T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ŞİŞLİ HAMİDİYE ETFAL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

ÇOKLU İLACA DİRENÇLİ GRAM NEGATİF BAKTERİLERDE AZTREONAM-SEFTAZİDİM AVİBAKTAM KOMBİNASYONUNUN SİNERJİSTİK AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Büşra Yılmaz Güler

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İstanbul 2024

T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ŞİŞLİ HAMİDİYE ETFAL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

ÇOKLU İLACA DİRENÇLİ GRAM NEGATİF BAKTERİLERDE AZTREONAM-SEFTAZİDİM AVİBAKTAM KOMBİNASYONUNUN SİNERJİSTİK AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Büşra Yılmaz Güler

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Banu Bayraktar

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İstanbul 2024

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince kıymetli bilgi birikimi ve tecrübelerini paylaşarak bana yol gösteren, yardımlarıyla destek olan değerli danışman hocam, Prof Dr. Banu Bayraktar'a,

Bilgi ve tecrübelerini paylaşarak uzmanlık eğitimimde emeği geçen değerli hocalarım Prof. Dr. Elif Aktaş Sepetci, Doç Dr. Ayşe Barış, Doç. Dr. Mehmet Emin Bulut'a,

Tüm uzmanlık eğitimimde ve tez çalışmamın her aşamasında emeğini ve yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. Hanife Tutan'a,

Uzmanlık eğitimim süresince sağladıkları katkılardan dolayı Uzm. Dr. Murat Öcal, Uzm. Dr. Leyla Genç ve Uzm. Dr. Süleyman Pelit'e,

Tez çalışmamın yürütülme aşamasında emeğini ve yardımlarını esirgemeyen Biyolog Ebru Akağaç'a,

Birlikte çalışmaktan her zaman keyif aldığım değerli asistan arkadaşlarıma ve tüm laboratuvar çalışma ekibine,

Hayatımın her döneminde sevgilerini ve sonsuz desteklerini hissettiğim kıymetli aileme ve daima yanımda olan ve beni destekleyen sevgili eşim Yasin Güler'e çok teşekkür ederim.

Dr. Büşra Yılmaz Güler

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **İ**

İÇİNDEKİLER ..... **İİ**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **V**

TABLOLAR ..... **Vİİ**

ŞEKİLLER ..... **Vİİİ**

ÖZET ..... **İX**

ABSTRACT ..... **Xİ**

1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**

2. GENEL BİLGİLER **3**

2.1. *ENTEROBACTERIACEAE* 3

2.1.1. Genel Özellikleri ve Sınıflandırması 3

2.1.2. Biyokimyasal, Morfolojik ve Boyanma Özellikleri 3

2.1.3. Antijenik Yapı 4

2.1.4. *Enterobacter cloacae complex* 4

2.1.4.1. Genel bilgiler 4

2.1.4.2. Etken olduğu enfeksiyonlar 5

2.1.4.3. Laboratuvar tanısı 5

2.1.4.4. Direnç mekanizmaları ve antibiyotik duyarlılık profili 6

2.1.5. *Klebsiella pneumoniae* 7

2.1.5.1. Genel bilgiler 7

2.1.5.2. Etken olduğu enfeksiyonlar 8

2.1.5.3. Laboratuvar tanısı 9

2.1.5.4. Tedavi seçenekleri 9

2.1.5.5. Antibiyotik duyarlılık profili 10

2.1.6. Karbapenemazlar 11

2.1.6.1. Ambler sınıf A karbapenemazlar 11

2.1.6.2. Ambler sınıf B karbapenemazlar 12
2.1.6.3. Ambler sınıf D karbapenemazlar 12
2.2. *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* 13
2.2.1. Genel Bilgiler 13
2.2.2. Virulans Faktörleri 14
2.2.3. Etken Olduğu Enfeksiyonlar 15
2.2.3.1. Kan dolaşımı enfeksiyonları 16
2.2.4. Laboratuvar Tanısı 16
2.2.5. Direnç Mekanizmaları 17
2.2.6. Tedavi Seçenekleri 19
2.3. AZTREONAM VE SEFTAZİDİM-AVİBAKTAM KOMBİNASYONU 20
2.3.1. Aztreonam 20
2.3.2. Seftazidim-Avibaktam 21
2.3.3. Aztreonam ve Seftazidim-Avibaktam Kombinasyonu Sinerjisi 21
2.4. SİNERJİ TESPİTİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER 22
2.4.1. Difüzyon Temelli Yöntemler 22
2.4.1.1. Çift disk sinerji yöntemi 22
2.4.1.2. Kombine disk sinerji yöntemi 22
2.4.1.3. Gradiyent difüzyon test yöntemi: 23
2.4.2. Dama Tahtası (Checkerboard) Yöntemi 23
2.4.3. Zamana Bağlı Öldürme (Time-Kill) Yöntemi 24

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER 25

3.1. BAKTERİ İZOLATLARI 25
3.2. SIVI DİSK ELÜSYON YÖNTEMİ (SDE) 27
3.3. GRADİYENT DİFÜZYON TEST YÖNTEMİ 29
3.4. KOMBİNE DİSK SİNERJİ YÖNTEMİ 30
3.4.1. Serum Fizyolojikle Islatarak Kombine Disk Sinerji Test Yöntemi 31
3.5. ÇİFT DİSK SİNERJİ YÖNTEMİ 31
3.6. KALİTE KONTROL 32
3.7. SONUÇLARIN ANALİZİ 32

4. BULGULAR 33

4.1. DİRENÇ PATERNLERİ VE ADT SONUÇLARI 33
4.1.1. MBL Taşıyan İzolatların Enzim Dağılımı 33
4.1.2. *Enterobacteriaceae* İzolatlarının Duyarlılık Profili 34
4.1.3. *S. maltophilia* İzolatlarının Duyarlılık Profili 37
4.2. SIVI DİSK ELÜSYON SONUÇLARI 38
4.3. GRADİYENT DİFÜZYON TESTİ SONUÇLARI 39
4.4. KOMBİNE DİSK SİNERJİ YÖNTEMİ 42
4.5. ÇİFT DİSK SİNERJİ YÖNTEMİ 43
4.6. SONUÇLARIN ANALİZİ 44
5. TARTIŞMA 45
5.1. TEZ ÇALIŞMASININ KISITLILIKLARI 52
SONUÇLAR 53
KAYNAKLAR 54

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADT: Antimikrobiyal duyarlılık testi

ATM: Aztreonam

AVI: Avibaktam

CA-MHB: Katyon ayarlı Mueller Hinton Broth

CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute

CZA: Seftazidim-avibaktam

ÇDS: Çift disk sinerji

EMB: Eosin Methylene Blue

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FİK: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu

FİKİ: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu indeksi

GES: Guiana genişletilmiş spektrum

GSBL: Genişletilmiş spektrumlu β-laktamaz

IMP: İmipenemaz

KDS: Kombine disk sinerji

LPS: Lipopolisakkarit

MALDI-TOF-MS: Matriks İle Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi

MBL: Metallo-beta-laktamaz

MHA: Mueller Hinton Agar

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon

NDM: New Delhi metallo-beta-laktamaz

OXA-48: Oksasilinaz-48

SDE: Sıvı disk elüsyon

TMP-SMX: Trimetoprim sulfametaksazol

VIM: Verona integron kodlu metallo-beta-laktamaz

YBÜ: Yoğun bakım ünitesi

TABLOLAR

Tablo 1. MBL taşıyan izolatların enzim dağılımı 34
Tablo 2. ATM, CZA ve ATM-AVI için CLSI standartlarında önerilen klinik sınır değerler (µg/mL) 30
Tablo 3. *Enterobacteriaceae* izolatlarının ürettikleri enzim türüne göre antibiyotik duyarlılık profili 36
Tablo 4. *S.maltophilia* izolatlarında disk difüzyon ADT sonuçları 38
Tablo 5. Tüm izolatlarda ve mikroorganizma türüne göre sıvı disk elüsyon testi sonuçları 38
Tablo 6. Tüm izolatlarda ve mikroorganizma türüne göre gradiyent difüzyon test sonuçları 40
Tablo 7. ATM, CZA ve ATM+CZA'nın *Enterobacteriaceae* ve *S.maltophilia* izolatlarında $MİK_{50}$ (µg/ml), $MİK_{90}$ (µg/ml), MİK dağılımı (µg/ml) ve duyarlılık yüzdeleri (%) 41
Tablo 8. Tüm izolatlarda ve mikroorganizma türüne göre disk difüzyon ve kombine disk sinerji testi sonuçları 43
Tablo 9. SDE testi sonuçlarının gradiyent test yöntemiyle kategorik uyumu ve saptanan hata oranları 44

ŞEKİLLER

Şekil 1. Sıvı disk elüsyon testi uygulama adımları 27
Şekil 2. Kalite kontrol suşu olan *E.coli* 25922'nin sıvı disk elüsyon testinde beklenen duyarlılık profili 28
Şekil 3. ATM ve CZA gradiyent test şeritlerinin ayrı ayrı yerleştirildiği birinci plak 29
Şekil 4. İkinci plakta uygulanan gradiyent difüzyon test istifleme yöntemi 30
Şekil 5. İzolatların gönderildiği kliniklere göre dağılımı 33
Şekil 6. *Enterobacteriaceae* izolatlarının antibiyotik duyarlılık profili 35
Şekil 7. Meropenem, imipenem, kolistin, CZA antibiyotiklerinin *Enterobacteriaceae* izolatlarındaki MİK değerleri (µg/ml) 37
Şekil 8a. ATM dirençli, CZA dirençli, ATM + CZA duyarlı bir *K.pneumoniae* izolatının SDE test sonucu 39
Şekil 8b. ATM dirençli, CZA duyarlı, ATM + CZA duyarlı bir *S. maltophilia* izolatının SDE test sonucu 39
Şekil 9. *Enterobacteriaceae* izolatlarında ATM ve ATM+CZA MİK(µg/ml) dağılımı yüzdeleri 41
Şekil 10. *S.maltophilia* izolatlarında ATM ve ATM+CZA MİK(µg/ml) dağılımı yüzdeleri 42

ÇOKLU İLACA DİRENÇLİ GRAM NEGATİF BAKTERİLERDE AZTREONAM-SEFTAZİDİM AVİBAKTAM KOMBİNASYONUNUN SİNERJİSTİK AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Amaç: Metallo-beta-laktamaz (MBL) üreten mikroorganizmalar seftazidim-avibaktam (CZA) dahil olmak üzere çoğu β-laktam antibiyotiğe direnç gösterir ancak aztreonam'ı (ATM) hidrolize edemez. Birçok MBL üreticisi ayrıca ATM'yi inaktive eden ancak avibaktam (AVI) tarafından inhibe edilen enzimler taşır. Bu durum, ATM-CZA kombinasyonu için bir etki mekanizması sağlar. Yakın zamanda geliştirilen sıvı disk elüsyon (SDE) yöntemi sinerji testine basit bir yaklaşım sunmaktadır. Bu çalışmanın amacı ATM-CZA sinerjisini tespit etmek için SDE yöntemini gradiyent difüzyon test yöntemiyle karşılaştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: 89 *Klebsiella pneumoniae*, 3 *Enterobacter cloacae complex* ve 54 *Stenotrophomonas maltophilia* olmak üzere toplam 146 izolat çalışmaya dahil edildi. SDE yöntemi, referans yöntem olarak gradiyent difüzyon testi ile karşılaştırıldı. Sonuçlar, kombine disk sinerji (KDS) ve çift disk sinerji (ÇDS) testleriyle karşılaştırıldı. SDE'de üreme kontrolü, ATM, CZA ve ATM+CZA olmak üzere dört tüp hazırlandı. Dördüncü tüpte üreme görülmediğinde sinerji varlığı kaydedildi. ATM ve CZA gradiyent test şeritleri, bakteri inokülumu ekimi yapılmış olan Mueller-Hinton Agar (MHA) plaklarına sırayla yerleştirildi. ATM ve CZA için minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) da ayrı ayrı belirlendi. KDS sonuçlarında, kombinasyon zon çapının ATM çapından ≥5mm olması sinerji lehine değerlendirildi. KDS ile sinerji negatif bulunan izolatlar (n=22), antibiyotik diskleri %0,9 izotonik sodyum klorür (serum fizyolojik) ile ıslatılarak tekrar edildi.

Bulgular: SDE test sonuçları, gradiyent difüzyon test sonuçlarıyla %100 uyumlu bulundu. SDE, KDS ve ÇDS'nin gradiyent difüzyon testiyle uyumları sırasıyla %100(146/146), %84,93(124/146), %98,63(144/146) bulundu. Sinerji negatif bulunan 22 izolatta KDS testi, antibiyotik testleri ıslatılarak tekrarlandı ve

%100 uyumlu bulundu. Sinerji, oksasilinaz-48 (OXA-48) benzeri ve KPC üreten suşlarda da tespit edildi. CZA'ya duyarlı bulunan 86 izolatın 80 tanesinde, kombinasyonla saptanan MİK değeri, CZA MİK'inden daha düşük bulundu.

Sonuç: SDE yöntemi, ATM-CZA kombinasyonunun sinerjik etkisini saptamada gradiyent difüzyon testiyle %100 uyum göstermiştir. SDE'nin, KDS ve ÇDS yöntemlerine kıyasla sinerjiyi saptamada daha güvenilir sonuçlar verdiği belirlenmiştir. ATM-CZA kombinasyonu, yalnızca *S. maltophilia* ve MBL üreten *Enterobacteriaceae* üzerinde değil; farklı karbapenemaz sınıflarına karşı da etkili bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Aztreonam, Seftazidim-avibaktam, Sıvı disk elüsyon testi, Antimikrobiyal duyarlılık testi, Sinerji testi, Metallobetalaktamaz

EVALUATION OF THE SYNERGISTIC ACTIVITY OF AZTREONAM-SEFTAZIDIM AVIBACTAM COMBINATION IN MULTIDRUG-RESISTANT GRAM-NEGATIVE BACTERIA

ABSTRACT

Aim: Metallo-beta-lactamase producing microorganisms pose resistance to most β-lactam antibiotics, including ceftazidime-avibactam (CZA), but cannot hydrolyse ATM. Many MBL producers also carry enzymes that inactivate ATM but are inhibited by avibactam. This provides a mechanism of action for the ATM-CZA combination. The recently developed broth disc elution method (BDE) offers a simple approach to synergy testing. This study aimed to compare the BDE method with the gradient diffusion test method for detecting ATM-CZA synergy.

Materials and Methods: A total of 146 isolates including 89 *K.pneumoniae*, 3 *E.cloacae complex* and 54 *S.maltophilia* were included in the study. The BDE method was compared with the gradient diffusion test method. The results were compared with combined disc synergy and double disc synergy tests also. In BDE, four tubes were prepared as growth control, ATM, CZA and ATM+CZA. The presence of synergy was recorded when no growth was observed in the fourth tube. ATM and CZA gradient test strips were placed sequentially on Mueller-Hinton Agar (MHA) plates inoculated with bacterial inoculum. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of ATM and CZA were also determined separately. In combined disc synergy results, a combination zone diameter ≥5 mm larger than the ATM diameter was considered in favour of synergy. For 22 isolates found to be synergy-negative by the combined disk synergy test, antibiotic disks were moistened with 0.9% isotonic sodium chloride and retested.

Results: BDE method, demonstrated 100% agreement with the gradient diffusion test. The agreement of BDE, combined disc synergy and double disc synergy with the gradient diffusion test was 100%(146/146), 84.93% (124/146), 98.63% (144/146), respectively. In 22 isolates that were found to be synergy negative, the CDS test was repeated by soaking antibiotic tests and found to be 100%

compatible. Synergy was also detected in OXA-48 and KPC producing strains. In 80 of 86 isolates found to be sensitive to CZA, the MIC value determined with the combination was lower than the CZA MIC.

Conclusion: The broth disc elution method agreed 100% with the gradient diffusion test in detecting the synergistic effect of ATM-CZA combination. It was determined that broth disc elution gave more reliable results in detecting synergism compared to other two methods. ATM-CZA combination was found to be effective not only against *S. maltophilia* and MBL-producing *Enterobacteriaceae* but also against other carbapenemase classes.

Keywords: Aztreonam, Ceftazidime-avibactam, Broth disc elution test, Antimicrobial susceptibility test, Synergy test, Metallobetalactamase

1. GİRİŞ VE AMAÇ

β-laktam antibiyotiklere karşı antimikrobiyal direncin, penisilinin 1940 yılında keşfiyle birlikte ilk kez tanımlandığı ve yeni antimikrobiyal ajanların kullanıma sunulmasıyla hızla yayıldığı bilinmektedir (1). Bu durum, günümüzde önemli bir küresel sağlık sorunu haline gelmiştir.

Karbapenemler, en geniş spektrumlu β-laktam antibiyotik sınıfıdır. Karbapenem direnci, iki ana mekanizmaya dayanmaktadır: doğrudan karbapenemleri hidrolize edebilen karbapenemazlar ve hücre duvarı geçirgenliğindeki defektlerle birlikte AmpC veya genişletilmiş spektrumlu β-laktamazlar (GSBL) gibi karbapenemaz dışı mekanizmalar (2, 3).

MBL'ler, çinko bağımlı aktivite gösteren bir karbapenemaz ailesine aittir. Bu enzimler, Doğu Avrupa, Hint Yarımadası ve Güneydoğu Asya gibi bölgelerde en sık görülen karbapenemaz türüdür ve dünya genelinde yaygınlıkları artmaktadır (3, 4).

MBL'ler, neredeyse tüm geleneksel β-laktam antibiyotikleri hidrolize edebilir ancak ATM'yi hidrolize edemezler. Ayrıca CZA, imipenem-relebaktam ve meropenem-vaborbaktam gibi β-laktam – β-laktamaz inhibitörü kombinasyonlarına yanıt vermezler. MBL üreten izolatların çoğu, ATM üzerinde etkili ancak AVI ile inhibe edilebilen diğer β-laktamazları da eksprese etmektedir. Azalan tedavi seçenekleri karşısında ATM-AVI kombinasyonu yeni bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır. Bu kombinasyon, Avrupa Komisyonu tarafından Nisan 2024'te onaylanmış ve Avrupa Birliği'nde kullanım için yetkilendirilmiştir (5). Fakat henüz Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi (Food and Drug Administration) onayı bulunmamaktadır.

ATM ile CZA'nın birlikte kullanımı, çoklu ilaç direnci gösteren ve geniş spektrumlu ilaç direnci bulunan *Enterobacteriaceae* izolatlarına karşı in-vitro ve klinik olarak etkili bulunmuştur (6, 7). Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği, ATM-CZA kombinasyonunu, MBL üreten karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* ve *S.maltophilia* gibi sınırlı tedavi seçeneği bulunan enfeksiyonlarda alternatif bir tedavi olarak önermektedir (8).

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında bu kombinasyonun aktivitesini değerlendirmek için doğrulanmış, pratik ve kolayca uygulanabilir bir antibiyotik duyarlılık testi (ADT) yöntemi bulunmamaktadır. KDS ve gradiyent difüzyon testi yöntemleri, okuyuculara göre subjektif olması ve üretici firmalar arasında sonuçların farklılık göstermesi nedeniyle standardize edilememiştir. Dama tahtası, time-kill ve sıvı mikrodilüsyon testleri gibi diğer yöntemler ise oldukça fazla zaman ve kaynak gerektirmektedir (9). 2024 yılında Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından yayınlanan M100 dokümanında ATM+CZA kombinasyonunu değerlendirmek için sınır değerler tanımlanmıştır (10).

Bu çalışmanın amacı, ATM ve CZA kombinasyonunun in-vitro aktivitesini değerlendirmek için klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kolayca uygulanabilecek bir yöntem olan sıvı disk elüsyon (SDE) yönteminin etkinliğini araştırmaktır. Halihazırda mevcut yöntemlerin sınırlılıkları ve klinik ihtiyaçlar doğrultusunda, bu yeni yöntemin etkinliği araştırılarak, MBL üreten gram-negatif bakterilerin tedavisinde güvenilir ve hızlı bir çözüm sunması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *ENTEROBACTERIACEAE*

2.1.1. Genel Özellikleri ve Sınıflandırması

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında en sık karşılaşılan mikroorganizmalar arasında, *Enterobacteriaceae* ailesine ait gram-negatif basiller bulunmaktadır (11). Bu bakteriler, toprakta, sularda, bitkilerde ve isminden de belli olacağı üzere özellikle insanların ve hayvanların bağırsaklarında doğal olarak bulunan mikroorganizmalar olarak karşımıza çıkarlar (12). Örneğin *E.coli, K.pneumoniae* ve *P.mirabilis*, insanın normal bağırsak mikrobiyotası içinde yer almakta ve zaman zaman hastalığa yol açabilmektedir (11). *E. coli*, bağırsak florasında en yaygın olarak bulunan fakültatif anaerop bakteridir (12).

Bu ailedeki mikroorganizmalar, birçok enfeksiyon türünün kaynağı olabilirler ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli örneklerden izole edilebilirler (13). Klinik kültürlerde sıklıkla tespit edilen *E.coli, Klebsiella* ve *Enterobacter* cinsleri gibi birçok bakteri *Enterobacteriaceae* ailesi üyesidir (4, 14).

2.1.2. Biyokimyasal, Morfolojik ve Boyanma Özellikleri

Enterobacteriaceae familyası üyeleri, yaklaşık 1-3 μm uzunluğunda ve 0.5-0.6 μm eninde olan gram-negatif, fakültatif anaerobik ve spor oluşturmayan bakterilerdir. *Y.pestis, Salmonella* cinsindeki bazı serovarlar, *Klebsiella* ve *Shigella* türleri hariç birçoğu peritrik flagella sayesinde hareketlidirler. *Klebsiella* cinsi gibi bazı *Enterobacteriaceae* türlerinde, hücreyi çevreleyen kalın bir kapsül veya ince bir slime tabakası bulunabilir (12). *Plesiomonas shigelloides* hariç oksidaz enzimi üretmezler (15, 16). Glikozu fermente ederler, nitratı nitrite indirgerler ve katalaz enzimi üretirler (4, 14) Bu familyadaki farklı cins ve türler, karbonhidratların fermentasyonunu farklı yollarla gerçekleştirirler. Bu metabolik çeşitlilik, kullanılan karbonhidratlar veya üretilen son ürünlere göre elde edilen verilere dayanarak bu mikroorganizmaların identifikasyonunda önemlidir (12).

2.1.3. Antijenik Yapı

Hücre yapısında iç ve dış membran, periplazmik boşluk ve hücre duvarı bulunur. *Enterobacteriaceae* ailesinin serotipik sınıflandırılmasında, somatik O antijeni, flagellar H antijeni ve kapsüler K antijeni temel antijenler olarak kullanılır (12).

Lipopolisakkarit (LPS) molekülü, gram-negatif bakterilerin dış duvarının karakteristik bir yapı taşı olup, bu bakterilerin endotoksin etkinliğini belirleyen bileşendir. LPS, lipid A, kor polisakkarit ve O antijeni olarak bilinen üç temel bileşenden meydana gelir. O antijeni, gram-negatif bakterilerin özgül serolojik belirtecidir (13) . Dış membranda yer alan oligosakkaritlerin varyasyonları nedeniyle farklı O-antijenik yapıları meydana gelir (14). Isı ve alkole dirençli olan bu antijene karşı oluşturulan antikorlar genellikle IgM yapısındadır (11).

Enterobacteriaceae ailesinin üyeleri, flagellaları sayesinde hareket kabiliyeti, adezyon, kolonizasyon ve biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir. Flagella yapısını oluşturan flagellin proteinindeki varyasyonlar, farklı H-antijenik yapılarını meydana getirir (17). Hücre yüzeyindeki pili veya fimbriyalar, otoagregasyon ve adezyon işlevleri görmektedir. Aynı zamanda konjugasyon ile genetik değişim süreçlerinde de etkindirler (14). Protein yapıda olduğu için ısı ve alkole duyarlıdır (11) Bu antijene karşı oluşturulan antikorlar IgG yapısındadır (12).

K antijeni, *Klebsiella* gibi bazı cinslerde kalın polisakkarit kapsül antijeni formunda, diğer türlerde ise daha ince ve slime tabakası şeklinde bakteriyel hücreyi çevreleyen yapıdır (12). Bu yapı, O antijenlerinin dış kısmında yer alır (11).

2.1.4. *Enterobacter cloacae complex*

2.1.4.1. Genel bilgiler: *E. cloacae complex*, fakültatif anaerobik, peritriköz kamçıları sayesinde hareketli, gram-negatif çomak şeklinde boyanan bakterilerden oluşan bir komplekstir. Bu kompleks, genetik ve fenotipik olarak benzer birçok türü içerir ve *E. cloacae* ve *E. hormaechei*, insan klinik örneklerinde en sık izole edilenlerdir (18). *E. cloacae complex* üyeleri, genellikle su, toprak, bitkiler, hayvan ve insan bağırsak florası gibi çeşitli çevresel ve insan kaynaklı habitatlarda bulunur (19). İnsanlarda fırsatçı patojen olarak kabul edilirler ve özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda nozokomiyal enfeksiyonlara neden olurlar (20).

İlk olarak 1960 yılında tanımlanmıştır, ancak taksonomide son 50 yılda değişiklikler meydana gelmiştir (21). *E.cloacae complex üyeleri; E. cloacae, E. asburiae, E. hormaechei, E. kobei, E. ludwigii, E. mori* ve *E. nimipressuralis*'tir. Bu kompleks içinde yer alan türler arasında genetik farklılıklar mevcut olsa da fenotipik benzerlikler nedeniyle ayrım güçlüğü yaşanabilir. Örneğin *E. cloacae*'nin genomunda bu grubun diğer altı üyesiyle en az %60 benzerlik bulunmaktadır. Moleküler yöntemlerin kullanımının artması, bu türlerin tanımlanmasını ve sınıflandırılmasını kolaylaştırmıştır (22).

2.1.4.2. Etken olduğu enfeksiyonlar: *Enterobacter* türleri, dirençli hastane enfeksiyonlarının önde gelen nedeni olarak tanımlanan ESKAPE grubunun (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* türleri) üyeleridir(20, 23, 24).

Özellikle yoğun bakım ünitesinde yatan ve bağışıklığı baskılanmış bireylerde çeşitli nozokomiyal enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiştir. En sık idrar yolu enfeksiyonları, pnömoni, bakteriyemi, yara enfeksiyonları ve cerrahi alan enfeksiyonları gibi klinik tablolar oluşturabilir (25). İntravenöz kateter ve organ nakli ile ilişkili enfeksiyonlarda yaygın olduğu rapor edilmiştir (26, 27). Neonatoloji ünitelerinde yenidoğan sepsis vakalarında sıklıkla görülmektedir ve bildirilen sepsis salgınları nedenlerindendir (28).

Kompleksin farklı türleri, enfeksiyon yerlerine göre değişen yaygınlık gösterir. Örneğin, *E. hormaechei subsp. oharae* genellikle kan kültürlerinde izole edilirken, *E. asburiae* solunum yolu örneklerinde, *E. hormaechei subsp. steigerwaltii* yanık yaralarında baskın olarak izole edilmiştir (29). *E. cloacae complex* ayrıca diyabetik ayak enfeksiyonlarında, özellikle yara ve kemik enfeksiyonlarında önemli bir yer tutmaktadır (30).

2.1.4.3. Laboratuvar tanısı: Tanımlama yöntemlerinden ticari sistemler, örneğin API 20E (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), Matriks İle Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF-MS) sıkça kullanılır. Ancak, bu

sistemler genellikle kompleksin yalnızca belirli üyelerini tanımlayabilmekte ve türler arasında ayrım yapmada yetersiz kalmaktadır (31).

Daha kesin tanımlama için genotipik yöntemler gereklidir. 16S rRNA gen sekanslaması yaygın olarak kullanılmasına rağmen, *E. cloacae complex'*teki türlerin yüksek genetik benzerliği nedeniyle bu yöntemin de tür ayrımında yetersiz olduğu bilinmektedir (32). Çok odaklı dizi analizi (multilocus sequence analysis), özellikle hsp60 gibi genlerin sekanslanmasına dayanarak kompleksin üyelerini ayırt etmede daha üstün bir yöntem olarak öne çıkmaktadır (33).

Sonuç olarak, laboratuvar tanısında hem fenotipik hem de genotipik yöntemlerin bir arada kullanımı, türlerin doğru tanımlanmasını ve direnç profillerinin net bir şekilde belirlenmesini sağlamaktadır. Bu yöntemlerin kombinasyonu, hastane enfeksiyonlarının yönetiminde ve dirençli suşların izlenmesinde önemli katkılar sunmaktadır.

2.1.4.4. Direnç mekanizmaları ve antibiyotik duyarlılık profili: *E. cloacae complex* üyeleri, antibiyotik direncini farklı mekanizmalarla kazanabilir. Sıklıkla çoklu ilaç direnci fenotipi ile ilişkilidir, bunun başlıca nedeni hastane ortamına adaptasyonları ve direnç, virülans genleri içeren çok sayıda genetik mobil elementi kolayca edinebilme yetenekleridir (18).

Bu bakteriler, doğal olarak düşük seviyelerde AmpC tipi β-laktamaz üretir ve bu durum, özellikle birinci kuşak sefalosporinlere karşı dirençle sonuçlanır. Ancak AmpC'nin aşırı üretimi, üçüncü kuşak sefalosporinlere ve diğer β-laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç gelişmesine yol açar. Bu aşırı üretim, genellikle AmpR düzenleyici genindeki mutasyonlarla veya plazmid kaynaklı AmpC genlerinin kazanılmasıyla meydana gelir (18, 34, 35).

Karbapenemaz üretimi, *E. cloacae complex* için önemli bir direnç mekanizmasıdır. Özellikle IMP, NDM ve KPC gibi karbapenemaz enzim türleri, karbapenemlere karşı direnç gelişiminden sorumludur. Ayrıca porin proteinlerinde görülen değişiklikler, bakterinin dış zar geçirgenliğini azaltarak antibiyotik girişini sınırlar. Bu durum, özellikle karbapenemlere karşı direncin bir diğer önemli nedeni olarak öne çıkar. Effluks pompalarının aktivasyonu ise hem florokinolonlar hem de

diğer antibiyotiklere karşı direnci artırabilir (36, 37). Piperasilin-tazobaktam gibi kombinasyon tedavilerinin, kan dolaşımı enfeksiyonlarında başarılı olduğu bildirilmiştir (38).

Aminoglikozidler (özellikle amikasin) çoğu suşa karşı etkili bulunmuştur (39). Yeni geliştirilen siderofor sefalosporin olan sefiderokol, *E. cloacae complex*'e yönelik tedavi seçenekleri arasında son derece olumlu sonuçlarıyla dikkat çekmektedir (40). Ayrıca β-laktam/β-laktamaz inhibitörü kombinasyonları (örneğin seftazidim-avibaktam, seftolozan-tazobaktam, aztreonam-avibaktam, sefepim-tazobaktam) yüksek etkinlik göstermektedir (41, 42).

2.1.5. *Klebsiella pneumoniae*

2.1.5.1. Genel bilgiler: Klinik açıdan en önemli patojen *Klebsiella* türü *K. pneumoniae*'dır. *K.pneumoniae,* hareketsiz, laktozu fermente eden, aerobik gram-negatif basildir. Günümüzde, dünyanın en sık görülen hastane kaynaklı enfeksiyon patojenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (43).

Klebsiella türlerinin neden olduğu enfeksiyonların %75-86'sının *K. pneumoniae*, %13-25'inin ise *K. oxytoca* tarafından kaynaklandığı düşünülmektedir (44–46). *K. pneumoniae* taşıyıcılığının, asemptomatik olarak, toplumda yaklaşık %5 ila %38 oranında görülebildiği ve bu oranın hastane çalışanları arasında daha yüksek olduğu bilinmektedir. Yatan hastalar ve hastane çalışanları için ise taşıyıcılık oranı, hastanede kalma süresi ile doğru orantılı olarak %77'ye kadar ulaşabilmektedir (47). Antibiyotik tedavisi almakta ve hastanede yatmakta olan hastalarda, gastrointestinal sistemde *K. pneumoniae* kolonizasyonu insidansında artış gözlenmektedir (48).

Semptomatik hastalığı olanların yanı sıra, karbapenem dirençli *K. pneumoniae* taşıyan asemptomatik hastalar veya sağlık çalışanları da enfeksiyon kaynağı olarak rol oynayabilir. *K. pneumoniae* 'nin hastanede yatan hastaların ve sağlık çalışanlarının ellerinde birkaç saat boyunca kolonize olabildiği tespit edilmiştir (49, 50)

Amerika Birleşik Devletleri'ndeki bir klinikte karbapenem dirençli *K. pneumoniae* salgınına yol açan suşun, ventilasyon cihazlarına ek olarak altı farklı lavabodan alınan örnek kültürlerinde ürediği rapor edilmiştir. Bu lavabolar, günde iki

kez çamaşır suyu ve günde bir kez kuaterner amonyum bileşiği ile temizlenmesine rağmen üreme görülmüştür (51). Cansız yüzeylerin enfeksiyon yayılımına katkıda bulunup bulunmadığı henüz tam olarak açıklığa kavuşmamış olsa da, *Klebsiella* türlerinin kimyasal sterilizasyon işlemlerine rağmen cansız yüzeylerde kalabildiği unutulmamalıdır. *Klebsiella* türleri ayrıca hastane dışındaki ortamlarda, bitki örtüsünde, toprakta ve su kaynaklarında da görülebilir (52). Doğal ortamda bulunan türlerin, klinik suşlardan farklı özellikler göstermelerine rağmen, üriner ve gastrointestinal sistemlerden elde edilen klinik suşlar kadar virulans potansiyeline sahip oldukları ortaya konmuştur (53).

Hastane içi ve dışı çevrede alınacak önlemler, *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının yayılımını ve direnç faktörlerinin bakteriler arasında aktarımını engellemek açısından kritik öneme sahiptir. Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının yayılmasını kontrol altına almak için yüksek risk taşıyan hastaların düzenli taranması, standart önlemlerin eksiksiz uygulanması ve kolonize veya enfekte hastaların kohort izolasyonu uygulanması tavsiye edilmektedir (54, 55).

2.1.5.2. Etken olduğu enfeksiyonlar: *K. pneumoniae* enfeksiyonları çoğunlukla hastane ortamında görülmekte olup, özellikle immünsuprese hastalarda daha sık rastlanmaktadır. Geçmişte antibiyotik kullanım öyküsü, idrar kateteri, intravasküler kateter ve entübasyon tüpü gibi kalıcı yabancı cisimlerin bulunması predispozan faktörler arasındadır (47, 56). Kolonizasyon, enfeksiyon gelişme riskini artıran önemli bir risk faktörü olarak öne çıkmaktadır.

Bu enfeksiyonlar arasında en yaygın olanlar üriner sistem enfeksiyonlarıdır ve bunu pnömoni, primer bakteriyemi, yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda gelişen hastane enfeksiyonları ve piyojenik karaciğer apsesi izler (47, 57).

K. pneumoniae hastane kökenli enfeksiyonlarda, gram-negatif basillerin neden olduğu bakteriyemilerin ve hastane enfeksiyonlarına bağlı mortalitenin yaygın sebeplerindendir (58) İleri yaş ve hastanede kalış süresinin uzamasının bakteriyemi gelişme riskini artırdığı bilinmektedir (59, 60). Yoğun bakım yatışı, altta yatan solid tümörler ve eşlik eden pnömoniler, mortalite riskiyle ilişkili bulunmuştur (58).

1980'li yıllarda Asya-Pasifik Bölgesi'nde tanımlanan hipermukovisköz fenotipli hipervirülan *K. pneumoniae* suşlarının, diğer türlerden farklı olarak genç hastalarda karaciğer apsesi, menenjit, septik artrit ve endoftalmi gibi toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olduğu tespit edilmiştir (61–63)

2.1.5.3. Laboratuvar tanısı: Kültür için laboratuvara gönderilen örnekler, koyun kanlı agar, MacConkey agar ve Eosin Methylene Blue (EMB) gibi besiyerlerine ekilebilir. Optimal üreme; 37°C sıcaklık ve 7.0 pH koşullarında olmaktadır. Besiyerlerinde, kapsül yapısına bağlı olarak mukoid, büyük, akışkan, S ya da R tipi koloniler oluşturabilir. Hareketsiz olmaları, onları *Enterobacteriaceae* ailesindeki diğer bakterilerden ayırt eden bir özellik olarak öne çıkmaktadır (64).

Triple Sugar Iron agarda her üç şekeri de fermente etmesine bağlı olarak oluşan yoğun asit, besiyerinin renginin kırmızıdan sarıya dönüşmesine yol açar. Üre besiyerinde, üreaz enzimi aktivitesi besiyerinin renginin sarıdan pembeye değişmesine neden olur. Sitrat testi pozitiftir. Triptofanaz enzimi taşımadığı için sıvı besiyerinde triptofanı indole dönüştüremez ve bu durum indol negatif olarak yorumlanır (65).

Mikroskopta 0,3-1,0 µm çapında, 0,6-6,0 µm uzunluğunda, kapsül ile çevrili ve gram-negatif özellikte, tekli, ikili ya da kısa zincirler halinde bulunan basiller olarak görülür.

Tiplendirme, geleneksel manuel laboratuvar testlerinin yanı sıra hem otomatize sistemler hem de moleküler tanı yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir.

2.1.5.4. Tedavi seçenekleri: *K. pneumoniae*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla tercih edilen antibiyotikler arasında sefalosporinler, kinolonlar, aminoglikozidler ve karbapenemler yer almaktadır.

Yumuşak doku enfeksiyonları, bakteriyemi ve pnömoni tedavisinde ise öncelikli olarak 3. kuşak bir sefalosporin olan seftriakson tercih edilmektedir. Bunun yanında, kinolonlar, aminoglikozidler, trimetoprim-sülfametoksazol ve diğer sefalosporinler de bu bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde alternatif tedavi seçenekleri olarak değerlendirilmektedir (13).

GSBL üreten suşların neden olduğu yumuşak doku enfeksiyonları, pnömoni ve bakteriyemi tedavisinde ise karbapenem grubu antibiyotiklerle tedaviye başlanması önerilmektedir. Karbapenemlerle sağlanan klinik yanıt sonrasında tedaviye, trimetoprim-sülfametoksazol veya kinolonlarla devam edilebilmektedir (8, 66).

Sistit ve pyelonefrit tedavisinde trimetoprim-sülfametoksazol, siprofloksasin ve levofloksasin kullanılabilir. Ayrıca, amoksisilin-klavulanat ve piperasilin-tazobaktam gibi β-laktam/β-laktamaz inhibitör kombinasyonları ile sefepim, bu izolatlara bağlı idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde alternatif seçenekler olarak değerlendirilmektedir (8, 66).

2.1.5.5. Antibiyotik duyarlılık profili: *K. pneumoniae*'de gözlenen çoklu ilaç direnci, dünya genelinde ciddi bir endişe kaynağı haline gelmiştir. Sahip olduğu yüksek prevalans, antibiyotik direncinin yayılmasında önemli bir neden olarak değerlendirilmektedir.

K. pneumoniae'de penisilin direnci ilk kez 1960'lı yıllarda bildirilmiş ve bu dönemde SHV-1 ile TEM-1 β-laktamaz genleri tespit edilmiştir. Bundan kısa bir süre sonra, 3. kuşak sefalosporinler ve monobaktamlara etkili olan ilk GSBL geni SHV-2 ile birlikte, TEM-3 geni tanımlanmıştır. TEM-3 geni plazmid aracılığıyla taşınan bir diğer GSBL varyantıdır (67, 68). Kromozomal bir β-laktamaz olan SHV-1 geni *K. pneumoniae'yi* ampisilin, karbenisilin ve tikarsilin gibi β-laktam antibiyotiklere karşı dirençli hale getirmektedir. Son yıllarda klinik olarak izole edilen *Klebsiella* türlerinde, yeni keşfedilen β-laktamaz türlerinin tespit edilmesi, β-laktam grubu antibiyotiklerin kullanımını büyük ölçüde sınırlandırmış ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir (69, 70).

K. pneumoniae kaynaklı enfeksiyonlarda, diğer birçok antibiyotiğe dirençli olması nedeniyle karbapenem grubu antibiyotikler sıklıkla tercih edilmişse de, 2001 yılında karbapenem dirençli *K. pneumoniae*'nin ilk kez izole edilmesi ve ardından dirençli suşların giderek artan oranlarda bildirilmesiyle bu yaklaşım değişmeye başlamıştır (71–73). Bu durum, dünya genelinde antibiyotik direnciyle mücadelede ciddi bir sorun haline gelmiştir. Dünya Sağlık Örgütü, 2013 yılında karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae'*yi halk sağlığını tehdit eden en önemli üç

mikroorganizmadan biri olarak tanımlamış ve bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları öncelikli bir halk sağlığı sorunu olarak değerlendirmiştir. Ardından, 2017 yılında karbapenem dirençli *K. pneumoniae*, Dünya Sağlık Örgütü tarafından "acil olarak yeni antibiyotik geliştirilmesi gereken antibiyotik dirençli bakteriler" arasında yer almış ve bu bakterilere karşı etkili tedavi seçeneklerinin geliştirilmesinin önemine vurgu yapılmıştır (74).

K. pneumoniae'de karbapenem direncini açıklayan üç temel mekanizma bulunmaktadır. Bunlar; karbapenemleri hidrolize ederek etkisiz hale getiren karbapenemaz enzimlerinin üretimi, karbapenemlerin hücre dışına aktif olarak atılmasını sağlayan efflux pompalarının sentezi ve karbapenemlerin hücreye girişini engelleyen porin kaybı veya mutasyonlarıdır (75). Klinik açıdan en önemli mekanizma, karbapenemaz enzimlerini üreterek direnç geliştirmesidir. Ancak, karbapenem dirençli *Klebsiella* türlerinin direnç oluşturmak için bu mekanizmalardan birden fazlasını aynı anda kullanabildiği de bilinmektedir. Bu kombinasyonlar, patojenin kontrolünü ve yönetimini daha da zorlaştırmaktadır (76).

2.1.6. Karbapenemazlar

2.1.6.1. Ambler sınıf A karbapenemazlar: Sınıf A karbapenemazlar aktif bölgelerinde serin aminoasidi bulundururlar ve β-laktamlar üzerinde güçlü bir hidrolitik aktiviteye sahiptir. Bu enzimler, karbapenemleri, penisilinleri, sefalosporinleri ve aztreonamı hidrolize ederek antibiyotik direnci kazandırabilmektedir. Sınıf A karbapenemazlar arasında klinik açıdan en önemli enzim olan KPC, aynı zamanda keşfedilen ilk karbapenemazdır. Bu gruptaki karbapenemazlar arasında yer alan KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) ve Guiana genişletilmiş spektrum (Guiana extended spectrum, GES) genleri, genellikle plazmidler aracılığıyla taşınır ve bu sayede bakteriler arasında kolaylıkla yatay gen transferi yoluyla yayılabilir. Buna karşılık, NMC (Not metallo-enzyme carbapenemase), IMI (Imipenem hydrolyzing β-lactamase) ve SME (*Serratia marcescens* enzyme) genleri, bakterilerin kromozomal DNA'sında kodlanır ve bu genler genellikle bakterinin doğal yapısının bir parçası olarak korunur. Bu kodlama farklılıkları, karbapenemazların yayılım mekanizmalarını ve direnç profillerini anlamada önemli bir rol oynamaktadır (71, 77).

2.1.6.2. Ambler sınıf B karbapenemazlar: Aktif bölgelerinde çinko (Zn^{+2}) iyonları bulunan bu karbapenemaz grubu, bu özelliklerinden dolayı metallo-beta-laktamazlar olarak adlandırılmaktadır. Aktif bölgelerinde iyon bulundurmaları nedeniyle bir iyon şelatörü olan etilendiamin tetraasetik asit ile inhibe edilebilen bu karbapenemazlar; klavulanat, avibaktam, tazobaktam ve sulbaktam gibi β-laktamaz inhibitörlerine karşı dirençlidir. Klinik açıdan önemli olan bu sınıf karbapenemazlar arasında, plazmid yoluyla taşınabilen NDM ve kromozomal olarak kodlanan VIM ile IMP bulunmaktadır (78).

NDM'yi kodlayan gen, oldukça kolay transfer edilebilen bir plazmid üzerinde bulunması nedeniyle, KPC'yi kodlayan gene göre daha karmaşık ve tahmin edilmesi zor bir yayılma paterni göstermektedir. Bu durum, NDM genine sahip bakterilerin genetik materyalini diğer bakterilere hızlı bir şekilde aktarabilmesine yol açar. Ayrıca, NDM genini taşıyan izolatlarda sıklıkla aynı anda diğer direnç mekanizmalarının da bulunması, bu suşların yalnızca β-laktam antibiyotiklere değil, diğer antibiyotik gruplarına karşı da direnç geliştirebileceğini göstermektedir. Tüm bu özellikler, NDM üreten bakterilerin çok güçlü bir direnç profiline ve klinik açıdan ciddi bir tehdit oluşturan bir karaktere sahip olduğunu düşündürmektedir (79, 80).

2.1.6.3. Ambler sınıf D karbapenemazlar: Aktif bölgelerinde serin aminoasidi barındıran bu karbapenemaz grubu, oksasilini hidrolize etmeleri nedeniyle OXA-tipi veya oksasilinazlar olarak adlandırılmaktadır. Bu grubun önde gelen enzimi olan OXA-48, genellikle kromozomal olarak kodlanır.

OXA-48 enzimi, penisilinleri ve karbapenemleri hidrolize edebilme kapasitesine sahip olmasına rağmen, sefalosporinlere karşı etkinliği oldukça düşüktür. Bunun yanında, klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam gibi β-laktamaz inhibitörlerine dirençli olup, AVI ile etkili bir şekilde inhibe edilebilmektedir (4, 81–83) OXA-48 benzeri enzim üreten bakteriyel suşların genellikle başka β-laktamaz genlerini veya alternatif direnç mekanizmalarını da taşıdığı gözlemlenmiştir. Bu durum, tedavi seçeneklerini daha da sınırlamakta ve sefalosporinlerin kullanımını kısıtlamaktadır. Özellikle geniş spektrumlu direnç mekanizmalarının eşzamanlı bulunması, bu suşların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde ciddi zorluklar

yaratmakta ve klinik açıdan daha dikkatli antibiyotik yönetimini gerektirmektedir (70, 84).

2.2. *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA*

2.2.1. Genel Bilgiler

S.maltophilia, latince kökenli olup "besin ihtiyacı minimum olan ve maltozu seven tek hücreli canlı" anlamına gelmektedir (85). İlk olarak 1943 yılında tanımlanmış, 1960'ta ise *Pseudomonas maltophilia* olarak adlandırılmıştır. 1981 yılında yapılan çalışmalar sonucunda bakterinin *Xanthomonas* cinsine kaydırılması önerilse de; karakteristik özellikler göstermesi nedeniyle 1993 yılında *Xanthomonadaceae* ailesinde yeni bir cins olan *Stenotrophomonas* cinsi içerisinde yeniden sınıflandırılmıştır (86–88).

S. maltophilia, doğal çevrede geniş bir dağılım gösteren, su kaynakları, toprak ve bitkilerde yaygın olarak bulunabilen bir mikroorganizma olduğu için insan ve hayvan sağlığı açısından önem arz eden bir patojen haline gelmiştir. Çevresel kaynaklar dışında; insan ve hayvan dışkılarından, dondurulmuş deniz ürünlerinden, çiğ süt gibi gıda maddelerinden ve çeşitli diğer kaynaklardan da izole edilmiştir (89, 90).

Prevalans oranları incelendiğinde, en yüksek oranların %10.5 ile Batı Pasifik bölgesinde ve %7.9 ile Avrupa kıtasında kaydedilmiştir. Buna karşın, Amerika kıtasında bu oran %4.3 ile en düşük düzeyde bildirilmiştir. Bu veriler, *S. maltophilia* enfeksiyonlarının küresel dağılımında bölgesel farklılıklar olduğunu ve bu patojenin epidemiyolojisinin coğrafi faktörlerden etkilenebileceğini ortaya koymaktadır(91). *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* cinsinden sonra en sık izole edilen non-fermentatif gram-negatif basil olduğu bildirilmiştir (92, 93).

0.5-1.5 µm boyutlarında, düz ya da hafif kıvrımlı yapıda, spor oluşturmayan, genellikle tekli ya da çiftler halinde görülen, gram-negatif bir basildir. Polar yapıdaki flagellaları sayesinde hareket kabiliyetine sahiptir (85, 94). Zorunlu aerob bir mikroorganizma olup, 5-40 °C arasında, %5 CO_2 ortamında veya normal ortam havasında 24-48 saatlik inkübasyon sonucunda üreyebilmektedir. İzolasyonu için standart bakteriyolojik besiyerleri kullanılabilir, ancak bazı izolatların üreyebilmesi için metiyonin, sistein ve glisin gibi spesifik amino asitlere ihtiyaç duyar (95).

Non-fermentatif bir bakteridir ve katalaz testi pozitiftir. Oksidaz testi genellikle negatif olarak kabul edilmekle birlikte, daha nadir de olsa pozitif olarak da bildirilmiştir (96, 97). Eskülin hidrolizi, lizin dekarboksilaz ve DNAaz testlerinde pozitif sonuç vermektedir. Lipaz, esteraz, musinaz ve hiyaluronidaz gibi enzimlere sahip olan *S. maltophilia*; indol, üreaz, metil red, fenilalanin deaminaz ve ornitin dekarboksilaz testlerinde ise negatif sonuç verir (85, 98, 99) Laktoz, glikoz, ksiloz ve maltozu oksidatif yolla metabolize edebilmekle beraber, "maltophilia" ismini maltozu okside etme yeteneğinden almıştır (100).

2.2.2. Virulans Faktörleri

S. maltophilia enfeksiyonlarının patogenezi ve virülans faktörleri hakkında bilgiler sınırlıdır ve moleküler temelleri tam olarak açıklanamamıştır. Kolonizasyon ile enfeksiyonun ayrımındaki zorluklar, bakterinin düşük patojeniteye sahip olduğu görüşünü desteklemektedir. Ancak özellikle risk faktörlerine sahip hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olması nedeniyle önemi giderek artan, çoklu ilaca dirençli, küresel ölçekte yaygınlaşan ve fırsatçı bir patojen olarak dikkat çekmektedir (85, 98, 101).

Biyofilm oluşturma yeteneği, *S. maltophilia*'nın önemli virülans faktörlerinden biridir ve plastik, cam, teflon gibi yüzeylerin yanı sıra hastane ekipmanlarında ve nemli ortamlarda gelişebilir. Biyofilmler, mikroorganizmaların birbirine tutunmasını kolaylaştırarak nozokomiyal enfeksiyonların yaklaşık %65'i ile ilişkilendirilmiştir (98, 102). Biyofilm oluşturarak, konak savunma mekanizmalarından kaçabilir, çevresel etkilere karşı direnç kazanabilir, farklı yüzeylere yayılarak hareketlilik gösterebilir ve çeşitli antimikrobiyal ajanlara karşı doğal direnç geliştirebilir. Biyofilm oluşturma sürecini etkileyen çevresel faktörler arasında pH, sıcaklık, fosfat düzeyleri, klorür miktarları, bakır ve gümüş iyonlarının varlığı ile aerobik veya anaerobik ortam koşulları yer almaktadır (103–106).

Quorum sensing, hücre yoğunluğuna bağlı olarak gen ekspresyonunu düzenleyen bir mekanizmadır. Gram-negatif bakteriler genellikle homoserin lakton türevlerini kullanırken, *S. maltophilia* farklı olarak yayılabilir sinyal faktörü DSF (cis-11-metil-2-dodekanoik asit) sinyal sistemini tercih eder. DSF, rpf gen kümesi

tarafından kodlanır ve antibiyotik direnci, biyofilm oluşumu ve virülans gibi süreçleri düzenler (107, 108).

S. maltophilia'nın dış membranında bulunan lipopolisakkarit (LPS), antimikrobiyal ajanlara direnç, kolonizasyon ve immün sistemden kaçışta önemli rol oynar. LPS bileşenlerinden olan lipid A, TNF-α salınımını artırarak inflamasyonu tetikler ve IL-8 ekspresyonuyla lökosit göçünü indükler (85, 90, 109).

Patogenezinde rol oynayan diğer faktörler DNAaz, lipaz, lesitinaz, hiyalüronidaz, heparinaz, jelatinaz ve proteinaz gibi hücre dışı enzimlerdir. Ürettiği melanin pigmenti, konak savunmasından korunarak antibiyotik direnci artışına neden olur (110). Hücresel işlevler ve virülans faktörlerinin taşınmasını sağlayan sekresyon sistemlerinden tip I, II, IV, V ve VI *S. maltophilia*'da bulunmaktadır (111, 112).

Demir, *S. maltophilia*'nın virülansı için kritik öneme sahiptir. Biyofilm oluşumu ve oksidatif stres yanıtında rol oynar. Sideroforlar, demir alımını kolaylaştırarak bakterinin konak içinde hayatta kalmasına yardımcı olur (108, 113).

2.2.3. Etken Olduğu Enfeksiyonlar

S. maltophilia enfeksiyonları çoğunlukla nozokomiyal kökenli olup, toplum kaynaklı vakalar daha nadirdir. Etken olduğu enfeksiyonlar genellikle sağlık hizmeti sunulan ortamlarda görülür. İzolasyon kaynakları arasında kontamine dezenfektanlar, intravenöz sıvılar, hastanedeki lavabo muslukları, kateterler, diyaliz makineleri, ventilatörler ve sağlık çalışanlarının elleri gibi birçok tıbbi cihaz ve ortam bulunmaktadır (85).

Genellikle virülansı yüksek bir bakteri olarak kabul edilmese de, bağışıklığı baskılanmış bireylerde fırsatçı patojen olarak tanınır (93). Risk faktörleri arasında uzun hastane yatış süresi, yoğun bakım ünitesinde bulunma, santral venöz kateter varlığı, mekanik ventilasyon ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı bulunmaktadır. Bunun yanı sıra, maligniteler, hepatobiliyer, kardiyovasküler ve kronik pulmoner hastalıklar, organ nakli, diyaliz, HIV enfeksiyonu, kortikosteroid veya immünsüpresif tedavi kullanımı, nötropeni, sitotoksik kemoterapi, gastrointestinal kolonizasyon, mukozit, hematopoetik kök hücre nakli, cerrahi

müdahaleler, travma ve intravenöz ilaç bağımlılığı da risk faktörleri olarak belirtilmektedir (85, 114).

Hem yoğun bakım ünitelerinde hem de diğer kliniklerde *S. maltophilia* 'nın neden olduğu nozokomiyal ve toplum kökenli enfeksiyonların, en sık solunum yolu enfeksiyonları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bunu kan dolaşımı enfeksiyonlarının izlediği bilinmektedir (91, 93, 115). Bakteriyemi ve pnömoni, komplikasyon ve mortalite riski en yüksek enfeksiyonlar arasında yer almaktadır (116). Bunların dışında; menenjit, endokardit, kemik ve eklem enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, göz enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları, gastrointestinal enfeksiyonlar enfeksiyonları gibi çeşitli klinik durumlara neden olabilmektedir (108).

2.2.3.1. Kan dolaşımı enfeksiyonları: Kan kültüründen *S.maltophilia* izole edilmesi durumunda, enfeksiyonun doğrulanması gerekli olup; kontaminasyon veya kolonizasyondan ayırt edilmesi önemlidir (90). Nozokomiyal bakteriyemilerin yaklaşık %1'inin *S. maltophilia* kaynaklı olduğu bildirilmiştir (117).

Santral venöz kateterler, bu bakteriyemilerin en sık kaynağı olup, genellikle polimikrobiyal olduğu belirtilmektedir (90, 94). Ayrıca, sıklıkla solunum, üriner veya gastrointestinal sistem enfeksiyonlarına sekonder olarak geliştiği tespit edilmiştir (85).

S.maltophilia kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonları, ciddi morbidite ve mortalite riski taşımaktadır. Bu enfeksiyonlarda mortalite oranları %21 ile %69 arasında değişmekle beraber, hematolojik malignite tanısı bulunan hastalarda %60'ın üzerinde olduğu belirtilmiştir (118).

2.2.4. Laboratuvar Tanısı

Koyun kanlı agarda beyaz, açık sarı veya lavanta-yeşil tonlarında, düzgün ve parlak görünümde koloniler oluştururken, EMB ve MacConkey agar gibi besiyerlerinde laktoz negatif özellik göstererek renksiz ve şeffaf koloniler meydana getirir. Mueller-Hinton agar (MHA) üzerinde ise kahverengimsi tonlarda küçük koloniler oluşturduğu gözlenmiştir.

Tanıda konvansiyonel yöntemler olan gram boyama, kültür ve biyokimyasal testler tercih edilmekle birlikte; API 20NE (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France),

VITEK 2 ID (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) ve Phoenix ID (Becton Dickinson, ABD) gibi ticari otomatize veya yarı otomatize sistemler de kullanılmaktadır (116, 119).

Moleküler tiplendirme çalışmalarıyla bakterinin genetik yapısı detaylı olarak analiz edilebilmekte, bu yöntemler salgınların izlenmesi ve direnç mekanizmalarının belirlenmesinde önem taşımaktadır. Tiplendirme ve epidemiyolojik çalışmalarda Pulsed-Field Jel Electroforez, yüksek ayrım gücü nedeniyle altın standart olarak kabul edilmekle birlikte, maliyetli ve zaman alıcı olması nedeniyle rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA(Random Amplified Polymorphic DNA) ve genom boyunca tekrarlayan DNA sekanslarını hedef alan repetitive sequence-based polimeraz zincir reaksiyonu gibi PCR temelli yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır (120). Bunun yanı sıra, multilokus sekans analizi ve 16S rRNA sekanslama gibi teknikler izolatlar arasındaki genetik ilişkilerin belirlenmesinde tercih edilmektedir. MALDI-TOF-MS gibi kütle spektrometrisi tabanlı yöntemler de alternatif bir seçenek olarak kullanılmaktadır (13, 120).

Genom dizileme teknolojileri, yüksek doğruluk ve detaylı genetik analiz imkanı sunarak, salgın izleme ve sürveyans çalışmalarında giderek daha fazla kullanılmaktadır. Ancak, yüksek maliyet ve biyoinformatik gereksinimler nedeniyle rutin klinik uygulamalarda henüz diğer yöntemlerin yerini tam anlamıyla alamamıştır (120).

2.2.5. Direnç Mekanizmaları

S. maltophilia, β-laktamlar, sefalosporinler, aminoglikozidler, makrolidler ve karbapenemler gibi birçok antibiyotiğe dirençlidir. Bu intrensek direnç, β-laktamazlar, düşük membran geçirgenliği, kromozomal çoklu ilaç efluks pompaları ve antibiyotik modifiye edici enzimler gibi mekanizmalarla sağlanmaktadır. Ek olarak, direnç genleri mutasyonlarla veya plazmid, integron, transpozon ve biyofilmler aracılığıyla horizontal transfer yoluyla kazanılabilir (93, 98).

β-laktamlara karşı direnç, kromozomal olarak kodlanan ve indüklenebilir özellikteki iki β-laktamaz, L1 ve L2, tarafından sağlanmaktadır. Bu enzimler, hücrelerin β-laktamlara maruz kalmasıyla aktif hale gelir ve AmpR düzenleyicisi

tarafından kontrol edilir. Ancak L1'in üretimi, L2'ye kıyasla daha fazla AmpR gerektirir (90).

L1 β-laktamaz, Ambler B sınıfına ait bir MBL olup, Zn^{+2} bağımlıdır ve monobaktamlar hariç tüm β-laktam sınıflarını hidrolize edebilir. Bu enzim, klavulanat gibi β-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmez ve oldukça geniş bir hidrolitik spektruma sahiptir. L2 β-laktamaz, Ambler A sınıfına ait, serin aktif bölgeli geniş spektrumlu bir β-laktamazdır. Genişletilmiş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonam dahil çoğu β-laktamı hidrolize edebilir. Klavulanat tarafından tamamen, diğer β-laktamaz inhibitörleri tarafından ise kısmen inhibe edilebilir (93, 121, 122). *S.maltophilia* enfeksiyonlarında ATM+CZA kombinasyonu, özellikle çoklu ilaca dirençli suşlara karşı önemli bir tedavi seçeneği sunar. Bu kombinasyon, β-laktamaz üreten dirençli izolatlarda sinerjik etki göstererek bakterisidal aktiviteyi artırabilmektedir. Özellikle çinko bağımlı olan L1 MBL enzimi varlığında, ATM bu enzime karşı dirençli olmasından dolayı etkili bir seçenek olmaktadır. L2 serin β-laktamaz, serin bağımlıdır ve genellikle aztreonama karşı etkili bir şekilde β-laktam halkasını hidrolize eder. Ancak CZA, L2'nin etkisini bloke ederek etkinlik sağlayabilmektedir (123).

Klinik izolatlarda, Tn1 benzeri bir transpozon üzerinde yer alan TEM-2 penisilinaz ve CTX-M-1 β-laktamaz gibi ek β-laktamazlar da tanımlanmıştır. Ayrıca, CTX-M-15, TEM-116, TEM-127, SHV-1 ve NDM-1 gibi β-laktamazlar da tespit edilmiştir (90, 122).

Bunlar dışında, *S. maltophilia*'da antibiyotik direncinin gelişiminde birçok mekanizma ve genetik element rol oynamaktadır. Efluks pompaları, düşük membran geçirgenliği ve enzimatik modifikasyonlar, bu bakterinin doğal ve kazanılmış direnç mekanizmalarının başlıca unsurlarıdır (93). Direnç gelişiminde rol oynayan aminoglikozid modifiye edici enzimler ve qnr genleri gibi çeşitli direnç faktörleri tanımlanmıştır (93, 122). Özellikle dış membran proteinlerindeki değişiklikler ve LPS yapısındaki modifikasyonlar, aminoglikozidler gibi antimikrobiyal ajanlara dirençte önemli bir role sahiptir(124).

Integronlar, antibiyotik direnç genlerinin yatay transferinde rol oynayan genetik elementlerdir. Rekombinasyon sistemleri aracılığıyla gen kasetlerini entegre

edip eksprese edebilirler ve genellikle transpozonlar ve plazmidler ile taşınırlar. Sınıf 1 integronlar, çoklu antibiyotik direncinden sorumlu en yaygın türdür. Sınıf 2 integronlar daha az direnç geni taşırken, sınıf 3, 4 ve 5 integronlar nadiren görülür ve belirli bakterilerle sınırlıdır. Mobil elementlerden farklı olan kromozomal integronlar ise genellikle patojenite ile ilişkilidir. *S. maltophilia*, özellikle sınıf 1 integronlar ve ekleme dizisi ortak bölgesi (Insertion Sequence Common Region) elementleri aracılığıyla sulfonamid ve diğer antibiyotiklere direnç genlerini horizontal olarak aktarabilmektedir (125, 126).

2.2.6. Tedavi Seçenekleri

S. maltophilia'nın yüksek düzeyde doğal direnç göstermesi, artan direnç oranları ve in-vitro duyarlılık testlerindeki belirsizlikler nedeniyle uygun antimikrobiyal tedavisinin belirlenmesi oldukça zordur. Tedavi genellikle in-vitro duyarlılık sonuçlarına dayandırılmalı ve izolatların hassas olduğu antibiyotikler tercih edilmelidir. Klinik kanıtlar sınırlı olmakla birlikte, in-vitro çalışmalar, özellikle zor tedavi edilen enfeksiyonlarda kombinasyon tedavilerinin monoterapiye kıyasla daha etkili olabileceğini göstermektedir (90).

Tedavide ilk tercih edilen ajan, yüksek duyarlılık oranları nedeniyle trimetoprim-sülfametoksazoldür (TMP-SMX). Trimetoprim, dihidrofolat redüktazı, sülfametoksazol ise dihidropteroat sentazı inhibe ederek folik asit sentezini bozar, bu da pürin ve DNA sentezini engeller. İki ajan birlikte kullanıldığında, bu metabolik yol üzerinde ardışık inhibisyonlarla sinerjik bir etki elde edilir (11). Bakteriyostatik etkisi bulunan TMP-SMX'in, ciddi enfeksiyonların tedavisinde 15-20 mg/kg/gün veya daha yüksek dozlarda kullanılması önerilmektedir. TMP-SMX'e direnç saptanması durumunda; moksifloksasin/levofloksasin, tikarsilin-klavulanat, aztreonam-klavulanat, minosiklin/tigesiklin, kolistin (±rifampin) kullanılması önerilmektedir (127).

S. maltophilia, çoğu penisilin, sefalosporin ve karbapeneme doğal olarak dirençlidir. Ancak klavulanat gibi β-laktamaz inhibitörleri ile kombinasyon, bu ajanların etkinliğini artırabilir (90). Seftazidim ve tikarsilin-klavulanat, β-laktam antibiyotikler arasında *S. maltophilia*'ya karşı en etkili ajanlar olarak bilinmektedir.

Ancak bazı çalışmalar bu antibiyotiklere karşı direnç oranlarının arttığını göstermektedir (93, 128).

Sefiderokol, bakteriyel demir taşıma mekanizmasını kullanarak dış membranı geçip periplazmik boşluğa ulaşan yeni bir siderofor sefalosporindir. *S. maltophilia* enfeksiyonlarında, kombinasyon tedavilerinin bir parçası olarak kullanılması önerilmektedir (129, 130). Florokinolonlar, *S. maltophilia*'ya karşı iyi derecede in-vitro etkinlik göstermektedirler, ancak hızlı direnç gelişimi nedeniyle genellikle kombinasyon tedavilerinde tercih edilirler (90). Tetrasiklinler ve yarı sentetik türevleri olan glisilsiklinler, *S. maltophilia*'ya karşı laboratuvar ortamında etkinlik göstermiştir, ancak klinik deneyimler sınırlıdır. TMP-SMX'e dirençli suşlar üzerinde yapılan çalışmalarda tigesiklin ve eravasiklinin, kombinasyon tedavisinde umut verici sonuçları olduğu tespit edilmiştir (11, 129). Polimiksinler, gram-negatif bakterilere karşı etkili olup kombinasyon tedavilerinde önerilmektedir (90, 93).

2.3. AZTREONAM VE SEFTAZİDİM-AVİBAKTAM KOMBİNASYONU

2.3.1. Aztreonam

Monobaktam sınıfına ait sentetik bir β-laktam antibiyotiktir ve özellikle gram-negatif aerobik bakterilere karşı etkilidir. Bu antibiyotiğin yapısında, β-laktam halkasına bağlı sülfamik asit grubu ve aminotiyazolil yan zinciri bulunur. Bu yapı, aztreonamın β-laktamaz enzimlerine karşı dirençli olmasını ve gram-negatif bakterilere karşı etkinliğini sağlar (131, 132).

Gram-negatif bakterilerin penisilin bağlayıcı protein 3'üne yüksek afinite ile bağlanarak peptidoglikan sentezinin son aşamasını engeller. Bu inhibisyon, hücre duvarının zayıflamasına ve bakterisidal etkiye yol açar (133).

Etki spektrumu dar bir antibiyotik olup, başlıca gram-negatif aerobik bakterilere karşı etkilidir. *Enterobacteriaceae* ailesinin üyeleri olan *E.coli, K.pneumoniae, P.mirabilis, Serratia* türleri, *Citrobacter* türleri ve *P.aeruginosa* gibi patojenlere karşı etkilidir. Ancak, gram-pozitif bakterilere ve anaeroblara karşı etkinliği bulunmamaktadır (134).

ATM, özellikle β-laktam antibiyotiklere alerjisi olan hastalarda gram-negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde alternatif bir seçenek olarak kullanılır. Ancak, seftazidime karşı alerjisi olan bireylerde çapraz reaksiyon riski nedeniyle dikkatli olunmalıdır. Bu antibiyotik, idrar yolu enfeksiyonları, alt solunum yolu enfeksiyonları, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, intra-abdominal enfeksiyonlar ve jinekolojik enfeksiyonlar gibi çeşitli klinik durumların tedavisinde etkilidir (135). Ayrıca, kistik fibrozis hastalarında *P. aeruginosa*'ya bağlı akciğer enfeksiyonlarının tedavisinde inhalasyon yoluyla da uygulanabilir (136).

2.3.2. Seftazidim-Avibaktam

Seftazidim, β-laktam halkasına sahip üçüncü kuşak bir sefalosporindir. Avibaktam, β-laktam yapısında olmayan, diazabisiklooktan yapısında sentetik bir β-laktamaz inhibitörüdür.

AVI, Ambler sınıf A, sınıf C ve bazı sınıf D karbapenemazlara karşı etkilidir. Ancak, MBL'ye karşı etkili değildir. CZA, geniş bir spektruma sahip olup, özellikle *Enterobacteriaceae* ailesi ve *P. aeruginosa*'ya karşı etkilidir. Bu kombinasyon, seftazidim dirençli *Enterobacteriaceae* suşlarında MİK değerlerini belirgin şekilde düşürerek etkinliğini artırır (137).

Komplike üriner sistem enfeksiyonları, komplike intra-abdominal enfeksiyonlar ve ventilatörle ilişkili pnömoni gibi ciddi gram-negatif enfeksiyonların tedavisinde kullanılır.

2.3.3. Aztreonam ve Seftazidim-Avibaktam Kombinasyonu Sinerjisi

MBL'ler, özellikle NDM, VIM ve IMP, çoğu β-laktam antibiyotiği etkisiz hale getirebilir. Ancak, monobaktam sınıfı bir antibiyotik olan ATM, MBL enzimlerinden etkilenmez. Bununla birlikte, MBL üreten birçok izolat, ATM'yi inaktive eden diğer β-laktamazları taşır, ancak bu enzimler AVI ile inhibe edilebilir (7, 9, 138).

ATM-AVI kombinasyonunun sinerjik etkisi, ATM’nin MBL’lerin hidrolitik aktivitesinden etkilenmemesi ve AVI’nin diğer β-laktamazları inhibe ederek ATM’nin etkinliğini desteklemesi üzerine kuruludur. AVI, sınıf A ve C β-laktamazlara karşı etkili bir inhibitördür ancak MBL'lere karşı etkili değildir. Bu

kombinasyonda AVI, ATM'nin sınıf A ve C enzimleri tarafından hidrolizini engellerken; ATM, sınıf B enzimlerinden kaçarak bakterisidal etkisini korur (7, 9, 138).

2.4. SİNERJİ TESPİTİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Kombinasyon halinde kullanılan antibiyotiklerin etkileşimleri; sinerji, additif etki, indiferans ve antagonizma gibi farklı sonuçlar doğurabilir. Bu kavramlar, ilaçların birlikte kullanımının tedaviye olan etkisini anlamada kritik öneme sahiptir.

Sinerji, kombinasyonun toplam etkisinin, her bir ilacın tek başına etkisinin toplamından daha fazla olduğu durumu ifade eder (ör. 1+1=≥3). Bu, antibiyotiklerin birbirinin etkisini güçlendirdiğini gösterir. Additif etki, ilaçların birlikte kullanımında, toplam etkinin, tek başına etkilerinin toplamına eşit olduğu durumdur (ör. 1+1=2). Eğer kombinasyondaki etkili olan ilaç, diğerinin varlığından bağımsız olarak aynı etkiyi gösteriyorsa, bu durum indiferans etki olarak tanımlanır ve ilaçlar arasında anlamlı bir etkileşim olmadığı kabul edilir. Antagonistik etki ise, ilaçlardan birinin diğerinin etkisini azalttığı ve toplam etkinin, ilaçların tek başına kullanıldığındaki toplam etkiden daha düşük olduğu durumu ifade eder (ör. 1+1<2) (139).

Antibiyotik kombinasyonlarının sinerjisini değerlendirmek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.

2.4.1. Difüzyon Temelli Yöntemler

2.4.1.1. Çift disk sinerji yöntemi: Antibiyotik diskleri, bakteri süspansiyonu ile inoküle edilmiş plaklara, aralarındaki mesafe en az her iki inhibisyon zon çapının toplamı olacak şekilde yerleştirilir. 16-20 saatlik inkübasyon süresi sonunda, diskler arasında sinerjik bir etkileşim varsa, inhibisyon zonlarının birbirine bakan bölgelerinde genişleme gözlenir. Eğer etkileşim antagonistik ise inhibisyon zonlarında düzleşme meydana gelir. Etkileşim olmadığı durumlarda ise inhibisyon zonlarında herhangi bir değişiklik izlenmez (140).

2.4.1.2. Kombine disk sinerji yöntemi: Bakteri süspansiyonu ile inoküle edilen agar plaklarına, bir antibiyotik diski ve aynı antibiyotiğin başka bir antibiyotikle kombine edilmiş diski yerleştirilir. İnkübasyonun ardından, kombine

disk etrafındaki inhibisyon zon çapının tek antibiyotik diskinin zon çapına kıyasla ≥5 mm daha geniş olması, sinerjinin varlığını gösterir (138).

2.4.1.3. Gradiyent difüzyon test yöntemi: Burada uygulanabilecek iki farklı yöntem bulunmaktadır.

Çapraz yerleştirme yönteminde, bakteri süspansiyonu ile inoküle edilmiş agar plaklarına, iki farklı antibiyotiğin gradiyent test şeritleri, birbirine 90 derece dik açıyla yerleştirilir. Şeritlerin kesişim noktası, her iki antibiyotiğin ayrı ayrı belirlenen MİK değerlerine göre ayarlanır.

Ardışık yerleştirilen yöntem olan gradiyent test istifleme (stacking) yönteminde ise, ilk antibiyotiğe ait test şeridi inoküle edilen plak üzerine yerleştirilir ve 10 dakika inkübe edilir. Ardından bu şerit dikkatlice kaldırılır ve tam olarak aynı noktaya ikinci antibiyotik şeridi yerleştirilir.

Her iki yöntemde de inkübasyon sonrası sonuçlar değerlendirilir. Eğer kombinasyon ile MİK değeri, tek başına antibiyotiklere göre iki dilüsyon veya daha fazla düşüş gösteriyorsa, bu sinerji olarak kabul edilir (138).

2.4.2. Dama Tahtası (Checkerboard) Yöntemi

Bu yöntem, genellikle 96 kuyucuklu mikroplaka üzerinde uygulanır ve her bir kuyucukta iki farklı antibiyotiğin belirli konsantrasyonları birleştirilir. Bu konsantrasyonlar genellikle iki antibiyotiğin ayrı ayrı MİK değerleri temel alınarak belirlenir.

Sonuçların değerlendirilmesinde, öncelikle her iki antibiyotiğin, üreme gözlenmeyen kuyucuklardaki fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) ayrı ayrı hesaplanır. FİK, kombinasyonda kullanılan her bir antibiyotiğin MİK değerinin, antibiyotiğin tek başına test edildiğinde belirlenen MİK değerine oranı olarak tanımlanır. FİK indeksi (FİKİ) hesaplanır, bu hesaplamada değerlendirilen tüm antibiyotiklerin FİK değerleri toplanır. ≤ 0.5 ise sinerji, 0.5 ≤ FİKİ ≤ 1 ise additif etki, 1 ≤ FİKİ ≤ 4 ise indiferans etki, >4 ise antagonistik etki olarak yorumlanır (141).

$MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değeri hesaplaması yapılabilir. $MİK_{50}$ değeri, bir popülasyonun %50'sinin üremesini inhibe eden en düşük antibiyotik

konsantrasyonudur. Yani, $MİK_{50}$ değerini bulmak için, MİK değerleri sıralanır küçükten büyüğe sıralanarak popülasyonun %50'sinin inhibe olduğu konsantrasyonu belirlemek gerekir. $MİK_{90}$ değeri hesaplaması için popülasyonun %90'ının üremesini inhibe eden en düşük antibiyotik konsantrasyonu belirlenir.

2.4.3. Zamana Bağlı Öldürme (Time-Kill) Yöntemi

Sinerji araştırılacak antibiyotikler hem tek başına hem de kombinasyon halinde tüplere inoküle edilir. İnokülasyon sonrası 24 saatlik inkübasyon süresince belirli aralıklarla katı besiyerine pasaj yapılır. İnkübasyon sonunda, plaklarda oluşan bakteri kolonileri sayılarak cfu/mL değerleri kaydedilir ve semilogaritmik grafik üzerine işaretlenir. Kombinasyonda kullanılan antibiyotiklerin sinerjik etkisini değerlendirmek için, kombinasyondaki en etkili antibiyotiğin koloni sayıları referans alınır. Buna göre, 24 saat sonunda koloni sayılarında ≥2 log10 (100 kat) azalma sinerjiyi, ≥2 log10 artış antagonizmayı, 10 kattan az bir değişiklik ise additif veya indiferans etkiyi gösterir. Bu yöntem, zaman alıcı ve zahmetli olması nedeniyle genellikle sınırlı sayıda kombinasyon ve bakteri suşu üzerinde uygulanmaktadır (142).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, Helsinki Bildirgesi'nde belirtilen uluslararası etik ilkelerine uygun olarak yapılmış olup, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 29.08.2023 tarihli 4064 sayılı karar ile etik kurul onayı (Ek.1) alınmıştır.

3.1. BAKTERİ İZOLATLARI

Bu araştırmaya Ocak 2017– Şubat 2024 tarihleri arasında İstanbul Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına sepsis ön tanısıyla gönderilmiş kan kültürü örneklerinden ve periton kültürü örneklerinden izole edilmiş olan, ATM antibiyotiğine duyarlı olmayan 146 izolat dahil edilmiştir. 54 adet ATM dirençli *S.maltophilia* izolatı ve daha önceden karbapenemaz geni bilinen ATM dirençli 89 adet *K.pneumoniae* ve 3 adet *E.cloacae complex* izolatı dahil edilmiştir. Enzim tipleri belli olan izolatların 66 tanesi MBL(tek olarak veya ikinci bir enzimle beraber), 17 tanesi sınıf D (OXA48 benzeri) ve 9 tanesi sınıf A (KPC) karbapenemaz üreticisiydi.

Toplam 146 izolatın 137'si kan kültürlerinden, 9'u periton kültürlerinden elde edilmiştir. 137 kan kültürü örneğinden elde edilmiş izolatın ise 88 tanesi kan kültürü , 49 tanesi kateter kültürü örneği olarak laboratuvara gönderilmiştir.

Aynı hastaya ait, aynı setteki ve eş zamanlı karşı koldan alınan setteki kan kültürü şişelerinden elde edilen ilk izolat çalışmaya dahil edilmiş, eş zamanlı alınan diğer şişelerdeki üremeler çalışma dışı bırakılmıştır.

Laboratuvarımıza gönderilmiş olan aerobik ve anaerobik kan kültür şişeleri ve periton kültür şişeleri, Ocak 2017- Kasım 2020 tarihleri arasında BACTEC FX (Becton Dickinson, Sparks, ABD), Kasım 2020-Şubat 2024 tarihleri arasında BACT-ALERT (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) otomatize mikrobiyal tespit sistemlerinde çalışılmıştır. Pozitif sinyal alınan kültür şişelerinden, rutin olarak koyun kanlı agar ve çikolatamsı agara ekim yapılmıştır. Üremiş olan kolonilerden MALDI-TOF MS ile tür düzeyinde tanımlama yapılmıştır. Ocak 2017- Kasım 2020

tarihleri arasında MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) kullanılırken, Kasım 2020-Şubat 2024 tarihleri arasında VITEK® MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) ile tanımlanmıştır.

Enterobacteriaceae üyesi mikroorganizmalarda ADT, otomatize sistemlerle çalışılmıştır. İlk tarih aralığında izolatların antibiyotik duyarlılık testleri Phoenix (Becton Dickinson, Sparks, ABD), ikinci tarih aralığında VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) ile elde edilmiştir. Kolistin duyarlılık sonuçları ise sıvı mikrodilüsyon testi ile çalışılmıştır. Sonuçlar European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) klinik sınır değerler tablosuna göre değerlendirilmiştir.

S.maltophilia izolatlarında ADT, manuel disk difüzyon testleriyle çalışılmıştır. Trimetoprim-sulfametaksazol disk difüzyon testi sonuçları EUCAST kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Levofloksasin disk difüzyon testi sonuçları ise CLSI M100 standartlarına göre değerlendirilmiştir.

Raporlama süreçleri sonlandıktan sonra izolatlar, -80 °C'de gliserollü triptik soy broth içerisinde dondurularak muhafaza edilmiştir. Saklanmış olan *Enterobacteriaceae* izolatlarına, karbapenemaz geni tespiti için üretici önerisine göre Biospeedy karbapenemaz direnci qPCR kiti (Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri) ile polimeraz zincir reaksiyonu testi çalışılmıştır. İşlem sonrasında tekrar -80°C'de dondurulmuştur.

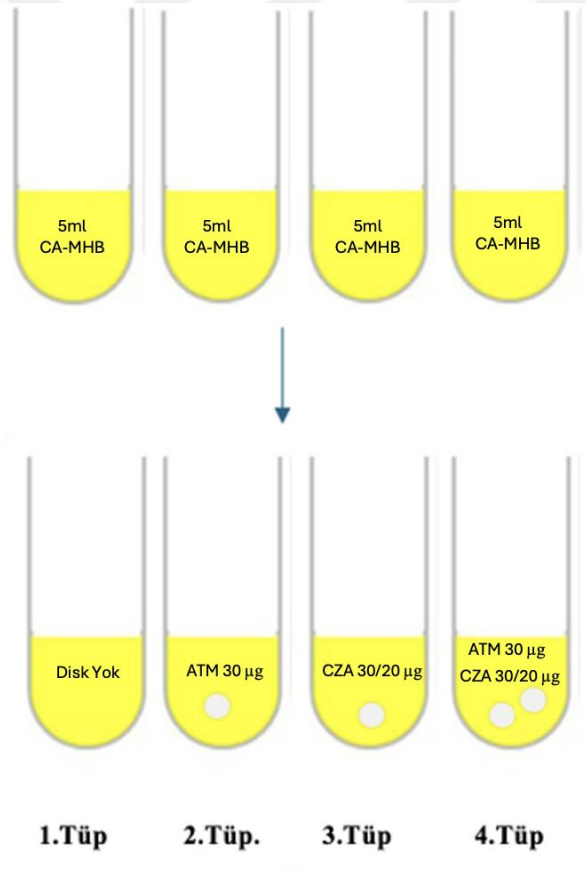
Karbapenemaz enzimleri belli olan *Enterobacteriaceae* suşları seçilirken, MBL üreticisi ve MBL artı ikinci bir enzim üreten suşlar ardışık olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Ek olarak KPC, OXA-48 benzeri enzimleri barındıran suşları temsil eden bir grup dahil edilmiştir.

Çalışmaya alınacak izolatların stok bakteri kültürlerinden koyun kanlı agara tek koloni düşürme tekniği ile pasajları yapılmıştır. Besiyerleri 35 ± 2 °C sıcaklıktaki etüvde 18-24 saat inkübe edilmiştir. Bu işlem ile canlandırılamayan toplam dört tane izolat olmuştur, bu izolatlar çalışmadan çıkarılmıştır ve izolat sayılarını gösteren tablolara dahil edilmemiştir. Canlandırılan izolatlar ise ikinci pasajları yapıldıktan sonra çalışmaya alınmıştır.

3.2. SIVI DİSK ELÜSYON YÖNTEMİ (SDE)

SDE yöntemi için 30 µg ATM diski (Oxoid, Waltham, ABD), 30/20 µg CZA diski (Oxoid, Waltham, ABD), katyon ayarlı Mueller Hinton Broth (CA-MHB) (Condalab, Madrid, Spain) kullanılmıştır.

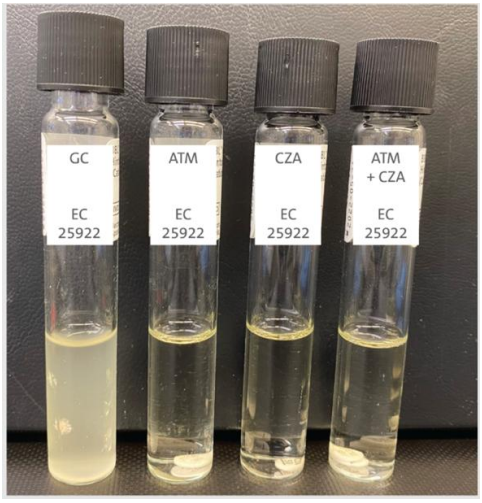
Her bir izolat için dört ayrı tüp hazırlanmıştır. Tüplerin her birine 5 mililitre CA-MHB eklenmiştir. Birinci tüpe herhangi bir disk konulmamış ve üreme kontrolü değerlendirilmiştir. İkinci tüpe bir adet ATM, üçüncü tüpe bir adet CZA, dördüncü tüpe ise birer adet ATM ve CZA diski birlikte eklenmiştir. Böylece tüplerdeki nihai konsantrasyonlar 6 µg/ml ATM, 6/4 µg/ml CZA, 6/6/4 µg/ml ATM-CZA olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonlar, CLSI'ın önerilerine göre duyarlı sınır değere yakın bir ATM konsantrasyonu sağlayacak şekilde bilinçli olarak seçilmiştir. Disk ve besiyeri eklenmiş tüpler 30 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Sıvı disk elüsyon testinin aşamaları Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Sıvı disk elüsyon testi uygulama adımları

Koyun kanlı agardan elde edilen taze koloniler ile fizyolojik tuzlu su içerisinde 0.5 McFarland bulanıklığında olacak şekilde inokülüm hazırlanmıştır. Tüm yöntemler, tek inokülum kullanılarak eş zamanlı olarak yapılmıştır. Hazırlanmış olan bu inokülümden her bir tüpe 25 µl eklenmiş ve vortexlenmiştir. Sonuç olarak her bir tüpteki nihai bakteri konsantrasyonu 7,5 x 10^5 CFU/ml olmuştur. 35 ± 2 °C'de *Enterobacteriaceae* için 16-20 saat, *S.maltophilia* için 20-24 saat inkübasyon sonrası sonuçlar değerlendirilmiştir. Değerlendirme yapılırken; 1. tüp üreme kontrolü (ÜK), 2. tüp ATM, 3. tüp CZA, 4. tüp ATM + CZA değerlendirmek için kullanılmıştır. Bulanık olan tüplerde üreme var, berrak olan tüplerde üreme yok olarak değerlendirilmiştir. Antibiyotik diskinin olduğu tüplerde üreme olması, ilgili antibiyotiğe izolatın dirençli olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Tüp içeriği berrak görünümde ise üreme olmamış ve duyarlı olarak değerlendirilmiştir. ATM'ye dirençli ve CZA'ya dirençli iken ATM ve CZA kombinasyonu tüpünde üreme olmadığı durumda iki ilacın sinerjistik etki gösterdiği kabul edilmiştir. Ayrıca ATM'ye tek başına dirençli izolatlarda da; kombinasyona duyarlıysa sinerji pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Kalite kontrol suşu olan *E.coli* 25922'nin üreme kontrolü tüpünde üremiş olması; ATM, CZA ve ATM+CZA tüplerinde üreme olmaması Şekil 2'de gösterilmiştir. Bu testin sonucu ATM, CZA ve ATM+CZA duyarlı olarak değerlendirilmelidir.



Şekil 2. Kalite kontrol suşu olan *E.coli* 25922'nin sıvı disk elüsyon testinde beklenen duyarlılık profili (10)

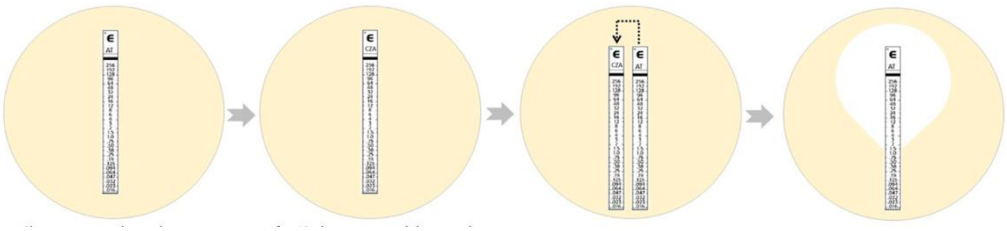
Sıvı disk elüsyon tüplerinde sırasıyla 6, 6/4, 6/6/4 µg/ml olan konsantrasyonlardaki üremeler, gradiyent test sonuçlarıyla karşılaştırılırken, aynı konsantrasyonlarda üreme olup olmaması dikkate alınmıştır. SDE testindeki dördüncü tüpte üreme olmuş fakat gradiyent test sonuçlarında aynı konsantrasyonda üreme olmadıysa büyük hata; sıvı disk elüsyon testinde üreme olmamış fakat gradiyent test yöntemiyle aynı konsantrasyonda üreme tespit edildiyse çok büyük hata olarak kaydedilmiştir.

3.3. GRADİYENT DİFÜZYON TEST YÖNTEMİ

Çalışmaya alınmış olan tüm izolatların ATM MİK'i, CZA MİK'i, ATM ve CZA kombinasyon MİK'ininin saptanmasında gradiyent difüzyon test istifleme yöntemi kullanılmıştır. Hazırlanmış olan 0.5 McFarland bulanıklıktaki süspansiyondan, iki adet MHA (RTA Lab,Türkiye) yüzeyine üç yönde yaygın ekim yapılmıştır. Birinci plağa ATM gradiyent test (Liofilchem, Italy) ve CZA gradiyent test (Liofilchem, Italy) ayrı ayrı yerleştirilmiştir. CZA gradiyent testteki seftazidim konsantrasyonu değişken fakat AVI konsantrasyonu 4 µg/ml olarak sabit olduğundan metin içinde AVI konsantrasyonu sürekli belirtilmemiştir. İkinci plağa ATM gradiyent test şeridi yerleştirilip 10 dakika boyunca beklenerek antimikrobiyalin agara difüzyonu sağlanmıştır. Daha sonra kaldırılan ATM test şeridinin yerine tam olarak denk gelecek şekilde CZA gradiyent test şeridi yerleştirilmiştir. Kaldırılmış olan ATM şeridi, CZA şeridinin üzerine ATM MİK değerinin belirlenebilmesi için tekrar yerleştirilmiştir. Birinci plak şekil 3'te, ikinci plakta yapılan işlemler şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 3. ATM ve CZA gradiyent test şeritlerinin ayrı ayrı yerleştirildiği birinci plak (143)



Şekil 4. İkinci plakta uygulanan gradiyent difüzyon test istifleme yöntemi (143)

35 ± 2 °C sıcaklıktaki etüvde *Enterobacteriaceae* için 16-20 saat, *S.maltophilia* için 20-24 saat inkübasyon sonrası sonuçlar değerlendirilmiştir. Her bir antibiyotik için elde edilen MİK'ler CLSI M100 standartlarına göre değerlendirilmiştir (10). *S.maltophilia* için CLSI dokümanında sınır değerler mevcut olmadığı için, *P. aeruginosa* sınır değerleri kullanılmıştır (9). Değerlendirilirken kullanılan sınır değerler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. ATM, CZA ve ATM-AVI için CLSI standartlarında önerilen klinik sınır değerler (µg/mL)

	ATM			CZA		ATM-AVI
	S	I	R	S	R	S
Enterobacteriaceae	≤4	8	≥16	≤8/4	≥16/4	≤4/4
S. maltophilia	≤8*	16*	≥32*	≤8/4*	≥16/4*	≤8/4*

* *S. maltophilia* için CLSI dokümanında sınır değerler mevcut olmadığı için, *P. aeruginosa* sınır değerleri kullanılmıştır.

Kombine edildiğinde elde edilen MİK değeri, ATM MİK değerinden en az iki dilüsyon düşük tespit edildiyse sinerji var olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen verilerle MİK aralığı, $MİK_{50}$, $MİK_{90}$ değerleri hesaplanmıştır.

3.4. KOMBİNE DİSK SİNERJİ YÖNTEMİ

KDS yöntemi için 30 µg ATM antibiyotik diski, 30/20 µg CZA antibiyotik diski, MHA kullanılmıştır.

Hazırlanmış olan 0.5 McFarland bulanıklıktaki süspansiyondan, eküvyon ile tüpün kenarına bastırıp çevirerek sıvının fazlası uzaklaştırılarak alınan inokülum MHA plak yüzeyine üç yönde sürülerek ekim yapılmıştır. ATM diski, CZA diski,

ATM disk ve onun tam üzerine yerleştirilmiş CZA diski olacak şekilde üç ayrı yerleşim yapılmıştır. Diskler arası mesafenin en az 20 mm olmasına dikkat edilmiştir.

35 ± 2 °C sıcaklıktaki etüvde *Enterobacteriaceae* için 16-20 saat, *S.maltophilia* için 20-24 saat inkübasyon sonrası sonuçlar değerlendirilmiştir. KDS yöntemiyle, çalışmaya dahil edilen 146 izolatın ATM ve CZA kombinasyonuna karşı sinerjistik aktivitesi incelenmiştir. Sinerji varlığı değerlendirilirken, kombine haldeki diskin zon çapı ile ATM diskinin zon çapı karşılaştırılmıştır. Kombinasyon halinde sadece ATM ile oluşan zon çapından ≥5 mm zon çapı artışı varsa sinerji pozitif olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, gradiyent test yöntemi sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

3.4.1. Serum Fizyolojikle Islatarak Kombine Disk Sinerji Test Yöntemi

KDS yöntemiyle sinerji tespit edilememiş olan izolatlarda, %0,9'luk fizyolojik tuzlu su ile antibiyotik diskleri ıslatılarak aynı yöntem tekrarlanmıştır. Bunun nedeni, KDS uygulanırken, disklerin üst üste konmasından kaynaklı olarak üstteki diskin antibiyotik içeriğinin besiyerine yeterince difüze olamayabileceğini düşünmemizdir. Diğer yöntemlerle sinerji tespit edilip KDS ile tespit edilemeyen 22 adet izolatta, serum fizyolojikle antibiyotik diskleri ıslatılarak test tekrarlanmıştır.

Hazırlanmış olan 0.5 McFarland bulanıklıktaki süspansiyondan, eküvyon ile tüpün kenarına bastırıp çevirerek sıvının fazlası uzaklaştırılarak alınan inokülum MHA plak yüzeyine üç yönde sürülerek ekim yapılmıştır. ATM diski yerleştirildikten sonra üzerine steril pipet yardımıyla 10 µl serum fizyolojik damlatılarak diskin ıslanması sağlanmıştır. ATM diskinin tam üzerine CZA diski yerleştirilerek üzerine 20 µl serum fizyolojik damlatılmıştır ve disklerin birbirine yapışması sağlanmıştır. Fakat bu yöntem uygulanırken besiyeri zemininde diskler çevresine serum fizyolojik taşmaması ve yayılım yapmamasına dikkat edilmiştir.

3.5. ÇİFT DİSK SİNERJİ YÖNTEMİ

ÇDS yöntemi için 30 µg ATM antibiyotik diski, 30/20 µg CZA antibiyotik diski, MHA kullanılmıştır. Hazırlanmış olan bakteri inokülumundan, steril eküvyon yardımıyla MHA yüzeyine üç yönde sürülerek ekim yapılmıştır. ATM diski ve CZA diski, aralarında 20-30 mm mesafe olacak şekilde yerleştirilmiştir.

35 ± 2 °C sıcaklıktaki etüvde *Enterobacteriaceae* için 16-20 saat, *S.maltophilia* için 20-24 saat inkübasyon sonrası sonuçlar değerlendirildi. Diskler etrafındaki inhibisyon zonu, diğer diske doğru genişliyorsa veya iki disk arasında kalan alanda inhibisyon zonu benzeri bir görüntü varsa sinerji pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.6. KALİTE KONTROL

SDE yönteminin ve gradiyent test yönteminin rutin haftalık kalite kontrolleri yapılmıştır. Kalite kontrol için Halk Sağlığı Referans Laboratuvarları'ndan temin edilen *E.coli* ATCC 25922, *K.pneumoniae* NCTC 13438(KPC üreticisi), *K.pneumoniae* NCTC 13443(NDM üreticisi), *K.pneumoniae* NCTC 13442(OXA-48 üreticisi), *K.pneumoniae* NCTC 13440(VIM üreticisi) suşları kullanılmıştır.

3.7. SONUÇLARIN ANALİZİ

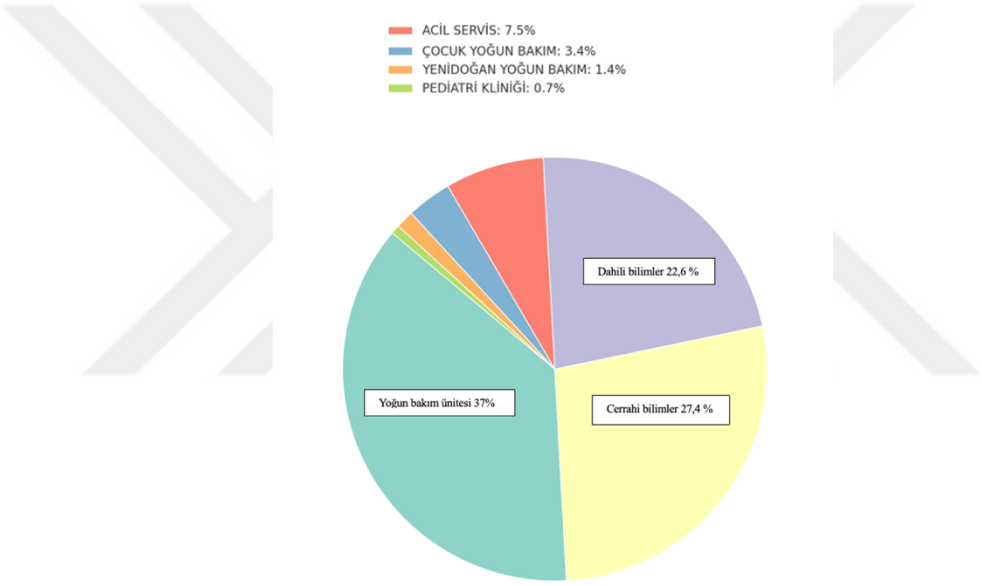
Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama, standart sapma, medyan, en düşük, en yüksek, frekans ve oran değerleri kullanılmıştır. Uyum analizinde Kappa test kullanılmıştır. Analizlerde SPSS 28.0 programı kullanılmıştır.

Tüm izolatlar, gradiyent difüzyon test sonuçlarına göre sinerji pozitif ve sinerji negatif olarak kategorize edilmiştir. SDE, KDS ve ÇDS yönteminde saptanan sonuçlar, referans yöntem olarak kullanılan gradiyent difüzyon test yöntemiyle karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 146 izolatın 75 tanesi kadın, 71 tanesi erkek hastaya ait örneklerden elde edilmiştir. Hastaların yaş ortalaması 61.92 ± 23.38 (yıl) olarak hesaplanmıştır. Median yaş 69'dur. Çalışmadaki izolatların 135'i erişkin (>18yaş), 6'sı bebek (<2yaş), 5'i (2-18 yaş) çocuk hastalardan izole edilmiştir.

Örneklerin gönderildiği klinikler incelendiğinde yoğun bakım üniteleri %37 ile en yüksek orana sahipti. İzolatların kliniklere göre dağılımı Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5. İzolatların gönderildiği kliniklere göre dağılımı

4.1. DİRENÇ PATERNLERİ VE ADT SONUÇLARI

4.1.1. MBL Taşıyan İzolatların Enzim Dağılımı

Kültür koleksiyonumuzda birden fazla enzim içeren suşların tamamı en az bir adet MBL enzimi içermektedir. Eşlik eden ikinci karbapenemaz en sık OXA48 benzeri enzimdir. Ardışık dahil edilmiş olan, MBL taşıyan izolatların enzim dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir.

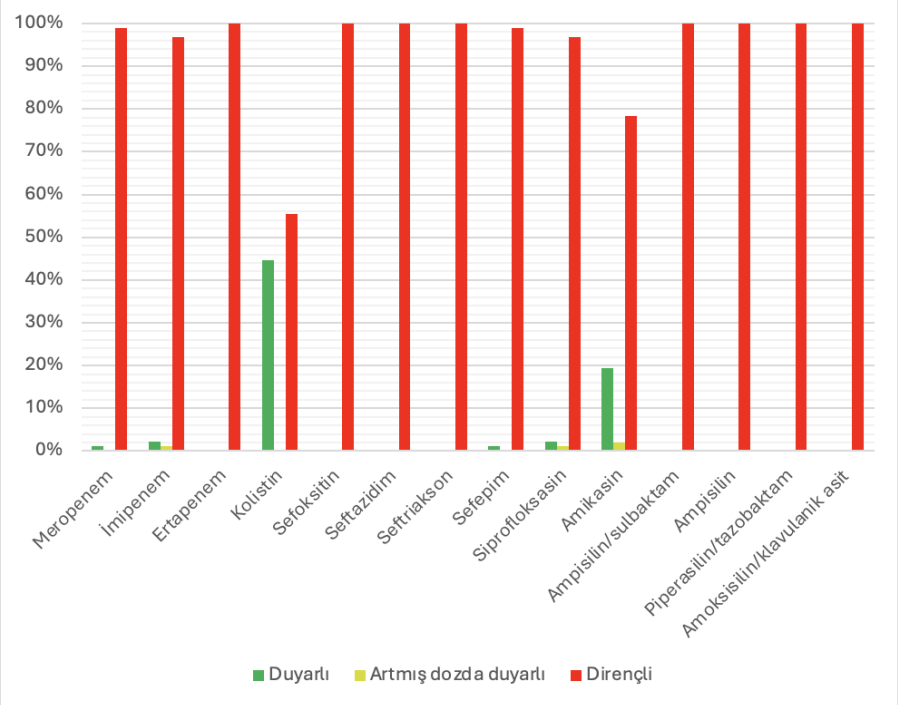
Tablo 1. MBL taşıyan izolatların enzim dağılımı (n=66)

	K.pneumoniae (n=89)	*E.cloacae complex* (n=3)	Toplam
NDM	15	1	16
VIM	0	1	1
OXA48+NDM	35	0	35
KPC+NDM	8	0	8
OXA48+KPC+NDM	4	0	4
OXA48+VIM	1	0	1
OXA48+NDM+VIM	0	1	1

4.1.2. *Enterobacteriaceae* İzolatlarının Duyarlılık Profili

Enterobacteriaceae izolatlarına ait VITEK 2 ve disk difüzyon testi ile elde edilmiş olan antibiyotik duyarlılık profiline Şekil 6'da yer verilmiştir. Ertapenem, sefoksitin, seftazidim, seftriakson, ampisilin, amsipilin-sulbaktam, piperasilin-tazobaktam, amoksisilin-klavulanik asite karşı 92 izolat %100 dirençli bulundu. Meropenem ve sefepime %98,9, imipeneme %96,7, siprofloksasine %96,7, amikasine % 78,4, kolistine %55,4 oranında dirençli tespit edildi. En yüksek

duyarlılık %44,6 oranla kolistin ve %19,5 oranla amikasine karşı bulundu.



Şekil 6. *Enterobacteriaceae* izolatlarının antibiyotik duyarlılık profili (n=92)

İzolatların ürettikleri enzim türüne göre antibiyotik duyarlılık profili Tablo 3'te verilmiştir. VIM üreticisi *E.cloacae complex*, meropeneme duyarlı sonuç veren tek izolat olarak bulunmuştur. Aynı zamanda aynı izolatın imipenem, kolistin, amikasin, siprofloksasine de duyarlı olduğu saptanmıştır.

Kolistin, direnç oranı en az saptanan antibiyotikti. Kolistine karşı en fazla direnç %65,7 oranıyla OXA48+NDM grubunda bulundu. Kolistinden sonra duyarlılık oranı yüksek bulunan antibiyotikler sırasıyla CZA ve amikasindi.

Ertapenem, ampisilin, ampisilin-sulbaktam, sefoksitin, seftazidim, seftriakson, amoksisilin-klavulanik asit ve piperasilin-tazobaktama karşı *Enterobacteriaceae* izolatları %100 oranında dirençli tespit edildi.

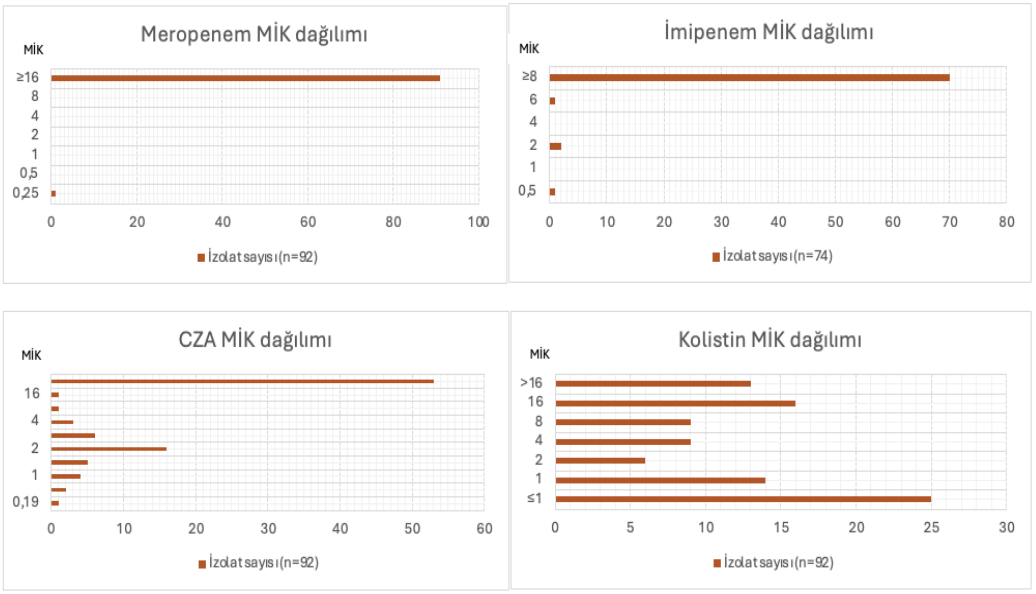
Tablo 3. *Enterobacteriaceae* izolatlarının ürettikleri enzim türüne göre antibiyotik duyarlılık profili

	DİRENÇ N1/N (%)															
	Meropenem	**İmipenem**	**Ertapenem**	**Kolistin**	**Amikasin**	**Siprofloksasin**	**Ampisilin**	**Ampisilin-sulbaktam**	**Sefoksitin**	**Seftazidim**	**Seftriakson**	**Sefepim**	**Amoksisilin-klavulanik asit**	**Piperasilin-tazobaktam**	**Seftazidim-avibaktam**
NDM	16/16 (%100)	16/16 (%100)	16/16 (%100)	7/16 (%43,8)	15/16 (%93,8)	15/16 (%93,8)	16/16 (%100)	16/16 (%100)	16/16 (%100)	16/16 (%100)	16/16 (%100)	16/16 (%100)	16/16 (%100)	16/16 (%100)	14/16 (%87,5)
OXA48+NDM	35/35 (%100)	34/35 (%97,1)	35/35 (%100)	23/35 (%65,7)	32/35 (%91,4)	35/35 (%100)	35/35 (%100)	35/35 (%100)	35/35 (%100)	35/35 (%100)	35/35 (%100)	35/35 (%100)	35/35 (%100)	35/35 (%100)	28/35 (%80)
OXA48	17/17 (%100)	16/17 (%94,1)	17/17 (%100)	7/17 (%41,2)	15/17 (%88,2)	17/17 (%100)	17/17 (%100)	17/17 (%100)	17/17 (%100)	17/17 (%100)	17/17 (%100)	17/17 (%100)	17/17 (%100)	17/17 (%100)	6/17 (%35,3)
KPC+NDM	8/8	8/8	8/8	6/8	3/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	2/8
OXA48+KPC+NDM	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	1/4
KPC	9/9	9/9	9/9	4/9	2/9	8/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	1/9
VIM	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	0/1
OXA48+VIM	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
OXA48+NDM+VIM	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
TOPLAM	91/92 (%98,9)	89/92 (%96,74)	92/92 (%100)	51/92 (%55,4)	73/92 (%78,4)	89/92 (%96,7)	92/92 (%100)	92/92 (%100)	92/92 (%100)	92/92 (%100)	92/92 (%100)	91/92 (%98,9)	92/92 (%100)	92/92 (%100)	54/92 (%58,7)

N1: Dirençli saptanan izolat sayısı N: Çalışılan izolat sayısı

Meropenem, imipenem, kolistin ve siprofloksasin antibiyotiklerinin MİK dağılımları Şekil 7'de verilmiştir.

Çalışmamızdaki *Enterobacteriaceae* izolatlarının 91 tanesinde meropenem MİK değeri >16 µg/ml bulunmuştur. Bir adet VIM üreticisi *E.cloacae complex* suşunda ise meropenem MİK değerinin 0,25 µg/ml tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu suşta imipenem MİK değeri 0,5 µg/ml olarak bulunmuştur. Bunun dışında iki izolatta imipenem MİK değeri 2 µg/ml bulunmuştur. Bir tanesinin OXA-48, diğerinin OXA-48+NDM üreten *K.pneumoniae* izolatı olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 7. Meropenem, imipenem, kolistin, CZA antibiyotiklerinin Enterobacteriaceae izolatlarındaki MİK değerleri (µg/ml)

4.1.3. *S. maltophilia* İzolatlarının Duyarlılık Profili

54 *S.maltophilia* izolatının tamamı TMP-SMX'e artmış dozda duyarlı bulundu. 54 suşun 52 tanesi(%96,3) levofloksasine duyarlıydı, diğer iki tanesi artmış dozda duyarlı tespit edildi. *S.maltophilia* izolatlarına ait antibiyotik duyarlılık profili Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. S.maltophilia izolatlarında disk difüzyon ADT sonuçları (n=54)

	Duyarlı	Artmış Dozda Duyarlı	Dirençli
TMP-SMX	0	54 (%100)	0
Levofloksasin	52 (%96,3)	2 (%3,7)	0

4.2. SIVI DİSK ELÜSYON SONUÇLARI

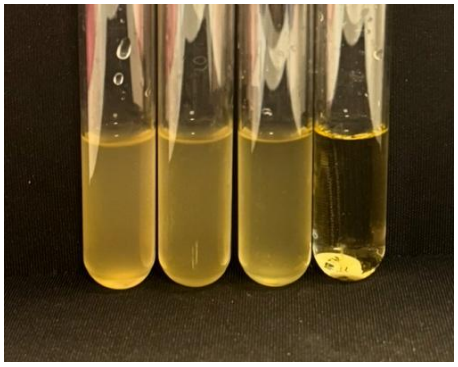
SDE sonuçları değerlendirildiğinde ATM'ye dirençli olan 146 izolatın 65 tanesi (%44,5) CZA'ya dirençli bulunmuştur. Çalışmaya dahil edilmiş 146 izolatın tamamında sinerji tespit edilmiştir. Tablo 5'te çalışılan mikroorganizma türüne göre SDE testi sonuçları verilmiştir.

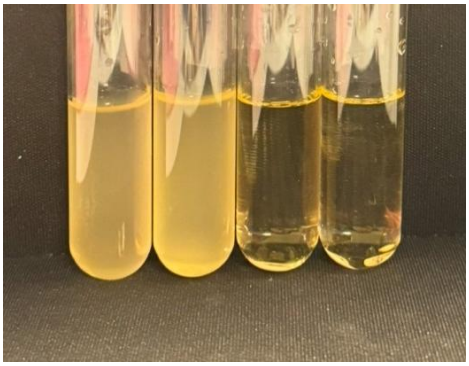
Tablo 5. Tüm izolatlarda ve mikroorganizma türüne göre sıvı disk elüsyon testi sonuçları

		Duyarlı	Duyarlı Değil
K.pneumoniae **(n=89)**	**ATM**	0	89 (%100)
	CZA	35 (%39,3)	54 (%60,7)
	ATM + CZA	89 (%100)	0
S.maltophilia **(n=54)**	**ATM**	0	54 (%100)
	CZA	45 (%83,3)	9 (%16,7)
	ATM + CZA	54 (%100)	0
E.cloacae complex **(n=3)**	**ATM**	0	3 (%100)
	CZA	1 (%33,3)	2 (%66,7)
	ATM + CZA	3 (%100)	0
Toplam (n=146)	**ATM**	0	146 (%100)
	CZA	81 (%55,5)	65 (%44,5)
	ATM + CZA	146 (%100)	0

ATM dirençli, CZA dirençli iken ATM+CZA kombinasyonuna duyarlı bulunarak sinerji saptanan bir *K.pneumoniae* izolatına ait SDE test sonucuna Şekil 8a'da yer verilmiştir. Benzer şekilde; Şekil 8b'de ilk iki tüpte üreme varken, üçüncü

ve dördüncü tüplerde üreme olmaması ATM dirençli ve CZA duyarlıyken, ATM+ CZA kombinasyonuna duyarlı ve sinerji saptandı olarak kaydedilmiştir.

8a. 

8b. 

Şekil 8a. ATM dirençli, CZA dirençli, ATM + CZA duyarlı bir *K.pneumoniae* izolatının SDE test sonucu

Şekil 8b. ATM dirençli, CZA duyarlı, ATM + CZA duyarlı bir *S. maltophilia* izolatının SDE test sonucu

4.3. GRADİYENT DİFÜZYON TESTİ SONUÇLARI

Gradiyent difüzyon test sonuçları değerlendirildiğinde 146 izolatın 142 tanesi (%97,3) ATM'ye dirençli ve dört tanesi (%7,4) artmış dozda duyarlı bulunmuştur. Artmış dozda duyarlı bulunan dört izolat, *S.maltophilia* türüne aittir. ATM MİK değerleri 12, 16, 16, 24 µg/ml'dir.

Çalışmaya dahil edilmiş 146 izolatın tamamında sinerji tespit edilmiştir. Tüm izolatlardaki ve izolat türlerine göre sonuçlar Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Tüm izolatlarda ve mikroorganizma türüne göre gradiyent difüzyon test sonuçları

		Duyarlı	Artmış Dozda Duyarlı	Dirençli
K.pneumoniae **(n=89)**	**ATM**	0	0	89 (%100)
	CZA	37 (%41,6)	0	52 (%58,4)
	ATM + CZA	89 (%100)	0	0
S.maltophilia **(n=54)**	**ATM***	0	4 (%7,4)	50 (%92,6)
	CZA*	48 (%89)	1 (%1,8)	5 (%9,2)
	ATM + CZA*	54 (%100)	0	0
E.cloacae complex **(n=3)**	**ATM**	0	0	3 (%100)
	CZA	1 (%33,3)	0	2 (%66,7)
	ATM + CZA	3 (%100)	0	0
Toplam (n=146)	**ATM**	0	4 (%2,7)	142 (%97,3)
	CZA	86 (%58,9)	1 (%0,7)	59 (%40,4)
	ATM + CZA	146 (%100)	0	0

* *S. maltophilia* için CLSI dokümanında sınır değerler mevcut olmadığı için, *P. aeruginosa* sınır değerleri kullanılmıştır.

Antimikrobiyallerin tek tek ve kombine haldeki $MİK_{50}$ (µg/ml), $MİK_{90}$ (µg/ml), MİK dağılımları (µg/ml), saptanan duyarlılık yüzdeleri (%) Tablo 7'de gösterilmiştir.

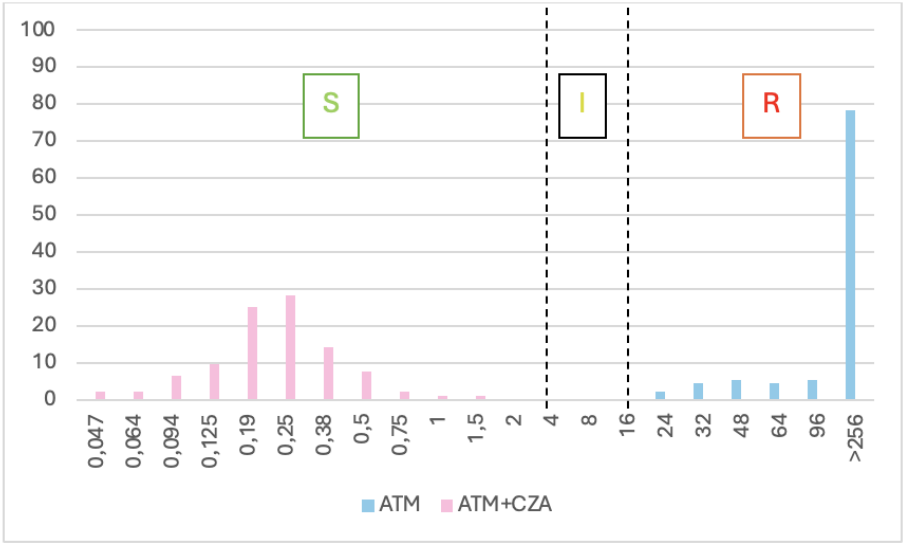
Tablo 7. ATM, CZA ve ATM+CZA'nın *Enterobacteriaceae* ve *S.maltophilia* izolatlarında $MİK_{50}$ (µg/ml), $MİK_{90}$ (µg/ml), MİK dağılımı (µg/ml) ve duyarlılık yüzdeleri (%)

Mikroorganizma	Antimikrobiyal	$MİK_{50}$	$MİK_{90}$	MİK Dağılımı	Duyarlılık (%)
Enterobacteriaceae (n=92)	ATM	>256	>256	24 - >256	0
	CZA	>256	>256	0,19 - >256	41,3
	ATM+CZA	0,25	0,5	0,047 - 1,5	100
S.maltophilia (n=54)	ATM	>256	>256	12 - >256	0*
	CZA	1,5	12	0,38 - >256	88,8*
	ATM+CZA	0,75	1,5	0,125 - 2	100*

* *S. maltophilia* için CLSI dokümanında sınır değerler mevcut olmadığı için, *P. aeruginosa* sınır değerleri kullanılmıştır.

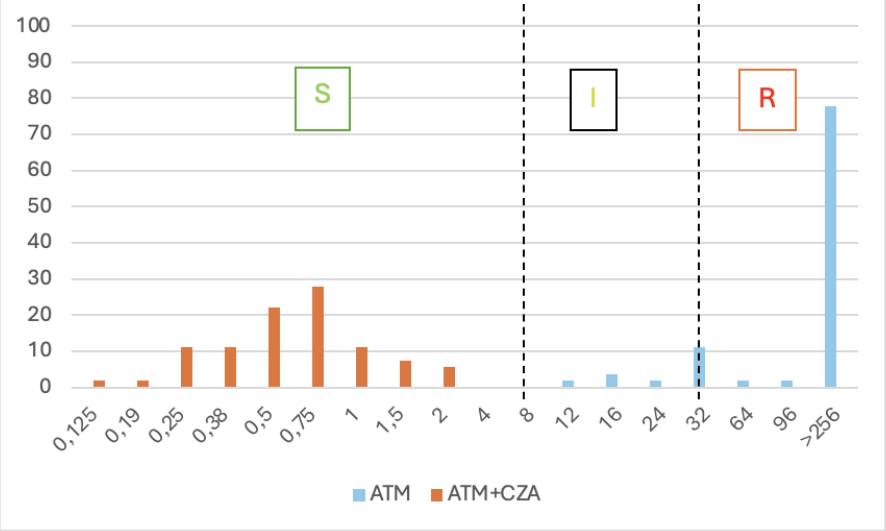
146 izolatın %78,1'inde ATM MİK değeri >256 µg/ml olarak bulunmuştur.

Enterobacteriaceae izolatlarında ATM MİK değerleri aralığı 24-96 µg/ml iken, CZA ile kombinasyon halinde 0,064-2 µg/ml aralığında tespit edilmiştir. *Enterobacteriaceae* izolatlarındaki ATM ve ATM+CZA'ya ait MİK dağılımları Şekil 9'da verilmiştir.



Şekil 9. *Enterobacteriaceae* (n=92) izolatlarında ATM ve ATM+CZA MİK(µg/ml) dağılımı yüzdeleri

ATM MİK değerleri *S.maltophilia* izolatlarında 12-96 µg/ml aralığında, CZA ile kombinasyon halinde ise 0,125-2 µg/ml aralığında bulunmuştur. *S.maltophilia* izolatlarındaki ATM ve ATM+CZA'ya ait MİK dağılımları Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 10. *S.maltophilia* (n=54) izolatlarında ATM ve ATM+CZA MİK(µg/ml) dağılımı yüzdeleri

4.4. KOMBİNE DİSK SİNERJİ YÖNTEMİ

Çalışmaya dahil edilmiş olan 146 suşun 124'ünde KDS yöntemiyle sinerji tespit edilmiştir. Bu yöntemin SDE ve gradiyent difüzyon test yöntemi sonuçlarıyla uyumu %84,9 bulunmuştur.

K. pneumoniae türlerinin 69 tanesinde (%77,5), *S. maltophilia* izolatlarının 52'sinde (%96,3), *E.cloacae complex* türlerinin 3'ünde (%100) sinerji tespit edilmiştir. Mikroorganizma türlerine göre disk difüzyon ve KDS sonuçları Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. Tüm izolatlarda ve mikroorganizma türüne göre disk difüzyon ve kombine disk sinerji testi sonuçları

		Duyarlı	Artmış Dozda Duyarlı	Dirençli
K.pneumoniae **(n=89)**	**ATM**	0	0	89 (%100)
	CZA	35 (%39,3)	0	54 (%60,7)
	ATM + CZA	69 (%77,5)	0	20 (%22,5)*
S.maltophilia **(n=54)**	**ATM**	0	7 (%13)	47 (%87)**
	CZA	47 (%87)	0	7 (%13)**
	ATM + CZA	52 (%96,3)	0	2 (%3,7)* **
E.cloacae complex **(n=3)**	**ATM**	0	0	3 (%100)
	CZA	1 (%33,3)	0	2 (%66,7)
	ATM + CZA	3 (%100)	0	0
Toplam (n=146)	**ATM**	0	7 (%4,8)	139 (%95,2)
	CZA	83 (%56,9)	0	63 (%43,1)
	ATM + CZA	124 (%84,9)	0	22 (%15)*

*Sinerji tespit edilemeyen 22 izolata, serum fizyolojikle ıslatarak KDS çalışıldığında %100 sinerji tespit edilmiştir

** *S. maltophilia* için CLSI dokümanında sınır değerler mevcut olmadığı için, *P. aeruginosa* sınır değerleri kullanılmıştır.

Sinerji tespit edilemeyen 22 suşun, *S.maltophilia* türüydü. 20 tanesi *K.pneumoniae* izolatıydı ve 13 tanesi MBL enzimi barındırıyordu (9'u OXA 48+NDM, 4 tanesi NDM).

Bu 22 izolata serum fizyolojikle ıslatarak KDS yöntemi tekrarlandığında 22'sinde de sinerji saptanmıştır. Bu yöntemin SDE ve gradiyent difüzyon test sonucuyla uyumu %100 olarak bulunmuştur.

4.5. ÇİFT DİSK SİNERJİ YÖNTEMİ

146 izolatın 144 tanesinde ÇDS yöntemiyle sinerji tespit edilmiştir. Bunun SDE ve gradiyent test yöntemleriyle uyumu %98,6'dır.

Sinerji tespit edilemeyen iki suş, *S.maltophilia* ve *K.pneumoniae* (KPC üreticisi) türleridir. SDE, gradiyent difüzyon test ve KDS ile sinerji tespit edilmesine

rağmen ÇDS ile sinerji saptanmamıştır. *S.maltophilia* SDE, gradiyent difüzyon testi ve disk difüzyon testinde ATM'ye dirençli ve CZA'ya duyarlı bulunmuştur. *K.pneumoniae* ise her üç yöntemle de ATM ve CZA'ya dirençli bulunmuştur.

4.6. SONUÇLARIN ANALİZİ

SDE yöntemi sonuçlarının, çalışmamızda referans yöntem olan gradiyent difüzyon testi sonuçlarına göre bulunan kategorik uyum, büyük hata, çok büyük hata oranları Tablo 9'da verilmiştir. ATM ve ATM+CZA kombinasyonu değerlendirildiğinde iki yöntem sonuçlarında %100 kategorik uyum bulunmuştur. CZA sonuçları arasında %96,6 kategorik uyum bulunmuştur. CZA için saptanan büyük ve çok büyük hata oranları sırasıyla %3,5, %3,3 olarak bulunmuştur.

Tablo 9. SDE testi sonuçlarının gradiyent test yöntemiyle kategorik uyumu ve saptanan hata oranları

		Duyarlı	Duyarlı Değil	Kategorik Uyum	Büyük Hata	Çok Büyük Hata
Toplam (n=146)	**ATM**	0	146 (%100)	146/146 (%100)	0	0
	CZA	86 (%58,9)	60 (%41,1)	141/146 (%96,6)	3/86 (%3,5)	2/60 (%3,3)
	ATM + CZA	146 (%100)	0	146/146 (%100)	0	0

5. TARTIŞMA

Çoklu ilaca dirençli gram-negatif bakteri enfeksiyonları, sınırlı tedavi seçenekleri nedeniyle küresel bir sağlık tehdidi haline gelmiştir. Özellikle MBL üreten gram-negatif bakteriler, sınırlı tedavi alternatifleriyle tedavi yönetimini zorlaştırmaktadır. Bu doğrultuda, kombine tedaviler dirençli enfeksiyonların yönetiminde umut vadeden bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır (138). Antibiyotik kombinasyonlarının sinerjik etkilerini değerlendiren birçok çalışma, bu tür tedavilerin etkinliğini ve güvenilirliğini ortaya koymuştur (144). Ancak, bu yöntemlerin standartlarının oluşturulması ve klinik uygulamalara entegrasyonu halen tartışmalıdır (138).

Çalışmamızda, ATM ve CZA kombinasyonunun sinerjik etkisi, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında pratik bir yöntem olarak kullanılan SDE testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar, referans yöntem olarak kullanılan gradiyent difüzyon testi ile karşılaştırılmıştır. Sinerjiyi saptamada SDE test sonuçları, gradiyent difüzyon test sonuçlarıyla karşılaştırıldığında %100 uyumlu tespit edilmiştir. Beraberinde KDS ve ÇDS testleri de yapılmıştır. Bu yöntemlerin gradiyent difüzyon testiyle uyumları sırasıyla %84,93 (124/146), %98,63 (144/146) bulunmuştur.

ATM ve CZA kombinasyonu, MBL üreten gram-negatif bakterilere karşı etkili bir tedavi seçeneği olarak öne çıkmaktadır. Bu kombinasyon, özellikle karbapenemlere dirençli *Enterobacteriaceae*, *P.aeruginosa* ve *S.maltophilia* suşlarında umut vadeden sonuçlar vermektedir (144). Çalışmamıza 89 *K.pneumoniae*, 54 *S.maltophilia*, 3 *E.cloacae complex* izolatı dahil edilmiştir. Toplam 146 suşun 142 tanesi ATM'ye dirençli, 4 tanesi artmış dozda duyarlı bulunmuştur. *K.pneumoniae* ve *E.cloacae complex* izolatlarının hepsi karbapenemaz üreticisidir. *S.maltophilia* izolatlarının %96,3'ü levofloksasine duyarlı, %100'ü TMP-SMX'e artmış dozda duyarlı olarak bulunmuştur. Bu patojen için alternatif tedaviler mevcutsa da, kombinasyon tedavilerine hala ihtiyaç vardır. *S.maltophilia* duyarlılığını in-vitro olarak değerlendirirken laboratuvarımızda; levofloksasin CLSI'a, TMP-SMX ise EUCAST kriterlerine göre değerlendirilmiştir. ATM ve CZA için her iki dokümanda da öneri bulunmadığı için, bu çalışma sırasında ATM, CZA,

ATM+CZA MİK sonuçları *S.maltophilia* izolatlarında değerlendirilirken *P.aeruginosa* için önerilen değerler referans alınmıştır (9).

Adrie ve arkadaşları, YBÜ'de yatan hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada kan dolaşımı enfeksiyonlarının, mortaliteyi %40 oranında artırdığını, uygunsuz ampirik tedavi verilmesinin mortalite riskini iki kat arttırdığını göstermişlerdir. Bununla birlikte, uygun tedavi sağlandığında mortalitenin azaldığı bulunmuştur (145). Çalışmamızdaki izolatların elde edildiği örneklerin klinik dağılımına bakıldığında YBÜ %37 ile en yüksek orana sahiptir. Bunu %27,4 ile cerrahi birim, %22 ile dahili birim klinikleri izlemektedir. Özellikle mortalite riskinin daha yüksek bulunduğu birimlerde yatan hastalar için, ATM+CZA kombinasyonunun kullanımı ve bunun laboratuvarda diğer yöntemlerden daha kolay bir şekilde saptanabilmesi önemli hale gelmiştir.

Maraki ve arkadaşları, MBL üreten ve çoklu ilaca dirençli 40 adet MBL üreten *K.pneumoniae* izolatında, ATM ve CZA kombinasyonunun %97,5 oranında sinerjik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. ATM ve CZA kombinasyonunun MBL üreten *K. pneumoniae* suşlarına karşı en güçlü seçeneklerden biri olduğunu ortaya koymuşlardır (146). Mauri ve arkadaşları, 2209 adet izolat üzerinde MBL üreten gram-negatif bakterilere karşı ATM ve AVI kombinasyonunun etkinliğini incelemişlerdir. MBL üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarının %80'inde, *S.maltophilia*'ların %85'inde ve MBL üreten *P.aeruginosa*'ların %6'sında ATM+CZA kombinasyonu, antimikrobiyal aktivite göstermiştir. (147). Çalışmamıza ardışık olarak alınmış olan MBL üreticisi izolatlarda en sık tespit edilmiş olan karbapenemaz enzimi kombinasyonu, OXA 48 + NDM olarak bulunmuştur. Bunu sırasıyla NDM, KPC+NDM ve diğer enzim kombinasyonları izlemektedir. Çalışmamıza dahil edilen *Enterobacteriaceae* izolatlarından yalnızca MBL üreten izolat sayısı 17'yken, MBL ve diğer enzim kombinasyonlarını barındıranların sayısı 49 olarak bulunmuştur. Yalnızca MBL üreten 17 izolatın hepsi ATM dirençli, 14'ü aynı zamanda CZA'ya da dirençli bulunmuştur. ATM, CZA ve ATM+CZA SDE test sonuçları, gradiyent difüzyon testi sonuçlarıyla %100 kategorik uyum göstermiştir. MBL ve beraberinde ikinci veya üçüncü enzimler taşıyan 49 izolatın hepsi ATM dirençliyken, CZA'ya da dirençli olanların sayısı 33 olarak tespit edilmiştir. Bu grupta ATM ve ATM+CZA kategorik uyumu %100 bulunmuş, CZA duyarlı iki adet

izolatta (%4,1) SDE tüpünde üreme saptanmış ve büyük hata olarak kaydedilmiştir. Bu izolatların enzim tipleri OXA48+KPC+NDM ve KPC+NDM'dir. ATM + CZA kombinasyonu, MBL üreten ve çoklu enzim taşıyan izolatlara karşı güçlü bir tedavi seçeneği olarak öne çıkarken, laboratuvarda %100 kategorik uyum göstermesi, klinik uygulamalarda güvenilirliğini artırmaktadır.

MBL üreten suşlarda ATM+CZA kombinasyonunun etkinliğini kanıtlayan oldukça fazla araştırma bulunmasının yanı sıra, farklı direnç enzimleri üretenlerde de etkili olduğunu ortaya koyan çalışmalar vardır. Wise ve arkadaşları Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance (ATLAS) kapsamında yaptıkları çalışmalarında, ATM+AVI kombinasyonunu MBL üreten izolatların %97,3'ünde etkili bulmuşlardır. Bu oran NDM, KPC, OXA48 benzeri enzim üreticilerinde sırasıyla %97,2, %100, %99,5 olarak bulunmuştur (148). Papp-Wallace ve arkadaşlarının ATM+AVI kombinasyonunun sinerjik etkisini araştırdıkları bir çalışmada, KPC üreten izolatlarda %91,4 oranında etkinlik gösterdiği rapor edilmiştir (149). Zhang ve arkadaşlarının çalışmasında ATM+CZA kombinasyonunun etkinliği, KPC ve OXA-232 üreten izolatlarda araştırılmış, %90'ın üzerinde sinerjik etki gösterdiği belirtilmiştir (150). Wu ve arkadaşlarının çalışmasında ATM+CZA kombinasyonu ile, NDM gibi MBL üreten izolatlarda %95'in üzerinde, OXA-48 üreten izolatlarda ise %80 oranında sinerji gözlemlenmiştir. Bu bulgular, ATM ve CZA kombinasyonunun farklı karbapenemaz türlerine karşı etkili olabileceğini göstermektedir (151). Çalışmamıza dahil edilen 17 OXA-48 ve 9 KPC üreten *K.pneumoniae* izolatında SDE ve gradiyent difüzyon testleriyle %100 sinerji saptanmıştır. 9 adet KPC üreten izolatın tamamı ATM dirençliyken, yalnızca bir tanesinde CZA direnci saptanmıştır. ATM, CZA, ATM+CZA için kategorik uyum %100 bulunmuştur. 17 adet OXA-48 benzeri enzim üreten izolatın tamamı ATM'ye, 6'sı CZA'ya dirençli saptanmıştır. Tespit edilen kategorik uyum oranı %100'dür. Bu sonuçlarla, KPC ve OXA-48 benzeri enzim üreten toplam 26 izolatın 19 tanesinde CZA duyarlı bulunmuş olup monoterapiyle tedavi edilebilmeleri de mümkün görünmektedir. Buna rağmen bu izolatlarda %100 oranda ATM+CZA sinerjisi saptanmıştır.

Falcone ve arkadaşlarının VIM-1 üreten *E.cloacae* izolatları üzerinde yaptığı bir çalışmada, bu izolatların imipeneme ve meropeneme duyarlı olduğu ve genellikle

hastane kökenli enfeksiyonlarla ilişkilendirildiği gösterilmiştir (152). Çalışmamızdaki bir adet VIM üreticisi *E.cloacae complex* izolatında ise meropenem MİK değeri 0,25 µg/ml tespit edilmiştir. Bu izolatın MİK değerleri ATM, CZA, ATM+CZA için sırasıyla 48 µg/ml, 1,5 µg/ml, 1 µg/ml olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar, diğer antibiyotiklerle tedavi alternatifleri olduğunu gösterse de, MBL enzimi üretimi saptandığı için çalışmamıza dahil edilmiştir. ATM+CZA tedavisinin, bu izolatta primer olarak olmasa da alternatif bir tedavi seçeneği olabileceği düşünülmüştür.

Moquet ve arkadaşları çoklu ilaca dirençli OXA-48 benzeri enzim üreten *Enterobacteriaceae* izolatıyla yaptıkları çalışmada; 11 izolattan 9 tanesini imipenem ve meropeneme duyarlı bulmuşlardır (153). Potron ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 107 adet OXA-48 benzeri enzim üreten izolat incelenmiştir (*K. pneumoniae*, *E.coli*, ve *E.cloacae*). İzolatların %66'sı imipeneme duyarlı bulunmuştur (154). VIM üreten ve meropeneme de duyarlı olduğu bulunan *E.cloacae complex* izolatında, aynı zamanda imipenem MİK değeri 0,5 µg/ml olarak bulunmuştur. Bunun dışında iki izolatta imipenem MİK değeri 2 µg/ml bulunmuştur. Bir tanesinin OXA-48, diğerinin OXA-48+NDM üreten *K.pneumoniae* izolatı olduğu tespit edilmiştir. Bu iki izolat aynı zamanda CZA'ya karşı duyarlı bulunmuştur. Bu izolatlarla enfekte hastalar için tedavi, diğer ajanlarla mümkün görünse de ATM+CZA kombinasyonunun da alternatif bir seçenek olabileceği düşünülmüştür.

Vasoo ve arkadaşlarının 177 tane karbapenemaz üreticisi suşla yaptığı çalışmada, %88 oranla en yüksek kolistine duyarlılık saptanmıştır (155). Sonnevend ve arkadaşlarının karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* izolatlarında yaptığı çalışmada, en yüksek duyarlılık %95,5 oranıyla ATM-AVI kombinasyonuna karşı saptanmakla beraber, buna en yakın %79,8 ile kolistine karşı duyarlılık bulunmuştur (156). Çalışmamızdaki *Enterobacteriaceae* izolatlarının antibiyotik duyarlılık profiline bakıldığında en yüksek duyarlılık %44,57 oranla kolistine karşı bulunmuştur. Bu oran literatürde rapor edilen kolistin duyarlılığına kıyasla belirgin şekilde daha düşüktür. Kolistine dirençli izolatlar incelendiğinde, dirençli suşlar arasında en sık olarak OXA-48+NDM kombinasyonuna sahip izolatlarda (%65,7) direnç tespit edilmiştir. Bu durum, özellikle çoklu direnç mekanizmalarına sahip izolatlarda kolistin gibi son çare antibiyotiklerin dahi etkisiz kalabileceğini

göstermekte ve bu tür direnç mekanizmalarının yönetiminde daha etkili stratejilere ihtiyaç duyulduğunu ortaya koymaktadır. Bununla beraber kolistinin, monoterapide kulanıldığında direnç gelişimi ve tedavi başarısızlıkları gibi sorunlara yol açabileceği bilinmektedir (157).

Biedenbach ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada, NDM-1 üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarında amikasin direnci %79.9 olarak rapor edilmiştir (158). Benzer şekilde Lin ve arkadaşları, NDM üreten *K.pneumoniae* izolatlarını amikasine %69.57 oranında duyarlı olarak bildirmiştir (159). Çalışmamızda, NDM ve OXA48+NDM üreten izolatlarda amikasin direncinin %90'ın üzerinde olduğu saptanmıştır ve literatürle karşılaştırıldığında dikkat çekicidir. Bu durum, bulgularımızın daha yüksek direnç oranlarını işaret ettiğini göstermektedir. Çalışmamızda incelenen suşların genetik yapısındaki farklılıklar, coğrafi varyasyonlar, ek direnç genlerinin varlığı veya izolat sayısının az olmasının bu farka neden olabileceği düşünülmüştür.

S. maltophilia enfeksiyonlarında görülme sıklığının ve antibiyotik direncinin küresel olarak artış gösterdiğini rapor eden araştırmalar vardır (91). Karbapenemler dahil geniş spektrumlu antibiyotiklere direnç göstermesi, tedaviyi zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, tedavi seçenekleri sınırlıdır ve direnç mekanizmaları dikkate alınarak yaklaşım belirlenmelidir (160, 161). Ayrıca *S.maltophilia* için önerilen standart bir test yöntemi ve bazı antibiyotiklerin MİK sınır değerleri, uluslararası standartlarda (örneğin, CLSI veya EUCAST) tam olarak belirlenmemiştir. Bu durum, test sonuçlarının yorumlanmasını zorlaştırmaktadır.

S.maltophilia kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonlarında, ilk tercih edilen tedavi seçeneği TMP-SMX'dir. TMP-SMX kullanılamadığı durumlarda, levofloksasin, minosiklin veya yeni bir ajan olan sefiderokol alternatif tedavi seçenekleridir. Komplike enfeksiyonlarda veya direnç saptanması durumunda, TMP-SMX ile levofloksasin veya seftazidim kombinasyonları kullanılmaktadır (162). Çalışmamızdaki *S.maltophilia* izolatlarının %100'ü TMP-SMX'e artmış dozda duyarlı bulunmuştur. Levofloksasine ise 52 izolat (%96,3) duyarlı bulunmuştur.

ATM+AVI kombinasyonu *S. maltophilia*'nın L1 ve L2 β-laktamaz enzimlerine karşı etkinliği değişkendir. L2 enzimi AVI tarafından etkili bir şekilde

inhibe edilirken, L1 bu inhibitöre dirençlidir. Ancak, ATM'nin L1 enzimi tarafından parçalanmaması nedeniyle kombinasyonun L1 üreten izolatlarda da etkili olduğu belirlenmiştir. ATM+CZA kombinasyonunun L2'yi inhibe ederek güçlü bir etki gösterdiği, L1'e dolaylı olarak etkili olduğu bildirilmiştir (163, 164). Çalışmamızdaki *S.maltophilia* izolatlarında L1 ve L2 ayrımı yapılamamıştır.

Harris ve arkadaşları, ATM+CZA kombinasyonundaki sinerjiyi saptamak için SDE yöntemini geliştirmişlerdir (9). SDE yönteminin düşük maliyet ve kolay uygulanabilirliği sayesinde, özellikle imkanları kısıtlı olan laboratuvarlarda dahi kolaylıkla kullanılabilir olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (138). Sadece belirli bir konsantrasyondaki üremenin değerlendirilmesi, bu değerlere yakın ancak antibiyotik duyarlılık standartlarına göre farklı duyarlılık kategorilerine giren durumlarda uyumsuzluklara yol açabilmektedir. Song ve arkadaşları, daha önce geliştirilmiş olan bu yöntemi uygularken modifiye ederek bazı tüplerde bir veya iki ATM diski, bazı tüplerde 30/20 µg veya 10/4 µg CZA diskleri kullanarak, farklı konsantrasyonlarda SDE tüpleri oluşturmuşlardır. Bu sayede testin saptayabileceği MİK aralığı genişletilmiştir. ATM+CZA kombinasyonu ve referans yöntem arasında %99.5 kategorik uyum ve %0.5 büyük hata oranı tespit edilmiştir (165). Benzer şekilde; Harris ve arkadaşlarının çalışmasında, SDE yöntemi, referans yönteme kıyasla %98.3 kategorik uyumlu bulunmuş ve büyük hata oranı %1,8 olarak belirtilmiştir (9). Bu bulgular, sıvı disk elüsyon yönteminin, ATM+CZA kombinasyonunun etkinliğini değerlendirmek için pratik ve doğru bir test aracı olduğunu göstermekte ve laboratuvar ortamında kullanımını desteklemektedir. SDE yönteminin etkinliğini araştırdığımız çalışmamızda ATM için 6 µg/ml, CZA için 6/4 µg/ml, ATM+CZA için 6/6/4 µg/ml konsantrasyonları değerlendirilmiştir. Çalışmada yer alan 146 izolatın tamamında ATM+CZA kombinasyonunun güçlü bir sinerjik etki gösterdiği tespit edilmiştir. *Enterobacteriaceae* ve *S.maltophilia* izolatlarında ATM+CZA kombinasyonuyla %100 duyarlılık sağlanmıştır. Ayrıca, sıvı disk elüsyon ve gradiyent difüzyon test yöntemleri arasında %100 uyum tespit edilmiştir. SDE ve gradiyent test sonuçlarının karşılaştırmasında; ATM ve ATM+CZA için %100, CZA için %96,6 kategorik uyum saptanmıştır. %95'in üzerindeki uyum oranları, test yöntemlerinin tanı ve tedavi süreçlerinde doğru yönlendirme sağlayabileceğini göstermektedir. ATM ve ATM+CZA'da büyük ve çok büyük hata tespit edilmezken,

CZA'da bunların oranı sırasıyla %3,5 ve %3,3 olarak bulunmuştur. Literatürde, %5'in altındaki büyük ve çok büyük hata oranları, klinik olarak kabul edilebilir sınırlar içerisinde belirtilmektedir. Bu bulgular, özellikle ATM ve ATM+CZA testlerinin doğruluğunu vurgulamakta ve CZA testinin de yüksek düzeyde güvenilir bir yöntem olduğunu ortaya koymaktadır.

Gradiyent difüzyon testiyle sinerjiyi saptamak için gradiyent test istifleme dışında çapraz yerleştirme yöntemi de yapılan çalışmalarda sıkça test edilmektedir. Avery ve arkadaşları, çaprazlama ve gradiyent test istifleme yöntemlerinde farklı firmalara ait ürünleri kıyaslamışlardır. Çaprazlama yöntemi, özellikle Etest (bioMérieux) şeritleri ile daha tutarlı ve güvenilir sonuçlar sağlamıştır. Buna karşılık, istifleme yönteminin Liofilchem Minimum Inhibitory Concentration Test Strips (MTS) şeritleri kullanıldığında daha iyi sonuç verdiği belirtilmiştir. Liofilchem'in kağıt tabanlı şeritlerinin, sinerjiyi daha net görülür hale getirdiğini ifade etmişlerdir. Özetle, kullanılan yöntemin ve test şeridi markasının uygulamaya bağlı olarak değişen avantajlar sunduğunu göstermektedir (166). Çalışmamızdaki tüm gradiyent test şeritleri ardışık yerleştirme uygulanan gradiyent test istifleme yöntemine uygun olarak Liofilchem firmasından temin edilmiştir.

Khan ve arkadaşlarının çalışmasında, KDS yönteminin ATM+CZA kombinasyonundaki sinerjiyi tespit etmede düşük performans gösterdiği ve referans yönteme göre %54 büyük hata oranı ile yalnızca %25 uyum sağladığı rapor edilmiştir (138). Çalışmamızdaki KDS sonuçlarının SDE ve gradiyent difüzyon test yöntemiyle uyumu %84,9 olarak bulunmuştur. Sinerjiyi saptamada diğer üç yöntemden daha az başarılı bulunmuştur.

Yamano ve arkadaşları, çalışmalarında sinerji tespiti için KDS yöntemini kullanmış ve antibiyotik diskleri fizyolojik tuzlu su ile ıslatılarak üst üste yerleştirmişlerdir. Sonuç olarak bu yöntemin doğruluğunu yüksek bulduklarını belirtmişlerdir (167). Bizim çalışmamızda da sinerji saptanmayan 22 izolatta (%15,1) serum fizyolojikle antibiyotik diskleri ıslatıldıktan sonra KDS yöntemi tekrar edildiğinde %100 uyum elde edilmiştir. Bu sonuçların diğer çalışmalara göre daha iyi olması, fizyolojik tuzlu su ile antibiyotik disklerinin ıslatılmasının yöntemin sonucunu etkileyebileceğini göstermektedir.

Verschelden ve arkadaşları, ATM ve CZA kombinasyonunda ÇDS yönteminin etkinliğini değerlendirilmiştir. *Enterobacteriaceae, P.aeruginosa* ve *S.maltophilia* olmak üzere toplam 65 izolatla çalışılan ÇDS testi sonuçları referans alınan yöntemle %100 uyumlu bulunmuştur (168). Khan ve arkadaşları, *Enterobacteriaceae* izolatlarında yaptıkları çalışmada, izolatların yalnızca %60'ında ÇDS ile sinerjiyi tespit edebildiklerini bildirmişlerdir (169). Çalışmamızda ÇDS testi sonuçlarının, SDE ve gradiyent test yöntemiyle uyumu %98,6 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, değerlendirmenin daha subjektif olması ve diskler arası mesafe gibi faktörlerin, bu yöntemin doğruluğunu etkilediğini düşündürmektedir.

5.1. TEZ ÇALIŞMASININ KISITLILIKLARI

Çalışmamıza 146 izolat dahil edilmiştir. Bunlardan hem ATM hem de CZA dirençli 59 izolat, ATM dirençli ve CZA'ya artmış dozda duyarlı olan bir adet izolat bulunmaktadır. Her iki ajana da duyarlı olmayan suş sayısı hedeflenenden daha azdır.

Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik durumları ve risk faktörleri ile ilgili veri sağlanamamıştır. Çalışmadan elde edilen verilerin bu parametreler ile birlikte tartışılması mümkün olamamıştır.

S.maltophilia izolatlarında L1-L2 beta laktamaz ayrımı yapılamamıştır.

Çalışmamızda referans yöntem olarak, MİK değeri saptamanın mümkün olduğu gradiyent difüzyon test yöntemi kullanılmıştır. İn vitro sinerjinin değerlendirilmesi için altın standart bir yöntem olan sıvı mikrodilüsyon ve zamana bağlı öldürme (time kill) yöntemleri çalışma bütçesinin kısıtlılığı nedeniyle çalışılamamıştır.

SONUÇLAR

Bu çalışmada, çoklu ilaca dirençli gram-negatif bakteriler üzerinde ATM ve CZA kombinasyonunun sinerjik etkisini değerlendirmek amacıyla sıvı disk elüsyon (SDE) yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmanın bulguları, MBL üreten *Enterobacteriaceae* ve *S.maltophilia* gibi klinik açıdan önemli ve tedavisi güç bakterilere karşı bu kombinasyonun etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca, bu etkinin SDE yöntemiyle güvenilir bir şekilde saptanabileceği doğrulanmıştır.

Çalışmada, SDE yöntemi ile gradiyent difüzyon testi karşılaştırılmış ve %100 uyum sağladıkları belirlenmiştir. Bu durum, SDE'nin kolay uygulanabilir ve güvenilir bir alternatif olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, KDS ve ÇDS testleriyle yapılan karşılaştırmalar, SDE yönteminin sinerji tespitinde daha başarılı bir yöntem olduğunu ortaya koymuştur.

Elde edilen sonuçlar, MBL üreten izolatların yanı sıra KPC ve OXA-48 gibi farklı karbapenemaz sınıflarında da SDE yönteminin etkinliğini doğrulamaktadır. Özellikle ATM ve CZA kombinasyonu ile izolatların %94'ünde düşük MİK değerlerinin elde edilmesi, kombine tedavinin klinik olarak etkinliğini desteklemektedir.

Sonuç olarak, ATM-CZA kombinasyonu, hem laboratuvar uygulamalarında hem de klinik pratikte önemli bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. SDE yöntemi, yalnızca pratikliği ve güvenilirliği ile değil, aynı zamanda mevcut laboratuvar yöntemlerine kıyasla sağladığı avantajlarla dikkat çekmektedir. Bu bulgular, antimikrobiyal dirençle mücadelede yenilikçi ve uygulanabilir stratejilerin geliştirilmesine yönelik değerli bir katkı sunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Abraham, E. P., & Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Nature, 146(3713), 837-837.

2. Tamma, P. D., & Simner, P. J. (2018). Phenotypic detection of carbapenemase-producing organisms from clinical isolates. Journal of clinical microbiology, 56(11), 10-1128.

3. Bush, K., & Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of β-lactamase-producing pathogens. Clinical microbiology reviews, 33(2), 10-1128.

4. van Duin, D., & Doi, Y. (2017). The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Virulence, 8(4), 460-469.

5. CHMP. European Medicines Agency. (n.d.). Emblaveo. European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/emblaveo.

6. Rossolini, G. M., Stone, G., Kantecki, M., & Arhin, F. F. (2022). In vitro activity of aztreonam/avibactam against isolates of *Enterobacterales* collected globally from ATLAS in 2019. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 30, 214-221.

7. Falcone, M., Daikos, G. L., Tiseo, G., Bassoulis, D., Giordano, C., Galfo, V., ... & Menichetti, F. (2021). Efficacy of ceftazidime-avibactam plus aztreonam in patients with bloodstream infections caused by metallo-β-lactamase–producing *Enterobacterales*. Clinical Infectious Diseases, 72(11), 1871-1878.

8. Tamma, P. D., Aitken, S. L., Bonomo, R. A., Mathers, A. J., Van Duin, D., & Clancy, C. J. (2021). Infectious Diseases Society of America guidance on the treatment of extended-spectrum β-lactamase producing *Enterobacterales* (ESBL-E), carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with difficult-to-treat resistance (DTR-P. aeruginosa). Clinical Infectious Diseases, 72(7), e169-e183.

9. Harris, H., Tao, L., Jacobs, E. B., Bergman, Y., Adebayo, A., Tekle, T., ... & Simner, P. J. (2023). Multicenter evaluation of an MIC-based aztreonam and ceftazidime-avibactam broth disk elution test. Journal of clinical microbiology, 61(5), e01647-22.

10. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2024). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (34th ed., CLSI M100).

11. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Jawetz, Melnick ve Adelberg Tıbbi Mikrobiyoloji.Çeviri Yenen OŞ. 1.baskı. Ankara, Nobel Tıp Kitabevleri, 2015.

12. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara, Güneş Kitabevi, 1999; 471-516.

13. Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., Koneman E.W., Schreckenberger P.C. ND Woods G.L. (2017). Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology (7th ed.). Jones & Bartlett Learning.

14. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. Vol. 2.

15. Janda, J. M., Abbott, S. L., & McIver, C. J. (2016). *Plesiomonas shigelloides* revisited. Clinical microbiology reviews, 29(2), 349-374.

16. Wilke Topçu A SGDM (eds). *Enterobacteriaceae*. In: Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 4. baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi; 2017. p. 1853–96.

17. Eckhard, U., Bandukwala, H., Mansfield, M. J., Marino, G., Cheng, J., Wallace, I., ... & Doxey, A. C. (2017). Discovery of a proteolytic flagellin family in diverse bacterial phyla that assembles enzymatically active flagella. Nature communications, 8(1), 521.

18. Davin-Regli, A., Lavigne, J. P., & Pagès, J. M. (2019). *Enterobacter* spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. Clinical microbiology reviews, 32(4), 10-1128.

19. Singh, N. K., Bezdan, D., Checinska Sielaff, A., Wheeler, K., Mason, C. E., & Venkateswaran, K. (2018). Multi-drug resistant *Enterobacter* bugandensis species isolated from the International Space Station and comparative genomic analyses with human pathogenic strains. BMC microbiology, 18, 1-13.

20. Paauw, A., Caspers, M. P., Leverstein-van Hall, M. A., Schuren, F. H., Montijn, R. C., Verhoef, J., & Fluit, A. C. (2009). Identification of resistance and virulence factors in an epidemic *Enterobacter hormaechei* outbreak strain. Microbiology, 155(5), 1478-1488.

21. Hormaeche, E., & Edwards, P. R. (1960). A proposed genus *Enterobacter*.

22. Hoffmann, H., & Roggenkamp, A. (2003). Population genetics of the nomenspecies *Enterobacter cloacae*. Applied and environmental microbiology, 69(9), 5306-5318.

23. Morand, P. C., Billoet, A., Rottman, M., Sivadon-Tardy, V., Eyrolle, L., Jeanne, L., ... & Dumaine, V. (2009). Specific distribution within the Enterobacter cloacae complex of strains isolated from infected orthopedic implants. Journal of clinical microbiology, 47(8), 2489-2495.

24. Akbari, M., Bakhshi, B., & Peerayeh, S. N. (2016). Particular distribution of *Enterobacter cloacae* strains isolated from urinary tract infection within clonal complexes. Iranian biomedical journal, 20(1), 49.

25. Sanders Jr, W. E., & Sanders, C. C. (1997). *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. Clinical microbiology reviews, 10(2), 220-241.

26. Mezzatesta, M. L., Gona, F., & Stefani, S. (2012). *Enterobacter cloacae complex*: clinical impact and emerging antibiotic resistance. Future microbiology, 7(7), 887-902. https://doi.org/10.2217/fmb.12.61.

27. Tebano, G., Geneve, C., Tanaka, S., Grall, N., Atchade, E., Augustin, P., ... & Desmard, M. (2016). Epidemiology and risk factors of multidrug-resistant bacteria in respiratory samples after lung transplantation. Transplant Infectious Disease, 18(1), 22-30.

28. Dalben, M., Varkulja, G., Basso, M., Krebs, V. L. J., Gibelli, M. A., Van der Heijden, I., ... & Costa, S. F. (2008). Investigation of an outbreak *of Enterobacter cloacae* in a neonatal unit and review of the literature. Journal of Hospital Infection, 70(1), 7-14.

29. Ganbold, M., Seo, J., Wi, Y. M., Kwon, K. T., & Ko, K. S. (2023). Species identification, antibiotic resistance, and virulence in *Enterobacter cloacae complex* clinical isolates from South Korea. Frontiers in Microbiology, 14, 1122691.

30. Jneid, J., Cassir, N., Schuldiner, S., Jourdan, N., Sotto, A., Lavigne, J. P., & La Scola, B. (2018). Exploring the microbiota of diabetic foot infections with culturomics. Frontiers in cellular and infection microbiology, 8, 282.

31. Pavlovic, M., Konrad, R., Iwobi, A. N., Sing, A., Busch, U., & Huber, I. (2012). A dual approach employing MALDI-TOF MS and real-time PCR for fast species identification within the *Enterobacter cloacae complex*. FEMS microbiology letters, 328(1), 46-53.

32. Alou, M. T., Cadoret, F., Brah, S., Diallo, A., Sokhna, C., Mehrej, V., ... & Raoult, D. (2017). '*Khelaifiella massiliensis', 'Niameybacter massiliensis', 'Brachybacterium massiliense', 'Enterobacter timonensis', 'Massilibacillus massiliensis'*, new bacterial species and genera isolated from the gut microbiota of healthy infants. New Microbes and New Infections, 19, 1-7.

33. Sutton, G. G., Brinkac, L. M., Clarke, T. H., & Fouts, D. E. (2018). *Enterobacter hormaechei subsp. hoffmannii subsp. nov., Enterobacter hormaechei subsp. xiangfangensis comb. nov.,*

Enterobacter roggenkampii sp. nov., and Enterobacter muelleri is a later heterotypic synonym of Enterobacter asburiae based on computational analysis of sequenced *Enterobacter* genomes. F1000Research, 7.

34. Davin-Regli, A., & Pagès, J. M. (2015). Enterobacter aerogenes and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. Frontiers in microbiology, 6, 392.

35. Davin-Regli, A., Masi, M., Bialek, S., Nicolas-Chanoine, M. H., & Pagès, J. M. (2016). Antimicrobial drug efflux pumps in *Enterobacter* and *Klebsiella*. Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Regulation and Clinical Implications, 281-306.

36. Dai, W., Sun, S., Yang, P., Huang, S., Zhang, X., & Zhang, L. (2013). Characterization of carbapenemases, extended spectrum β-lactamases and molecular epidemiology of carbapenem-non-susceptible *Enterobacter cloacae* in a Chinese hospital in Chongqing. Infection, Genetics and Evolution, 14, 1-7.

37. Huang, S., Dai, W., Sun, S., Zhang, X., & Zhang, L. (2012). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and aminoglycoside resistance determinants among carbapeneme non-susceptible *Enterobacter cloacae*.

38. Cheng, L., Nelson, B. C., Mehta, M., Seval, N., Park, S., Giddins, M. J., ... & Uhlemann, A. C. (2017). Piperacillin-tazobactam versus other antibacterial agents for treatment of bloodstream infections due to AmpC β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 61(6), 10-1128.

39. Haidar, G., Alkroud, A., Cheng, S., Churilla, T. M., Churilla, B. M., Shields, R. K., ... & Nguyen, M. H. (2016). Association between the presence of aminoglycoside-modifying enzymes and in vitro activity of gentamicin, tobramycin, amikacin, and plazomicin against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-and extended-spectrum-β-lactamase-producing *Enterobacter* species. Antimicrobial agents and chemotherapy, 60(9), 5208-5214.

40. Dobias, J., Dénervaud-Tendon, V., Poirel, L., & Nordmann, P. (2017). Activity of the novel siderophore cephalosporin cefiderocol against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 36, 2319-2327.

41. Sader, H. S., Castanheira, M., Mendes, R. E., Flamm, R. K., & Jones, R. N. (2017). Antimicrobial activity of high-proportion cefepime-tazobactam (WCK 4282) against a large number of Gram-negative isolates collected worldwide in 2014. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 61(4), 10-1128.

42. Mischnik, A., Baumert, P., Hamprecht, A., Rohde, A., Peter, S., Feihl, S., ... & DZIF-ATHOS Study Group. (2017). Susceptibility to cephalosporin combinations and aztreonam/avibactam among third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* recovered on hospital admission. International journal of antimicrobial agents, 49(2), 239-242.

43. Pendleton, J. N., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. Expert review of anti-infective therapy, 11(3), 297-308.

44. Hansen, D. S., Aucken, H. M., Abiola, T., & Podschun, R. (2004). Recommended test panel for differentiation of *Klebsiella* species on the basis of a trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical tests. Journal of clinical microbiology, 42(8), 3665-3669.

45. Acheampong, D. O., Boaponsem, L. K., & Fegbo, P. K. (2011). Occurrence and species distribution of *Klebsiella* Isolates: A case study at Komfo Anokye teaching hospital (Kath) in Ghana.

46. Hansen, D. S., Gottschau, A., & Kolmos, H. J. (1998). Epidemiology of *Klebsiella* bacteraemia: a case control study using *Escherichia coli* bacteraemia as control. Journal of Hospital Infection, 38(2), 119-132.

47. Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clinical microbiology reviews, 11(4), 589-603.

48. SELDEN, R., Lee, S., Wang, W. L. L., BENNETT, J. V., & EICKHOFF, T. C. (1971). Nosocomial *Klebsiella* infections: intestinal colonization as a reservoir. Annals of Internal Medicine, 74(5), 657-664.Annals of Internal Medicine.

49. Casewell, M., & Phillips, I. A. N. (1977). Hands as route of transmission for *Klebsiella* species. Br Med J, 2(6098), 1315-1317.

50. Hart, C. A., Gibson, M. F., & Buckles, A. M. (1981). Variation in skin and environmental survival of hospital gentamicin-resistant enterobacteria. Epidemiology & Infection, 87(2), 277-285.J. Hyg., Camb.

51. Snitkin, E. S., Zelazny, A. M., Thomas, P. J., Stock, F., NISC Comparative Sequencing Program, Henderson, D. K., ... & Segre, J. A. (2012). Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing. Science translational medicine, 4(148), 148ra116-148ra116.

52. Bagley, S. T. (1985). Habitat association of *Klebsiella* species. Infection Control & Hospital Epidemiology, 6(2), 52-58.Control.

53. Struve, C., & Krogfelt, K. A. (2004). Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. Environmental microbiology, 6(6), 584-590.

54. Warren, R. E., Harvey, G., Carr, R., Ward, D., & Doroshenko, A. (2008). Control of infections due to extended-spectrum β-lactamase-producing organisms in hospitals and the community. Clinical Microbiology and Infection, 14, 124-133.

55. Akova, M., Daikos, G. L., Tzouvelekis, L., & Carmeli, Y. (2012). Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. Clinical Microbiology and Infection, 18(5), 439-448.

56. Szilágyi, E., Füzi, M., Böröcz, K., Kurcz, A., Tóth, A., & Nagy, K. (2009). Risk factors and outcomes for bloodstream infections with extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*; Findings of the nosocomial surveillance system in Hungary. Acta microbiologica et immunologica Hungarica, 56(3), 251-262.

57. Hazen, T. H., Zhao, L., Sahl, J. W., Robinson, G., Harris, A. D., Rasko, D. A., & Johnson, J. K. (2014). Characterization of *Klebsiella* sp. strain 10982, a colonizer of humans that contains novel antibiotic resistance alleles and exhibits genetic similarities to plant and clinical *Klebsiella* isolates. Antimicrobial agents and chemotherapy, 58(4), 1879-1888.

58. Zammit, S. C., Azzopardi, N., & Sant, J. (2014). Mortality risk score for *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. European journal of internal medicine, 25(6), 571-576.

59. Centers for Disease Control and Prevention. (2013, March 8). Vital signs: Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. Morbidity and Mortality Weekly Report, 62(9), 165-170. http://www.cdc.gov/mmwr.

60. Al-Hasan, M. N., Lahr, B. D., Eckel-Passow, J. E., & Baddour, L. M. (2010, February). Epidemiology and outcome of *Klebsiella* species bloodstream infection: a population-based study. In Mayo Clinic Proceedings (Vol. 85, No. 2, pp. 139-144). Elsevier.

61. Kishibe, S., Okubo, Y., Morino, S., Hirotaki, S., Tame, T., Aoki, K., ... & Horikoshi, Y. (2016). Pediatric hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* septic arthritis. Pediatrics International, 58(5), 382-385.

62. Russo, T. A., & Marr, C. M. (2019). Hypervirulent *klebsiella pneumoniae*. Clinical microbiology reviews, 32(3), 10-1128.

63. Cubero, M., Grau, I., Tubau, F., Pallarés, R., Dominguez, M. A., Liñares, J., & Ardanuy, C. (2016). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clones causing bacteraemia in adults in a teaching hospital in Barcelona, Spain (2007–2013). Clinical Microbiology and Infection, 22(2), 154-160.

64. Mahon, C. R., & Manuselis, G. (Eds.). (2000). Textbook of diagnostic microbiology (Vol. 355). Saunders.

65. Akbaş, E. (2014). Ulusal mikrobiyoloji standartları: Bulaşıcı hastalıklar laboratuvar tanı rehberi. Türk Halk Sağlığı Kurumu. http://mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/tanirehberi/UMS-Cilt-1.pdf.

66. Rodríguez-Baño, J., Gutiérrez-Gutiérrez, B., Machuca, I., & Pascual, A. (2018). Treatment of infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-, AmpC-, and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Clinical microbiology reviews, 31(2), 10-1128.

67. Kliebe, C., Nies, B. A., Meyer, J. F., Tolxdorff-Neutzling, R. M., & Wiedemann, B. (1985). Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. Antimicrobial agents and chemotherapy, 28(2), 302-307.

68. Sirot, D. (1987). Sirot J. Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfennille-Michand A, Perronx R. Transferable resistance to third generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: Identification of CTX-1, a novel-lactamase. Antimicrob. Agents. Chemother, 20, 323-4.Journal of Antimicrobial Chemotherapy.

69. Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo-β-lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrobial agents and chemotherapy, 53(12), 5046-5054.

70. Potron, A., Kalpoe, J., Poirel, L., & Nordmann, P. (2011). European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. Clinical Microbiology and Infection, 17(12), E24-E26.

71. Sánchez, M. B. (2015). Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. Frontiers in microbiology, 6, 658.

72. Nordmann, P., Cuzon, G., & Naas, T. (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. The Lancet infectious diseases, 9(4), 228-236.

73. Cuzon, G., Naas, T., Truong, H., Villegas, M. V., Wisell, K. T., Carmeli, Y., ... & Nordmann, P. (2010). Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce β-lactamase blaKPC-2 gene. Emerging infectious diseases, 16(9), 1349.

74. Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., ... & Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. The Lancet infectious diseases, 18(3), 318-327.

75. Haidar, G., Clancy, C. J., Chen, L., Samanta, P., Shields, R. K., Kreiswirth, B. N., & Nguyen, M. H. (2017). Identifying spectra of activity and therapeutic niches for ceftazidime-avibactam and imipenem-relebactam against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 61(9), 10-1128.

76. Ham, D. C., Mahon, G., Bhaurla, S. K., Horwich-Scholefield, S., Klein, L., Dotson, N., Rasheed, J. K., McAllister, G., Stanton, R. A., Karlsson, M., Lonsway, D., Huang, J. Y., Brown, A. C., & Walters, M. S. (2021). Gram-Negative Bacteria Harboring Multiple Carbapenemase Genes, United States, 2012-2019. Emerging infectious diseases, 27(9), 2475–2479. https://doi.org/10.3201/eid2709.210456.

77. Ambler, R. P., Coulson, A. F., Frère, J. M., Ghuysen, J. M., Joris, B., Forsman, M., ... & Waley, S. G. (1991). A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. Biochemical Journal, 276(Pt 1), 269.

78. Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile β-lactamases. Clinical microbiology reviews, 20(3), 440-458.

79. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2010). Detection of *Enterobacteriaceae* isolates carrying metallo-beta-lactamase — United States, 2010. Morbidity and Mortality Weekly Report, 59(24), 750-751. Retrieved from https://www.cdc.gov/mmwr.

80. Nordmann, P., Poirel, L., Toleman, M. A., & Walsh, T. R. (2011). Does broad-spectrum β-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria?. Journal of antimicrobial chemotherapy, 66(4), 689-692.

81. Hirvonen, V. H., Spencer, J., & Van Der Kamp, M. W. (2021). Antimicrobial resistance conferred by OXA-48 β-lactamases: towards a detailed mechanistic understanding. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 65(6), 10-1128.

82. Rabaan, A. A., Eljaaly, K., Alhumaid, S., Albayat, H., Al-Adsani, W., Sabour, A. A., ... & Ahmed, N. (2022). An overview on phenotypic and genotypic characterisation of carbapenem-resistant *Enterobacterales*. Medicina, 58(11), 1675.

83. Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V., & Nordmann, P. (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 48(1), 15-22.

84. Espedido, B. A., Steen, J. A., Ziochos, H., Grimmond, S. M., Cooper, M. A., Gosbell, I. B., ... & Jensen, S. O. (2013). Whole genome sequence analysis of the first Australian OXA-48-producing outbreak-associated *Klebsiella pneumoniae* isolates: the resistome and in vivo evolution. PLoS One, 8(3), e59920.

85. Denton, M., & Kerr, K. G. (1998). Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. Clinical microbiology reviews, 11(1), 57-80.

86. Hugh, R., & Ryschenkow, E. (1961). *Pseudomonas maltophilia*, an alcaligenes-like species. Microbiology, 26(1), 123-132.J. gen. Microbiol.

87. Swings, J. D. V. P., De Vos, P., Van den Mooter, M., & De Ley, J. (1983). Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 33(2), 409-413.

88. Hugh, R., & Leifson, E. (1963). A description of the type strain of *Pseudomonas maltophilia*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 13(3), 133-138.

89. AYDIN, K., & ÇAYLAN, R. (2002). Antibiotic Resistance Mechanisms in *Stenotrophomonas maltophilia.*

90. Looney, W. J., Narita, M., & Mühlemann, K. (2009). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. The Lancet infectious diseases, 9(5), 312-323.

91. Banar, M., Sattari-Maraji, A., Bayatinejad, G., Ebrahimi, E., Jabalameli, L., Beigverdi, R., ... & Jabalameli, F. (2023). Global prevalence and antibiotic resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*: a systematic review and meta-analysis. Frontiers in Medicine, 10, 1163439.

92. Sader, H. S., & Jones, R. N. (2005). Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli. International journal of antimicrobial agents, 25(2), 95-109.

93. Chang, Y. T., Lin, C. Y., Chen, Y. H., & Hsueh, P. R. (2015). Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. Frontiers in microbiology, 6, 893.

94. Abbott, I. J., Slavin, M. A., Turnidge, J. D., Thursky, K. A., & Worth, L. J. (2011). *Stenotrophomonas maltophilia*: emerging disease patterns and challenges for treatment. Expert review of anti-infective therapy, 9(4), 471-488.

95. Looney, W. J. (2005). Role of *Stenotrophomonas maltophilia* in hospital-acquired infection. British journal of biomedical science, 62(3), 145-154.

96. Isenberg, H. D. (2007). Clinical Microbiology Procedures Handbook (3rd ed., pp. 877–899). Washington, DC: ASM Press.

97. Carmody, L. A., Spilker, T., & LiPuma, J. J. (2011). Reassessment of *Stenotrophomonas maltophilia* phenotype. Journal of clinical microbiology, 49(3), 1101-1103.

98. Brooke, J. S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. Clinical microbiology reviews, 25(1), 2-41.

99. Dülger, D., & Berktaş, M. (2007). *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının klinik önemi. Van Tıp Derg, 14(3), 90-5.

100. Palleroni, N. J., & Bradbury, J. F. (1993*). Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 43(3), 606-609.INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY.

101. DuMont, A. L., Karaba, S. M., & Cianciotto, N. P. (2015). Type II secretion-dependent degradative and cytotoxic activities mediated by *Stenotrophomonas maltophilia* serine proteases StmPr1 and StmPr2. Infection and immunity, 83(10), 3825-3837.

102. de Oliveira-Garcia, D., Dall'Agnol, M., Rosales, M., Azzuz, A. C., Alcántara, N., Martinez, M. B., & Girón, J. A. (2003). Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. Cellular microbiology, 5(9), 625-636.

103. Critchley, M. M., Cromar, N. J., McClure, N. C., & Fallowfield, H. J. (2003). The influence of the chemical composition of drinking water on cuprosolvency by biofilm bacteria. Journal of applied microbiology, 94(3), 501-507.

104. Shih, H. Y., & Lin, Y. E. (2010). Efficacy of copper-silver ionization in controlling biofilm- and plankton-associated waterborne pathogens. Applied and environmental microbiology, 76(6), 2032-2035.

105. Di Bonaventura, G., Stepanović, S., Picciani, C., Pompilio, A., & Piccolomini, R. (2007). Effect of environmental factors on biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. Folia microbiologica, 52(1), 86-90.

106. Brooke, J. S. (2007). Biofilm production of clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* altered by sodium phosphate buffer supplementation of the medium. Annals of microbiology, 57(4), 677-679.

107. Wang, L. H., He, Y., Gao, Y., Wu, J. E., Dong, Y. H., He, C., ... & Zhang, L. H. (2004). A bacterial cell–cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. Molecular microbiology, 51(3), 903-912.

108. Brooke, J. S. (2021). Advances in the microbiology of *Stenotrophomonas maltophilia*. Clinical microbiology reviews, 34(3), 10-1128.

109. Waters, V. J., Gómez, M. I., Soong, G., Amin, S., Ernst, R. K., & Prince, A. (2007). Immunostimulatory properties of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. Infection and immunity, 75(4), 1698-1703.

110. Thomas, R., Hamat, R. A., & Neela, V. (2014). Extracellular enzyme profiling of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. Virulence, 5(2), 326-330.

111. Adamek, M., Linke, B., & Schwartz, T. (2014). Virulence genes in clinical and environmental *Stenotrophomas maltophilia* isolates: a genome sequencing and gene expression approach. Microbial pathogenesis, 67, 20-30.

112. Crossman, L. C., Gould, V. C., Dow, J. M., Vernikos, G. S., Okazaki, A., Sebaihia, M., ... & Avison, M. B. (2008). The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. Genome biology, 9, 1-13.

113. García, C. A., Passerini De Rossi, B., Alcaraz, E., Vay, C., & Franco, M. (2012). Siderophores of *Stenotrophomonas maltophilia*: detection and determination of their chemical nature. Rev Argent Microbiol, 44(3), 150-4.

114. Al-Anazi, K. A., & Al-Jasser, A. M. (2014). Infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in recipients of hematopoietic stem cell transplantation. Frontiers in oncology, 4, 232.

115. Gales, A. C., Jones, R. N., Forward, K. R., Linares, J., Sader, H. S., & Verhoef, J. (2001). Emerging importance of multidrug-resistant Acinetobacter species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–1999). Clinical Infectious Diseases, 32(Supplement_2), S104-S113.

116. Murray, P. R., Rosental, K.S. and Pfaller, M. A. (2016). Tıbbi mikrobiyoloji (7.Baskı). (A. Başustaoğlu, Çev.). Ankara, Atlas Kitapçılık.

117. Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., ... & Dow, J. M. (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. Nature reviews microbiology, 7(7), 514-525.

118. Kim, S. H., Cho, S. Y., Kang, C. I., Seok, H., Huh, K., Ha, Y. E., ... & Song, J. H. (2018). Clinical predictors of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in adult patients with hematologic malignancy. Annals of hematology, 97, 343-350.

119. Whitby, P. W., Carter, K. B., Burns, J. L., Royall, J. A., LiPuma, J. J., & Stull, T. L. (2000). Identification and detection of *Stenotrophomonas maltophilia* by rRNA-directed PCR. Journal of Clinical Microbiology, 38(12), 4305-4309.

120. Gherardi, G., Creti, R., Pompilio, A., & Di Bonaventura, G. (2015). An overview of various typing methods for clinical epidemiology of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. Diagnostic microbiology and infectious disease, 81(3), 219-226.

121. Nicodemo, A. C., & Paez, J. G. (2007). Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections. European journal of clinical microbiology & infectious diseases, 26, 229-237.

122. Wang, Y., He, T., Shen, Z., & Wu, C. (2018). Antimicrobial resistance in *Stenotrophomonas* spp. Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals, 409-423.

123. Alexander, J., Carr, A., Minor, S. B., & Navas, D. (2020). 1607. Dual Therapy with Aztreonam & Ceftazidime/Avibactam Against Multi-Drug Resistant *Stenotrophomonas maltophilia* on Tricuspid Valve Endocarditis. Open Forum Infectious Diseases, 7(Suppl 1), S798. https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa439.1787.

124. Sánchez MB. 2015. Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. Front Microbiol. Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00658.

125. Mazel, D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. Nature Reviews Microbiology, 4(8), 608-620.

126. Toleman, M. A., Bennett, P. M., Bennett, D. M., Jones, R. N., & Walsh, T. R. (2007). Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of sul genes. Emerging infectious diseases, 13(4), 559.

127. Abbott, I. J., & Peleg, A. Y. (2015, February). *Stenotrophomonas, Achromobacter*, and nonmelioid *Burkholderia* species: antimicrobial resistance and therapeutic strategies. In Seminars in respiratory and critical care medicine (Vol. 36, No. 01, pp. 099-110). Thieme Medical Publishers.

128. Sader, H. S., Farrell, D. J., Flamm, R. K., & Jones, R. N. (2014). Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalised with pneumonia in US and European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2009–2012. International journal of antimicrobial agents, 43(4), 328-334.

129. Hackel, M. A., Tsuji, M., Yamano, Y., Echols, R., Karlowsky, J. A., & Sahm, D. F. (2018). In vitro activity of the siderophore cephalosporin, cefiderocol, against carbapenem-nonsusceptible and multidrug-resistant isolates of Gram-negative bacilli collected worldwide in 2014 to 2016. Antimicrobial agents and chemotherapy, 62(2), 10-1128.

130. Tamma, P. D., Heil, E. L., Justo, J. A., Mathers, A. J., Satlin, M. J., & Bonomo, R. A. (2024). Infectious Diseases Society of America 2024 guidance on the treatment of antimicrobial-resistant gram-negative infections. Clinical infectious diseases, ciae403.

131. Onur, U. R. A. L. (1998). Monobaktam Antibiyotikler. Flora, 3(1), 48-52.

132. ChemicalBook. (n.d.). Aztreonam: Antimicrobial activity, susceptibility, administration and dosage, clinical uses, etc. Retrieved December 9, 2024, from https://www.chemicalbook.com/Article/Aztreonam-Antimicrobial-Activity-Susceptibility-Administration-and-Dosage-Clinical-Uses-etc.htm.

133. Finberg, R. W., Guharoy, R., Finberg, R. W., & Guharoy, R. (2021). Monobactam: Aztreonam. Clinical Use of Anti-infective Agents: A Guide on How to Prescribe Drugs Used to Treat Infections, 47-49.

134. Mosby, Inc. (2006). Aztreonam. In Mosby's Drug Consult 2006 (16th ed., pp. 170–173). .

135. World Health Organization (WHO). (2019). WHO Model List of Essential Medicines: 21st List 2019. Retrieved from https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/330668/9789241210300-eng.pdf.

136. Jiménez-Lozano, I., Luna-Paredes, C., Monte-Boquet, E., Fernández-Polo, A., Cañete-Ramírez, C., Roch-Santed, M., ... & Álvarez-Fernández, A. (2023). Inhaled aztreonam lysine in the management of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis: real-life effectiveness. European Journal of Hospital Pharmacy.

137. Zhanel, G. G., Lawson, C. D., Adam, H., Schweizer, F., Zelenitsky, S., Lagacé-Wiens, P. R., ... & Karlowsky, J. A. (2013). Ceftazidime-avibactam: a novel cephalosporin/β-lactamase inhibitor combination. Drugs, 73, 159-177.

138. Khan, A., Erickson, S. G., Pettaway, C., Arias, C. A., Miller, W. R., & Bhatti, M. M. (2021). Evaluation of susceptibility testing methods for aztreonam and ceftazidime-avibactam combination therapy on extensively drug-resistant gram-negative organisms. Antimicrobial agents and chemotherapy, 65(11), 10-1128.

139. Aktaş, G. (2015). Antibiotic Combinations and Synergistic Interactions. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 44, 47-55.

140. Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., & Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum β-lactamases conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. Clinical Infectious Diseases, 10(4), 867-878.

141. Hall, M. J., Middleton, R. F., & Westmacott, D. (1983). The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. Journal of antimicrobial chemotherapy, 11(5), 427-433.

142. Leber, A. L. (2020). Clinical microbiology procedures handbook. John Wiley & Sons.

143. Bakthavatchalam, Y. D., Walia, K., & Veeraraghavan, B. (2022). Susceptibility testing for aztreonam plus ceftazidime/avibactam combination: A general guidance for clinical microbiology laboratories in India. Indian Journal of Medical Microbiology, 40(1), 3-6.

144. Emeraud, C., Escaut, L., Boucly, A., Fortineau, N., Bonnin, R. A., Naas, T., & Dortet, L. (2019). Aztreonam plus clavulanate, tazobactam, or avibactam for treatment of infections caused by metallo-β-lactamase-producing Gram-negative bacteria. Antimicrobial agents and chemotherapy, 63(5), 10-1128.

145. Adrie, C., Garrouste-Orgeas, M., Essaied, W. I., Schwebel, C., Darmon, M., Mourvillier, B., ... & Deiler, V. (2017). Attributable mortality of ICU-acquired bloodstream infections: impact of the source, causative micro-organism, resistance profile and antimicrobial therapy. Journal of infection, 74(2), 131-141.

146. Maraki, S., Mavromanolaki, V. E., Moraitis, P., Stafylaki, D., Kasimati, A., Magkafouraki, E., & Scoulica, E. (2021). Ceftazidime-avibactam, meropenen-vaborbactam, and imipenem-relebactam in combination with aztreonam against multidrug-resistant, metallo-β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 40, 1755-1759.

147. Mauri, C., Maraolo, A. E., Di Bella, S., Luzzaro, F., & Principe, L. (2021). The revival of aztreonam in combination with avibactam against metallo-β-lactamase-producing Gram-negatives: a systematic review of in vitro studies and clinical cases. Antibiotics, 10(8), 1012.

148. Wise M, Li H, Stone G, Sahm D. Activity of Aztreonam-Avibactam and Comparator Agents Against Carbapenemase-Producing Enterobacterales Collected in Asia/Pacific as Part of the ATLAS Surveillance Program: 2018-2022 Figure 4 MIC frequency distribution of aztreonam-avibactam and aztreonam against MBL-positive isolates (n=1351)* https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01126.

149. Papp-Wallace, K. M., Bajaksouzian, S., Abdelhamed, A. M., Foster, A. N., Winkler, M. L., Gatta, J. A., ... & Jacobs, M. R. (2015). Activities of ceftazidime, ceftaroline, and aztreonam

alone and combined with avibactam against isogenic *Escherichia coli* strains expressing selected single β-lactamases. Diagnostic microbiology and infectious disease, 82(1), 65-69.

150. Zhang, W., Guo, Y., Li, J., Zhang, Y., Yang, Y., Dong, D., ... & Hu, F. (2018). In vitro and in vivo bactericidal activity of ceftazidime-avibactam against Carbapenemase–producing *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 7, 1-9.

151. Wu, Y., Yu, W., Chu, X., Zhang, J., Jia, P., Liu, X., ... & Yang, Q. (2024). Effect of ceftazidime-avibactam combined with different antimicrobials against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Microbiology Spectrum, 12(6), e00107-24.

152. Falcone, M., Mezzatesta, M. L., Perilli, M., Forcella, C., Giordano, A., Cafiso, V., ... & Venditti, M. (2009). Infections with VIM-1 metallo-β-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* and their correlation with clinical outcome. Journal of clinical microbiology, 47(11), 3514-3519.

153. Moquet, O., Bouchiat, C., Kinana, A., Seck, A., Arouna, O., Bercion, R., ... & Garin, B. (2011). Class D OXA-48 carbapenemase in multidrug-resistant enterobacteria, Senegal. Emerging infectious diseases, 17(1), 143.

154. Potron, A., Poirel, L., Rondinaud, E., & Nordmann, P. (2013). Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011. Eurosurveillance, 18(31).

155. Vasoo, S., Cunningham, S. A., Cole, N. C., Kohner, P. C., Menon, S. R., Krause, K. M., ... & Patel, R. (2015). In vitro activities of ceftazidime-avibactam, aztreonam-avibactam, and a panel of older and contemporary antimicrobial agents against carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. Antimicrobial agents and chemotherapy, 59(12), 7842-7846.

156. Sonnevend, Á., Ghazawi, A., Darwish, D., Barathan, G., Hashmey, R., Ashraf, T., ... & Pál, T. (2020). In vitro efficacy of ceftazidime-avibactam, aztreonam-avibactam and other rescue

antibiotics against carbapenem-resistant *Enterobacterales* from the Arabian Peninsula. International Journal of Infectious Diseases, 99, 253-259.

157. Zhou, Y. F., Tao, M. T., Feng, Y., Yang, R. S., Liao, X. P., Liu, Y. H., & Sun, J. (2017). Increased activity of colistin in combination with amikacin against *Escherichia coli* co-producing NDM-5 and MCR-1. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 72(6), 1723-1730.

158. Biedenbach, D., Bouchillon, S., Hackel, M., Hoban, D., Kazmierczak, K., Hawser, S., & Badal, R. (2015). Dissemination of NDM metallo-β-lactamase genes among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* collected during the SMART global surveillance study from 2008 to 2012. Antimicrobial agents and chemotherapy, 59(2), 826–830. https://doi.org/10.1128/AAC.03938-14.

159. Lin, L., Xiao, X., Wang, X., Xia, M., & Liu, S. (2020). In Vitro Antimicrobial Susceptibility Differences Between Carbapenem-Resistant KPC-2-Producing and NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Teaching Hospital in Northeast China. Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.), 26(2), 94–99. https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0398.

160. Chang, Y. T., Lin, C. Y., Chen, Y. H., & Hsueh, P. R. (2015). Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. Frontiers in microbiology, 6, 893.

161. Nicodemo, A. C., & Paez, J. G. (2007). Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections. European journal of clinical microbiology & infectious diseases, 26, 229-237.

162. Infectious Diseases Society of America (IDSA). (2024). Management of antimicrobial-resistant gram-negative infections: *Stenotrophomonas maltophilia* treatment guidelines. Retrieved from https://www.idsociety.org.

163. Calvopiña, K., Hinchliffe, P., Brem, J., Heesom, K. J., Johnson, S., Cain, R., ... & Avison, M. B. (2017). Structural/mechanistic insights into the efficacy of nonclassical β-lactamase

inhibitors against extensively drug resistant *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. Molecular microbiology, 106(3), 492-504.

164. Biagi, M., Lamm, D., Meyer, K., Vialichka, A., Jurkovic, M., Patel, S., ... & Wenzler, E. (2020). Activity of aztreonam in combination with avibactam, clavulanate, relebactam, and vaborbactam against multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 64(12), 10-1128.

165. Song, P., Xu, J., Jiang, L., Zhang, Q., & Liu, C. (2024). Assessment of broth disk elution method for aztreonam in combination with ceftazidime/avibactam against *Enterobacterales* isolates. Microbiology Spectrum, 12(10), e00953-24.

166. Avery, L. M., & Nicolau, D. P. (2018). Assessing the in vitro activity of ceftazidime/avibactam and aztreonam among carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: defining the zone of hope. International journal of antimicrobial agents, 52(5), 688-691.

167. Yamano, Y., Takemura, M., Anan, N., Echols, R., & Longshaw, C. (2021, November). 1287. Double Disk Diffusion Study to Evaluate the Synergistic Effect Between Cefiderocol and Ceftazidime-Avibactam Against Cefiderocol-Non-susceptible *Acinetobacter baumannii*. In Open Forum Infectious Diseases (Vol. 8, No. Supplement_1, pp. S732-S733). US: Oxford University Press.

168. Verschelden, G., Noeparast, M., Stoefs, A., Van Honacker, E., Vandoorslaer, K., Vandervore, L., ... & Wybo, I. (2023). Aztreonam-avibactam synergy, a validation and comparison of diagnostic tools. Frontiers in Microbiology, 14, 1322180.

169. Khan, S., Das, A., Vashisth, D., Mishra, A., Vidyarthi, A. J., Gupta, R., ... & Bhatnagar, S. (2024). Evaluation of a simple method for testing aztreonam and ceftazidime-avibactam synergy in New Delhi metallo-beta-lactamase producing *Enterobacterales*. Plos one, 19(5), e0303753.