dır. CRE+GSBL pozitif 46 Enterobacterales izolatından 39'u (%84,7) agar dilüsyon yöntemiyle fosfomisine duyarlı olarak saptanmıştır. Dirençli yedi izolatın tamamı *K. pneumoniae'*dır. Sonuçta 60 CRE izolatının 53'ü (%88,3) agar dilüsyon yöntemiyle fosfomisine duyarlıdır.

İdrar ve idrar dışı izolatların duyarlılık oranları değerlendirildiğinde 240 idrar örneğinden elde edilen izolatların agar dilüsyon ile fosfomisin duyarlılığı %93 (223/240), 83 idrar dışı örnekten elde edilen izolatların agar dilüsyon ile fosfomisin duyarlılığı %95,2 (79/83) olarak saptanmıştır.

Tablo 8: **İzolatların agar dilüsyon yöntemiyle tespit edilen fosfomisin MİK dağılımı.**

Fosfomisin MİK (µg/ml)		**Duyarlı**									**Dirençli**				**MİK50-90**	
Tür (n)		**<0.25**	**0.25**	**0.5**	**1**	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**128**	**256**	**>256**	**MİK 50**	**MİK 90**
***E. coli* (188)**	**n**	65	16	44	23	21	8	4	1	3	1	2	0	0	0,5	2
***K. pneumoniae* (121)**		0	0	2	2	6	21	41	17	15	2	3	5	7	8	128
Diğer Enterobacterales (14)		0	0	0	1	2	1	3	3	3	1	0	0	0	8	32



Şekil 8: *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarının agar dilüsyon yöntemiyle belirlenen fosfomisine duyarlı-dirençli izolat sayısı.

4.5 Otomatize Sistemler ile Fosfomisin Duyarlılık Sonuçlarının Agar Dilüsyon Testi Sonuçlarıyla Karşılaştırılması

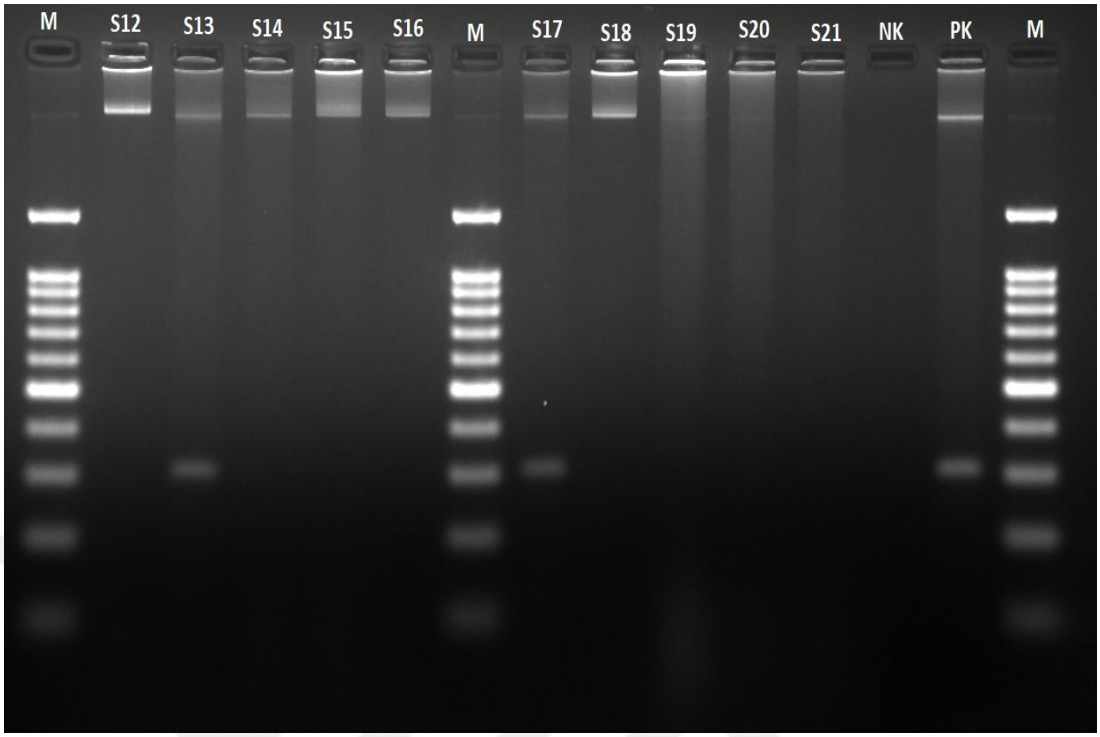
İdrar örneklerinden elde edilen 240 Enterobacterales izolatı için otomatize sistem fosfomisin duyarlılık test sonuçlarında çok büyük hata (ÇBH) saptanmamıştır. *E. coli* izolatları için Phoenix otomatize sistemiyle %1,3 oranında büyük hata (BH) saptanırken, Vitek-2 otomatize sistemiyle BH saptanmamış; *K. pneumoniae* izolatları için ise Phoenix otomatize sistemiyle %5,4, Vitek-2 otomatize sistemiyle %12 oranında BH saptanmıştır (Tablo 9). Otomatize sistemlerle (Phoenix ve Vitek-2) yapılan fosfomisin duyarlılık testinde büyük hata oranları *E. coli* için kabul edilebilir düzeyde iken, *K. pneumoniae* için yüksek bulunmuştur. *E. coli* ve *K. pneumoniae* için Phoenix ve Vitek-2 otomatize sistemlerinde saptanan fosfomisin duyarlılıkları arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 9: Otomatize sistemlerin fosfomisin duyarlılık sonuçlarının altın standart yöntem duyarlılık sonuçları ile kaşılaştırılması.

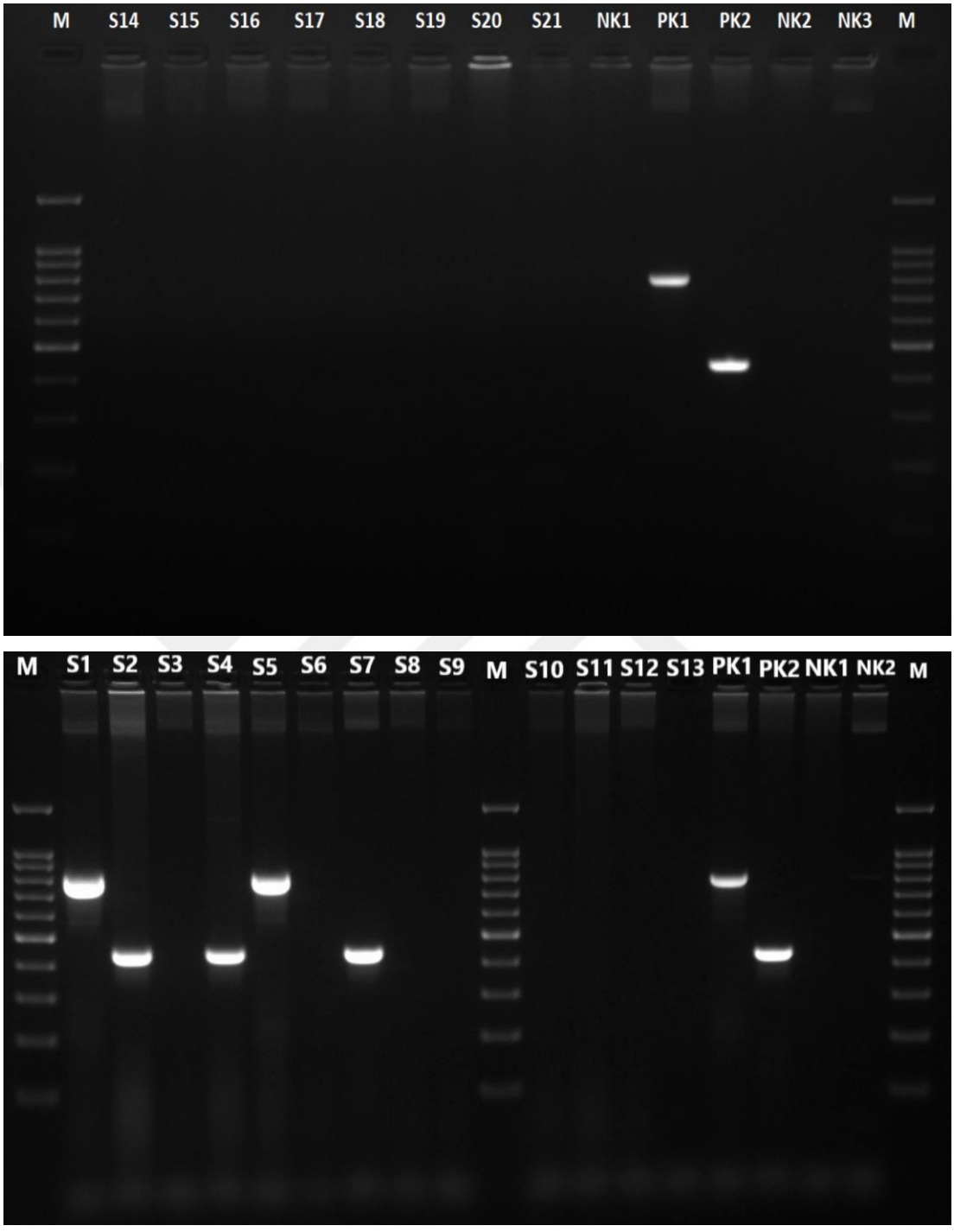
İzolat	Metot	n	Kategorik Uyum	Büyük Hata (BH)	Çok Büyük Hata (ÇBH)	Doğruluk
E. coli	**Phoenix**	82	%98,8 (81/82)	%1,3 (1/80)	%0 (0/2)	98,8% κ:0,794
	Vitek-2	81	%100 (81/81)	%0 (0/80)	%0 (0/1)	%100 κ:1,000
K. pneumoniae	**Phoenix**	39	% 94,8 (37/39)	%5,4 (2/37)	%0 (0/2)	%94,9 κ:0.642
	Vitek-2	38	%92,1 (35/38)	%12 (3/25)	% 0 (0/13)	%92,1 κ:0.834

4.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları

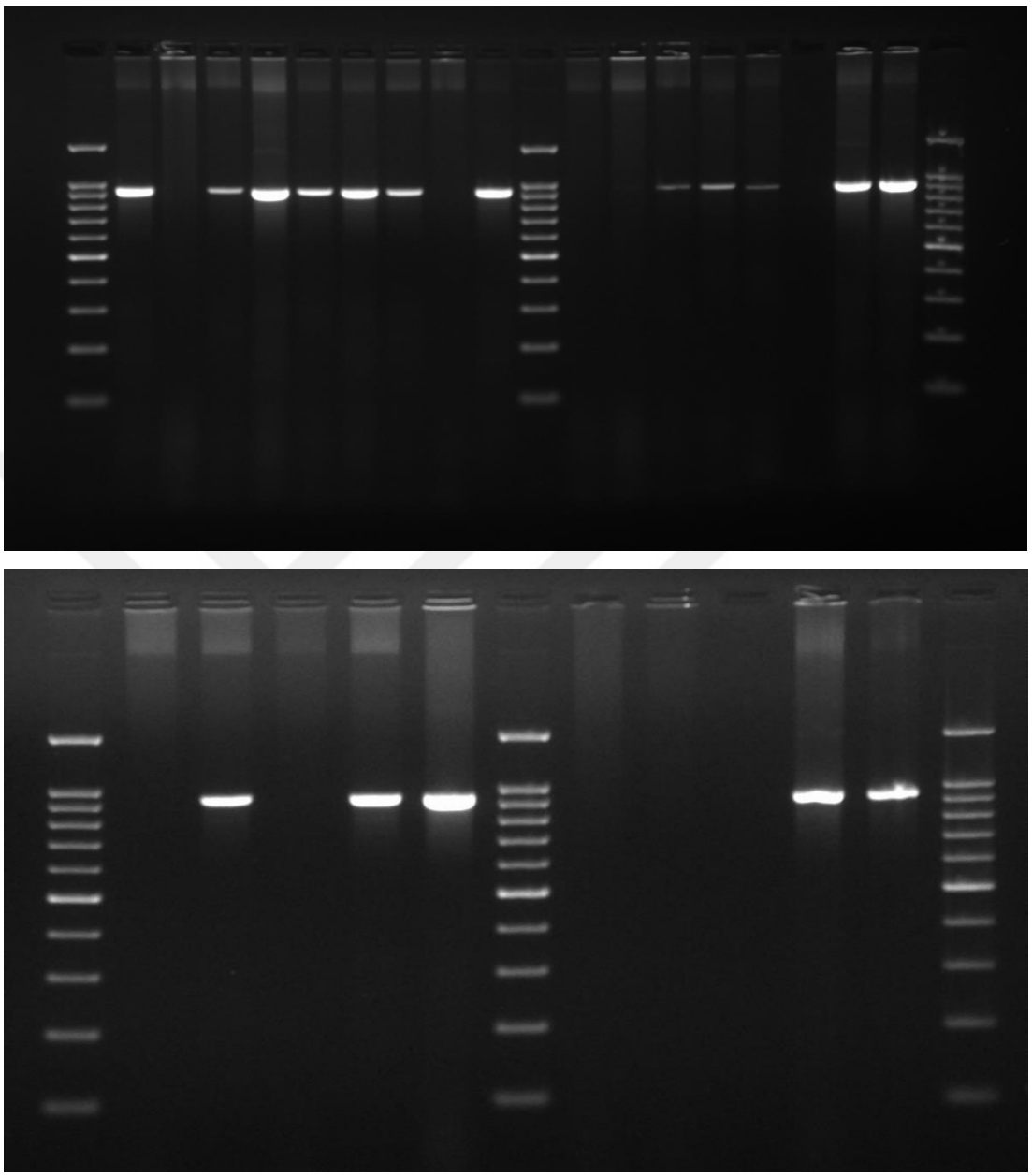
Referans yöntem olan agar dilüsyon ile fosfomisine dirençli olduğu saptanan 21 izolat arasından bir *K. pneumoniae* ve bir *K. oxytoca* izolatında *fosA* direnç geni saptanmıştır. *K. pneumoniae* (MİK: 128 µg/ml) izolatı idrardan izole edilirken, *K. oxytoca* (MİK: 64 µg/ml) izolatı biyopsi örneğinden izole edilmiş ve her iki izolatın da GSBL olduğu görülmüştür. İzolatların hiçbirinde *fosA3* ve *fosC2* geni tespit edilmemiştir. *FosA* direnç geni saptanan izolatların agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 9'da verilmiştir. Karbapenemaz kodlayan genlerin tespiti için yapılan PZR sonrasında; üç *K. pneumoniae* izolatında OXA-48, iki *K. pneumoniae* izolatında ise KPC geni saptanmıştır; PZR sonuçları Şekil 10'da gösterilmiştir. GSBL kodlayan genlerin tespiti için yapılan PZR sonrasında; 5 izolatta *bla*CTX-M, 3 izolatta *bla*TEM ve 10 izolatta *bla*TEM+ *bla*CTX-M genleri tespit edilmiştir; PZR sonuçları Şekil 11 ve Şekil 12'de gösterilmiştir. Fosfomisin dirençli 21 izolatın fenotipik ve genotipik özellikleri Tablo 10'da gösterilmiştir.



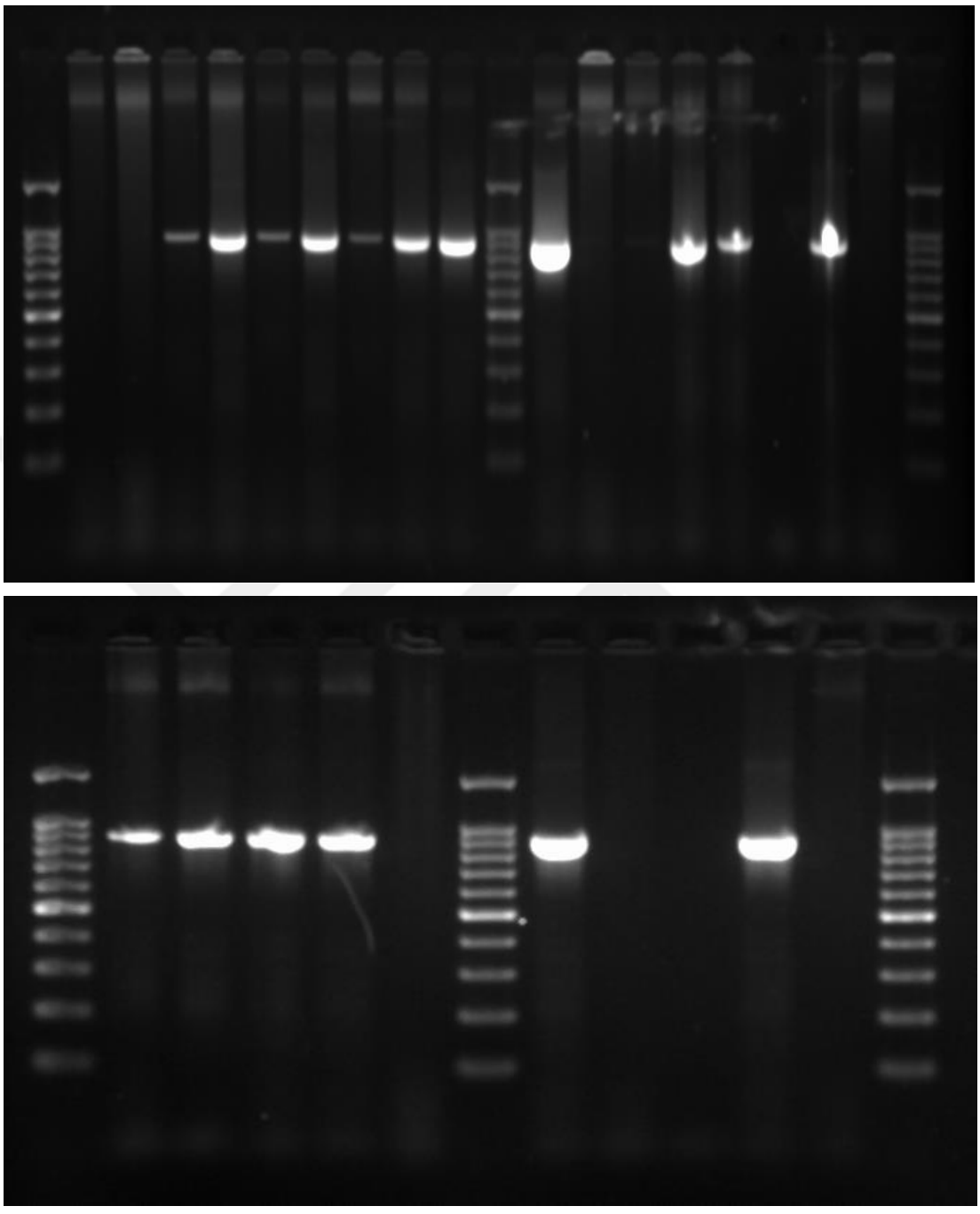
Şekil 9: *FosA* direnç geni saptanan izolatların agaroz jel elektroforez görüntüsü. S13 ve S17 numaralı bölgede *fosA* geni pozitif saptanmıştır.



Şekil 10: OXA-48 *ve* KPC karbapenemazının varlığını gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü. S1 ve S5 bölesinde KPC; S2, S4, S7 bölgesinde OXA-48 pozitifliği saptanmıştır.



Şekil 11: *bla*TEM PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. 13 izolatta *bla*TEM varlığı saptanmıştır.



Şekil 12: *bla*CTX-M PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. 15 izolatta *bla*CTX-M varlığı saptanmıştır.

Tablo 10: Fosfomisin dirençli 21 izolatın fenotipik ve genotipik özellikleri.

İZOLAT NO	ORGANIZMA	DİRENÇ PROFİLİ	CARBA NP	GSBL GENİ	KARBAPENAMAZ GENİ	FOSFOMİSİN DİRENÇ GENİ	MATERYAL
1	*K. pneumoniae*	CRE/GSBL	+	TEM	**KPC**		KAN
2	*K. pneumoniae*	CRE/GSBL	+		**OXA-48**		TRAKEA
3	*K. pneumoniae*	CRE/GSBL	-	TEM+CTX-M			İDRAR
4	*K. pneumoniae*	CRE/GSBL	+	TEM+CTX-M	**OXA-48**		İDRAR
5	*K. pneumoniae*	CRE/GSBL	+	TEM+CTX-M	**KPC**		İDRAR
6	*K. pneumoniae*	CRE/GSBL	-	TEM+CTX-M			İDRAR
7	*K. pneumoniae*	CRE/GSBL	+	TEM+CTX-M	**OXA-48**		YARA
8	*K. pneumoniae*	GSBL		CTX-M			İDRAR
9	*K. pneumoniae*	GSBL		TEM+CTX-M			İDRAR
10	*K. pneumoniae*	GSBL		CTX-M			İDRAR
11	*K. pneumoniae*	GSBL					İDRAR
12	*K. pneumoniae*	GSBL		TEM			İDRAR
13	***K. pneumoniae***	**GSBL**		**TEM+CTX-M**		***FosA***	**İDRAR**
14	*K. pneumoniae*	GSBL		TEM+CTX-M			İDRAR
15	*K. pneumoniae*	GSBL		CTX-M			İDRAR
16	*K. pneumoniae*	GSBL		TEM+CTX-M			İDRAR
17	***K.oxytoca***	**GSBL**		**CTX-M**		***FosA***	**BİOPSİ**
18	*K. pneumoniae*	GSBL		TEM+CTX-M			İDRAR
19	*Escherichia coli*	GSBL		TEM			İDRAR
20	*Escherichia coli*	GSBL		CTX-M			İDRAR
21	*Escherichia coli*	GSBL					İDRAR

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, GSBL üreten ve/veya karbapenem dirençli 323 Enterobacterales izolatının fosfomisin duyarlılığı altın standart yöntem ile oldukça yüksek (%93,5) olarak saptanmıştır. Otomatize sistemlerle yapılan fosfomisin duyarlılık testinde büyük hata oranları *E. coli* için kabul edilebilir düzeyde iken (Vitek-2: %0, Phoenix: 1,3). *K. pneumoniae* için yüksek bulunmuştur (Vitek-2: %12, Phoenix: %5,4). Fosfomisin dirençli 21 izolatın ikisinde *fosA* geni bulunmuş ve *fosA* ile blaCTX-M ve blaCTX-M+blaTEM birlikteliği saptanmıştır.

Gram negatif bakteriler sahip oldukları beta laktamaz, AmpC sefalosporinaz ve karbapenemaz enzimleriyle antibiyotiklere yüksek oranda direnç geliştirmektedir (77). Özellikle GSBL üreten bakterilerin sayısı son yıllarda oldukça artış göstermiştir. Birçok GSBL üreten Enterobacterales üyesi aynı zamanda amioglikozidler, trimetoprim ve kinolonlar gibi diğer antimikrobiyal ajanlara karşı da dirençlidir. GSBL enzimlerini kodlayan genler plazmidler yoluyla kolayca taşındığından ciddi bir antibiyotik yönetimi sorunu oluşturur (78). ÇİD patojenlerin yakın zamanda yaygınlaşmasının sonucu olarak artan karbapenem kullanımı nedeniyle karbapenem direncinin dünya çapında arttığı görülmektedir (79). Karbapenemaz üreten çeşitli Enterobacterales izolatları ile gelişen enfeksiyonların oldukça mortal seyretmesi (%40-50) ve plazmidler yoluyla hastadan hastaya yayılım olabilmesi de hastane enfeksiyonları açısından önemli sorun teşkil etmektedir (79). Avrupa Antimikrobiyal Direnç Gözetim Ağı (EARS-net) verilerine göre 2015 yılında yayınlanan sürveyans raporlarına göre, klinik *E. coli* izolatlarının %26,8'i ve *K. pneumoniae* izolatlarının %70,7'si 3. kuşak sefalosporinlere direnç göstermiştir. *K. pneumoniae* için, 2017 yılında EARS-Net tarafından elde edilen verilerde karbapenem direnci ülkere göre %0 - %64.7 arasında değişkenlik göstermekteyken, *E. coli* için bu oran %0 - %1.6 arasındadır (80). Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Ağı (UAMDS)'nın dahil olduğu Orta Asya ve Doğu Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Ağı (CAESAR) 2018 verilerine göre Türkiye'de kan ve beyin omurilik sıvısında (BOS) üreyen *E. coli* ve *K. pneumoniae* için sefotaksim/seftriakson dirençli izolat oranı sırasıyla %52 ve

%71 olarak saptanmıştır. Yine aynı verilere göre imipenem/meropenem veya ertapenem dirençli *E. coli* oranı %3-9 iken *K. pneumoniae*'da bu oran %39-51 arasındadır (81). Çalışma döneminde hastanemizde Enterobacterales izolatları için GSBL oranı % 24,4 ve CRE oranı ise %11,6 oranında saptanmıştır. Yoğun bakım izolatları söz konusu olduğunda bu oranlar GSBL için %42,7 ve CRE için %25,2'e yükselmiştir. Bölgemizde ve hastanemizde de çoklu ilaca dirençli bakteriler önemli bir problem olup yeni tedavi seçeneklerine ihtiyaç vardır.

Günümüzde, karbapenem dirençli Enterobacterales üyelerinin tedavisinde kullanım potansiyeli olan antibiyotik seçenekleri oldukça kısıtlıdır ve tedavinin temel dayanaklarını aminoglikozidler, polimiksinler ve tigesiklin gibi antibiyotikler oluşturmaktadır. CRE enfeksiyonlarında kullanılabilecek yeni ve etkin tedavi rejimlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan çalışmalarda CRE'ye karşı yeni nesil bir aminoglikozit olan plazomisin ve bir tetrasiklin sınıfı antibakteriyel olan eravasiklinin, KPC ve OXA-48 üreticilerine karşı seftazidim/avibaktamın, KPC üreticilerine karşı meropenem/vaborbaktamın in vitro olarak etkinliği gösterilmiştir (82). Bu yeni antibiyotikler için CRE tedavisine yönelik doğrudan kanıtlar hala eksik olmasına rağmen, CRE enfeksiyonları için ek terapötik seçenekler sunmaktadır (82). Yeni antibiyotik keşfinin maliyetli ve zaman alıcı olması, klinik verilerin yeterli olmaması fosfomisin gibi direnç oranı düşük kalmış antibiyotiklere ve kombinasyon tedavilerine ilgiyi arttırmıştır (83,84). Fosfomisinin birçok antibiyotikle in vitro olarak sinerjistik etkisi kanıtlanmıştır (84). Grabein ve ark.'nın yayınladığı bir metaanalizde 5527 hastada intravenöz fosfomisin ile ilgili 128 çalışma değerlendirilmiştir. MDR bakterilerin neden olduğu sepsis, üriner sistem, BOS, kemik ve solunum yolu enfeksiyonlarında güvenilir ve tedavide etkin bir seçenek olduğu sonucuna varılmıştır (85). Liao ve ark.'nın 2017 yılında 104 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatı saptanan hastalar ile yaptığı fosfomisin kombinasyon tedavisi çalışmalarında fosfomisin kombinasyonlarının sağ kalım sürelerinin artmasıyla ilişkili olduğu saptanmıştır. Mukherjee ve ark. kolistine dirençli Enterobacterales ile enfekte kritik hastalarda en son çare olarak fosfomisin-kolistin kombinasyonun kullanılabileceğini

bildirmiştir (86). Fosfomisinin tedavi seçeneği olarak kullanımının mümkün olması için fosfomisin duyarlılık sonuçlarının elde edilmesi önemlidir.

Fosfomisin duyarlılığı; Van den Bijllaardt ve ark.'ın Hollanda'da 2016-2017 yılları arasında gerçekleştirdiği, 775 *E. coli* ve 201 *K. pneumoniae* izolatını kapsayan çalışmasında *E. coli* için %95,9, *K. pneumoniae* için %87,6 oranında; Karlowsky ve ark.'ın 554 *E. coli* izolatı ile yaptığı araştırmasında ise %98,4 oranında bildirilmiştir (7,87). Karbapenem dirençli ve/veya GSBL üreticisi *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında fosfomisin duyarlılığını araştıran çeşitli çalışmalar da mevcuttur. April ve ark., 85 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* ve 35 GSBL üreticisi *E. coli* izolatı için fosfomisin duyarlılığı araştırmış, *E. coli* için %88,6, *K. pneumoniae* için %76 oranında fosfomisin duyarlılığı bildirmiştir (88). Kaase ve ark.'nın Almanya'da 2009-2011 yılları arasında, karbapenem dirençli 24 *E. coli* ve 50 *K. pneumoniae* izolatını incelediği çok merkezli bir çalışmada, fosfomisin duyarlılığı %78 olarak saptanmıştır (89). Camarlinghi ve ark.'nın 2018 yılında yayınlanan araştırmasında 78 KPC-*K. pneumoniae* izolatında %57,7 oranında fosfomisin duyarlılığı bildirilmiştir (90).

Ülkemizde fosfomisin duyarlılığını altın standart agar dilüsyon ile belirleyen sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda farklı oranlar bildirilmiştir. Akpınar ve ark.'nın İstanbul'da 2020'de üriner sistem örneklerinden elde edilen izolatlar ile yaptığı çalışmada 56 *E. coli* izolatının %85,7'sini, 44 *K. pneumoniae* izolatının %75'ini fosfomisine duyarlı olarak bulunmuşken; Nigiz ve ark. 2020 yılında yatan hastaların idrar örneklerinden elde edilen 300 *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatında fosfomisin duyarlılığını %93,3 olarak saptamıştır (61,91). Süzük ve ark.'nın 2018 yılında çeşitli klinik örneklerden elde ettikleri çoğunluğu OXA-48 karbapenemaz üreticisi olan ÇİD Enterobacterales izolatları ile yaptığı çalışmada fosfomisin duyarlılığını %32,65 olarak belirlemişlerdir (25). GSBL üreten ve/veya karbapenem dirençli Enterobacterales izolatları ile gerçekleştirilen çalışmamızda fosfomisin duyarlılık oranları *E. coli* izolatları için %98,4, *K. pneumoniae* izolatları için ise %86 oranında saptanmış olup duyarlılık oranının oldukça yüksek olduğu görülmüştür.

Fosfomisin duyarlılık testleri diğer bakterilerden farklı bazı özelliklere sahiptir. Fosfomisinin antibakteriyel aktivitesi, 1- α gliserofosfat taşıma sistemi ve glukoz-6-fosfat varlığını içeren heksoz monofosfat sistemleri ile bakteri hücresine taşınmasına bağlıdır. Bu nedenle in vitro fosfomisinin antibakteriyel aktivitesi, MİK belirlemek için ortama glikoz-6-fosfat eklenmesini gerektirir (56). EUCAST v10.0 ve CLSI, duyarlılık saptanmasında birçok bakteri için altın standart olarak önerdiği sıvı mikrodilüsyon testi yerine fosfomisin için (glukoz-6-fosfat eklenen Mueller Hinton agar ile) agar dilüsyon testini önermektedir. Fakat zaman alıcı ve emek yoğun olması nedeniyle bu yöntem rutin uygulamada çoğunlukla yer almamakta, bu durum fosfomisinin diğer antibiyotiklerle beraber raporlanmasını ve klinik kullanımını sınırlandırmaktadır. Rutin laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan disk difüzyon ve gradiyent testleri ise fosfomisin inhibisyon zonunda kolonilerin oluşması nedeniyle sonuçların değerlendirilmesi ve raporlanmasında belirsizlikler barındırmaktadır.

Otomatize sistemler laboratuvarlarda iş yükünü azaltmaları, tekrarlanabilirliklerinin yüksek olması, uzman sistem analizi ile veri yönetimi sağlaması gibi avantajları nedeniyle sık kullanılan yöntemlerdir. Otomatize sistemlerin fosfomisin duyarlılık sonuçları ile agar dilüsyon testinin uyumunu araştıran sınırlı sayıda çalışma mevcut olup bu çalışmalarda iki yöntem arasında uyumsuz sonuçlar olduğu bildirilmiştir (7,90). April ve ark. otomatize sistemler ile elde edilen fosfomisin duyarlılık sonuçlarını altın standart yöntem ile karşılaştırdığında Vitek-2 ve Phoenix sistemleriyle *E. coli* için kategorik uyumu sırasıyla %80 ve %94, *K. pneumoniae* için ise %84 ve %98 olarak bildirmişlerdir. Ayrıca *E. coli* için çok büyük hata saptanmamışken *K. pneumoniae* izolatlarında %2 oranında çok büyük hata saptanmıştır (88). Van den Bijllaardt ve ark.'nın araştırmasında ise Vitek-2 ve Phoenix otomatize sistemlerinin kategorik uyumu *E. coli* için sırasıyla %99, %99,5; *K. pneumoniae* için sırasıyla %94,5, %93 olarak bulunmuştur. Aynı araştırmada *E. coli* için Vitek-2 sisteminde %18,8 ve Phoenix sisteminde %12,5; *K. pneumoniae* izolatları için Vitek-2 sisteminde %16 ve Phoenix sisteminde %12 oranında çok büyük hata tespit edilmiştir (7). Camarlinghi ve ark. Karbapenem dirençli *K. pneumoniae*

izolatlarının fosfomisin duyarlılık tespitinde Vitek-2 otomatize sistemi için %52,6 kategorik uyum, %9,1 çok büyük hata bildirmiştir (90). Akpınar ve ark., Vitek-2 sisteminin kategorik uyumunu *E. coli* izolatları için %100, *K. pneumoniae* izolatları için %95,5 olarak bildirmiştir. Aynı çalışmada çok büyük hata tespit edilmezken yalnızca *K. pneumoniae* izolatları için %18 oranında büyük hata saptanmıştır (91). Çalışmamızda otomatize antibiyotik duyarlılık sistemlerinden Phoenix ve Vitek-2 sistemleri kullanılarak 240 idrar izolatı için fosfomisin duyarlılık sonuçları elde edilmiş ve agar dilüsyon duyarlılık sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. *E. coli* izolatlarında Phoenix ve Vitek-2 sistemleri için kategorik uyum sırasıyla %98,8, %100 iken *K. pneumoniae* izolatlarında kategorik uyum sırasıyla %94,8, %92,1 olarak daha düşük bulunmuş ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Her iki sistem için de ÇBH görülmemiştir. Büyük hata oranları *E. coli* için kabul edilebilir düzeyde iken (Vitek-2: %0, Phoenix: 1,3), *K. pneumoniae* için yüksek bulunmuştur (Vitek-2: %12, Phoenix: %5,4).

Fosfomisin duyarlılığı ile ilgili günümüzde üriner sistem izolatları ile yapılmış çeşitli çalışmalar olsa da diğer klinik örneklerden elde edilen izolatlarla yapılmış çalışmalar az sayıdadır ve bu çalışmalarda bildirilen fosfomisin MİK dağılımları değişkendir (7, 90). Fosfomisin MİK50-MİK90 değerleri birçok araştırmada *E. coli* için düşük bulunurken, *K. pneumoniae* için yüksek olarak bildirilmektedir (7, 88, 89, 80). Karbapenem dirençli ve/veya GSBL üreticisi *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında fosfomisin MİK'leri çeşitli çalışmalarda irdelenmiştir (7, 88, 89, 80). April ve ark. karbapenem dirençli ve/veya GSBL pozitif izolatlar ile yaptığı fosfomisin duyarlılığını saptadığı çalışmasında MİK50-MİK90 değerini; *E. coli* için 1 ve 32 µg/ml, KPC-*K. pneumoniae* için ise 32 ve 2048 mg/L olarak saptamıştır (88). Kaase ve ark.'nın gerçekleştirdiği çok merkezli bir çalışmada, karbapenemlerden en az birine dirençli 24 *E. coli* ve 50 *K. pneumoniae* izolatının MİK50-MİK90 değerleri sırasıyla; *E. coli* için 1 ve 256 µg/ml, *K. pneumoniae* için ise 16 ve 256 µg/ml olarak saptamıştır (89). Karbapenem dirençli ve/veya GSBL üreticisi olmayan *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında da fosfomisin MİK'leri bazı çalışmalarda belirtilmiştir. Van den Bijllaardt ve ark. Hollanda'da bağımsız 10

laboratuvardan gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş 775 *E. coli* ve 201 *K. pneumoniae* izolatında fosfomisin MİK50-MİK90 değerlerini *E. coli* için 1 ve 2 µg/ml, *K. pneumoniae* için ise 16 ve >256 µg/ml olarak belirlemiştir (7). Hirsch ve ark. 150 *E. coli*, 44 *Klebsiella* spp. izolatını değerlendirdiği çalışmasında MİK50-MİK90 değerini; *E. coli* için 0.5 ve 2 µg/ml, KPC-*K. pneumoniae* için ise 8 ve 128 µg/ml olarak belirlemiştir (92). Çalışmamızda çeşitli klinik örneklerden elde edilen *E. coli, K. pneumoniae* ve diğer Enterobacterales türleri için MİK50 değerleri sırasıyla 0.5, 8, 8 µg/ml; MİK90 değerleri ise 2, 128, 32 µg/ml olarak bulunmuştur. *E. coli* için fosfomisin MİK değerlerini düşük iken *K. pneumoniae* ve diğer Enterobacterales izolatları için yüksek MİK değerleri dikkat çekmektedir.

Fosfomisin için üç temel direnç mekanizması vardır. MurA mutasyonları, azalmış geçirkenlik ve enzimatik inaktivasyon şeklindedir. Direnç mekanizmaları çoğunlukla kromozomal kaynaklıdır ve ender olarak plazmid aracılıdır. Kromozomal mutasyonların çoğu, ilacın hücre içine taşınmasını sağlayan bakteriyel proteinleri kodlayan yapısal ve düzenleyici genlerden olmaktadır. Bu mutasyonlar, bakterilerin iki temel transport mekanizması olan L-alfa-gliserofosfat ve heksoz fosfat sistemlerinin bozulmasına yol açarak fosfomisinin, bakteri hücresi içine geçişini azaltmakta ve hedef bölgeye ulaşmasını engellemektedir (51). Fos enzimlerine bağlı olarak gelişen direnç plasmid ile bakteriler arasında hızlı bir şekilde yayılarak farklı coğrafi bölgelerde ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca bu genlerin diğer karbapenemaz veya GSBL genleri ile beraber bulunması dirençli Enterobacterales türlerini de arttırmaktadır (93). Özellikle karbapenem dirençli *K. pneumoniae'*nın fosfomisin direncindeki primer mekanizma *fosA3* genidir (94).

Fosfomisin modifiye edici enzimlerin Enterobacterales izolatları tarafından üretilmesiyle fosfomisine dirençli izolatlar artmaktadır. Son zamanlarda tanımlanan *fosA, fosA* subtipleri ve *fosC2* Enterobacterales üyelerinin fosfomisin direncinde önemlidir (95). Enterobacterales üyelerinden *K. pneumoniae, Providencia stuartii, Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella aerogenes, Klebsiella oxytoca, Morganella morganii, Providencia rettgeri ve Enterobacter cloacae* için *fosA*

prevelansı yüksek olmasına rağmen, *E. coli* için bu oran düşüktür (95). En sık bildirilen plazmid aracılı *fosA*, Doğu Asya'da GSBL üreten *Escherichia coli* arasında yaygın olarak görülen *fosA3*'tür. Bazı *fosA* homolog genlerinin, plazmidlerde karbapenemaz genleri (*bla*NDM, *bla*OXA-48, *bla*IMP ve *bla*KPC) ile birlikte taşınması hem fosfomisin hem de karbapenem direncine sahip izolatların yayılımı ile ilgili olabilir (96). 12 Çin hastanesini içeren bir çalışmada Jiang ve ark. KPC ve GSBL üreten *K. pneumoniae* izolatlarında fosfomisin duyarlılığını sırasıyla 109/278 (%39,2) ve 70/80 (%87,5) olarak saptamışlardır. PZR verileri, 94/278 (%33,8) KPC üreticisinin ve 7/80 (%8,8) GSBL üreticisinin *fosA3* genini barındırdığını göstermiştir (97). Peng Liu ve ark., tarafından 2020 yılında, 99 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatı ile yapılan çalışmada 48 izolat fosfomisine dirençli olarak saptanmıştır. Fenotipik direnç saptanan izolatların 44'ünde *fosA3* ile birlikte KPC (en çok), NDM-1 ve IMP-4 karbapenem direnç geni tespit edilmiştir (94).

Fosfomisin direnç genlerinin yalnızca karbapenemaz genleri ile değil GSBL genleri ile de birlikteliği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. GSBL üreticisi Enterobacterales izolatlarını araştıran bazı çalışmalarda *bla*CTX-M genleri fosfomisin direnç genleriyle birlikte bulunmuştur (63). Korede bir çalışmada GSBL üreten *E. coli ve K. pneumoniae* izolatlarının fosfomisin duyarlılığı sırasıyla %92,9 (157/165) ve %95,2 (169/182) şeklinde saptanmıştır. Dirençli olan 26 izolattan yedisinde *fosA3* tespit edilmiş ve bunların hepsinde *bla*CTX-M geni pozitif saptanmıştır (62). Çin'de epidemik bir izolat olan *K. pneumoniae* ST11 izolatlarında *fosA3*, *bla*KPC-2, *bla*CTX-M-65, *bla*SHV-12 ve *rmtB* genlerini birlikte barındıran IncR-F33:A-:B- Pkp1034 plasmidi tespiti endişe vericidir (64). Ülkemizde, Nigiz ve ark., idrar kültürlerinden izole ettikleri fosfomisine dirençli dokuz *K. pneumoniae* izolatında *fosA*, *fosA3* ve *fosC2* direnç genlerinin varlığını araştırmıştır. İki *K. pneumoniae* izolatında *fosA* direnç geni saptanmış, bunlardan bir izolatta *fosA* ve *fosA3* genleri birlikte bulunmuş, bu izolatın ayrıca *bla*CTX-M geni taşıdığı da belirlenmiştir (61). Çalışmamızda 21 fosfomisin dirençli izolattan 14'ünün GSBL ve yedisinin CRE+GSBL direnç fenotipine sahip olduğu görülmüştür. Bu izolatların ikisinde *fosA* geni bulunmuştur. *FosA* genine sahip iki izolatın GSBL olup bir *K. pneumoniae'*nın *bla*CTX-M, bir *K.*

oxytoca'nın *bla*CTX-M+*bla*TEM genlerini taşıdığı tespit edilmiştir. OXA-48 ve KPC geni saptanan beş izolatta test edilen *fosA, fosA3* ve *fosC2* genlerinden herhangi birine saptanmamıştır.

Prospektif olarak tasarlanmış olması ve idrar dışı klinik örneklerden elde edilen Enterobacterales izolatlarını da içermesi, oldukça yüksek sayıda izolatın değerlendirilmiş olması, bu çalışmanın güçlü yönlerini oluşturmaktadır. *E. coli* ve *K. pneumoniae* dışında kalan diğer Enterobacterales izolatlarının sayısının az olması, tüm fosfomisin direnç mekanizmalarının moleküler olarak incelenememiş olup sınırlı sayıda fosfomisin direnç geninin araştırılması çalışmamızın zayıf yönlerindendir. Ayrıca fosfomisin duyarlılık sonuçlarının rutin olarak bildirilmesine rağmen klinik kullanımının sınırlı kalması ve tedavi sonuçlarının değerlendirilememiş olması çalışmanın kısıtlılıklarındandır.

6. SONUÇLAR

- GSBL üreten ve/veya karbapenem dirençli Enterobacterales izolatlarında fosfomisin duyarlılığı, altın standart yöntem olan agar dilüsyon yöntemiyle yüksek olarak (%93,5) saptanmıştır. *E. coli* izolatlarının %98,4'ü, *K. pneumoniae* izolatlarının %86'sı fosfomisine duyarlı saptanmıştır. Yüksek duyarlılık oranları fosfomisinin, dirençli bakteriler için kombinasyon tedavilerinde kullanılabilecek bir alternatif olabileceğini düşündürmüştür.

- Otomatize sistemlerle (Phoenix ve Vitek-2) yapılan fosfomisin duyarlılık testinde *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatları için çok büyük hata saptanmamıştır. Otomatize sistemlerle yapılan büyük hata oranları *E. coli* için kabul edilebilir düzeyde iken (%0-1,3), *K. pneumoniae* için yüksek bulunmuştur (%5,4-12). *K pneumoniae* izolatları için büyük hata oranının her iki sistemde de >%3'ün üzerinde olması sonuçların altın standart yöntem ile doğrulanması gerektiğini ortaya koymuştur.

- Fosfomisin dirençli 21 izolatın ikisinde fosA geni, beşinde karbapenemaz (üçü OXA-48 tipi, ikisi KPC tipi) geni ve 18'inde GSBL (5 *bla*CTX-M, 3 *bla*TEM, 10 *bla*CTX-M+*bla*TEM) geni tespit edilmiştir. Çalışmada *fosA* geni tespit edilen izolatların *bla*CTX-M ve *bla*CTX-M+*bla*TEM genleri ile birlikteliği gözlenmiştir. Fosfomisin modifiye edici enzimler ile GSBL ve karbapenemaz enzimlerini kodlayan genlerin birlikte tespiti ve ilişkili plazmidlerin saptanması ile ilgili ileri çalışmalar fosfomisin dirençli ve GSBL/karbapenemaz üreten Enterobacterales izolatlarının yayılım dinamikleri ile ilgili faydalı bilgiler sağlayacaktır.

- Dirençli izolatlarda fosfomisin duyarlılığının rutin laboratuvarlarda doğru ve hızlı bir şekilde saptanması, duyarlılığı yüksek bu antibiyotiğin klinikte kullanımı ile ilgili karar verme süreçlerine katkı sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1- Nordmann, Patrice, Laurent Poirel, and Linda Mueller. "Rapid detection of fosfomycin resistance in Escherichia coli." Journal of clinical microbiology 57.1 (2019): e01531-18.

2- Prestinaci, Francesca, Patrizio Pezzotti, and Annalisa Pantosti. "Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon." Pathogens and global health 109.7 (2015): 309-318.

3- Frieri, Marianne, Krishan Kumar, and Anthony Boutin. "Antibiotic resistance." Journal of infection and public health 10.4 (2017): 369-378.

4- Reyes, Jorge Aníbal, et al. "Mobile genetic elements associated with carbapenemase genes in South American Enterobacterales." Brazilian Journal of Infectious Diseases 24 (2020): 231-238.

5- Delgado-Valverde, Mercedes, et al. "Clinical management of infections caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae." Therapeutic advances in infectious disease 1.2 (2013): 49-96.

6- Falagas, Matthew E., et al. "Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum β-lactamase producing, Enterobacteriaceae infections: a systematic review." The Lancet infectious diseases 10.1 (2010): 43-50.

7- Van den Bijllaardt, Wouter, et al. "Susceptibility of ESBL Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae to fosfomycin in the Netherlands and comparison of several testing methods including Etest, MIC test strip, Vitek2, Phoenix and disc diffusion." Journal of Antimicrobial Chemotherapy 73.9 (2018): 2380-2387..

8- Eucast, “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters,” 2021.

9- CLSI M100-ED31:2021 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 31st Edition

10- Sato, Natsumi, et al. "First detection of fosfomycin resistance gene fosA3 in CTX-M-producing Escherichia coli isolates from healthy individuals in Japan." Microbial Drug Resistance 19.6 (2013): 477-482.

11- Richardson, E. "The role of public health organizations in addressing public health problems in Europe: the case of obesity, alcohol and antimicrobial resistance." (2018).

12- Paterson, David L. "Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae." American journal of infection control 34.5 (2006): S20-S28.

13- ESBL-producing Enterobacterales in Healthcare Settings. 2019 [cited 2021 April 8]; Available from: https://www.cdc.gov/hai/organisms/ESBL.html.

14- Pitout, Johann DD, et al. "Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) in the community." Journal of Antimicrobial Chemotherapy 56.1 (2005): 52-59.

15- ESBL-producing Enterobacterales in Healthcare Settings. 2019 [cited 2021 April 8]; Available from: https://www.cdc.gov/hai/organisms/ESBL.html.

16- Aguilera-Alonso, David, et al. "Carbapenem-Resistant Gram-Negative Infections in Children." Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2019).

17- Bush, Karen, and George A. Jacoby. "Updated functional classification of β-lactamases." Antimicrobial agents and chemotherapy 54.3 (2010): 969-976.

18- Eliopoulos, George M., and Karen Bush. "New β-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy." Clinical Infectious Diseases 32.7 (2001): 1085-1089.22- Eliopoulos, George M., and Karen Bush. "New β-lactamases in gram-negativebacteria: diversityandimpact on theselection of antimicrobialtherapy." ClinicalInfectiousDiseases 32.7 (2001): 1085-1089.

19- Cicek, Aysegul Copur, et al. "Nationwide study of Escherichia coli producing extended-spectrum β-lactamases TEM, SHV and CTX-M in Turkey." The Journal of antibiotics 66.11 (2013): 647-650.21- ESBL-producingEnterobacterales in Healthcare Settings. 2019 [cited 2021 April 8]; Availablefrom: https://www.cdc.gov/hai/organisms/ESBL.html..

20- Bayraktar, Banu, et al. "Comparison of Carba NP-direct, carbapenem inactivation method, and β-CARBA tests for detection of carbapenemase production in Enterobacteriaceae." Microbial Drug Resistance 25.1 (2019): 97-102..

21- Alpay, Yeşim, et al. "Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz pozitif escherichia coli ile oluşan komplike olmayan üriner sistem infeksiyonlarının tedavisinde oral antibiyotikler karbapenemlere alternatif olabilir mi?." (2017).

22- Mandal, Dipendra Kumar, et al. "Carriage of extended-spectrum-β-lactamase-and AmpC-β-lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBL-PE) in Healthy Community and Outpatient Department (OPD) patients in Nepal." Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology 2020 (2020)..

23- Iovleva, Alina, and Yohei Doi. "Carbapenem-resistant enterobacteriaceae." Clinics in laboratory medicine 37.2 (2017): 303-315.

24- Cizmeci, Zeynep, et al. "Molecular characterization of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae yieldsi ncreasing rates of NDM-1 carbapenemases and colistin resistance in an OXA-48-endemic area." Journal of Chemotherapy 29.6 (2017): 344-350.

25- Süzük Yıldız, Serap, et al. "High rate of colistin and fosfomycin resistance among carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Turkey." Acta microbiologica et immunologica Hungarica 66.1 (2019): 103-112

26- Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. US Department of Healthand Human Services, Centres for Disease Control and Prevention, 2019.

27-Son, Soo Kyung, et al. "Clinical effectiveness of carbapenems versus alternative antibiotics for treating ESBL-producing Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis." Journal of Antimicrobial Chemotherapy 73.10 (2018): 2631-2642.

28- Vrancianu, Corneliu Ovidiu, et al. "Current promising antibiotics and future approaches in combating carbapenemase-producing Enterobacteriaceae." Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings. Vol. 66. No. 1. 2021.

29-Karaiskos, Ilias, et al. "The “old” andthe “new” antibioticsfor MDR gram-negativepathogens: forwhom, when, and how." Frontiers in publichealth 7 (2019): 151.

30- Pandey, Neelanjana, and Marco Cascella. "Beta lactam antibiotics." StatPearls [Internet] (2020).

31- Pitout JDLK. Extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. Lancet Infect Dis. 2008;8(3):159–66.

32- Palzkill, Timothy. "Structural and mechanistic basis for extended-spectrum drug-resistance mutations in altering the specificity of TEM, CTX-M, and KPC β-lactamases." Frontiers in molecular biosciences 5 (2018): 16.

33- Bush, Karen. "Past and present perspectives on β-lactamases." Antimicrobial agents and chemotherapy 62.10 (2018): e01076-18.

34-Tan, Xing, et al. "Therapeutic options for metallo-β-lactamase-producing enterobacterales." Infection and drug resistance 14 (2021): 125.

35- Lasko, Maxwell J., and David P. Nicolau. "Carbapenem-resistant Enterobacterales: considerations for treatment in the era of new antimicrobials and evolving enzymology." Current infectious disease reports 22.3 (2020): 1-12.

36- Nation, Roger L., and Jian Li. "Colistin in the 21st century." Current opinion in infectious diseases 22.6 (2009): 535.

37- Aghapour, Zahra, et al. "Molecular mechanisms related to colistin resistance in Enterobacteriaceae." Infection and drug resistance 12 (2019): 965.

38- Xavier, Basil Britto, et al. "Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in Escherichia coli, Belgium, June 2016." Eurosurveillance 21.27 (2016): 30280.

39- ÖZKAYA, ESRA, et al. "Investigation of plasmid mediated mcr colistin resistance gene in clinical enterobacterales isolates Klinik enterobacterales İzolatlarında plazmit aracılı mcr kolistin direnç geninin araştırılması." (2020).

40- Ontong, Julalak C., et al. "Synergistic antibacterial effects of colistin in combination with aminoglycoside, carbapenems, cephalosporins, fluoroquinolones, tetracyclines, fosfomycin, and piperacillin on multidrug resistant Klebsiella pneumoniae isolates." Plos one 16.1 (2021): e0244673.

41-Liu, Xiaofen, et al. "Synergistic killing by meropenem and colistin combination of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii isolates from Chinese patients in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model." International journal of antimicrobial agents 48.5 (2016): 559-563.

42- S. Ulusoy, “TİGESİKLİN,” ANKEM Derg, vol. 20, no. Ek 2, pp. 117–119, 2006

43- Kelesidis, Theodoros, et al. "Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies." Journal of antimicrobial chemotherapy 62.5 (2008): 895-904.

44- Rose, Warren E., and Michael J. Rybak. "Tigecycline: first of a new class of antimicrobial agents." Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy 26.8 (2006): 1099-1110.

45- Michalopoulos, Argyris S., Ioannis G. Livaditis, and Vassilios Gougoutas. "The revival of fosfomycin." International journal of infectious diseases 15.11 (2011): e732-e739.

46- Dinh, Aurélien, et al. "Fosfomycin: efficacy against infections caused by multidrug-resistant bacteria." Scandinavian journal of infectious diseases 44.3 (2012): 182-189.

47- Rogers, Thomas O., and Jerome Birnbaum. "Biosynthesis of fosfomycin by Streptomyces fradiae." Antimicrobial agents and chemotherapy 5.2 (1974): 121-132.

48- Michalopoulos, Argyris S., Ioannis G. Livaditis, and Vassilios Gougoutas. "The revival of fosfomycin." International journal of infectious diseases 15.11 (2011): e732-e739.

49- BAYLAN, Orhan. "Fosfomisin: Dünü, Bugünü ve Geleceği." Mikrobiyol Bul 44 (2010): 311-321.

50- Rubio, Elena Múñez, Antonio Ramos Martínez, and Ana Fernández Cruz. "Fosfomycin in antimicrobial stewardship programs." Revista espanola de quimioterapia 32.Suppl 1 (2019): 62.

51- Hazırolan, Gülşen. "Fosfomisin: Geçmişe Dönüş." Klimik Journal/Klimik Dergisi 33.3 (2020).

52- Ramos, Jesús Ruiz, and Miguel Salavert Lletí. "Fosfomycin in infections caused by multidrug-resistant Gram-negative pathogens." Revista Española de Quimioterapia 32.Suppl 1 (2019): 45.

53- Falagas, Matthew E., et al. "Resistance to fosfomycin: mechanisms, frequency and clinical consequences." International journal of antimicrobial agents 53.1 (2019): 22-28.

54- Castañeda-García, Alfredo, Jesús Blázquez, and Alexandro Rodríguez-Rojas. "Molecular mechanisms and clinical impact of acquired and intrinsic fosfomycin resistance." Antibiotics 2.2 (2013): 217-236.

55- Silver, Lynn L. "Fosfomycin: mechanism and resistance." Cold Spring Harbor perspectives in medicine 7.2 (2017): a025262.

56- Raz, R1. "Fosfomycin: an old—new antibiotic." Clinical Microbiology and Infection 18.1 (2012): 4-7.

57- Falagas, Matthew E., et al. "Fosfomycin." Clinical Microbiology Reviews 29.2 (2016): 321-347.

58- Hashemian, Seyed Mohammad Reza, Zinat Farhadi, and Tayebeh Farhadi. "Fosfomycin: The characteristics, activity, and use in critical care." Therapeutics and clinical risk management 15 (2019): 525.

59- Dijkmans, Anneke Corinne, et al. "Fosfomycin: pharmacological, clinical and future perspectives." Antibiotics 6.4 (2017): 24.

60- Falagas, Matthew E., et al. "Resistance to fosfomycin: mechanisms, frequency and clinical consequences." International journal of antimicrobial agents 53.1 (2019): 22-28.

61- N. Şeyma, "Yatan hastaların idrar kültürlerinden elde edilen Klebsiella spp. ,E. coli,A. baumannii, P.aeruginosa izoaltlarının antibiyotik duyarlılıklarının in vitro yöntemlerle saptanması ve fosfomisine direnç mekanizmalarının araştırılması," 2020.

62- Yang, Tsung-Ying, Po-Liang Lu, and Sung-Pin Tseng. "Update on fosfomycin-modified genes in Enterobacteriaceae." Journal of Microbiology, Immunology and Infection 52.1 (2019): 9-21.

63- Cao, X-L., et al. "High prevalence of fosfomycin resistance gene fosA3 in bla CTX-M-harbouring Escherichia coli from urine in a Chinese tertiary hospital during 2010–2014." Epidemiology & Infection 145.4 (2017): 818-824.

64- Xiang, Dai-Rong, et al. "Complete Sequence of a Novel IncR-F33: A–: B–Plasmid, pKP1034, Harboring fosA3, bla KPC-2, bla CTX-M-65, bla SHV-12, and rmtB from an Epidemic Klebsiella pneumoniae Sequence Type 11 Strain in China." Antimicrobial agents and chemotherapy 60.3 (2015): 1343-1348.

65- Y. Jiang et al., "Dissemination of a clone carrying a fosA3-harbouring plasmid mediates high fosfomycin resistance rate of KPC-producing Klebsiella pneumoniae in China," Int. J. Antimicrob. Agents, vol. 45, no. 2, pp. 66–70, 2014, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.08.010.

66- Karabay, Oguz, et al. "The carbapenem-resistant Enterobacteriaceae threat is growing: NDM-1 epidemic at a training hospital in Turkey." Annals of clinical microbiology and antimicrobials 15.1 (2016): 1-6.

67- Li, Yi, et al. "Rapid increase in prevalence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) and emergence of colistin resistance gene mcr-1 in CRE in a hospital in Henan, China." Journal of clinical microbiology 56.4 (2018): e01932-17.

68- Nwabor, Ozioma F., et al. "Evaluation of the synergistic antibacterial effects of fosfomycin in combination with selected antibiotics against carbapenem–resistant Acinetobacter baumannii." Pharmaceuticals 14.3 (2021): 185.

69- Singkham-In, Uthaibhorn, and Tanittha Chatsuwan. "In vitro activities of carbapenems in combination with amikacin, colistin, or fosfomycin against carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii clinical isolates." Diagnostic microbiology and infectious disease 91.2 (2018): 169-174.

70- Díez-Aguilar, María, and Rafael Cantón. "New microbiological aspects of fosfomycin." Revista Española de Quimioterapia 32.Suppl 1 (2019): 8.

71- Campanile, Floriana, et al. "Gold standardsusceptibilitytesting of fosfomycin in StaphylococcusaureusandEnterobacteralesusing a newagardilution panel®." Journal of Global AntimicrobialResistance 23 (2020): 334-337.

72- Mojica, María Fernanda, et al. "Performance of disk diffusion and broth microdilution for fosfomycin susceptibility testing of multidrug-resistant clinical isolates of Enterobacterales and Pseudomonas aeruginosa." Journal of global antimicrobial resistance 21 (2020): 391-395.

73-Turner, Paul, et al. "Microbiology Investigation Criteria for Reporting Objectively (MICRO): a frame work for the reporting and interpretation of clinical microbiology data." BMC medicine 17.1 (2019): 1-8.

74- P. The Strengtheningt he Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. Annals of internalmedicine. 2007;147(8):573-

75- Poirel, Laurent, et al. "Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes." Diagnostic microbiology and infectious disease 70.1 (2011): 119-123.

76- Kiratisin, Pattarachai, et al. "Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-β-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates causing health

care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic." Antimicrobial agents and chemotherapy 52.8 (2008): 2818-2824.

77- Birgy, André, et al. "Phenotypic screening of carbapenemases and associated β-lactamases in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae." Journal of clinical microbiology 50.4 (2012): 1295-1302.

.78- Legese, Melese Hailu, Gebru Mulugeta Weldearegay, and Daniel Asrat. "Extended-spectrum beta-lactamase-and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae among Ethiopian children." Infection and drug resistance 10 (2017): 27.

79-Papp-Wallace, Krisztina M., et al. "Carbapenems: past, present, andfuture." Antimicrobialagentsandchemotherapy 55.11 (2011): 4943-4960.

80- European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) [(accessed on 8 August 2020)]; Available online: https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/ears-net

81-https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0003/469200/Central-Asian-and-European-Surveillance-of-Antimicrobial-Resistance.-Annual-report-2020-eng.pdf

82- Sheu, Chau-Chyun, et al. "Infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: an update on therapeutic options." Frontiers in microbiology 10 (2019): 80.

83- Uzun, Aslıhan, et al. "Fosfomisin ve bazı antimikrobiyal ajanların üriner Escherichia coli izolatlarına in vitro etkinliğinin değerlendirilmesi." Klimik Dergisi 25.2 (2012): 77-80.

84- Kastoris, Antonia C., et al. "Synergy of fosfomycin with other antibiotics for Gram-positive and Gram-negative bacteria." European journal of clinical pharmacology 66.4 (2010): 359-368.

85- Grabein, B., et al. "Intravenous fosfomycin—back to the future. Systematic review and meta-analysis of the clinical literature." Clinical Microbiology and Infection 23.6 (2017): 363-372.

86- Mukherjee, Dip Narayan, Lalit Agarwal, and I. Nayyar. "Intravenous fosfomycin therapy in critically ill patients infected with colistin-resistant enterobacteriacae." Critical Care 19.1 (2015): 1-201.

87- Karlowsky, James A., et al. "Susceptibility of clinical isolates of Escherichia coli to fosfomycin as measured by four in vitro testing methods." Journal of clinical microbiology 58.10 (2020): e01306-20.

88- Aprile, Ausilia, et al. "In vitro fosfomycin study on concordance of susceptibility testing methods against ESBL and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae." Journal of Global Antimicrobial Resistance 23 (2020): 286-289.

89- Kaase, Martin, et al. "Fosfomycin susceptibility in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from Germany." Journal of Clinical Microbiology 52.6 (2014): 1893-1897.

90- Camarlinghi, Giulio, et al. "Discrepancies in fosfomycin susceptibility testing of KPC-producing Klebsiella pneumoniae with various commercial methods." Diagnostic microbiology and infectious disease 93.1 (2019): 74-76.

91- Akpınar, Ezgi, Nilgün Kansak, and Sebahat Aksaray. "Mediterr J InfectMicrobAntimicrob 2021; 10: 26 Erişim: http://dx. doi. org/10.4274/mjima. galenos. 2021.2020. 26 araştırma makalesi Üriner sistem enfeksiyon etkeni E. coli ve K. pneumoniae izolatlarında fosfomisin duyarlılığının saptanmasında otomatize sıvı mikrodilusyon sistemi (Vitek-2) ile agardilüsyon yönteminin karşılaştırılması."

92- Hirsch, Elizabeth B., et al. "Activity of fosfomycin and comparison of several susceptibility testing methods against contemporary urine isolates." International journal of antimicrobial agents 46.6 (2015): 642-647.

93- Cheng, Ke, et al. "Emergence of fosA3 and blaCTX–M–14 in Multidrug-Resistant Citrobacter freundii Isolates From Flowers and the Retail Environment in China." Frontiers in microbiology 12 (2021): 108.

94- Liu, Peng, et al. "Mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae." Journal of global antimicrobial resistance 22 (2020): 238-243.

95- Zurfluh, Katrin, et al. "Mobile fosfomycin resistance genes in Enterobacteriaceae—an increasing threat." Microbiologyopen 9.12 (2020): e1135

96- Singkham-In, Uthaibhorn, Netchanok Muhummudaree, and Tanittha Chatsuwan. "fosA3 overexpression with transporter mutations mediates high-level of fosfomycin resistance and silence of fosA3 in fosfomycin-susceptible Klebsiella pneumoniae producing carbapenemase clinical isolates." PloS one 15.8 (2020): e02374