



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



Karbapenem ve yeni beta laktamaz inhibitörlerinin tek başlarına ve kolistinle kombinasyon halinde çeşitli Gram negatif bakteri suşlarına karşı *in vitro* etkilerinin araştırılması

**Proje No:
37825**

Proje Türü
Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Ayşe Seher BİRTEKSÖZ TAN
Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Mayram HACIOĞLU
Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Arş. Gör. Dr. Özlem OYARDI
Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Arş. Gör. Fatıma Nur YILMAZ
Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Bu alışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37825

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	2
ÖZET	4
ABSTRACT	4
GİRİŞ	5
1. GENEL BİLGİLER	6
2. MALZEME ve YÖNTEM	6
3. BULGULAR	8
4.TARTIŞMA ve SONUÇ	12
5. KAYNAKLAR	14
EKLER	17

PROJE ÖZET BİLGİLERİ: Türkçe Özet ve İngilizce “Abstract” şeklinde hazırlanmalıdır. Projedeki faaliyetlerin kısa özetini içermeli ve 500 kelimeyi geçmemelidir. Anahtar sözcükler de verilmelidir.

ÖZET

Gram negatif bakterilerde ortaya çıkan karbapenem direnci tüm dünyada önemi giderek artan bir sağlık problemidir. Karbapenem direnci çoğunlukla çoklu ilaca dirençli mikroorganizmalarda görülür ve tedavi seçenekleri de bu nedenle kısıtlıdır. Son yıllarda genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar ve karbapenemazlar da dâhil çoğu beta laktamaz üzerine etkili relebaktam ve vaborbaktam piyasaya çıkmıştır. Bu beta laktamaz inhibitörlerinin karbapenemlerle kombinasyonları tedavi seçenekleri kısıtlı Gram negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde umut vadetmektedir. Ancak yapılan çalışmalar bu iki beta laktamaz inhibitörünün, metallo-beta laktamaz (MBL) üreten suşlarda tutarlı bir aktivite göstermediğini belirlemiştir. Bu amaçla çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş toplam 107 adet suşun (*Pseudomonas aeruginosa* (16), *Acinetobacter baumannii* (37), *Klebsiella pneumoniae* (34), *Escherichia coli* (13) ve *Enterobacter sp.* (7)) çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları ve MBL üretimleri araştırılmıştır. MBL negatif 44 adet suşa karşı karbapenem-beta laktamaz inhibitörü kombinasyonlarının (imipenem-silastatin-relebaktam ve meropenem-vaborbaktam) MİK ve MBK değerleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre imipenem-silastatin-relebaktam kombinasyonunun MİK değerleri ($\mu\text{g/ml}$) *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*’e karşı sırasıyla 0.125 - 8 ve 0.25 - < 64, *K. pneumoniae*’ye karşı 1 - < 64, *E. coli*’ye karşı 0.06 - 1, *Enterobacter sp.*’ye karşı ise 4 - < 64 aralığında bulunmuştur. Meropenem-vaborbaktam kombinasyonunun MİK değerleri ise sırasıyla *P. aeruginosa*, *A. baumannii* ve *K. pneumoniae*’ye karşı 0.125 - 8, 0.125 - < 64, 0.25 - < 64 $\mu\text{g/ml}$ aralığında tespit edilmiştir. *E. coli* ve *Enterobacter sp.* suşları meropenem-vaborbaktam kombinasyonuna daha duyarlı bulunmuşlar ve MİK aralıklarının sırasıyla 0.03 – 1 ve 0.06 – 32 $\mu\text{g/ml}$ olduğu gösterilmiştir. İmipenem-silastatin-relebaktam ve meropenem-vaborbaktamın ve kolistin ile kombinasyon şeklinde etkinlikleri checkerboard tekniği kullanılarak araştırılmış ve bir *K. pneumoniae* (KP3) suşuna karşı hem kolistin + imipenem-silastatin-relebaktam hem de kolistin + meropenem-vaborbaktam kombinasyonlarının, bir *Enterobacter sp.* (EB1) suşuna karşı da kolistin + meropenem-vaborbaktam kombinasyonunun sinerjist etki gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışılan suşların hiçbirinde antagonist etki görülmemiştir. Zamana bağlı öldürme deneylerinde de KP3 ve EB1 suşlarına karşı Kolistin + Meropenem-vaborbaktam kombinasyonu 4. ve 6. saatlerde erken sinerjist etki gösterilmiştir. İmipenem ve meropenemin beta laktamaz inhibitörleri ile kombinasyonları beş farklı cinse ait, 28 bakterinin biyofilmlerine karşı MTT yöntemi ile de denenmiş ve sonuçlara göre İmipenem-silastatin+relebaktam kombinasyonu çalışılan tüm bakterilere etkili olmuş ve canlılık OD’sini kontrole göre azaltmıştır. Meropenem-vaborbaktam kombinasyonu ise yalnızca meropenemin 16 $\mu\text{g/ml}$ ’lik konsantrasyonunda, *Enterobacter sp.* hariç diğer bakteri gruplarına etkili olmuştur. Sonuç olarak; karbapenemlerin yeni beta laktamaz inhibitörleri olan vaborbaktam ve relebaktam ile kombinasyonu tedavide önemli bir seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle kolistin ile kombinasyonlarının ve biyofilmlere karşı etkinliklerinin araştırılması amaçlandığı çalışmamızın sonuçlarının literatüre önemli katkılar sunacağı düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Karbapenem, Relebaktam, Vaborbaktam, Kolistin, Biyofilm

ABSTRACT

Carbapenem resistance in Gram negative bacteria is an increasing health problem worldwide. Carbapenem-resistant microorganisms are often multidrug resistant microorganisms and thus treatment options are limited. In recent years, relebactam and vaborbactam, which are effective on most beta-lactamase including extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase, has been released on the market. Combinations of these beta lactamase inhibitors with carbapenems are promising in the treatment of Gram-negative bacterial infections with limited therapeutic options. However, studies have determined that these two beta lactamase inhibitors do not show consistent activity to strains

producing metallo-beta lactamase (MBL). For this purpose, the susceptibility to various antibiotics and MBL production of a total of 107 strains (*Pseudomonas aeruginosa* (16), *Acinetobacter baumannii* (37), *Klebsiella pneumoniae* (34), *Escherichia coli* (13) and *Enterobacter sp.* (7)) isolated from various clinical samples were investigated. MIC and MBC values ($\mu\text{g/ml}$) of carbapenem-beta lactamase inhibitor combinations (imipenem-cilastatin-relebactam and meropenem-vaborbactam) were investigated against 44 MBL-negative strains. According to the results obtained, the MIC values ($\mu\text{g/ml}$) of the imipenem-cilastatin-relebactam combination were 0.125 - 8 and 0.25 - < 64 against *P. aeruginosa* and *A. baumannii*, respectively, 1 - < 64 against *K. pneumoniae*, and 0.06- 1 against *E. Coli* and 4 - < 64 $\mu\text{g/ml}$ against *Enterobacter sp.* The MIC values ($\mu\text{g/ml}$) of the meropenem-vaborbactam combination were determined in the range of 0.125 - 8, 0.125 - < 64, 0.25 - < 64 $\mu\text{g/ml}$ against *P. aeruginosa*, *A. baumannii* and *K. pneumoniae*, respectively. *E. coli* and *Enterobacter sp.* strains were found to be more sensitive to the meropenem-vaborbactam combination and the MIC ranges were shown to be 0.03 – 1 and 0.06 – 32 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The effectiveness of imipenem-cilastatin-relebactam and meropenem-vaborbactam in combination with colistin was investigated using the checkerboard technique, and both colistin + imipenem-cilastatin-relebactam and colistin + meropenem-vaborbactam combinations against one *K. pneumoniae* (KP3) strain and the combination of colistin + meropenem + vaborbactam against one *Enterobacter spp.* were found synergistic. No antagonist effects were observed in any of the strains studied. In time kill assays, the combination of colistin + meropenem-vaborbactam showed an early synergistic effect against KP3 and EB1 strains at the 4th and 6th hours. Combinations of imipenem and meropenem with beta lactamase inhibitors were also tested using the MTT method against 28 bacteria, and according to the results, the combination of imipenem-cilastatin-relebactam was effective against all bacteria studied and reduced the viability OD compared to the control. Meropenem-vaborbactam combination only found effective at a concentration of 16 $\mu\text{g/ml}$ of meropenem, except *Enterobacter sp.* In conclusion, the combination of carbapenems with vaborbactam and relebactam, appears as an important option in treatment. It is thought that the results of our study, which aims to investigate especially its combination with colistin and its effectiveness against biofilms, will make important contributions to the literature.

Keywords: Carbapenem, Relebactam, Vaborbactam, Colistin, Biofilm

1. GİRİŞ

Antibiyotikler, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde tek etkili ilaçlardır. Ancak hem tıp hem de tarım gibi alanlarda mevcut antibiyotiklerin yaygın olarak kullanılması antibiyotik direncine neden olmuştur. Ayrıca günümüzde yeni antibiyotiklerin keşfi azaldığından, çoklu antibiyotik dirençli ve mevcut tüm antibiyotiklere dirençli (pan-resistant) bakteriler nedeniyle ciddi enfeksiyonların tedavi seçeneği azalmış, hastalık yükü, hastalığa bağlı mortalite ve ekonomik kayıplar tüm dünyada sağlık sistemine önemli yükler getirmiştir (De Oliveira ve ark, 2020; Nathan, 2020). ESKAPE grubu olarak adlandırılan ve özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda büyük problemler yaşatan *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve *Enterobacter sp* rapor edilen pan-resistant suşların önemli bir bölümünü oluşturmaktadır (Gülmez, 2013; Karakonstantis ve ark., 2020). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2017 yılında "Acilen yeni antibiyotiklere ihtiyaç duyulan bakterilerin listesi"nde yayınladığı ESKAPE mikroorganizmalarını ilaç şirketleri için öncelikli patojenler ilan etmesinden sonra hem bu patojenlerin hem de antimikrobiyal direncin önemi daha da vurgulanmıştır (Tacconelli vd., 2018; WHO, 2017).

Biyofilm, mikroorganizmaların herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışarak oluşturdukları topluluklar olarak tanımlanmakta ve çeşitli bakteri ve mantar türleri tarafından oluşturulmaktadır ve biyofilm içerisindeki hücreler antimikrobiyal ajanlara karşı planktonik hücrelere göre yaklaşık 1000 kat daha dirençlidirler (Ciofu ve ark, 2015).

Tüm bu nedenlerden dolayı bu önemli sağlık tehdidini ortadan kaldırmak için direnç sürveyans sistemlerinin oluşturulması, direnç yönetim uygulamalarının yapılması, tıp ve

tarımda antibiyotik kullanımının kontrol altına alınması gerekmektedir. Bu uygulamalardan en önemlisi yeni ve etkili antibiyotiklerin geliştirilmesidir. Ancak son yıllarda çok az sayıda yeni antibiyotik Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-FDA) tarafından onaylanmış ve enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için kullanıma girmiştir. Bunlardan imipenem-silastatin-relebaktam ve meropenem-vaborbaktam özellikle Gram negatif bakterilere etkin olan önemli kombinasyonlar olarak dikkat çekmektedir.

Karbapenemlerin yeni beta laktamaz inhibitörleri olan vaborbaktam ve relebaktam ile kombinasyonu tedavide önemli bir seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, ülkemizdeki hastalardan izole edilmiş Gram negatif bakterilerin imipenem-silastatin-relebaktam ve meropenem-vaborbaktamın etkinliklerinin belirlenmesi, antibiyotik direnç verilerinin elde edilmesi, kolistin ile kombinasyonlarının ve biyofilmlere karşı etkinliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER: Proje konusunda proje teklifi sırasında kullanılmış ve kabul edildikten sonraki dönem içinde dünya literatüründe gerçekleşen yenilikler ve çıkmış olan makaleler konusunda bilgi verilmeli, projenin mevcut literatür nasıl katkı sağladığı belirtilmelidir.

Karbapenemlerin yeni beta laktamaz inhibitörleri olan vaborbaktam ve relebaktam ile kombinasyonu tedavide önemli bir seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır. Vaborbaktam geniş bir yelpazede beta laktamlara karşı etkilidir ve meropenemle olan kombinasyonu olan meropenem-vaborbaktam, FDA tarafından 2017 yılında onaylanmıştır ve Gram negatif bakterilere olan etkinliği ile ilgili çalışmalar tüm dünyada devam etmektedir. Relebaktam ise bir diğer beta laktamaz inhibitörü olarak sentezlenmiş ve karbapenem grubu bir antibiyotik olan imipenem-silastatin, ile kombinasyonu komplike üriner sistem enfeksiyonları ve komplike karın içi enfeksiyonlarına karşı FDA tarafından 2019 yılında onaylanmıştır (Smith ve ark., 2020).

Proje kabul edildikten sonraki dönem içinde dünya literatüründe gerçekleşen yenilikler ve çıkmış olan makaleler incelendiğinde, araştırmacıların farklı direnç mekanizmalarına sahip Gram negatif bakterilere karşı meropenem-vaborbaktam ve imipenem-relebaktam aktivitelerini araştırdığı çalışmaların hızla arttığı tespit edilmiştir. Lasarte-Monterrubio ve ark. (2022) tarafından yapılan güncel bir çalışmada seftozolan/tazobaktam ve seftazidim/avibaktam dirençli *P. aeruginosa* suşlarına karşı aralarında imipenem-relebaktamın da bulunduğu çeşitli antibiyotiklerin aktiviteleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre imipenem-relebaktam, VIM-20 karbapenem taşıyan iki klinik izolat dışında tüm izolatlarla karşı oldukça aktif bulunmuştur. Bir başka çalışmada da karbapenem dirençli Enterobacterales ve *P. aeruginosa* suşlarının imipenem/relebaktama sırasıyla %98 ve %94 oranlarında duyarlı oldukları gösterilmiştir (Wise ve ark., 2023). 2023 yılında yapılan bir araştırmada da seftazidim/avibaktam, meropenem-vaborbaktam ve imipenem-relebaktamın karbapenemaz üreten Enterobacterales'e karşı aktiviteleri araştırılmış ve suşların %77'sinin meropenem-vaborbaktama, %62'sinin ise imipenem-relebaktama duyarlı oldukları tespit edilmiştir.

Ancak yapılan literatür taraması çalışmasında meropenem-vaborbaktam ve imipenem-relebaktamın kolistin ile kombinasyonlarının gerek checkerboard gerekse zamana bağlı öldürme yöntemiyle araştırıldığı çalışmaya pek fazla rastlanmamıştır. Yapılan literatür taramalarında imipenem-silastatin-relebaktam ve meropenem-vaborbaktamın kombinasyonlarının biyofilmlere karşı aktivitelerinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya ise rastlanmamıştır. Bu nedenle kolistin ile meropenem-vaborbaktam ve imipenem-relebaktamın kombinasyonlarına ait ve biyofilm üzerine etkilerinin belirlenmesine ait bulgularımızın hem tedavisi oldukça güç olan Gram negatif bakterilerin enfeksiyonlarının tedavisinde yeni bir açılım sağlayacağı hem de literatüre olumlu katkılar sunacağı düşünülmektedir.

3. MALZEME ve YÖNTEM: Proje kapsamında kullanılan yöntemler belirtilmelidir.

3.1. Mikroorganizmaların Çeşitli Antibiyotiklere Karşı Direnç Profillerinin Belirlenmesi

Çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş toplam 107 adet suşun (*Pseudomonas aeruginosa* (16), *Acinetobacter baumannii* (37), *Klebsiella pneumoniae* (34), *Escherichia coli* (13) ve

Enterobacter sp. (7)) çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları EUCAST tarafından belirtilen disk difüzyon yöntemi ile saptanmıştır. Buna göre bakterilerin taze kültürleri McFarland 0.5, yani 1×10^8 cfu/ml (cfu: colony-forming unit, koloni oluşturan birim) olacak şekilde hazırlanmış ve bu süspansiyonlar Mueller-Hinton agar üzerine eküvyon yardımıyla sürülüp kısa bir süre beklenerek agarın mikroorganizma solüsyonunu absorbe etmesi sağlanmıştır. İmipenem (10 µg), meropenem (10 µg), gentamisin (10 µg), tobramisin (10 µg), amikasin (30 µg), siprofloksasin (5 µg), levofloksasin (5 µg), seftazidim (30 µg), sefepim (30 µg), piperasilin (100 µg) ve aztreonam (30 µg) antibiyotiklerini içeren hazır diskler steril bir pens yardımıyla agar yüzeyine yerleştirip 37°C'de 24 saat inkübasyonun ardından disklerin çevresinde oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek değerlendirme yapılmıştır (EUCAST, 2019).

3.2. MBL Üretiminin Araştırılması

Disk difüzyon testi sonuçlarına göre 96 suş (*P. aeruginosa* (13), *A. baumannii* (36), *K. pneumoniae* (33), *E. coli* (8), *Enterobacter sp.* (6)) imipenem ve meropeneme dirençli ve orta duyarlı bulunmuştur. Bu bakterilerin, MBL enzim varlığını belirlemek için "meropenem-EDTA kombine disk difüzyon testi" uygulanmıştır. Buna göre bakterilerin taze kültürleri McFarland 0.5, yani 1×10^8 cfu/ml olacak şekilde hazırlanmış ve bu süspansiyonlar önceden hazırlanmış Mueller-Hinton agar üzerine eküvyon yardımıyla sürülmüştür. Agarın mikroorganizma solüsyonunu emmesi sağlandıktan sonra, 2 adet meropenem diski yerleştirip disklerden birisinin üzerine pH 8'de hazırlanmış 0.5 M EDTA solüsyonu eklenerek Petri kutuları 37°C'de 18-20 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra meropenem diski ile meropenem-EDTA'lı diski zon çaplarında 7 mm veya daha fazla fark bulunması MBL pozitif olarak kabul edilmiştir (Lee, 2003). MBL pozitif olarak tespit edilen suşlar çalışmadan çıkarılmış, MBL negatif olan suşlar ile deneylere devam edilmiştir. Deneyler iki kez tekrar edilmiştir.

3.3. Karbapenem+Beta laktamaz İnhibitörlerinin Antimikrobiyal Etkinliklerinin Belirlenmesi

3.3.1. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) Değerlerinin Saptanması

MBL negatif 44 adet suşun karbapenem-beta laktamaz inhibitörü kombinasyonuna (imipenem-silastatin-relebaktam ve meropenem-vaborbaktam) karşı duyarlılıkları EUCAST tarafından belirlenen mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiş ve antimikrobiyal ajanların MİK değerleri saptanmıştır. Buna göre relebaktam ve vaborbaktam hariç (relebaktam konsantrasyonu 4 µg/ml, vaborbaktam konsantrasyonu ise 8 µg/ml tüm kuyularda sabit olacak şekilde uygulanmıştır), antimikrobiyal maddelerin hazırlanan çift katlı seri dilüsyonlarına, mikropaktaki son konsantrasyonu 5×10^5 cfu/ml olan bakteri süspansiyonları ilave edilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübasyonun ardından üremenin görülmediği en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonu MİK değerleri olarak tanımlanmıştır (EUCAST, 2019). Deneyler en az iki kez tekrar edilmiştir.

3.3.2. Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu (MBK) Değerlerinin Saptanması

Antimikrobiyal maddelerin (imipenem-silastatin-relebaktam ve meropenem-vaborbaktam) MBK değerlerini saptamak için, MİK değerleri saptandıktan sonra üremenin görülmediği her kuyudan ikişer örnek olmak üzere 2×10^7 µl pipetör yardımıyla alınarak Petri kutusundaki Triptik Soya agarın yüzeyine tatbik edilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübasyona kaldırılmıştır. Ertesi gün oluşan koloniler sayılarak, inokulumun %99.9'unu öldüren en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonu MBK değeri olarak kabul edilmiştir (NCCLS, 2002). Deneyler en az iki kez tekrar edilmiştir.

3.4. Karbapenem+Beta laktamaz İnhibitörlerinin Kolistin ile Kombinasyonlarının Mikrodilüsyon "Checkerboard" Yöntemiyle Araştırılması

MİK sonuçlarına göre 44 adet suştan 28 tanesi (*K.pneumoniae* (4), *P. aeruginosa* (9), *A. baumannii* (2), *E. coli* (8), *Enterobacter sp.* (5)) ile çalışmaya devam edilmesine karar verilmiştir (MİK değeri < 64 µg/ml çıkan suşlar çalışmadan çıkarılmıştır). MİK'leri belirlenen karbapenem+beta laktamaz inhibitörlerinin (imipenem-silastatin-relebaktam ve meropenem-vaborbaktam) ve kolistinin kombinasyon şeklinde etkinlikleri checkerboard tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Buna göre karbapenem+beta laktamaz inhibitörlerinin ve kolistinin

mikroplak içerisinde farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerini içeren kombinasyonları elde edilmiştir. Bunun için antimikrobiyallerin 2xMİK, MİK, MİK/2, MİK/4 ve MİK/8 konsantrasyonlarının 4 katı konsantrasyonlar dış ortamda hazırlanıp, mikroplağın dikey düzlemine kolistinın aşağıdan yukarı doğru artan konsantrasyonları, yatay düzlemine ise karbapenem+beta laktamaz inhibitörlerinin sağdan sola doğru artan konsantrasyonları koyulmuştur. Daha sonra bu kuyulara 24 saatlik bakteri kültür süspansiyonları 10⁶ cfu/ml'ye ayarlanarak ilave edilmiş ve bir gece 37 °C'de inkübasyon sonrası üreme görülmeyen kuyularda bulunan iki antimikrobiyal maddenin en düşük konsantrasyonları saptanarak fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) indeksi belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar FİK indeksi esas alınarak sinerjist (≤ 0.5 olan değerler), additif (0.5-4 olan değerler) ve antagonist (≥ 4.0 olan değerler) olarak değerlendirilmiştir (Odds, 2003).

3.5. Karbapenem+Beta laktamaz inhibitörlerinin Kolistin ile Kombinasyonlarının “Zamana Bağlı Öldürme” Yöntemiyle Araştırılması

Kombinasyon testi sonuçlarına göre seçilen suşların 24 saatlik bakteri kültür süspansiyonları ile antimikrobiyal maddelerin 1xMİK konsantrasyonları karşılaştırılmış ve 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde örnekler alınarak seyreltmeler yapılarak 24 saat inkübasyona kaldırılmıştır. Ertesi gün oluşan koloniler sayılarak, bakteri sayımları yapılmış ve elde edilen sonuçlar zaman 'x' ekseninde, logaritmik olarak ifade edilen bakteri sayısı 'y' ekseninde olacak şekilde gösterilerek zaman- ölüm eğrileri çizilmiş ve sonuçlar “National Committee for Clinical Laboratory Standards-NCCLS” verilerine göre sinerjist, additif ve antagonist olarak değerlendirilmiştir (NCCLS, 2002).

3.6. Karbapenem+Beta laktamaz inhibitörlerinin Biyofilm Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Çalışmaya devam edilen 28 bakterinin bir gecelik kültürleri uygun işlemlerden geçirilerek 1x 10⁶ cfu/ml olacak şekilde seyreltilmiş ve hazırlanan süspansiyonları 96 kuyulu düz taban polistiren mikroplaklara 100'er µl aktarılmıştır. Plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edilerek biyofilm oluşumları sağlanmıştır. Biyofilm oluşumundan sonra çok kanallı pipetör yardımıyla besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış ve steril fosfat tamponu ile kuyucuklar yıkanmıştır. İmipenemin üç farklı konsantrasyonu (1, 2 ve 4 µg/ml) relebaktam (4 µg/ml) ile; meropenemin üç farklı konsantrasyonu ise (4, 8 ve 16 µg/ml) vaborbaktam (8 µg/ml) ile kombine edilmiş ve ilgili kuyucuklara ilave edilmiştir. Mikroplaklar tekrar 24 saat inkübasyona kaldırılmış ve inkübasyon sonrası kuyucuklar tekrar steril fosfat tamponu ile yıkanıp 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) yöntemi ile incelenmiştir. Uygun şekilde hazırlanan MTT solüsyonu kuyucuklara ilave edilip plaklar 35°C'de karanlıkta 5 saat inkübe edildikten sonra, ELISA mikroplak okuyucu cihazda (EON, Biotek) 490 nm dalga boyunda kuyucukların optik dansiteleri saptanıp kontrolle karşılaştırılarak değerlendirilmeleri yapılmıştır (Sabaeifard ve ark., 2014).

4. BULGULAR: Proje teklifinde belirtilmiş olan iş paketleri kapsamında yürütülen faaliyetler sıralaması ile elde edilen bulgular verilmelidir. Elde edilen bulgular gerekiyorsa tablo ve grafik olarak verilmelidir. Varsa istatistik sonuçlar, ara çıktılar ifade edilmelidir.

4.1. Mikroorganizmaların Çeşitli Antibiyotiklere Karşı Direnç Profillerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

Elde edilen sonuçlara göre çalışılan suşların çoğunun karbapenemlere dirençli oldukları tespit edilmiştir. *A. baumannii*, *K. pneumonia* ve *E. coli* izolatlarının %90'ından fazlasının seftazidim ve piperasiline dirençli olduğu bulunmuştur. Siprofloksasin ve piperasiline *E. coli*'ye hiçbir etki göstermediği (zon çapları=0 mm) ve *P. aeruginosa* suşlarının çoğunun imipenem ve aztreonama dirençli oldukları tespit edilmiştir. Gentamisin ve amikasin hariç tüm antibiyotiklerin *Enterobacter sp.*'e karşı etkisiz oldukları bulunmuştur. Sonuçlar Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Disk difüzyon testine göre meydana gelen zon çapları ve duyarlı, orta duyarlı ve direçli suş sayıları

	<i>A. baumannii</i> (n=37)				<i>K. pneumoniae</i> (n=34)				<i>P. aeruginosa</i> (n=16)				<i>E. coli</i> (n=13)				<i>Enterobacter sp.</i> (n=7)			
	Aralık (mm)	S	I	R	Aralık (mm)	S	I	R	Aralık (mm)	S	I	R	Aralık (mm)	S	I	R	Aralık (mm)	S	I	R
IPM	4-30	1	6	30	0-40	15	9	10	0-30	4	-	12	11-27	7	1	5	0-18	-	-	7
MEM	0-30	3	1	33	0-24	2	5	27	0-40	5	-	11	8-28	7	-	6	0-10	-	-	7
GN	0-32	3	-	34	0-34	6	1	27	0-36	7	-	9	0-24	9	-	4	0-14	-	1	6
TM	0-28	8	-	29	0-28	4	2	28	0-32	8	-	8	0-22	5	3	5	0-10	-	-	7
AN	0-26	2	1	34	0-30	7	1	26	0-30	8	-	8	0-22	11	-	2	0-21	5	1	1
CIP	0-36	2	-	35	0-36	4	1	29	0-42	7	-	9	0	-	-	13	0	-	-	7
LVX	0-30	3	3	31	0-36	5	-	29	0-40	7	1	8	0-15	-	-	13	0-8	-	-	7
CAZ	0-24	1	2	34	0-19	-	1	33	0-32	8	-	8	0-14	-	-	13	0	-	-	7
FEP	0-30	2	1	34	0-20	-	5	29	0-40	9	1	6	0-11	-	-	13	0	-	-	7
PIP	0-22	1	-	36	0-26	1	1	32	0-26	4	4	8	0	-	-	13	0	-	-	7
ATM	0-17	*	*	*	0-34	4	-	30	0-38	4	-	12	0-9	-	-	13	0	-	-	7

S: Duyarlı, I: Orta Duyarlı, R: Direçli

Imipenem (IPM), meropenem (MEM), gentamisin (GN), tobramisin (TM), amikasin (AN), siprofloksasin (CIP), levofloksasin (LVX), seftazidim (CAZ), sefepim (FEP), piperasilin (PIP), aztreonam (ATM)

4.2. Metallo-Beta-Laktamaz (MBL) Üretiminin Araştırılmasına Ait Bulgular

Sonuçlarımıza göre çalışılan 96 suştan, 44 tanesi (*K.pneumoniae* (15), *P. aeruginosa* (9), *A. baumannii* (6), *E. coli* (8), *Enterobacter sp.* (6)) MBL negatif olarak bulunmuş ve deneyler bu suşlar ile devam etmiştir.

4.3. Karbapenem+Beta laktamaz İnhibitörlerinin MİK ve MBK Değerlerine Ait Bulgular

Sonuçlarımıza göre imipenem-silastatin-relebaktam kombinasyonunun MİK değerleri (µg/ml) *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*'e karşı sırasıyla 0.125 - 8 ve 0.25 - < 64, *K. pneumoniae*'ye karşı 1 - < 64, *E. coli*'ye karşı 0.06 - 1, *Enterobacter sp.*'ye karşı ise 4 - < 64 aralığında bulunmuştur. Meropenem-vaborbaktam kombinasyonunun MİK değerleri ise sırasıyla *P. aeruginosa*, *A. baumannii* ve *K. pneumoniae*'ye karşı 0.125 - 8, 0.125 - < 64, 0.25 - < 64 µg/ml aralığında tespit edilmiştir. *E. coli* ve *Enterobacter sp.* suşları meropenem-vaborbaktam kombinasyonuna daha duyarlı bulunmuşlar ve MİK aralıklarının sırasıyla 0.03 - 1 ve 0.06 - 32 µg/ml olduğu gösterilmiştir (Tablo 2).

Elde edilen sonuçlara göre imipenem-silastatin-relebaktam kombinasyonu çalışılan hiç bir konsantrasyonda *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* suşlarına karşı bakterisit etki gösterememiştir. Kombinasyonlara ait MBK değerleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Karbapenem+Beta laktamaz inhibitörlerinin MİK ve MBK aralıkları (µg/ml)

	İmipenem-silastatin+relebaktam		Meropenem+vaborbaktam	
	MİK	MBK	MİK	MBK
<i>P. aeruginosa</i>	0.125 - 8	< 64	0.125 - 8	1 - < 64
<i>A. baumannii</i>	0.25 - < 64	1 - < 64	0.125 - < 64	2 - < 64
<i>K. pneumoniae</i>	1 - < 64	< 64	0.25 - < 64	32 - < 64
<i>E. coli</i>	0.06 - 1	0.25- < 64	0.03 - 1	0.06 - 16
<i>Enterobacter sp.</i>	4 - < 64	16 - < 64	0.06 - 32	4 - < 64

4.4. Karbapenem+Beta laktamaz İnhibitörlerinin Kolistin ile Kombinasyonlarına Ait Bulgular

28 suşu karşı karbapenem+beta laktamaz inhibitörlerinin ve kolistinin kombinasyon şeklinde etkinlikleri checkerboard tekniği kullanılarak araştırılmış ve elde edilen FİK değerleri Tablo 3'te gösterilmiştir. Sonuçlarımıza göre bir *K. pneumoniae* (KP3) suşuna karşı hem kolistin + **imipenem-silastatin+relebaktam** hem de kolistin + **meropenem+vaborbaktam** kombinasyonları sinerjistik etki göstermiştir. Bir diğer sinerjistik etki de *Enterobacter sp.* (EB1) suşunda kolistin + **meropenem+vaborbaktam** kombinasyonunda gösterilmiştir. Çalışılan suşların hiçbirinde antagonist etki görülmemiştir.

Tablo 3: Karbapenem+Beta laktamaz inhibitörlerinin kolistin ile kombinasyonları ile elde edilen FİK değerleri

Suş numarası	K+İR	K+MV
KP 1	2	1,125
KP 2	1,06	1,06
KP 3	0,185	0,185
KP 4	1,03	1,03
AB 1	2	2
AB 2	1,06	1,06
EB 1	1,06	0,12
EB 2	2	1,125
EB 3	1,06	1,06
EB 4	1,25	1,25
EB 5	1	1,25
PA 1	1,06	1,06
PA 2	2,06	2,06
PA 3	1,125	1,25
PA 4	0,53	0,53
PA 5	1,125	1,06
PA 6	1,06	1,06
PA 7	1,06	1,06
PA 8	1,125	1,25
PA 9	1,03	1,03
EC 1	1	1,5
EC 2	1,03	1,03
EC 3	0,53	1,03
EC 4	0,53	1,03
EC 5	1,5	2
EC 6	1	1
EC 7	1	1
EC 8	1,5	2

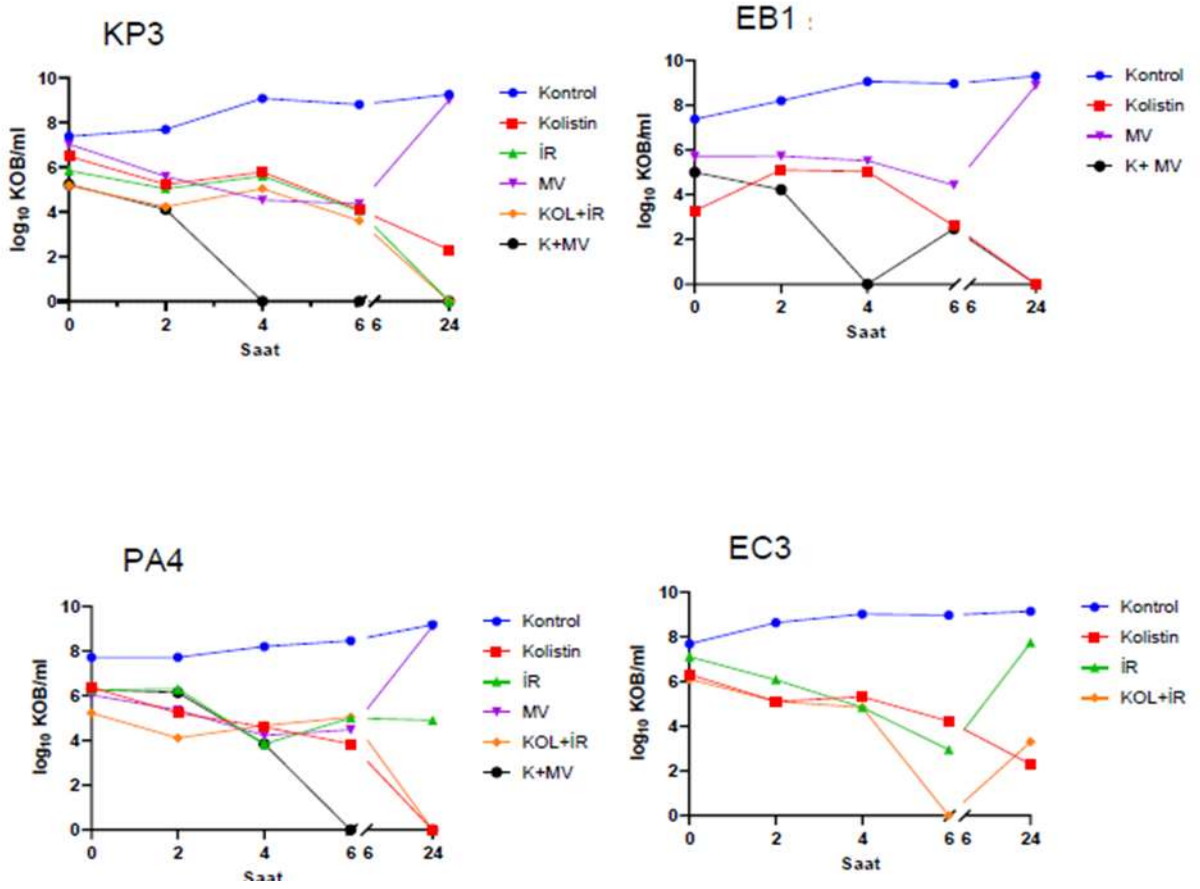
K+İR: Kolistin + imipenem-silastatin-relebaktam

K+MV: Kolistin + meropenem-vaborbaktam

KP: *K. pneumoniae* AB: *A. baumannii* EB: *Enterobacter sp.* PA: *P. aeruginosa* EC: *E. Coli*

4.5. Karbapenem+Beta laktamaz İnhibitörlerinin Kolistin ile Kombinasyonlarının “Zamana Bağlı Öldürme” Yöntemiyle Araştırılmasına Ait Bulgular

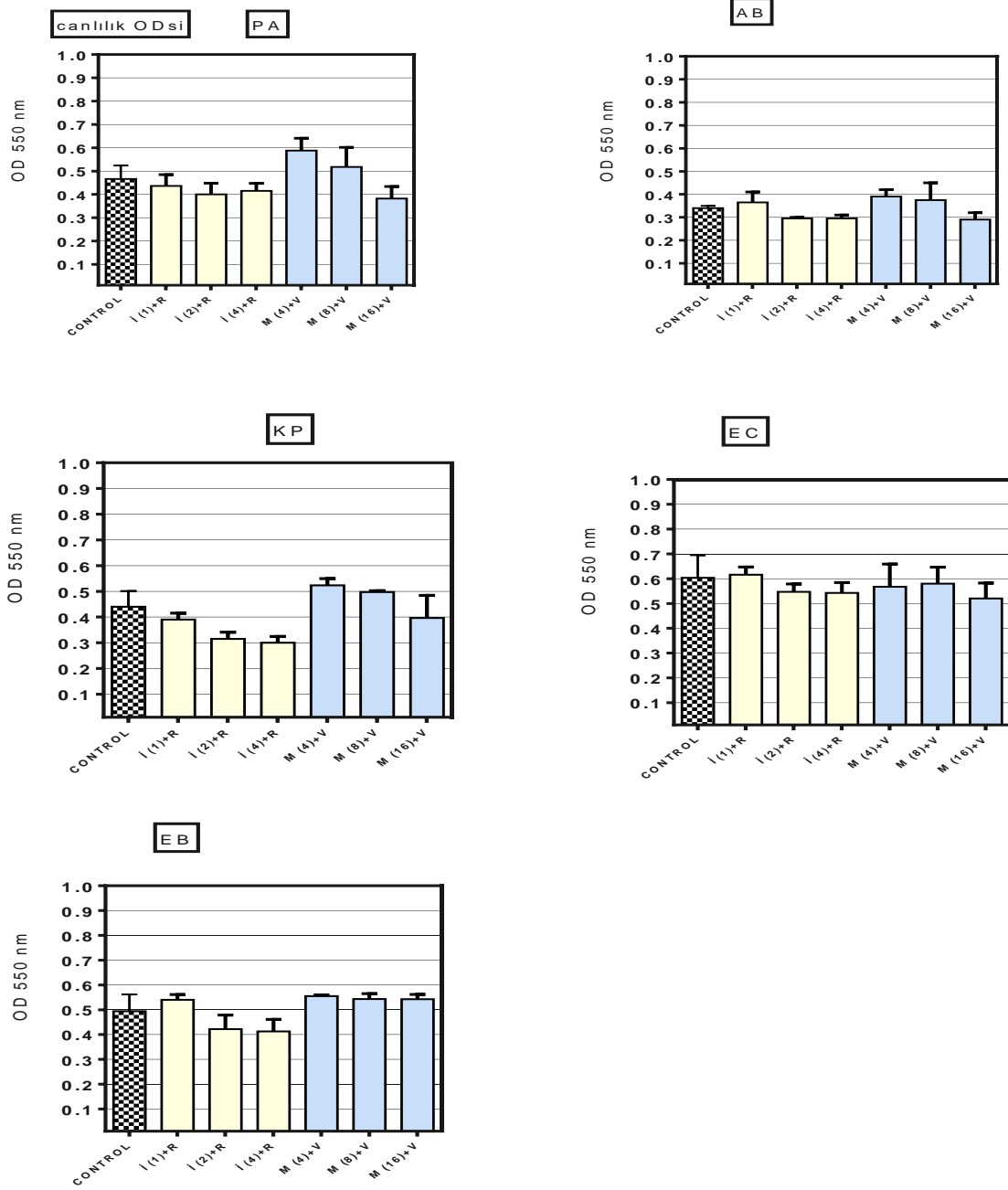
Kombinasyon deneyi sonuçlarına göre seçilen 4 suşun (KP3, EB1, PA4 ve EC3) sinerjistik veya sinerjiste en yakın kombinasyonlarına zamana bağlı öldürme deneyleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kolistin çalışılan dört suşa karşı da bakterisit aktivite göstermiştir. **KP3** ve **EB1** suşlarına karşı Kolistin + meropenem-vaborbaktam kombinasyonu 4. ve 6. saatlerde erken sinerjistik etki gösterirken; **PA4** suşuna karşı da 4. saatte erken sinerjistik etki göstermiştir. **EC3** suşuna karşı ise Kolistin + imipenem-silastatin-relebaktam kombinasyonu 6. saatte erken sinerjistik etki, 24. saatin sonunda ise additif etki göstermiştir. Sonuçlar Figür 1’de gösterilmiştir.



Figür 1: Karbapenem+beta laktamaz inhibitörlerinin kolistin ile kombinasyonlarının zamana-bağlı öldürme eğrilerine ait bulgular

4.6. Karbapenem+Beta laktamaz İnhibitörlerinin Biyofilm Üzerine Etkilerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

İmipenem ve meropenem beta laktamaz inhibitörleri ile kombinasyonları beş farklı cinse ait, 28 bakteriye karşı MTT yöntemi ile denenmiş ve sonuçlar Figür 2’de gösterilmiştir. Sonuçlara göre İmipenem-silastatin+relebaktam kombinasyonu çalışılan tüm bakterilere etkili olmuş ve canlılık OD’sini kontrole göre azaltmıştır. Meropenem vaborbaktam kombinasyonu ise yalnızca meropenemin 16 µg/ml’lik konsantrasyonunda *Enterobacter sp.* hariç diğer bakteri gruplarına etkili olmuştur.



Figür 2: Karbapenem+beta laktamaz inhibitörlerinin biyofilm üzerine etkileri, İmipenem (İ) ve Meropenem (M) farklı konsantrasyonlarda kullanılmıştır.

KP: *K. pneumoniae* AB: *A. baumannii* EB: *Enterobacter sp.* PA: *P. aeruginosa* EC: *E. coli*

R: Relebaktam V: Vaborbaktam

5. TARTIŞMA VE SONUÇ: Projede elde edilen bulgular ve değerlendirmeleri sonucunda bir hüküm oluşturulmalı ve literatür verileri ile karşılaştırılmalıdır. Proje kapsamında varsa yöntemde gerekli görülen veya gerçekleştirilen değişiklikler gerekçeleri ile beraber bu bölümde ifade edilmeli ve sonucunda hedeflenen noktaya ulaşıp ulaşılmadığı hükme bağlanmalıdır.

Gram negatif bakterilerde görülen yaygın direnç mekanizmalarından biri beta-laktam antibiyotiklere karşı gelişen dirençtir. Bu direncin en yaygın mekanizması beta laktamaz

üretimi ile bakterilerin beta laktam antibiyotikleri parçalamaları ve etkinliklerinin yok olmasına neden olmalarıdır. Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) enzimlerin varlığı beta laktam antibiyotiklerle birlikte beta laktamaz inhibitörlerinin de etkinliğinin yok olmasına neden olmuştur (Tooke ve ark., 2019). Bu nedenle yeni beta laktamaz inhibitörleri sentezlenmiş ve kullanımı onaylanmıştır. Yeni beta laktamaz inhibitörlerinin beta laktam antibiyotikleri ile kombinasyonları Gram negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde umut vadetmektedir. Beta laktam grubu antibiyotiklerden olan karbapenemler beta laktamazlardan etkilenmektedir ve karbapenem direnci tüm dünyada yaygın olarak rapor edilmektedir.

DSÖ 2017 yılında yeni antibiyotiklere ihtiyaç duyulan öncelikli patojenler listesi yayınlamıştır. Bu rapora göre kritik durumda bulunan ve birinci öncelik olarak belirlenen bakteriler karbapenem dirençli *A. baumannii*, karbapenem dirençli *P. aeruginosa* ve karbapenem dirençli, GSBL üreten Enterobacteriaceae'dir (WHO, 2017). Bu direnç mekanizmalarına karşı mücadelede yenilikçi tedavi seçeneklerine ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş toplam 107 adet suşun (*P. aeruginosa* (16), *A. baumannii* (37), *K. pneumoniae* (34), *E. coli* (13) ve *Enterobacter sp.* (7)) çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları EUCAST tarafından belirtilen disk difüzyon yöntemi ile saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre çalışılan suşların çoğunun karbapenemlere, seftazidim ve piperasiline dirençli oldukları tespit edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda da *A. baumannii* (Namaei ve ark., 2021, Yadav ve ark., 2020), *K. pneumoniae* (Candan & Aksöz 2015), *P. aeruginosa* (Dumarı ve ark., 2019), *E. coli* (Avcioğlu ve ark., 2020) ve *Enterobacter sp.* (Tanrıverdi Çaycı ve ark., 2020) suşlarının benzer duyarlılık profillerine sahip oldukları gösterilmiştir.

İmipenem-relebaktam ve meropenem-vaborbaktam kombinasyonları, karbapenemlere karşı gelişen dirençte en önemli mekanizmalardan olan MBL pozitif suşlara karşı etkisizdirler (Leone ve ark., 2019). Bu amaçla disk difüzyon testi sonuçlarına göre karbapenemlere dirençli ve orta duyarlı bulunan bakterilerin, MBL enzim varlığını belirlenmiş ve 96 suştan, 44 tanesi (%45.83) MBL negatif olarak bulunmuş ve deneyler bu suşlar ile devam etmiştir. İmipenem-silastatin-relebaktam ve meropenem-vaborbaktamın MİK ve MBK değerleri araştırılmıştır. İmipenem-silastatin-relebaktam kombinasyonunun MİK değerleri ($\mu\text{g/ml}$) *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*'e karşı sırasıyla 0.125 - 8 ve 0.25 - < 64, *K. pneumoniae*'ye karşı 1 - < 64, *E. coli*'ye karşı 0.06 - 1, *Enterobacter sp.*'ye karşı ise 4 - < 64 aralığında bulunmuştur. Meropenem-vaborbaktam kombinasyonunun MİK değerleri ise sırasıyla *P. aeruginosa*, *A. baumannii* ve *K. pneumoniae*'ye karşı 0.125 - 8, 0.125 - < 64, 0.25 - < 64 $\mu\text{g/ml}$ aralığında tespit edilmiştir. *E. coli* ve *Enterobacter sp.* suşları meropenem-vaborbaktam kombinasyonuna daha duyarlı bulunmuşlar ve MİK aralıklarının sırasıyla 0.03 - 1 ve 0.06 - 32 $\mu\text{g/ml}$ olduğu gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre imipenem-silastatin-relebaktam kombinasyonu çalışılan hiç bir konsantrasyonda *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* suşlarına karşı bakterisit etki gösterememiştir.

Nordmann ve ark. (2023) tarafından yayınlanan çalışmada sahip oldukları karbapenemaza bağlı olarak değişmekle birlikte imipenem-relebaktamın MİK değerleri ($\mu\text{g/ml}$) *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *Enterobacter cloacae* için sırasıyla, 32-0.06, >128-0.06 ve 32-0.125; meropenem-vaborbaktamın ise >64-0.016, >64-0.023 ve >64-0.016 olarak tespit edilmiştir. İmipenem dirençli dokuz *P. aeruginosa* suşuna aralarında imipenem-relebaktamın da bulunduğu çeşitli antibiyotiklerin etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada da, imipenem-relebaktamın bu suşlara karşı MİK değerinin 1-8 $\mu\text{g/ml}$ arasında değiştiği tespit edilmiştir (Asempa ve ark., 2019).

Birden fazla sayıda antimikrobiyalin eşzamanlı olarak kullanılması olarak tanımlanan "kombinasyon tedavisi", enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için kullanılan yöntemlerden biridir. Çalışmamızda imipenem-silastatin-relebaktam ve meropenem-vaborbaktamın kolistin ile kombinasyon şeklinde etkinlikleri checkerboard tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Sonuçlarımıza göre bir *K. pneumoniae* suşuna karşı hem kolistin hem imipenem-silastatin-relebaktam hem de meropenem-vaborbaktam ile kombinasyonları sinerjist etki göstermiştir. Bir diğer sinerjist etki de *Enterobacter sp.* suşunda kolistin ile meropenem-vaborbaktam kombinasyonunda gösterilmiştir. Bu sonuçlarına göre seçilen 4 suşun kombinasyonlarına

zamana bağılı öldürme deneyleri de yapılmıştır. *K. pneumoniae* ve *Enterobacter sp.* suşlarına karşı Kolistin + meropenem-vaborbaktam kombinasyonu 4. ve 6. saatlerde erken sinerjistik etki gösterirken; *P. aeruginosa* suşuna karşı da 4. saatte erken sinerjistik etki göstermiştir. *E. coli* suşuna karşı ise kolistin-imipenem-silastatin-relebaktam kombinasyonu 6. saatte erken sinerjistik etki, 24. saatin sonunda ise additif etki göstermiştir.

Asempa ve ark. (2019) dokuz imipenem dirençli olan, 10 *P. aeruginosa* suşuna karşı imipenem-relebaktamın amikasin veya kolistin ile kombinasyonlarını araştırmışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre İmipenem-relebaktam+kolistin kombinasyonunun dokuz imipenem dirençli suştan sekiz tanesine sinerjistik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Zamana bağılı öldürme deneylerinde de aynı kombinasyonun 6 saatte tüm suşlara karşı bakterisidal etkili olduğu ve sekiz suşa karşı yine sinerjistik etki gösterdiği bulunmuştur.

Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşlarına karşı aralarında meropenem-vaborbaktam ve imipenem silastatin-relebaktamın da bulunduğu çeşitli antibiyotiklerin ve kombinasyonların araştırıldığı bir başka çalışmada ise imipenem silastatin-relebaktamın 12. saatte suşların çoğunun sayısını 5 log'dan fazla azalttığı, meropenem-vaborbaktamın ise 24. saatte bakterisidal aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir (Yu ve ark., 2021). Benzer şekilde yapılan birkaç çalışmada da bu kombinasyonların doza bağılı olarak bakterisidal aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir (Biagi ve ark., 2020; Rogers ve ark., 2023).

Biyofilm içerisinde yer alan hücreler antibiyotiklere oldukça dirençli olduğundan farklı antibiyotik toleranslı alt popülasyonları ortadan kaldırmak ve biyofilm içerisinde bakterilerde antibiyotik direncine neden olan mutasyonların meydana gelmesini önlemek için biyofilm enfeksiyonlarının tedavisinde yüksek dozda antibiyotik ve/veya kombinasyon tedavisinin kullanılmasını gerektirmektedir (Ciofu ve ark., 2015). Bu amaçla çalışmamızda imipenem ve meropenemin beta laktamaz inhibitörleri ile kombinasyonları biyofilm içerisindeki hücrelere karşı denenmiş ve imipenem-silastatin-relebaktam kombinasyonunun çalışılan tüm bakterilere karşı etkili meropenem vaborbaktam kombinasyonu ise yalnızca meropenemin 16 µg/ml'lik konsantrasyonunda etkili olduğu (*Enterobacter sp.* hariç) tespit edilmiştir.

Yapılan literatür taramalarında imipenem-silastatin-relebaktam ve meropenem-vaborbaktamın kombinasyonlarının biyofilmlere karşı aktivitelerinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya ise rastlanmamıştır.

Sonuç olarak; karbapenemlerin yeni beta laktamaz inhibitörleri olan vaborbaktam ve relebaktam ile kombinasyonu tedavide önemli bir seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak yapılan literatür araştırmalarında kombinasyon ile ilgili çalışmaların oldukça kısıtlı olduğu görülmüş hatta biyofilmlere karşı aktivitelerinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, ülkemizdeki hastalardan izole edilmiş Gram negatif bakterilerin imipenem-silastatin-relebaktam ve meropenem-vaborbaktamın etkinliklerinin belirlenmesi, antibiyotik direnç verilerinin elde edilmesi, kolistin ile kombinasyonlarının ve biyofilmlere karşı etkinliklerinin araştırılması amaçlandığı çalışmamızın sonuçlarının literatüre önemli katkılar sunacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

Raporda, yararlanılan kaynakların listelendiği "Kaynaklar" bölümü bulunmalıdır ve aşağıdaki kurallara uygun olarak düzenlenmiş olmalıdır.

Asempa, T. E., Nicolau, D. P., & Kuti, J. L. (2019). In Vitro Activity of Imipenem-Relebactam Alone or in Combination with Amikacin or Colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(9), e00997-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00997-19>

Avcıoğlu, F. & Behcet, M. (2020). Uriner sistem enfeksiyonu etkeni *Escherichia coli* izolatlarının çeşitli antibiyotiklere direnç oranlarının değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 50(3), 172-7.

- Biagi, M., Shajee, A., Vialichka, A., Jurkovic, M., Tan, X., & Wenzler, E. (2020). Activity of Imipenem-Relebactam and Meropenem-Vaborbactam against Carbapenem-Resistant, SME-Producing *Serratia marcescens*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(4), e02255-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.02255-19>
- Candan, E. D., & Aksöz, N. (2015). *Klebsiella pneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. *Acta biochimica Polonica*, 62(4), 867–874. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1148
- Ciofu, O., Tolker-Nielsen, T., Jensen, P.Ø., Wang, H., Høiby, N. (2015). “Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients”, *Adv Drug Deliv Rev*, 85, 7-23.
- De Oliveira, D. M., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N., Schembri, M. A., Beatson, S. A., & Walker, M. J. (2020). Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical microbiology reviews*, 33(3).
- Dumaru, R., Baral, R., & Shrestha, L. B. (2019). Study of biofilm formation and antibiotic resistance pattern of gram-negative Bacilli among the clinical isolates at BPKIHS, Dharan. *BMC research notes*, 12(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4084-8>
- EUCAST, The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>
- Gülmez D. (2013). Bakterilerde saptanan yeni direnç mekanizmalarının yansımaları. *ANKEM Derg*; 27(3):158-166
- Karakonstantis, S., Kritsotakis, E. I., & Gikas, A. (2020). Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: a systematic review of current epidemiology, prognosis and treatment options. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(2), 271-282.
- Lasarte-Monterrubbio, C., Fraile-Ribot, P. A., Vázquez-Ucha, J. C., Cabot, G., Guijarro-Sánchez, P., Alonso-García, I., Rumbo-Feal, S., Galán-Sánchez, F., Beceiro, A., Arca-Suárez, J., Oliver, A., & Bou, G. (2022). Activity of cefiderocol, imipenem/relebactam, cefepime/taniborbactam and cefepime/zidebactam against ceftolozane/tazobactam- and ceftazidime/avibactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 77(10), 2809–2815. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac241>
- Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem EDTA double disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp., *J Clin Microbiol* 2003;41(10):4623-9. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.10.4623-4629.2003>
- Leone, S., Damiani, G., Pezone, I., Kelly, M. E., Cascella, M., Alfieri, A., Pace, M. C., & Fiore, M. (2019). New antimicrobial options for the management of complicated intra-abdominal infections. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 38(5), 819–827. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03533-y>
- Namaei, M. H., Yousefi, M., Askari, P., Roshanravan, B., Hashemi, A., & Rezaei, Y. (2021). High prevalence of multidrug-resistant non-fermentative Gram-negative bacilli harboring blaIMP-1 and blaVIM-1 metallo-beta-lactamase genes in Birjand, south-east Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 13(4), 470–479. <https://doi.org/10.18502/ijm.v13i4.6971>
- Nathan, C. (2020). Resisting antimicrobial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 18(5), 259-260.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for determining an bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved Guideline M26- A NCCLS, Wayne; 2002.

- Nordmann, P., Bouvier, M., & Poirel, L. (2023). Efficacy of ceftazidime-avibactam, meropenem-vaborbactam, and imipenem-relebactam combinations against carbapenemase-producing Enterobacterales in Switzerland. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 42(9), 1145–1152. <https://doi.org/10.1007/s10096-023-04647-0>
- Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52(1):1.
- Sabaeifard, P., Abdi-Ali, A., Soudi, M. R., & Dinarvand, R. (2014). Optimization of tetrazolium salt assay for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using microtiter plate method. *Journal of microbiological methods*, 105, 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.07.024>
- Smith, J. R., Rybak, J. M., & Claeys, K. C. (2020). Imipenem-Cilastatin-Relebactam: A Novel β -Lactam- β -Lactamase Inhibitor Combination for the Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Negative Infections. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 40(4), 343-356.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., ... 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. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Tanrıverdi Çaycı Y, Bıyık İ. Çınar C. Birinci A. (2020) Karbapenem dirençli Enterobacteriaceae izolatlarının 2015-2018 yılları arasındaki antibiyotik direnci. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg.*;50(3):134-40
- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of molecular biology*, 431(18), 3472-3500
- WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed.* (2017). World Health Organization. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Wise, M. G., Karlowsky, J. A., Chen, W. T., Siddiqui, F., Young, K., Motyl, M. R., & Sahm, D. F. (2023). Susceptibility of gram-negative isolates collected in Taiwan to imipenem/relebactam and comparator agents - SMART 2018-2021. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*, S0929-6646(23)00350-9. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2023.09.006>
- Yadav, S. K., Bhujel, R., Mishra, S. K., Sharma, S., & Sherchand, J. B. (2020). Emergence of multidrug-resistant non-fermentative gram negative bacterial infection in hospitalized patients in a tertiary care center of Nepal. *BMC research notes*, 13(1), 319. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05163-6>
- Yu, W., Luo, Q., Shen, P., Chen, Y., Xu, H., Xiao, Y., & Qiu, Y. (2021). New options for bloodstream infections caused by colistin- or ceftazidime/avibactam-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of antimicrobial agents*, 58(6), 106458. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106458>

EKLER: Proje faaliyetleri sırasında yapılmış makale, kongre bildirisi, teknik rapor, patent başvurusu gibi çıktılar belirtilmeli ve künyeleri ile hem akademik veri yönetim sistemine proje atıf edilerek işlenmeli hem de bu bölümde listelenmelidir. Yayınlanmış makalelere alınmış atıflar var ise bu bölümde bunlarda gösterilmelidir.

Makale: Oyardı, Ö., Hacıoğlu, M., Yılmaz, F. N., Inan, N., & Birteksöz Tan, A. S., (2023). Antibiotic susceptibility and biofilm formation of multi-drug resistant Gram-negative bacteria. *Istanbul Journal of Pharmacy* , vol.53, no.1, 45-50.

Kongre Bildirisi: Birteksöz Tan A. S., Hacıoğlu M.; Yılmaz F. N., Oyardı Ö., Inan N. (2023). Antibiotic resistance and metallo-beta-lactamase positivity in carbapenem-resistant Gram negative bacteria. "10th FEMS Congress of European Microbiologists", 9-13 Temmuz 2023, Hamburg Almanya