



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
GÖZTEPE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN KOLİSTİN DİRENÇLİ
KLEBSİELLA PNEUMONİAE SUŞLARI ÜZERİNDE GLİSİRHİZİK ASİT
VE KOLİSTİNİN SİNERJİSTİK ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Ferhat ZENGİN

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL
Ekim, 2019

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
GÖZTEPE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN KOLİSTİN DİRENÇLİ
KLEBSİELLA PNEUMONİAE SUŞLARI ÜZERİNDE GLİSİRHİZİK ASİT
VE KOLİSTİNİN SİNERJİSTİK ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Ferhat ZENGİN
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Zafer HABİP

İSTANBUL
Ekim, 2019

ONAY

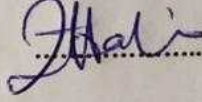
İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Fakültesi'nde Tıpta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Yönetmeliği hükümlerine göre uzmanlık eğitimi gören Dr. Ferhat ZENGİN'in hazırladığı ve jüri önünde savunduğu "KLİNİK ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN KOLİSTİN DİRENÇLİ KLEBSIELLA PNEUMONİA SUŞLARI ÜZERİNDE GLİSİRİZİK ASİT VE KOLİSTİNİN SİNERJİSTİK ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı tez başarılı kabul edilmiştir.

UNVAN, AD ve SOYAD
KURUMU

JURİ ÜYELERİ

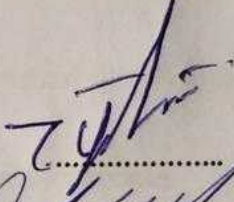
İMZA

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Zafer HABİP

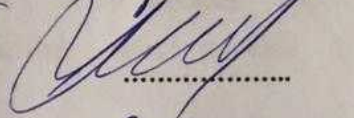


Üyeler:

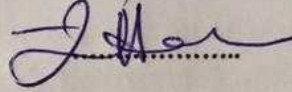
Prof. Dr. Tuncer ÖZKINICI



Prof. Dr. Fatma Köksal SAKANLAR



Dr. Öğr. Üyesi Zafer Habip



.....
.....
.....

Tez Savunma Tarihi: 18.10.2018

Yazar Bildirimi

"KLİNİK ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN KOLİSTİN DİRENÇLİ *KLEBSİELLA PNEUMONİAE* SUŞLARI ÜZERİNDE GLİSİRHİZİK ASİT VE KOLİSTİNİN SİNERJİSTİK ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI" isimli uzmanlık tezinde Dr. Ferhat ZENGİN

- Bu tezin kabulünden önce nerede ve ne kadarının yayınlandığını "Bilgilendirme" bölümünde belirtmiştir
- Tezin hazırlanmasında katkısı olanları "Bilgilendirme" bölümünde eksiksiz olarak belirtmiştir
- Bu tez ile ilgili çıkar çatışması olup olmadığını "Bilgilendirme" bölümünde belirtmiştir
- Tez içerisinde başkalarının yayınlanmış veya yayınlanmamış çalışmalarından yapılan alıntılar için gerekli kaynakları açıkça belirtmiştir
- Tez içerisinde başka kaynaklardan kopyalanmış olan kısımları tırnak içerisinde alarak ve izin alınan kaynağı belirterek kullanmıştır.

Ekim, 2019

İmza:



- Bu çalışmada adı geçen ilaç, tıbbi cihaz ve laboratuvar malzemelerinin üreticileri ile herhangi bir çıkar ilişkim yoktur.

Dr. Ferhat ZEĞİN



Teşekkür

Asistanlık eğitim ve tez sürecinde bilgi, deneyim ve tecrübelerinden faydalandığım mesleki anlamda bana her zaman yol gösterici olan kıymetli hocamız Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Mücahide Esra Koçoğlu'na

Tez sürecindeki yaşadığım zorlukların üstesinden gelmemi sağlayan, hoşgörüsü, enerjisi ve güleryüzüyle beni motive eden, tezimi hazırlama ve yazma döneminde bilimsel olarak bana yol gösteren değerli tez hocam Dr. Öğr. Üyesi Zafer Habip'e

Uzmalık eğitimi ve tez sürecimde engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, sorunlara sistematik bakış açısıyla bana destek olan kıymetli hocamız Prof. Dr. Tuncer Özekinci'ye

Asistanlık eğitimi boyunca bizlere yeni ufuklar açan, mesleki ve akademik anlamda gelişmemizi sağlayan değerli hocamız Prof. Dr. Mustafa Samastı'ya

Tez çalışmam sırasında bulduğumuz verilerin anlam kazanmasını sağlayan Biyoistatistik Anabilim Dalı Başkanı hocamız Prof. Dr. Handan Ankaralı'ya

Tez çalışmamda suşların toplanmasında ve süreç boyunca büyük yardımları olan asistan arkadaşlarım Rabia Güney Kavuşak, Melike Orkide Taşçılar ve Emre Yalçınkaya'ya

Uzmanlık eğitimim sürecinde desteklerini hep yanımda hissettiğim Mikrobiyoloji ve Biyokimya bölümü asistan arkadaşlarıma

Eğitim sürecinde bugünlere gelmemde büyük emekleri olan anne, baba ve kardeşlerime

Hem asistanlık hemde tez döneminde en zorlandığım anlarda hep yanımda ve destek olan canım eşim Miray'a

Bu zorlu süreçte beni hergün karşılayıp yüzümü güldüren biricik kızım Öykü'ye

Teşekkürlerimi, saygılarımı ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Ferhat ZENGİN

drferhatzengin@hotmail.com

Özet

KLİNİK ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN KOLİSTİN DİRENÇLİ KLEBSIELLA PNEUMONIAE SUŞLARI ÜZERİNDE GLİSİRHZİK ASİT VE KOLİSTİNİN SİNERJİSTİK ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

AMAÇ. Kolistin dirençli *Klebsiella pneumoniae* enfeksiyonu tedavisine yönelik çalışmalara katkıda bulunmak amacıyla, kolistin dirençli ve duyarlı *Klebsiella pneumoniae*'lar üzerinde kolistin ile birlikte glisirhizik asitin kombine etkinliğini incelemektir.

YÖNTEM. Çalışmamıza İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 30.06.2017-04.07.2019 tarihleri arasında gelen klinik örneklerinden izole edilmiş, 30 adet kolistin duyarlı ve 30 adet kolistin dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatu dahil edildi. Toplanan suşlarda sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak kolistin ve glisirhizik asit için MİK değerleri belirlendi. Daha sonra 60 izolat üzerinde kolistin-glisirhizik asit kombine etkinliği dama tahtası yöntemi kullanılarak araştırıldı. Elde edilen fraksiyonel inhibitör konsantrasyon değerlerine göre fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi hesaplamaları yapılarak kombine etkinlik değerlendirildi.

BULGULAR. Çalışılan 60 adet suş fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi değerlerine göre incelendiğinde 13'ünde (%21,7) indiferans, 13'ünde additif (%21,7), 9'unda (%15) sinerjistik, 21'inde (%35) antagonizma saptandı, 4'ünde (%6,7) ise fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi değeri saptanamadı.

Kolistin dirençli grup incelendiğinde n=19 (%63,3) antagonizma, n=6 (%20) indiferans, n=3 (%10) additif etki saptanırken, 2 adet izolatta fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi değeri saptanamamıştır. Kolistin duyarlı suşlar incelendiğinde ise n=10 (%33) additif, n=9 (%30) sinerjizm, n=7 (%23) indiferans, n=2 (%6,7) antagonizma saptanmış ve 2 adet izolatta fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi değeri hesaplanamamıştır. Kolistin duyarlı ve

dirençli grup kendi içinde değerlendirildiğinde; kolistin duyarlı grupta additif ve sinerjistik etkinlik, kolistin dirençli grupta ise antagonistik etkinlik diğer gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (p=0,001).

Her bir suş için sadece bir kuyucuk fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi değeri hesaplaması üzerinden (fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi hesaplanamayanlar dışarıda tutularak) duyarlı ve dirençli suşların fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi ortalamaları alındığında dirençli grup 4,04, duyarlı grup ise 1,05 olarak bulunup iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır(p=0,001).

Her bir suş için fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi değeri hesaplaması yapılmış tüm kuyucuklar değerlendirilerek (fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi değeri hesaplanamayanlar dışarıda tutularak) duyarlı ve dirençli grup ortalamaları alındığında; Dirençli grupta 301 adet kuyucuk ortalaması 2,01 olurken, duyarlı grupta 171 kuyucukta 1,14 olarak hesaplanmıştır. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,001).

SONUÇ. Bizim çalışmamızda kolistin dirençli ve duyarlı *K.pneumonia* suşları üzerinde kolistin-glisirhizik asit kombine etkinliği değerlendirilmiştir. Kolistin dirençli suşlarda antagonizma, kolistin duyarlı suşlarda ise additif ve sinerjistik etkinlik ön planda saptanmıştır. Buradan yola çıkarak kolistin dirençli enfeksiyonlarda, gıda sektöründe tatlandırıcı olarak kullanımı yaygın olan glisirhizik asitin kullanımının kolistinin etkinliğinde antagonistik etkinlik gösterebileceğini söyleyebiliriz. Buna karşın kolistin duyarlı suşlarda sinerjizm ve additif etkinlik ön planda olduğundan glisirhizik asit bileşiği içeren maddelerin tüketimi kolistinin etkinliğini arttırabilir.

Son yıllarda kolistin direnç sorununa yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Çoklu antibakteriyel ajanlarla yapılan kombinasyon çalışmalarında, birbiri ile çelişkili sonuçlar görülebilmektedir. Bazı çalışmalarda etkili görülen antibiyotik kombinasyonu, diğer çalışmalarda etkisiz olarak bulunabilmektedir. Bu farklılığın, kullanılan test metodu ve antibakteriyel maddelerin standart bir prosedür içerisinde uygulanmamasından

kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. İleriki çalışmaların daha sağlıklı ve tutarlı sonuç verebilmesi için, direnç mekanizmaları moleküler olarak ispatlanmış suşlarla, aynı özelliklere sahip etken maddeler kullanılarak invivo ve invitro çalışmaların yapılması gerekli olduğu kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Kolistin, *Klebsiella pneumoniae*, Glisirhizik asit



Abstract

INVESTIGATION OF THE SYNERGIC EFFECTIVENESS OF GLYCYRRHIZIC ACID AND COLISTIN ON COLISTIN-RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS ISOLATED FROM CLINICAL SAMPLES

OBJECTIVE. The aim of this study is to investigate the combined efficacy of colistin and glycyrrhizic acid on colistin-resistant and susceptible *Klebsiella pneumoniae* in order to contribute to the studies on the treatment of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection.

METHODS. 30 colistin susceptible and 30 colistin resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples received between 30.06.2017-04.07.2019 to the Medical Microbiology Laboratory of Göztepe Training and Research Hospital of Istanbul Medeniyet University were included in the study. MICs for colistin and glycyrrhizic acid were determined using liquid microdilution method in the strains collected. Combined efficiency of colistin-glycyrrhizic acid on these 60 isolates was investigated using the checkerboard method according to the pre-determined MIC values. Combined efficacy was evaluated by calculating fractional inhibitor concentration index according to obtained fractional inhibitor concentration values.

RESULTS. When 60 strains were examined according to their fractional inhibitory concentration index values, 13 (21.7%) indifferent, 13 additive (21.7%), 9 (15%) synergistic, 21 (35%) antagonistic effect were found and no fractional inhibitor concentration index value was found in 4 (6.7%) patients.

When the colistin resistant group was examined, n = 19 (63.3%) antagonism, n = 6 (20%) indifference, n = 3 (10%) additive effect were detected, but no fractional inhibitor concentration index value was detected in 2 isolates. When colistin susceptible strains were examined, n = 10 (33%) additive effect, n = 9 (30%) synergism, n = 7 (23%) indifference, n = 2 (6.7%) antagonism were detected and fractional inhibitor concentration index value in 2 isolates could not be calculated. When the sensitive and resistant group of colistin is

evaluated within itself; additive and synergistic efficacy in colistin susceptible group and antagonistic efficacy in colistin resistant group were statistically higher than the other group significantly ($p = 0.001$).

When inhibitor concentration index value was calculated for each strain considering only one well (excluding those whose fractional inhibitor concentration index could not be calculated), the fractional inhibitor concentration index of the resistant and susceptible strains were found to be 4.04 and 1.05 respectively and the difference between the two groups was statistically significant ($p = 0.001$).

When means for each strain was calculated considering all of the wells which had a fractional inhibitor concentration index value (excluding those whose fractional inhibitor concentration index value could not be calculated), sensitive and resistant group means were found; the mean of 301 wells of the resistant group and the mean of the susceptible group were 2.01 and 1.14 respectively where the difference between the two groups was statistically significant ($p = 0.001$).

CONCLUSION. In our study, the combined efficacy of colistin- glycyrrhizic acid on colistin-resistant and susceptible *K.pneumonia* strains were evaluated. In colistin-resistant strains, antagonism, and in colistin-sensitive strains, additive and synergistic efficacy were prominent. Regarding this we can say that use of glycyrrhizic acid, which is widely used as a sweetener in the food sector, may show antagonistic activity in colistin resistant infections. However, since the synergism and additive efficiency on colistin susceptible strains are prominent, consumption of substances containing glycyrrhizic acid compound may increase the efficacy of colistin.

In recent years, studies have been conducted about the colistin resistance problem. Contradictory results can be seen in studies with multiple antibacterial agents combinations. Antibiotic combinations which are found to be effective in some studies may be found ineffective in other studies. We think that this difference may be due to the fact that the test methods and antibacterial agents used in the studies are not applied in a standard procedure. We believe that in order to obtain more robust and consistent

results, it is necessary to perform in vivo and in vitro studies including same active ingredients using strains with resistance mechanisms proven molecularly.

Keywords: Colistin, *Klebsiella pneumoniae*, Glycyrrhizic acid



İçindekiler

Şekil Listesi	xiii
Tablo Listesi	xiv
Kısaltmalar	xv
1 GİRİŞ ve AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	2
2.1 <i>KLEBSİELLA</i>	2
2.1.1 Taksonomi	2
2.1.2 Tarihçe	2
2.1.3 Biyokimyasal özellikleri	3
2.1.4 Virülans özellikleri	4
2.1.4.1 Kapsül	4
2.1.4.2 Pili	4
2.1.4.3 Lipopolisakkarit	5
2.1.4.4 Siderefor	5
2.1.5 Epidemiyolojisi	5
2.1.6 Klinik	6
2.1.7 Antibiyotik direnç mekanizmaları	7
2.2 KOLİSTİN	9
2.2.1 Tarihçe	9
2.2.2 Yapısı	10
2.2.3 Etki mekanizması	12
2.2.4 Etki spektrum	12
2.2.5 Yan etkileri	13
2.2.6 Direnç mekanizmaları	13
2.3 <i>GLYCYRRHİZA GLABRA</i> (Meyan kökü)	15
2.3.1 Tarihçe	15
2.3.2 Yapısı	16
2.3.3 Etki mekanizması	17
2.3.4 Yan etkileri	18
2.3.5 İçinde bulunduğu maddeler	18
3 YÖNTEM	19
3.1 Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth Hazırlanması	19
3.2 Sıvı Mikrodilüsyon (Broth Mikrodilüsyon Yöntemi)	20
3.3 Dama tahtası yöntemi (Checker Board)	21
3.3.1 Mikroplate hazırlığı	21
3.3.2 Suşların inokülasyonları	24
3.3.3 Sonuçların incelenmesi	24
3.4 İSTATİSTİK YÖNTEMLER	25

4 BULGULAR	26
5 TARTIŞMA ve SONUÇ	39
5.1 TARTIŞMA	39
5.2 TEZİN KISITLILIKLARI	49
5.3 SONUÇ	50
Kaynaklar	51
Etik Kurul Onay Formu	67



Şekil Listesi

2.1	<i>Klebisella pneumoniae</i> antibiyotik keşif ve direnç gelişimi	8
2.2	Polimiksin B ve kolistin kimyasal yapısı	11
2.3	Direnç oluşumuna neden olan Lipid A modifikasyonu	14
2.4	Glisirhizik asit kimyasal yapısı	17
4.1	Kolistin duyarlı suşların izole edildiği bölümler	27
4.2	Kolistin dirençli suşların izole edildiği bölümler	27
4.3	Servislere göre dağılım	28
4.4	İzolatların örnek türlerine göre dağılımı	29
4.5	R-16 mikroplate resmi	30
4.6	R-16 mikroplate üreme durumu	30
4.7	R-16 doz yanıt grafiği	31
4.8	R-13 mikroplate fotoğrafı	32
4.9	R-13 mikroplate üreme durumu	32
4.10	R-13 doz yanıt grafiği	33
4.11	S-5 Mikroplate üreme durumu	34
4.12	S-5 Mikroplate resmi	34
4.13	S-5 doz yanıt grafiği	35

Tablo Listesi

2.1	<i>K.pneumoniae</i> 'nin biyokimyasal özellikleri	4
3.1	Dama tahtası duyarlı suş paneli	22
3.2	Dama tahtası dirençli suş paneli	23
4.1	Örnek suş R-16 Fiki hesaplama düzeneği	29
4.2	Örnek suş R-13 FİK indeksi hesaplama düzeneği	31
4.3	Örnek suş S-5 FİK indeksi hesaplama düzeneği	33
4.4	Duyarlı ve Dirençli grup GA ve Kolistin kombine etkinlik karşılaştırılması	35
4.5	Her bir suş için anlamlı FİKİ değeri için duyarlı ve dirençli grup ortalamaları	36
4.6	Tüm FİKİ hesaplamalarının duyarlı ve dirençli grup ortalamaları	36
4.7	Dirençli grup anlamlı FİKİ hesaplamaları ve sonuçları	37
4.8	Duyarlı grup anlamlı FİKİ hesaplamaları ve sonuçları	38

WHO	Dünya Sağlık Örgütü
MCR	Mobilized colistin resistance
GA	Glisirhizik asit
EMB	Eozin Metilen Blue
XLD	Ksiloz Lisin Deoksikolat agar
SS	Salmonella Shigella
LPS	Lipopolisakkarid
TLR-4	Toll benzeri reseptör-4
CDC	Centers for Disease Control
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
GSBL	Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz
Dab	α, γ diaminobütirik asit
CMS	Kolistimetat Sodyum
MDR	Çoklu ilaç dirençli
L-Ara4N	4-amino-4-deoksi-L-arabinoz
CPS	Bakteriyel kapsül polisakariti
TCM	Geleneksel Çin Tıbbı
HIV	İnsan immün yetmezlik virüsü
MHB	Mueller Hinton Broth
KAMHB	Katyon ayarlı mueller hinton broth
KKA	Koyun Kanlı Agar
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
Eucast	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FİK	Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon
FİKİ	Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi
BOS	Beyin omurilik sıvısı
AMP	Antimikrobiyal peptid

Kısaltmalar

CSA-13	Katyonik Steroid Antibiyotik
CCCP	Karbonil siyanid m-klorofenil hidrazon
COX-2	Siklooksijenaz-2
PG-1	Protegrinler
MBC	Minimumum Bakterisidal Konsantrasyon
ETEC	Entero toksijenik <i>E.coli</i>
LT	Isıya duyarlı enterotoksin
GM-1	Gangliozit



GİRİŞ ve AMAÇ

Klebsiella pneumoniae son yıllarda nazokomiyal enfeksiyonlar arasında ön planda bulunmaktadır. WHO'nun (Dünya sağlık örgütü) 2017 yılında yayınladığı yeni antibiyotik geliştirilmesine rehberlik ve teşvik etmek amaçlı bildiride karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* kritik grupta yer almaktadır (1). Günümüzde karbapenem dirençli bu kökenlere karşı 1960'larda nefrotoksisite yan etkisi nedeniyle kullanılmasına ara verilmiş kolistin ve kombinasyonları kullanılmaktadır. 2015 yılında Çin'de plazmid aracılı MCR-1 (Mobilized Colistin Resistance) geninin bildirilmesi kolistinin direncinin yatay olarak da aktarılabilirdiğini göstermiş ve daha sonrada dünyanın çeşitli yerlerinden bildirilmiştir (2, 3). Kolistin direncinin küresel olarak artması kolistin monoterapi ve kombine tedavilerinin başarı şansını düşürmektedir.

Meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra*) ayurveda tıbbında yüzyıllardır tedavi amacıyla kullanılan bir bitkidir. *Glycyrrhiza glabra* 'nın anti-enflamatuvar, anti-ülser, anti-alerjik, antioksidan, anti-tümör, anti-diyabetik ve hepatoprotektif etkinliğinin olduğu çalışmalar bildirilmiştir (4). Glisirhizik asit (GA) meyan kökünün saponin fragmanlarından tatlandırıcı özelliği olan bir bileşiktir.

Bizim bu çalışmadaki hedefimiz, kolistin dirençli *Klebsiella pneumoniae* enfeksiyonu tedavisine yönelik çalışmalara katkıda bulunmak, kolistin dirençli ve duyarlı *Klebsiella pneumoniae*'lar üzerinde kolistin ile birlikte glisirhizik asitin kombine etkinliğini incelemektir.

GENEL BİLGİLER

2.1. KLEBSİELLA

2.1.1 Taksonomi

Klebsiella pneumoniae prokaryot canlılar içerisinde, bakteriler aleminde, proteobacter şubesinde, gamma proteobacteria sınıfında, enterobacteriales takımında, *Enterobacteriaceae* ailesinde, *Klebsielleae* kabilesinde sınıflandırılır. *Klebsielleae* kabilesinde *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia* ve *Serratia* olmak üzere 4 majör cins bulunmaktadır (5). *Klebsiella* cinsi ise tür düzeyinde 3 ana kümeye bölünür (6).

1. küme: *K.pneumoniae*, *K.rinoskromatis*, *K.ozaena* ve *K. granulomatis*
2. küme: *K. ornithinolytica*, *K. planticola*, *K. trevisanii* ve *K. terrigena*
3. küme: *K. oksitoca*

2.1.2 Tarihçe

Enterobacteriaceae ailesindeki *Klebsiella* cinsi , Alman mikrobiyolog olan Edwin Klebsi onurlandırmak adına Trevisan tarafından adlandırıldı (7). Kapsüllü basil olarak tarif edilen ilk *Klebsiella* türü rinoskloremalı bir hastadan tanımlanmıştır (8). Bu organizma Trevisan tarafından " *Klebsiella rhinoscleromatis*" olarak adlandırılmıştır (9).

Abel, ozenası olan hastaların burun salgılarında " *Bacillus mucosus azaenae*" isimli kapsüllü basil gözlemledi (10). Bakteri daha sonra *Klebsiella* cinsine *K.ozaenea* olarak transfer edildi (11).

Friedländer 1982 yılında pnömoniden ölen bir hastanın akciğerlerinde bir bakteri tarif etmiştir (12). Organizma daha sonra 1889 yılında Schroeter

tarafından "*Hyalococcus pneumoniae*" ve 1887 yılında Trevisan tarafından "*Klebsiella pneumoniae*" olarak adlandırılmıştır (9).

Klebsiella 0,3-1 um çapında, 0,6-6 um uzunluğunda Gram negatif boyanma özelliği gösteren kapsüllü basillerdir (13). Kapsüllü olması nedeniyle mikroskopik inceleme ile kalın basiller olarak görülürken, katı besiyerlerinde ürerken büyük, mukoid koloni formasyonları oluşturur(5). Kanlı agarda üreme gösterirken hemoliz oluşturmaz(14).

Fakültatif anaerop üreme özelliği gösterirler(15). Optimal üreme sıcaklığı 35-37°C , pH değeri ise 7,2 dir. *Klebsiella* türleri diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinin de üreyebildiği nutrient agar, triptik soy agar, bromkrezol moru laktoz agar, kanlı agar gibi genel üretici besiyerlerinde ve MacConkey agar ve Eozin Metilen Blue (EMB) agar gibi seçici besiyerlerinde kolayca üreyebilir (13). Mac conkey agarda pembe mukoid, EMB agarda morumsu, Hektoen enterik agarda sarı turuncu, Ksiloz Lisin Deoksikolat (XLD) agarda sarı, Salmonella Shigella (SS) agarda pembe koloniler oluştururlar (5, 16).

Klebsiella türlerinin hücre duvarlarında lipopolisakkarit yapıda bileşikler bulunur. Lipopolisakkarit molekülü 3 temel komponentten oluşur; lipid A, çekirdek bir polisakkarid, O-antijeni. 9 farklı O antijeni tipi tanımlanmıştır ve en çok O-1 antijeni en sık görülen tipidir (17).

Çoğu *Klebsiella* türü hidrofilik yapıda polisakkarid kapsül bulundurur. Kapsül yapısı katı besiyerinde mukoid koloni oluşmasına sebep olmakla birlikte, bakterinin serolojik olarak sınıflandırılmasında O antijeniyle birlikte kullanılmaktadır. Bugüne kadar 77 farklı ekzopolisakkarit kapsül antijeni tanımlanmıştır (18).

2.1.3 Biyokimyasal özellikleri

Klebsiellalar katalaz enzimine sahip olup, H_2O_2 'yi su ve oksijene ayrıştırırlar. Oksidaz testi negatif, , metil red testi negatifken Voges-Proskauer testi pozitifdir. *K.oxytoca* dışında triptofandan indol oluşturmaz, çoğu türü sitratlı besiyerinde ve potasyum siyanürlü buyyonda ürer. Lizini dekarboksile ederken arjinin ve ornitini dekarboksile etmez. Laktoz, sükroz, sorbitol,

adonitol, arabinoz gibi karbonhidratları fermente eder. Hidrojen sülfid oluşturmaz, fenilalanini deamine etmez, üreyi hidrolize eder (5, 16). Aşağıdaki tabloda *K.pneumoniae*'nin biyokimyasal özellikleri özetlenmiştir (19).

Tablo 2.1: *K.pneumoniae*'nin biyokimyasal özellikleri

Biyokimyasal özellik	<i>K.pneumoniae</i>
Katalaz	+
Oksidaz	-
Metil- Red	-
Voges-Proskauer	+
İndol	-
Sitrat	+
Ornitin	-
Lizin	+
Üre	+
ONPG	+
Malonat	+

2.1.4 Virülans özellikleri

2.1.4.1 Kapsül

Klebsiellaların en çok araştırılan virülans faktörlerinden olan kapsül polisakkarid yapıdadır. Kapsül yapısı hem antimikrobiyal peptidlerin bakteriye ulaşmasını engeller hem de nötrofil ve makrofajların fagositik aktivitesini önler (20).

2.1.4.2 Pili

Enfeksiyon oluşumu sürecinde ilk adım bakterinin konak hücrenin epitel yüzeyine tutunmasıdır. Bu tutunma sürecinde pililer önemli fonksiyon görürler. Pililer bakteri yüzeyinden dışa doğru uzanan, proteinöz yapıda, tüy benzeri, uzun, esnek yapılardır. *K.pneumoniae* en sık görülen pili tipler Tip 1 ve Tip 3' tür. Tip 1 pili daha çok idrar yolları enfeksiyon süreçlerinde, Tip 3 pili ise biyofilm oluşumu ve solunum yollarındaki enfeksiyon süreçlerinde adezyon faktörü olarak rol oynar (21).

2.1.4.3 Lipopolisakkarit

K.pneumoniae nın bir diğer virölans faktörü de dış membran üzerinde bulunan lipopolisakkarid (LPS) yapısıdır. 3 komponentten oluşur O-antijen, çekirdek oligosakarit ve lipit A. O-antijenin en önemli rolü kompleman kaynaklı öldürmeden korunmaktır. Bu koruma için, O-antijen zincir uzunluğu önemli gibi görünmektedir. C3b hücrelerin yüzeyinde kolayca birikir, ancak hücreyi lizise uğratması beklenen membran atak kompleksi, uzun O zincirinin sterik bir etkisinden dolayı bakteriden uzakta oluştuğu için bakteriyi öldüremez (22).

Lipopolisakkarid yapısı ayrıca endotoksik aktiviteden sorumludur. Gram negatif bakterilerde bulunan bu yapı bakteri hücresinin parçalanmasıyla oluşur ve Toll benzeri reseptör-4 (TLR-4) üzerinden proinflatuar sitokinlerin üretimine neden olur (17)

2.1.4.4 Siderefor

Demir bakteri üremesi için temel bir elementtir (23). Temel olarak elektron transport sistemindeki proteinlerde redoks katalizörü olarak işlev görür. Serbest, biyoyararlanılabilen demir seviyesi normal bakteri üremesi için gereken miktardan binlerce kat azdır. *Klebsiella pneumoniae* bu az miktardaki serbest demiri bağlayabilmek için 4 farklı siderefor üretir, enterobaktin, yersiniabaktin, salmokekin ve aerobaktin. Enterobaktin demir bağlayıcılar içinde en yüksek afiniteye sahip olan siderefordur ve özellikle hipervirölün suşlarda bulunur (24).

2.1.5 Epidemiyolojisi

K. pneumoniae doğada yaygın olarak yüzey sularında, kanalizasyonda, bitkilerde, insan ve hayvanların mukozal yüzeylerinde bulunur. Sağlıklı bireylerde gastrointestinal taşıyıcılık oranı % 5-38 arasında değişmektedir. Nazofarenksin kolonizasyonu genel popölasyonda hastanede yatan hastalara göre daha az görülür (% 1-6) ve cilt florasının sadece geçici bir üyesi olarak kabul edilir. Hastanede yatan hastalar arasında gastrointestinal ve nazofarengeal kolonizasyon oranı hastanede kalış süresi ve antibiyotik kullanımı ile orantılı olarak yükselmektedir (25).

Hastane ortamındaki olası bulaşma yolları kirli tıbbi cihazlar, hastane personelinin elleri ve hastalardır. Büyük bir risk faktörü olan kolonizasyonun yanı sıra (kolonize olan hastalar enfeksiyon gelişimi için kolonize olmayanlara oranla dört kat fazla risk taşırlar), başka birçok predispozan faktör tanımlanmıştır:

1. Bozulmuş konak savunma mekanizması (diabetes mellitus, alkolizm, malignite, hepatobilyer hastalık, glukokortikoid tedavisi ve böbrek yetmezliği)
2. Antibiyotik kullanım sıklığı
3. Kalıcı tıbbi cihazların varlığı (idrar kateteri, intravasküler kateter ve endotrakeal tüp) (25, 26).

Centers for Disease Control (CDC) ve European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) ile yapılan nokta yayınlığı anketlerine göre pnömoni vakalarının %11,4-11,8'inden, cerrahi alan enfeksiyonlarının %6-13,6'sından, idrar yolu enfeksiyonlarının %12-23,1'inden, dolaşım yolu enfeksiyonlarının %8-9,8'inden *K.pneumoniae* sorumludur. *K.pneumoniae* sağlık hizmetleriyle ilişkili enfeksiyonlar arasında CDC 'ye göre üçüncü ve ECDC'ye göre beşinci sırada yer almıştır (27, 28).

Nazokomiyal enfeksiyonlarda önemli bir etken olması nedeniyle *K. pneumoniae* kolonizasyonunu ve enfeksiyonunu engellemeye yönelik; iyi el hijyeni, gereksiz invaziv prosedürlerden kaçınma, akılcı antibiyotik uygulaması, kalıcı tıbbi cihazların uygun bakımı gibi standart önlemlerin etkin bir şekilde alınması büyük önem taşımaktadır.

2.1.6 Klinik

K.pneumoniae toplum kökenli idrar yolu enfeksiyonları, pnömoni ve primer karaciğer apsesi gibi klinik tablolara neden olabilir. Nazokomiyal olarak ise toplum kökenli enfeksiyonlara ek olarak ventilatör ilişkili pnömoni, cerrahi alan enfeksiyonları, peritonit, menenjit, beyin apsesi ve sepsis gibi klinik durumlara neden olabilir (27, 28).

K.pneumoniae'nin oluşturduğu pnömoni 'Friedlander Hastalığı ' olarak da bilinir. Alkoliklerde enfeksiyon gelişim riski artmıştır. Genellikle akciğer üst loblar tutulur. Hastalarda 'frenk üzümü jeli' şeklinde balgam çıkarma önemli bir klinik bulgudur. Enfeksiyon, abseler oluşturarak seyretme eğilimindedir. Radyografide fissür işareti tanıda yardımcıdır (29).

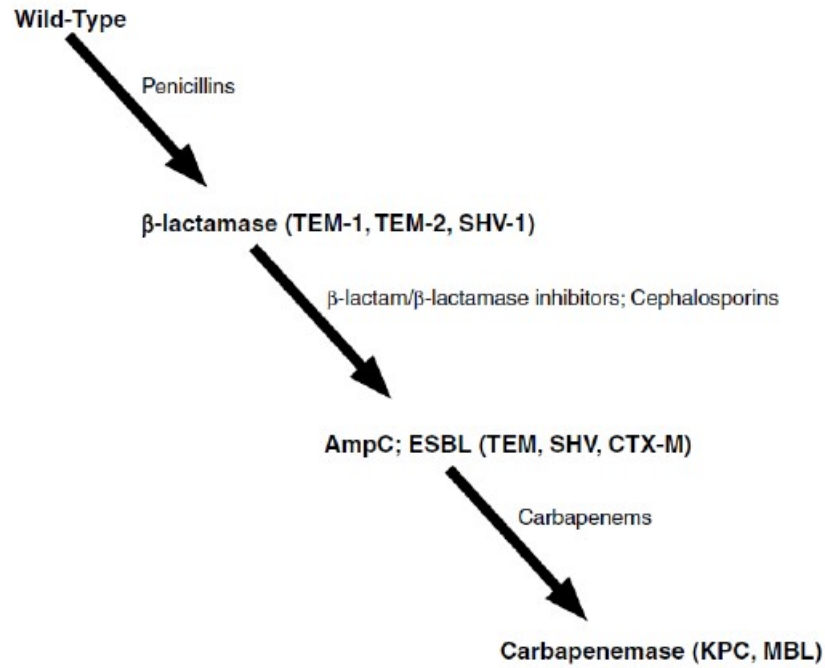
2.1.7 Antibiyotik direnç mekanizmaları

Bakterilerdeki antimikrobiallere direnç 2 farklı şekilde görülür:

1. Doğal direnç; bakteride yapısal olarak bulunan dirençtir. Antibakteriyelin bağlayabileceği hedef molekülün bakteride bulunmaması veya bakterinin ilacın hedef bölgeye ulaşımını engelleyecek mekanizmalara sahip olmasından kaynaklanabilir. *K. pneumoniae*, kromozomal olarak kodlanmış SHV beta-laktamazların sayesinde ampisiline karşı doğal olarak dirençlidir (30). Ancak yatay gen transferi ve mutasyon yoluyla birçok ek antimikrobiyal için direnç kazanma kapasitesine sahiptir (31).
2. Kazanılmış direnç; bakterinin kendisine karşı etkin olan antimikrobiyal ajanlara zamanla direnç geliştirmesi durumudur. Direncin kazanılması, spontan kromozomal mutasyonlar veya direnç genleri taşıyan plazmid, transpozon gibi ekstrakromozmal genetik materyalin kazanımı ile gerçekleşir. Genetik değişim sonucunda hayatta kalan dirençli kökenler gen aktarımına devam etmekte ve direncin yayılmasına neden olmaktadır. Direnç mekanizmaları dört şekilde oluşabilir.
 - a) Antimikrobialleri hedefinde değişiklik olması (PBP'lerin değişimi, ribozomal hedefin değişimi)
 - b) Antimikrobiyal ajanın enzimatik olarak bozulması (B-laktamaz)
 - c) Antimikrobiyalin bakteri hücresi içindeki miktarının azaltılması (porin kanal mutasyonları, aktif pompalama ile ilacın dışarı atılması)
 - d) Antimikrobiallerin hedefinin dışında yeni bir metabolik yolun kullanılması (*Enterokoklardaki* SXT direnci) (32, 33).

Penisilin ilk kez 1942 yılında, Streptokokal kan dolaşımı enfeksiyonunun tedavisi amacıyla Anne Miller adlı bir hastada kullanılmıştır. Fakat penisilinler

hastalar üzerinde kullanılmadan iki yıl önce Edward Abraham ve Ernst Chain, bakterilerin penisilinlere karşı geliştirmiş oldukları bir direnç mekanizması tanımlamışlardır (34). Antibakteriyel kullanımı arttıkça, bakterilerin antimikrobialerinin etkisini engellemek üzere sentezledikleri enzimler daha da çeşitlenmiştir. Bakteriler tarafından üretilen direnç enzimleri, fonksiyonel özelliklerine ve enzimlerin moleküler yapısına göre çeşitli sınıflandırmalara tabi tutulmuştur (35). Bu sınıflamalardan en önde gelen ikisi Ambler ve Bush sınıflamalarıdır (36).



Şekil 2.1: *Klebsiella pneumoniae* antibiyotik keşif ve direnç gelişimi (32)

Penisilin türevi antibiyotikleri hidrolize eden bakteri kaynaklı TEM, SHV gibi β -laktamaz enzimlerinin tedavi başarısızlıklarına neden olması üzerine, β -laktam/ β -laktamaz inhibitörü kombinasyonları ampisilin-sulbaktam ve sefalosporinler geliştirilerek dirençli bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmıştır. Bu yeni geliştirilen antibiyotikler TEM, SHV gibi β -laktamazların mevcudiyetinde işlev görmüş olsalar da daha sonra bakteriler tarafından geliştirilen genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) ile hidrolize olmuşlardır böylelikle direnç problemi tekrar ortaya çıkmıştır. GSBL'ler yüzlerce farklı alt tipi bulunan TEM ve SHV ailelerinin nokta mutasyonları ile oluşmaktadır (37). Dünyadaki farklı coğrafi bölgelerinden kromozoma lokalize olmuş çok sayıda B laktamaz ailesi CTX-M (37), OXA

(38), PER (39, 40), VEB (41), GES (42, 43), BES (44), TLA (45), SFO(46), IBC (47, 48) keşfedilmiştir (49).

1996 yılında Amerika Birleşik Devletleri'ne bağlı Kuzey Carolina'da yatan bir hastadan, karbapenemleri de hidrolize eden bir *Klebsiella pneumoniae* suşu izole edilmiştir (50). Karbapenem grubu antibiyotiklere karşı dirençten sorumlu tutulan enzimin blaKPC geni tarafından kodlandığı saptanmış ve aktarımında transpozonların önemli rol oynadığı gösterilmiştir (51). Bunun haricinde *Klebsiella pneumoniae* suşlarında karbapenemlere dirençte rol alan OXA-48, NDM, VIM ve IMP tipleride bulunabilir (52).

CDC tarafından yayınlanan rapora göre, ABD'deki *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarının % 19'unun GSBL üreten organizmalardan kaynaklandığı tahmin edilmektedir. 2013 yılındaki verilere göre en yaygın *Enterobacteriaceae* türlerinden *Klebsiella pneumoniae*'de GSBL üretim oranı % 23 ve *Escherichia coli*'de enfeksiyonlarının % 14 civarındadır (53).

Çoklu ilaç direncine sahip *K.pneumoniae* enfeksiyonlarında tedavide son seçenek olarak tigesiklinler ve polimiksinler kullanılır (54–56). Ancak tigesiklin ve polimiksinlere direnç *K. pneumoniae*'de da görülmüştür. Tigesiklin direnci, özellikle efflux pompalarını kodlayan genlerin overekspresyonu ile ortaya çıkmaktayken polimiksin B ve kolistin dirençleri kromozomal genler olan mgrB ve pmrB mutasyonları ile gerçekleşir (57–59).

K.pneumoniae enfeksiyonlarının etkili ve uygun tedavisi, bakterinin geliştirmiş olduğu direnç mekanizmaları nedeniyle oldukça güçleşmektedir. Etkin virülans faktörlerinin varlığı, enfeksiyonlarının yaygınlığı, antibakteriyel ajanlara olan yüksek direnci ile *K.pneumoniae* halk sağlığına yönelik en önemli bakteriyel tehditler arasında sayılmaktadır (53).

2.2. KOLİSTİN

2.2.1 Tarihçe

Doğadan birçok farklı polimiksin izole edilmesine rağmen, klinik kullanım alanı bulabilen iki polimiksin: polimiksin B ve kolistin (polimiksin E)'dir. 1947'de keşfedilen polimiksin B, bir toprak bakterisi olan *Paenibacillus polymyxa* tarafından üretilen bir antimikrobiyal peptittir (60). Öte yandan,

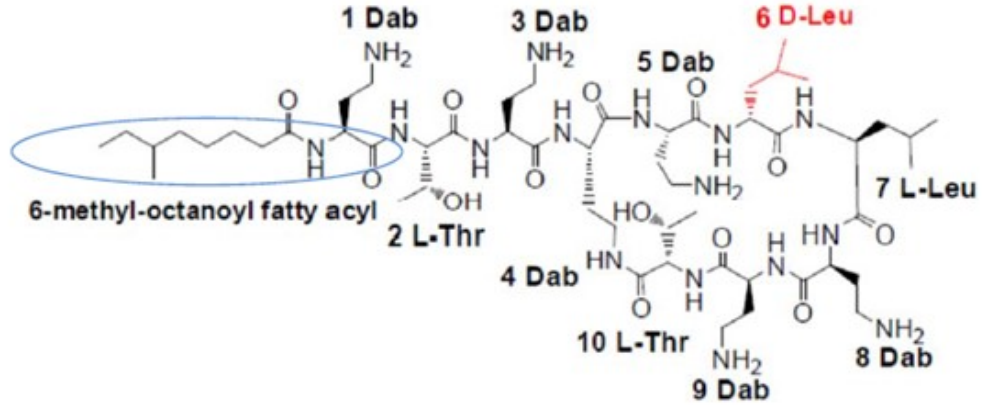
kolistin, farklı bir *Paenibacillus polymyxa colistinus* alt türü tarafından üretilir. Kolistinin başlangıçta polimiksinlerden farklı bir lipopeptid olduğu düşünülmekteydi, ancak daha sonra yapılan çalışmalarla polimiksin E ile aynı olduğu kanıtlandı (61).

Polimiksinler ilk olarak 1950'lerin sonunda Gram negatif bakteri enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanıldı. Polimiksinlerin nefrotoksisite ve nörotoksisite yan etkileri nedeniyle 1960'larda kullanımlarında bir düşüş gözlemlendi. Ek olarak, alternatif antibiyotiklerin, özellikle de aminoglikozitlerin mevcudiyeti, o zaman "daha güvenli" ve "daha etkili" olarak kabul edildi (62). MDR hastane kaynaklı enfeksiyonların yayılması ile kolistinin klinik kullanımı tekrar ön plana çıkmıştır. Antimikrobiyal ilaç geliştirme çabalarındaki azalma da, kolistinin tedavide son seçenek olarak kullanımının devam etmesine neden olmaktadır (63).

2.2.2 Yapısı

Polimiksinler, çok bileşenli katyonik lipopeptitlerdir. Siklik heptapeptid yapılı iskeletin N-terminal ucundan bir yağ asidi ile asile edilmiş bir tripeptid yan zinciri birleşimi ile meydana gelir. Polimiksin B ve kolistin, ortak bir primer sekansı paylaşır, ancak tek fark polimiksin B'deki D-fenilalanin olan pozisyonda kolistinde D-lösin olmasıdır (64). α , γ diaminobütirik asit (Dab) primerleri aminleri, polimiksin moleküllerinin fizyolojik pH'ta pozitif olmasında önemlidir (65).

Aşağıda polimiksin B ve kolistinin kimyasal formülündeki farklılıkları içeren şekil bulunmaktadır. Kolistindeki D-Phe (fenilalanin) yerine polimiksin B'de D-Leu (lösin) bulunur. Ayrıca kolistindeki 6-metil-oktaonik asit yerine polimiksin B'de 6-metil heptanoik asit bulunur (66).



Şekil 2.2: Polimiksin B ve kolistin kimyasal yapısı (66)

Polimiksin B'nin ana bileşenleri, polimiksin B1 ve polimiksin B2'dir. Polimiksin B1, terminusta 6-metil-oktanoik asit ile asillenir, polimiksin B2 ise 6-metilheptanoik asit ile asillenir (67). Öte yandan, iki ana kolistin bileşeni olan kolistin A ve kolistin B, sırasıyla 6-metiloktanoik asit ve 6-metil-heptanoik asit ile asile edilir (66). Bu yağ asidi zincirleri, LPS'nin yağ asilleri ile etkileşime girmek için polimiksin moleküllerinde hidrofobik bir bölge oluşturur (65).

Ticari olarak temin edilebilen iki kolistin formu, kolistin sülfat ve kolistimetat sodyumdur (CMS). CMS, kolistin formaldehit ve sodyum bisüfit ile tepkimesiyle üretilir, bu da kolistin primer aminlerine bir sülfometil grubunun eklenmesine yol açar (68). CMS, daha az etkilidir ve aynı zamanda, kolistin sülfattan daha az toksiktir (69, 70). Bu nedenle nefrotoksisiteyi azaltmak amacıyla tedavide parenteral kolistin olarak CMS formu kullanılır (71, 72).

Kolistin, fizyolojik pH'ta +5'lik bir net yük ile katyonik şekilde bulunurken, CMS fizyolojik pH'ta -5'lik bir yüke sahiptir ve anyonik formdadır. Kendisi de negatif yüklü olan CMS bu nedenle negatif yüklü bakteriyel membran ile etkileşime giremez. İnaktif bir ön ilaç olan CMS insan vücudunda etkin form olan kolistine dönüşerek etki gösterir (73).

2.2.3 Etki mekanizması

Polimiksinlerinin ilk etkileşiminin bakteriyel dış membranla olduğu kabul edilir (66, 74, 75). Polimiksin-LPS etkileşiminde, dış zarın negatif yüke sahip olması ve hidrofobik özelliği büyük önem arz eder. LPS, üç parçadan oluşur: O-antijeni, kor polisakkaridi ve lipid A (76). Gram negatif dış zar karakterizasyonu, lipid A'nın 1. ve 4. pozisyonlardan fosforillenmiş ve genellikle kovalanet olarak bağlı 3. bölgede hidroksiaçil zinciri içeren B1-6 D-glukozaminden oluşur (77). Lipit A'nın bu hidrofobik kısmı, genel dış zar yapısını stabilize etmek için bir çapa görevi görür (66). Hidrofobik kısmının yanı sıra, lipit A'nın kendisi de fosforile edilir ve kor polisakkarit bölgesine yakından bağlanır, bu nedenle genel LPS molekülleri ortak protein çözeltilerinde net negatif bir yük sergileyebilir (77).

Hem elektrostatik hem de hidrofobik etkileşimler, polimiksinlerin dış membranla birleşmesi için önemlidir (78). Lipit A'nın fosfat kısımları doğada polianyoniktir. Bu fosfat ve pozitif yüklü polimiksin aminlerin arasındaki elektrostatik etkileşimin, LPS dış zarının dengelenmesinde görevli 2 değerli katyonların yerlerini değiştirdiğine (Ca^{+2} ve Mg^{+2}) inanılmaktadır (79). Polimiksin başının katyonik kalıntıları lipit A'nın bu polar özellikleri ile etkileşime girerken, polimiksinin lipofilik yağ asidi kuyruğu, dış zarın hidrofobik açil tabakasına erişir (66). Polimiksinin yağlı açil kuyruklarının yerleştirilmesi zarın bozulmasına neden olur ve bu durum Lipid A'nın yağlı açil kuyruklarıyla hidrofobik temasların oluşumunu teşvik eder. Bu hidrofobik etkileşimler polimiksin-LPS kompleks oluşumu ile sonuçlanır (79-81).

2.2.4 Etki spektrum

Polimiksinler, *Enterobacteriaceae* (*Proteus spp.* ve *Serratia spp.* hariç), *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* dahil olmak üzere geniş bir Gram negatif aktivite spektrumuna sahiptir. Bununla birlikte, kullanımları aminoglikozitler ve sefalosporinler gibi daha güvenli antimikrobiyallerin geliştirilmesiyle sınırlı kalmıştır.

Polimiksin grubu antibiyotikler, oral biyoyararlanımlarının düşük olması nedeniyle bağırsak dekontaminasyonunda ve topikal olarak kullanılmışlardır (33). Sistemik kullanıma 1990'lı yılların başında kistik fibrozus hastalarında *Pseudomonas* enfeksiyonlarının tedavisi için tekrar başlanmıştır (65). 2000'li yıllarda, polimiksinin sistemik kullanıma yeniden girişi, diğer antibiyotiklere dirençli olan çoklu ilaç dirençli (MDR) Gram negatif basil ile gerçekleşen nozokomiyal enfeksiyonların ortaya çıkmasından kaynaklanmıştır (82, 83). CRE için polimiksin tedavisinin ilk yayınlanmış başarılarından biri karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonu olan kritik durumdaki bir hastada yüz güldürücü sonuç alınmasıdır (84).

2.2.5 Yan etkileri

Ortaya konulan en önemli yan etkisi polimiksinlerin yüksek doku ve hücre zarı bağlama kabiliyetlerinden kaynaklandığı düşünülen nefrotoksisitedir (85). Nefrotoksisite, tübüler epitel hücre zarındaki geçirgenliğin artması nedeniyle oluşur. Bu artış katyon, anyon ve su akışına, sonunda hücre şişmesine ve hücre erimesine yol açar. Kolistin nefrotoksisitesi, kolistin tedavisinin dozu, süresi, diğer nefrotoksik ilaçların birlikte uygulanması ve hastayla ilişkili faktörler gibi bazı risk faktörlerinden etkilenir (86). Diğer bildirilen yan etkiler ateş, eozinofili, deri döküntüleri, inhalasyon sonrası bronkospazm ve intratekal uygulamalarını takiben meningeal irritasyondur (82). Olumsuz etki olasılığını artıran faktörler premorbid böbrek hastalıkları (87), ileri yaş (85) ve nefrotoksik ilaçlarla birlikte tedavidir (88).

2.2.6 Direnç mekanizmaları

Gram negatif organizmalar arasında birçok farklı polimiksin direnci mekanizması vardır. Bunlardan en yaygın olanı polimiksinin modifiye LPS ile etkileşimin başarısızlığından kaynaklanır. Polimiksinlerin Gram-negatif bakterilerle etkileşiminde, polimiksinlerin pozitif yüklü Dab bölgeleri ile lipit A'daki negatif yüklü fosfat grupları arasında elektrostatik bağlanma önemli rol oynar (66). Bu nedenle lipit A üzerinde azalmış negatif yüklü fosfat grupları, polimiksinin LPS ile bağlanma başarısızlığına neden olur ve bu durum polimiksin direnciyle sonuçlanır. Dirençli *K. pneumoniae*'nin LPS

etkisi olduğunu bildirmiştir (92). Başka bir çalışmada, sadece anyonik CPS'nin polimiksinin bakterisit aktivitesini bloke ettiği gözlenmiştir (93). Bu nedenle polimiksinlerin anyonik CPS tarafından yakalandığı ve dış membrana ulaşan antibiyotik miktarlarının azaldığı varsayılmaktadır (93).

Mobilize kolistin direnci (MCR-1) geni ilk olarak Çin'de domuzlardan izole edilen *E. coli*'lerde tanımlanmıştır (94). MCR-1 genin translasyonu, *E. coli*'deki LPS'nin kor polisakkarit kalıntısına bir fosfoetanolin parçasının eklenmesi ve kolistin direnci ile sonuçlanmıştır. MCR-1'in yatay olarak aktarılabilen ilk polimiksin direnç geni olduğu tespit edilmiştir. Bu genin yatay olarak aktarılıyor olabilmesi global çaplı bir direnç sorunu potansiyeli olduğunu işaret etmektedir.

2.3. GLYCYRRHİZA GLABRA (Meyan kökü)

2.3.1 Tarihçe

Glycyrrhiza glabra kullanımı antik dönem tıp uygulamalarına kadar dayanan bir bitkidir. Geleneksel Çin tıbbının (TCM) temel felsefesi, iç enerji veya vücudun "qi" dengesinin yenilenmesi yoluyla sağlığı korumaktır. Bu dengeyi sağlamanın bir yolu da , insanlara ihtiyaçlarının olduğu bitkilerin verilmesidir. TCM uygulamasında, Çinli doktor, bir hasta için kişiselleştirilmiş bir bitki karışımı reçete edebilir veya bir Çin patent formülü kullanılması önerilebilir (95).

Glycyrrhiza cinsi, Yunanca glykos (tatlı) ve rhiza (kök) kelimelerinden türetilmiştir. *Glycyrrhiza* (*Fabaceae*) cinsi, *G. glabra*, *G. uralensis*, *G. inflata*, *G. aspera*, *G. korshinskyi* veya *G. eurycarpa* gibi yaklaşık 30 türden oluşur . *Glycyrrhiza glabra* (meyan kökü), Ayurveda antik tıbbi tarihinin en yaygın kullanılan bitkilerinden biridir. Hatta Mısırlılar, Yunanlılar ve Romalılar meyan kökünü çok çeşitli rahatsızlıklar için ilaç olarak kullandılar (96).

G. glabra'nın antimikrobiyal aktivitesi, uzun yıllardır hem tıbbi olarak araştırılmıştır. Ayrıca cilt, solunum sistemi ve üriner sistem üzerindeki antibakteriyel etkinliği bildirilmiştir (97). *G. glabra*'nın doğal bitki ürünleri antitusif, mukolitik, antiülser, antimutagenik, antimikrobiyal, immünostimulan ve bir lezzet verici ajan olarak kabul edilir (98).

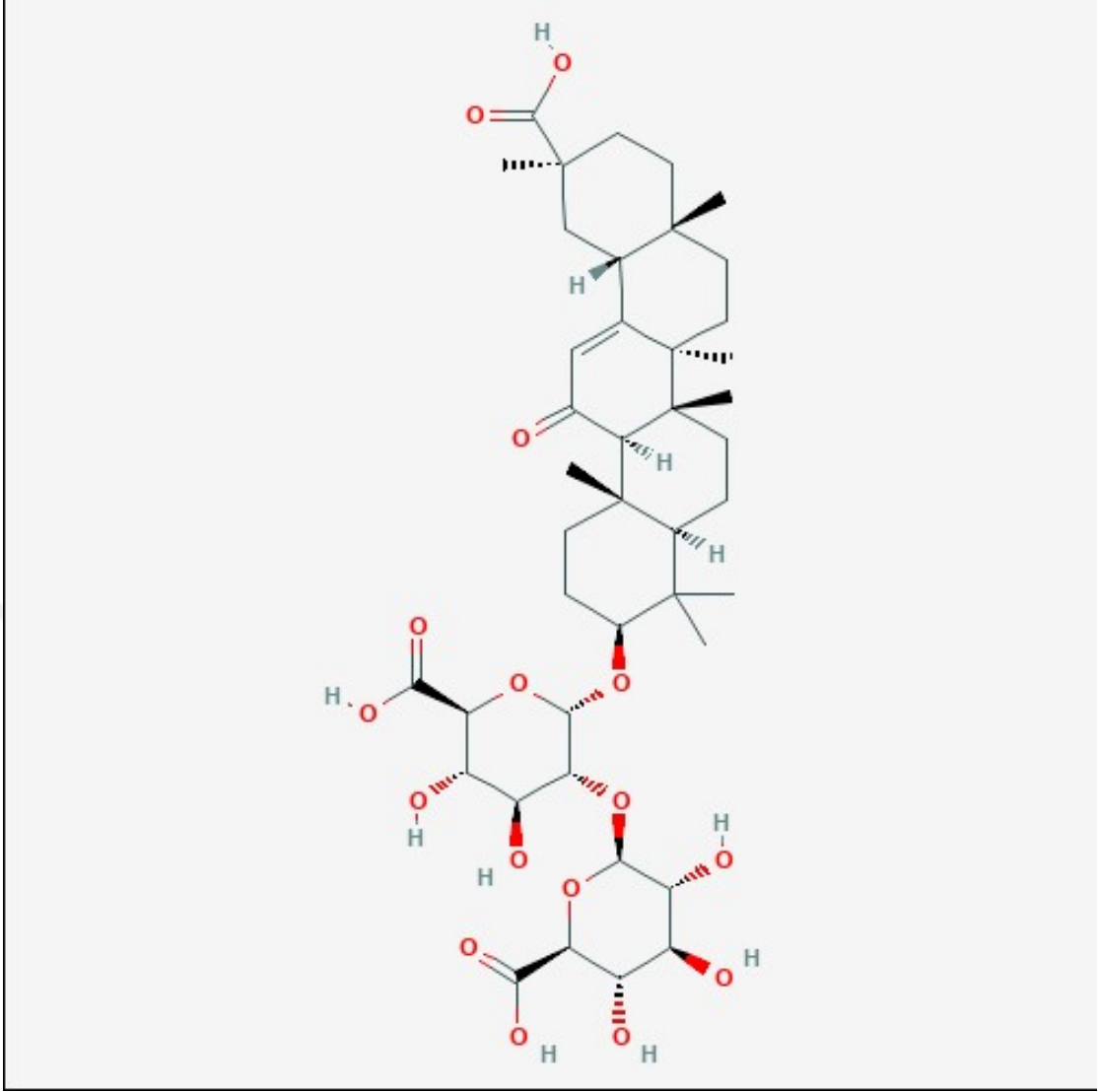
Glycyrriza'nın kökleri, ilacın kaynağına ve işlemine göre konsantrasyonu % 2.5 ile % 9 arasında değişen yüksek miktarda glisirhizik asit içerir (96).

2.3.2 Yapısı

Glyciza glabra çoğunlukla triterpenler, saponinler ve flavonoidler'den oluşur. Meyan kökünde saponinler glukuronitler olarak bulunurken, triterpen ve saponinler tatlı tattan sorumlu olan temel karakteristik bileşenleridir (99). Köklerin ana bileşeni, primer aktif bileşen olan sükrozdan neredeyse 50 kat daha tatlı olan bir saponin olan glisirizindir (100). Glycyrrhizin meyan kökü kök ağırlığının yaklaşık % 10'unu temsil eder, % 2 ila % 25 arasında değişen glisirhizik asidin potasyum, kalsiyum ve magnezyum tuzlarının bir karışımıdır (99). Oral uygulamadan sonra, glycyrrhizin intestinal bakteriler tarafından 18 glisiretik asit - 3 monoglukuronid ve glisiretik aside metabolize edilir (101). Meyan kökünün sarı rengi flavonoid içeriğinden kaynaklanmaktadır (4).

Meyan kökünün kimyasal yapısı için önemli bileşikler: Liquiritin, Isoliquiritin, Glycyrrhizin, Liquiritigenin, Isoliquiritigenin, 18 β -Glycyrrhetic acid, Liquiritin apioside, Glycyrrhetic acid, Licochalcone A, Glabridin'dir (4).

Yaygın olarak doğal bir tatlandırıcı olarak uygulanan, kozmetik ve eczacılıkta kullanılan Glisirhizik asit (GA), Leguminosae familyasının *glycyrrhiza* türlerinin yıllık bitkilerinin köklerinden izole edilir (102).



Şekil 2.4: Glisirhizik asit kimyasal yapısı (103)

GA üreten üç ana tür, *Glycyrrhiza glabra L.*, *G. uralensis Fisch.* ve *G. inflata Batal*'dır. Bu türler ağırlıklı olarak İspanya, Yunanistan, İtalya, Türkiye, Irak, İran, Moğolistan, Afganistan, Türkmenistan, Özbekistan ve Pakistan gibi Orta ve Güney Doğu Asya ülkelerinde bulunur (102).

2.3.3 Etki mekanizması

Glisirhizik asitin antibakteriyel etkinliğinin mekanizması tam olarak bilinmesede, bakteriyel hücre membran geçirgenliğini bozarak gerçekleştirdiği düşünülüyor (104).

Glycyrrhizin *S. mutans*lara bağlı diş çürümeleri üzerinde yüksek konsantrasyonlarında bakteri üremesini hafifçe önler ve düşük

konsantrasyonlarında bakteri plak oluşumunu inhibe eder (96). Glycyrrhizin sükroz varlığında bakteriler tarafından diş plağı oluşumunu inhibe etmesi bu nedenle büyük ilgi çekmektedir (96).

Ülseratif kolitte glisirhizik asitin olası bir anti-enflamatuar etkisini araştırmak için, sıçan modeliyle yapılan deneylerde, immünohistokimya ile kolon mukozasında NF- κ B, TNF- α ve ICAM-1 ekspresyonu sağladığı saptandı (105).

Bu farklı eylemler arasında, glisirhizik asitin lenfositlerin mitojen ve sitokin üretim tepkilerini benzersiz bir şekilde kontrol ettiği gösterilmiştir ancak mekanizma bilinmemektedir (106).

GA'nın anti-enflamatuar, anti-ülser, anti-alerjik, antioksidan, anti-tümör, anti-diyabetik ve hepatoprotektif gibi birden fazla terapötik özelliğe sahip olduğu, premenstrual sendrom ve viral enfeksiyonların tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir. Viral hepatit, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) antiviral olarak etkinliğinin değerlendirildiği virüslerden bazılarıdır(107).

G. glabra'nın kök ekstraktlarının ayrıca anti-lipidemik ve anti-hiperglisemik ajanlar olarak etki ettiği bilinmektedir(108).

2.3.4 Yan etkileri

Çalışmalar yüksek miktarlardaki meyan kökü kullanımının böbrekten sodyum tutulumu ve potasyum atımını arttırdığını, ödem oluşumuna yol açabildiğini, kan basıncını yükseltebildiğini, kardiyak şikayetlere neden olduğunu ve renin-angiotensin-aldosteron sisteminin depresyonuna yol açabildiğini göstermektedir (109).

2.3.5 İçinde bulunduğu maddeler

Doğal GA kaynağı olan meyan kökü, geleneksel Japon Kampo ilaçlarının vazgeçilmez bir bileşenidir ve meyan kökü özleri kozmetik, gıda katkı maddeleri, tütün lezzetleri ve şekerleme ürünlerinde kullanılır (102).

YÖNTEM

Çalışmamıza İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 30.06.2017-04.07.2019 tarihleri arasında gelen kan kültürü, trakeal aspirat, bos kültürü, idrar kültürü örneklerinden izole edilmiş, 30 adet kolistin duyarlı ve 30 adet kolistin dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatu dahil edildi. Kolistin duyarlı gruptaki suşlar sadece ampisilin doğal dirençli, kolistin dirençli gruptaki suşlar ise çoklu ilaç direncine sahip *K.pneumoniae*'lerden oluşturulmuştur. Bakterilerin tanımlamaları VITEK® MS MALDI TOF (BioMeerieux, Fransa), antibiyogramları ise VITEK II® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) otomatize sistemleri kullanıldı. Tüm suşlar çalışma tarihine kadar -20°C de %15'lik gliserin içeren stok besiyerlerinde saklandı. Kontrol suşları olarak ise *E.coli* ATCC® 25922™, *K.pneumoniae* ATCC® BAA-1705™ ve *K.pneumoniae* ATCC® 4352™ çalışılmıştır.

3.1. Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth Hazırlanması

Katyon ayarlı Mueller Hinton sıvı besiyeri hazırlamak için öncelikle hazır olarak alınmış dehidre besiyerinin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 23 gramı 1 litre distile su içerisinde çözüldü. Ardından otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi ve oda sıcaklığına gelene kadar soğutuldu. Katyon ayarlamasının yapılması içinde kalsiyum klorür (Merck, Germany) ve magnezyum klorür (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) kullanıldı. $CaCl_2$ stok çözeltisi hazırlamak için ise 100 ml deiyonize suda 3,68 gram $CaCl_2$ çözüldükten sonra filtre ile sterilize edildi. $MgCl_2$ stok çözeltisi hazırlamak için ise 100 ml deiyonize suda 8,36 gram $MgCl_2$ kullanıldı. Sonrasında her bir litre Mueller Hinton Broth (MHB) için 2,2 ml $CaCl_2$ stok çözeltisinden ve 1,1 ml $MgCl_2$ stok çözeltisinden eklenerek katyon ayarlamaları yapıldı.

3.2. Sıvı Mikrodilüsyon (Broth Mikrodilüsyon Yöntemi)

Çalışmada kullanacağımız kolistin sülfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) ve Glisirhizik asit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) toz formları üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı. Antibiyotiklerin potens değerleri yine üretici firmadan öğrenildi ve ml'de elde edilmek istenen konsantrasyonları sulandırılmaları aşağıdaki formüle göre yapıldı:

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

Tüm antimikrobiyaller işlem günü kullanılmak üzere istenen konsantrasyonlarda hazırlandıktan sonra steril ependorflarla -80°C deki derin dondurucularda saklandı.

Mikrodilüsyon yöntemi için 96 kuyucuklu steril U tabanlı mikroplateler kullanıldı. Kullanılacak tüm kuyucuklara 100 mikrolitre Katyon ayarlı mueller-hinton broth (KAMHB) konuldu. Ardından çalışılacak olan antimikrobik ajan ilk kuyucuğa kolistin için 64 $\mu\text{g/ml}$, glisirhizik asit için 1600 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon olacak şekilde 100 mikrolitre konduktan sonra seri halde 3-5 kez pipetaj yapıldıktan sonra seri dilüsyon yapılarak dilüsyon plakları hazırlandı. Her bir platedeki kuyucuklardan bir tanesi pozitif üreme kontrol, bir tanesinde negatif üreme kontrol olarak düşünülerek sadece 100 μl KAMHB konuldu.

Çalışma için saklanan stok suşlar mikrodilüsyon çalışması öncesinde oda ısısına çıkartılıp ardından %5'lik koyun kanlı agara (KKA) pasajlanarak 24 saat süreyle 37°C de inkübe edildi. Üreyen koloniler tekrar pasajlanarak çalışma taze koloniler üzerinden gerçekleştirildi. Saf üreyen bakteri kolonilerinden alınarak 0,5 McFarland (1×10^8 cfu/ml) bulanıklıkta sulandırım çözeltileri hazırlandı. Ardından her bir mikroplate bakteri sayısı (5×10^5 cfu/ml) olacak şekilde sulandırım yapılarak pozitif kontrol kuyucuğu dahil bütün kuyucuklara 5 μl aktarıldı. Daha sonra plaklar 18-24 saat süreyle etüvde inkübasyona kaldırıldı ve üremenin olmadığı ilk kuyucuk Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değeri olarak kabul edildi. Elde edilen MİK değerleri European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Eucast) önerileri doğrultusunda değerlendirildi.

3.3. Dama tahtası yöntemi (Checker Board)

3.3.1 Mikroplate hazırlığı

Dama tahtası (Chechker Board) yöntemi içinde steril 96 kuyucuklu mikroplateler kullanıldı. Kullanılacak olan antimikrobik stok solüsyonları -80°C'deki derin dondurucudan çıkartılarak oda ısısında çözünmesi beklendi. Kolistin dirençli ve duyarlı suşlar için ayrı dilüsyonda paneller hazırlandı. Duyarlı suşlar için kolistin 0,12-32 µg/ml aralığında, dirençli suşlar için ise kolistin 0,5-126 µg/ml aralığında çalışıldı. Glisirhizik asit için ise doz aralığımız sabit olacak şekilde 12,5-800 µg/ml olarak çalışıldı. Mikroplate düzeneğinde ilk sütun Glisirhizik asit MİK değerini, ilk satır ise kolistin MİK değerini belirlemek üzere kullanıldı.

Duyarlı suş panelini hazırlanırken 2-9. Sütundaki kuyucuklara 50 µl KAMHB konuldu, 10. Sütunun tamamına ise 64 µg/ml konsantrasyonunda son sulandırımı KAMHB yapılmış kolistin çözeltisi konuldu. Ardından çoklu pipet yardımıyla 10. Sütundan 50'şer µl alınarak 2. Sütuna kadar seri pipetaj yapılarak kolistin için sulandırmaları hazırlandı. Glisirhizik asit konsantrasyonları ise ilk satır hariç her satır için 2 katı olacak şekilde stok çözeltiden hazırlandı ve tekli pipetaj yardımıyla 50 µl kuyucuklara aktarıldı. A1 kuyucuğu pozitif üreme kontrol H12 kuyucuğu ise negatif üreme kontrol olarak kullanıldı ve 100 µl KAMHB konuldu. Çalışma gününe kadar -80°C de saklandı ve çalışılacağı zaman oda sıcaklığına getirilerek kullanıldı.

Dirençli suş paneli hazırlanırken 4-11 sütunlardaki tüm kuyucuklara 50 µl KAMHB konuldu. 12.sütunun tamamına ise 256 µg/ml konsantrasyonunda son sulandırmaları KAMHB ile yapılmış kolistin çözeltisi konuldu. Ardından çoklu pipetaj yardımıyla 12.sütundan 50'şer µl alınarak 4.sütuna kadar seri pipetajla dilüsyon yapılarak kolistin için sulandırmalar hazırlandı. Glisirhizik asit asit konsantrasyonları ise ilk satır hariç her satır için 2 katı olacak şekilde stok çözeltiden hazırlandı ve tekli pipetaj yardımıyla 50 µl kuyucuklara aktarıldı. A1 kuyucuğu pozitif üreme kontrol H3 kuyucuğu ise negatif üreme kontrol amacıyla kullanıldı ve 100 µl KAMHB konuldu. Çalışma gününe kadar -80°C de saklandı ve çalışılacağı zaman oda sıcaklığına getirilerek kullanıldı.

Tablo 3.1: Dama tahtası duyarlı suş paneli

ÜREME KONTROL (+)	C 0,12	C 0,25	C 0,5	C 1	C 2	C 4	C 8	C 16	C 32
GA 12,5	C 0,12 + GA 12,5	C 0,25 + GA 12,5	C 0,5 + GA 12,5	C 1 + GA 12,5	C 2 + GA 12,5	C 4 + GA 12,5	C 8 + GA 12,5	C 16 + GA 12,5	C 32 + GA 12,5
GA 25	C 0,12 + GA 25	C 0,25 + GA 25	C 0,5 + GA 25	C 1 + GA 25	C 2 + GA 25	C 4 + GA 25	C 8 + GA 25	C 16 + GA 25	C 32 + GA 25
GA 50	C 0,12 + GA 50	C 0,25 + GA 50	C 0,5 + GA 50	C 1 + GA 50	C 2 + GA 50	C 4 + GA 50	C 8 + GA 50	C 16 + GA 50	C 32 + GA 50
GA 100	C 0,12 + GA 100	C 0,25 + GA 100	C 0,5 + GA 100	C 1 + GA 100	C 2 + GA 100	C 4 + GA 100	C 8 + GA 100	C 16 + GA 100	C 32 + GA 100
GA 200	C 0,12 + GA 200	C 0,25 + GA 200	C 0,5 + GA 200	C 1 + GA 200	C 2 + GA 200	C 4 + GA 200	C 8 + GA 200	C 16 + GA 200	C 32 + GA 200
GA 400	C 0,12 + GA 400	C 0,25 + GA 400	C 0,5 + GA 400	C 1 + GA 400	C 2 + GA 400	C 4 + GA 400	C 8 + GA 400	C 16 + GA 400	C 32 + GA 400
GA 800	C 0,12 + GA 800	C 0,25 + GA 800	C 0,5 + GA 800	C 1 + GA 800	C 2 + GA 800	C 4 + GA 800	C 8 + GA 800	C 16 + GA 800	C 32 + GA 800
ÜREME KONTROL (-)									

Tablo 3.2: Dama tahtası dirençli suş paneli

ÜREME KONTROL (+)	C 0.5	C 1	C 2	C 4	C 8	C 16	C 32	C 64	C 128
GA 12.5	C 0.5 + GA 12.5	C 1 + GA 12.5	C 2 + GA 12.5	C 4 + GA 12.5	C 8 + GA 12.5	C 16 + GA 12.5	C 32 + GA 12.5	C 64 + GA 12.5	C 128 + GA 12.5
GA 25	C 0.5 + GA 25	C 1 + GA 25	C 2 + GA 25	C 4 + GA 25	C 8 + GA 25	C 16 + GA 25	C 32 + GA 25	C 64 + GA 25	C 128 + GA 25
GA 50	C 0.5 + GA 50	C 1 + GA 50	C 2 + GA 50	C 4 + GA 50	C 8 + GA 50	C 16 + GA 50	C 32 + GA 50	C 64 + GA 50	C 128 + GA 50
GA 100	C 0.5 + GA 100	C 1 + GA 100	C 2 + GA 100	C 4 + GA 100	C 8 + GA 100	C 16 + GA 100	C 32 + GA 100	C 64 + GA 100	C 128 + GA 100
GA 200	C 0.5 + GA 200	C 1 + GA 200	C 2 + GA 200	C 4 + GA 200	C 8 + GA 200	C 16 + GA 200	C 32 + GA 200	C 64 + GA 200	C 128 + GA 200
GA 400	C 0.5 + GA 400	C 1 + GA 400	C 2 + GA 400	C 4 + GA 400	C 8 + GA 400	C 16 + GA 400	C 32 + GA 400	C 64 + GA 400	C 128 + GA 400
GA 800	C 0.5 + GA 800	C 1 + GA 800	C 2 + GA 800	C 4 + GA 800	C 8 + GA 800	C 16 + GA 800	C 32 + GA 800	C 64 + GA 800	C 128 + GA 800
	ÜREME KONTROL (-)								

3.3.2 Suşların inokülasyonları

Çalışma için saklanan stok suşlar dama tahtası yöntemi öncesinde oda ısısına çıkartılıp ardından KKA'a pasajlanarak 24 saat süreyle 37°C de inkübe edildi. Üreyen koloniler tekrar pasajlanarak çalışma taze koloniler üzerinden gerçekleştirildi. Saf üreyen bakteri kolonilerinden alınarak 0,5 McFarland (1×10^8 cfu/ml) bulanıklıkta sulandırım çözeltileri hazırlandı. Ardından hazırlanan bu inokülumlar 10 kat sulandırım yapılarak son bakteri yoğunluğu (1×10^7 cfu/ml) getirildi. Bu son sulandırmadan ise 5 μ l alınarak negatif üreme kontrol kuyucuğu hariç diğer tüm kuyucuklara ekim yapıldı böylelikle son kuyucuk konsantrasyonu (5×10^5 cfu/ml) elde edilmiş oldu. Ardından mikrolateler kapakları kapatılarak 18-24 saat 37°C de inkübasyona bırakıldı.

3.3.3 Sonuçların incelenmesi

Sonuçlar incelenirken üremenin olmadığı kuyucuklara göre MİK değerleri belirlendi. Antimikrobiklerin kombine etkileşimi ise Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) ve fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi (FİKİ) hesaplanarak sinerji, additif, indiferens, antagonizma etkinlik durumları belirlendi.

FİK Kolistin = GA'nın varlığında kolistin'nin MİK sayısal değeri/Tek başına kolistin'nin MİK sayısal değeri

FİK GA = Kolistin'nin varlığında GA'nın MİK sayısal değeri/Tek başına GA'nın MİK sayısal değeri

Dama tahtası yöntemi test sonuçlarının yorumlanması literatürdeki veriler ışığında \sum FİK indeksi değerlerine göre gerçekleştirildi:

\sum FİK indeksi = FİK kolistin + FİK GA

\sum FİK indeksi 0,5: sinerji

\sum FİK indeksi > 0,5 ve < 1 : additif

\sum FİK indeksi 1 ve \leq 4 : etkisiz (indiferens)

\sum FİK indeksi > 4: antagonizma

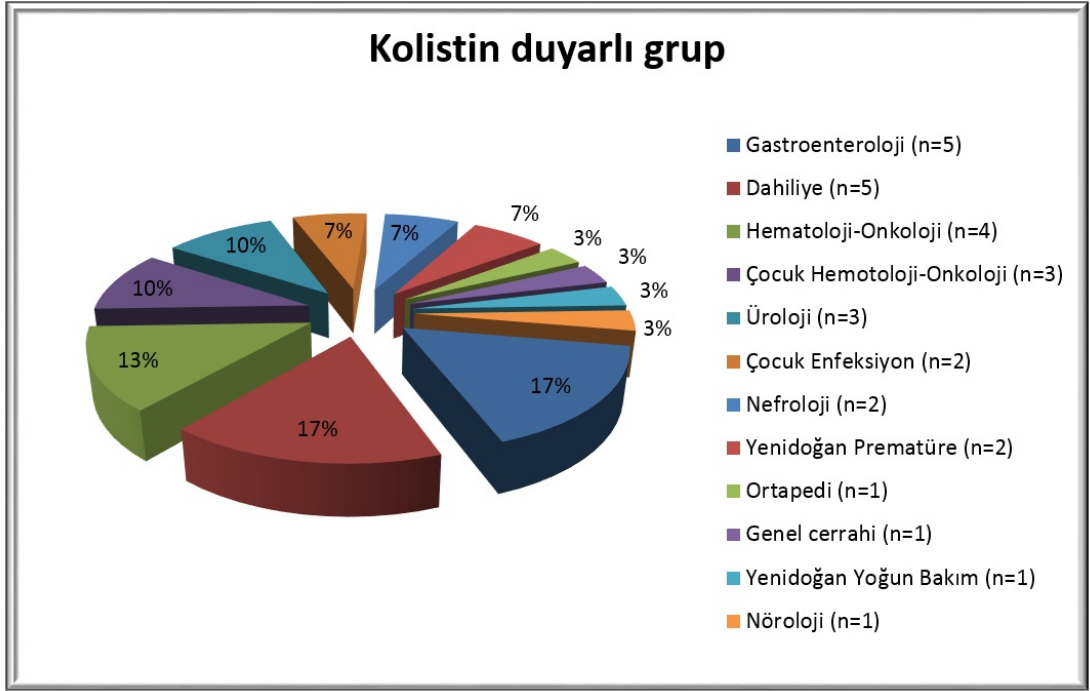
3.4. İSTATİSTİK YÖNTEMLER

İstatistiksel değerlendirmeler, İstanbul Medeniyet Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nın olanakları kullanılarak yapıldı. Veriler IBM SPSS, version 22,0 (Armonk, NY:IBM Corp, USA) istatistik programı kullanılarak analiz edildi. Kolistin duyarlı ve dirençli *K.pneumoniae*'larda kolistin ile glisirhizik asit kombine etkilerinin karşılaştırılmasında, iki grup arasında farkın değerlendirilmesinde Fisher-Freeman-Halton testi kullanılmış. İstatistiksel anlamlılık olarak $p=0,05$ alındı.

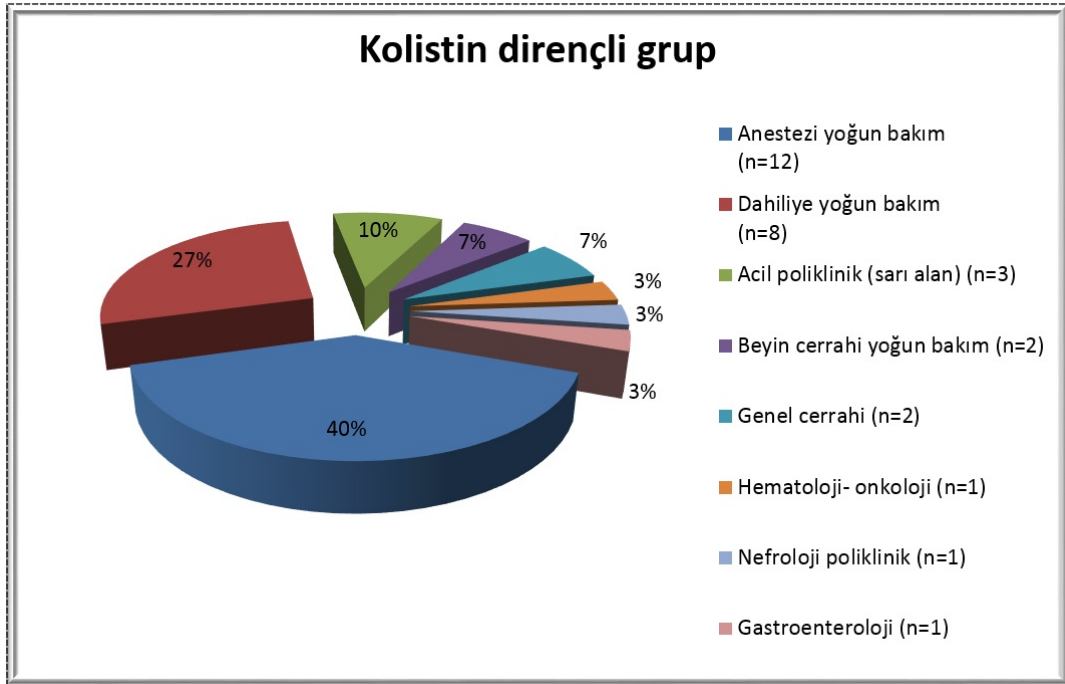


BULGULAR

Çalışmamızda İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 30.06.2017-04.07.2019 tarihleri arasında gelen örneklerden izole edilen 30 adet kolistin duyarlı ve 30 adet kolistin dirençli *K.pneumoniae* suşu çalışmaya alınmıştır. Kontrol suşları olarak ise *E.coli* ATCC® 25922™, *K.pneumoniae* ATCC® BAA-1705™ ve *K.pneumoniae* ATCC® 4352™ çalışılmıştır. Kolistin duyarlı suşlar sırasıyla Gastroenteroloji (n=5), Dahiliye (n=5), Hematoloji-Onkoloji (n=4), Çocuk Hemotoloji-Onkoloji (n=3), Üroloji (n=3), Çocuk Enfeksiyon (n=2), Nefroloji (n=2), Yenidoğan Prematüre (n=2), Ortopedi (n=1), Genel cerrahi (n=1), Yenidoğan Yoğun Bakım (n=1), Nöroloji (n=1) servislerinden gelen örnekler örneklerden elde edilmiştir. Dirençli suşlar ise Anestezi yoğun bakım (n=12), Dahiliye yoğun bakım (n=8), Acil poliklinik (sarı alan) (n=3), Beyin cerrahi yoğun bakım (n=2), Genel cerrahi (n=2), Hematoloji- onkoloji (n=1), Nefroloji poliklinik (n=1), Gastroenteroloji (n=1) servislerinden gelen örneklerden izole edilmiş olup, yüzdelik dağılımları aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

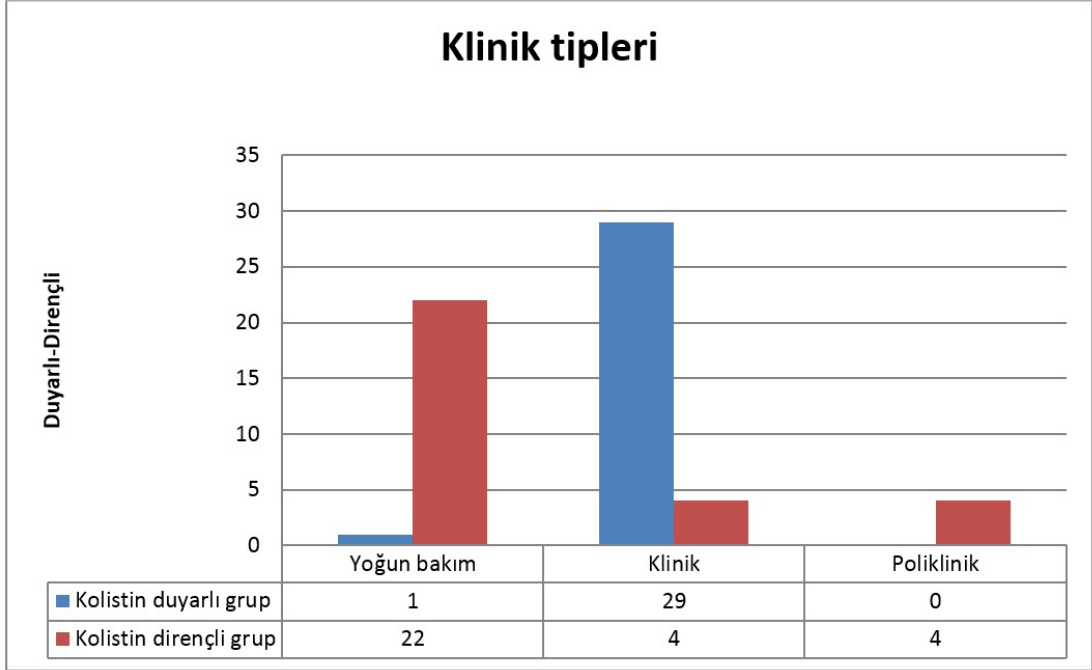


Şekil 4.1: Kolistin duyarlı suşların izole edildiği bölümler



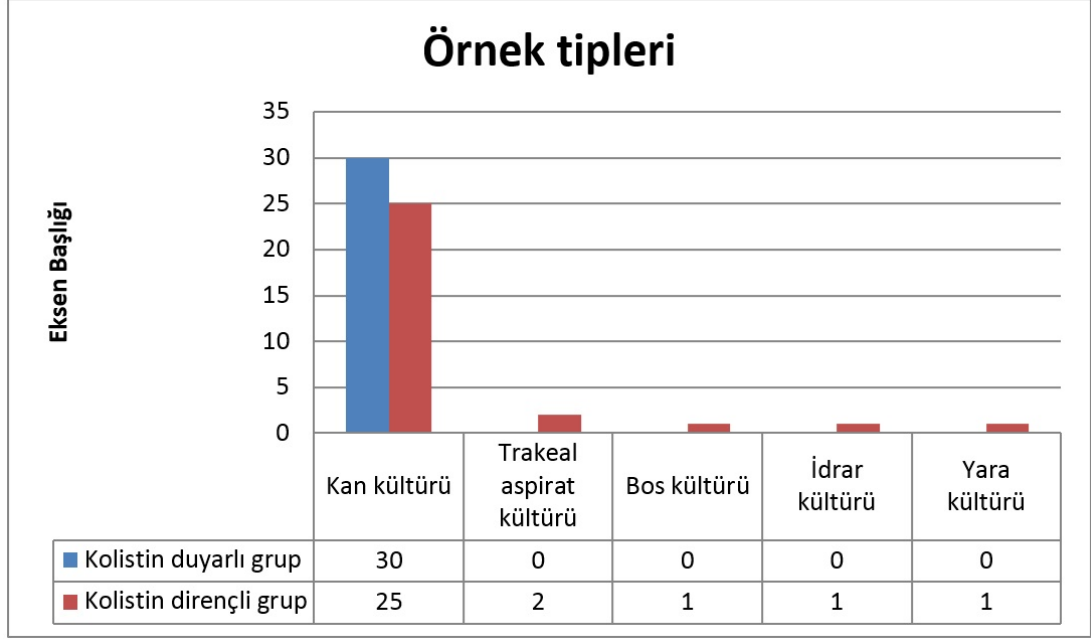
Şekil 4.2: Kolistin dirençli suşların izole edildiği bölümler

Duyarlı ve dirençli gruptan gelen örneklerin elde edildikleri servislere (yoğun bakım, klinik, poliklinik) göre dağılımları aşağıdaki şekildedir.



Şekil 4.3: Servislere göre dağılım

Çalışmadaki suşlar 55 kan, 2 trakeal aspirat, 1 Beyin omurilik sıvısı (BOS), 1 yara ve 1 idrar kültüründen izole edilerek çalışmaya dahil edildi. Kolistin duyarlı örneklerin tamamını kan kültüründen izole edilen örnekler oluşturmaktaydı. Kolistin dirençli gruptaki suşların ise 25'i kan, 2'si trakeal aspirat, 1'i BOS, 1'i yara ve 1'i idrar kültüründen izole edilmiştir.

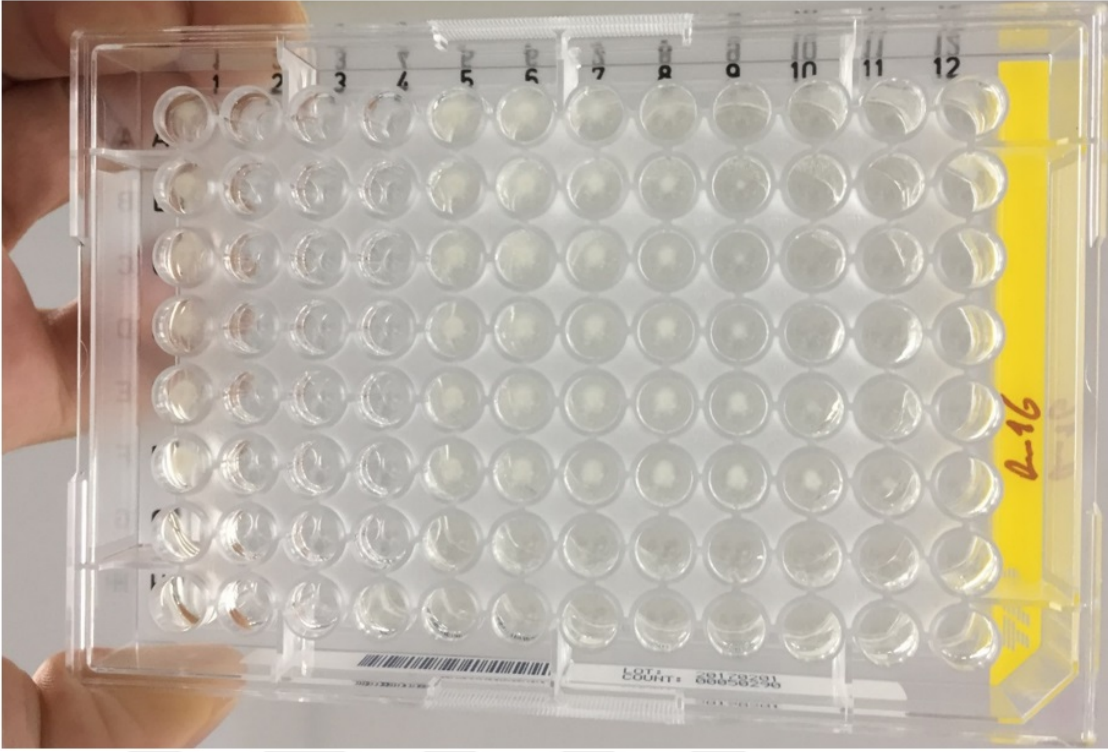


Şekil 4.4: İzolatların örnek türlerine göre dağılımı

Dama tahtası yöntemi uygulanan suşlarda kolistin ve glisirhizik asit kombine MİK değerleri tespit edilip, bu değerlere göre FİK değeri hesaplanarak kombine etkinlikleri incelenmiştir.

Tablo 4.1: Örnek suş R-16 Fiki hesaplama düzeneği

Kuyucuk	Kolistin MİK	Kolistin FİK	Ga MİK	Ga FİK	FİKİ	Yorum
A -9	16	Kolistin MİK	0	Kolistin MİK	Kolistin MİK	MİK
B-10	32	2	12,5	0,03	2,03	İndiferans
C-10	32	2	25	0,06	2,06	İndiferans
D-11	64	4	50	0,125	4,125	Antagonizma
E-11	64	4	100	0,25	4,25	Antagonizma
F-12	128	8	200	0,5	8,5	Antagonizma
G-11	64	4	400	1	5	Antagonizma
G-10	32	2	400	1	3	İndiferans
G-9	16	1	400	1	2	İndiferans
G-8	8	0,5	400	1	1,5	İndiferans
G-7	4	0,25	400	1	1,25	İndiferans
G-6	2	0,125	400	1	1,125	İndiferans
G-5	1	0,0625	400	1	10,625	İndiferans
G-1	0	Ga MİK	400	GA MİK	GA MİK	MİK

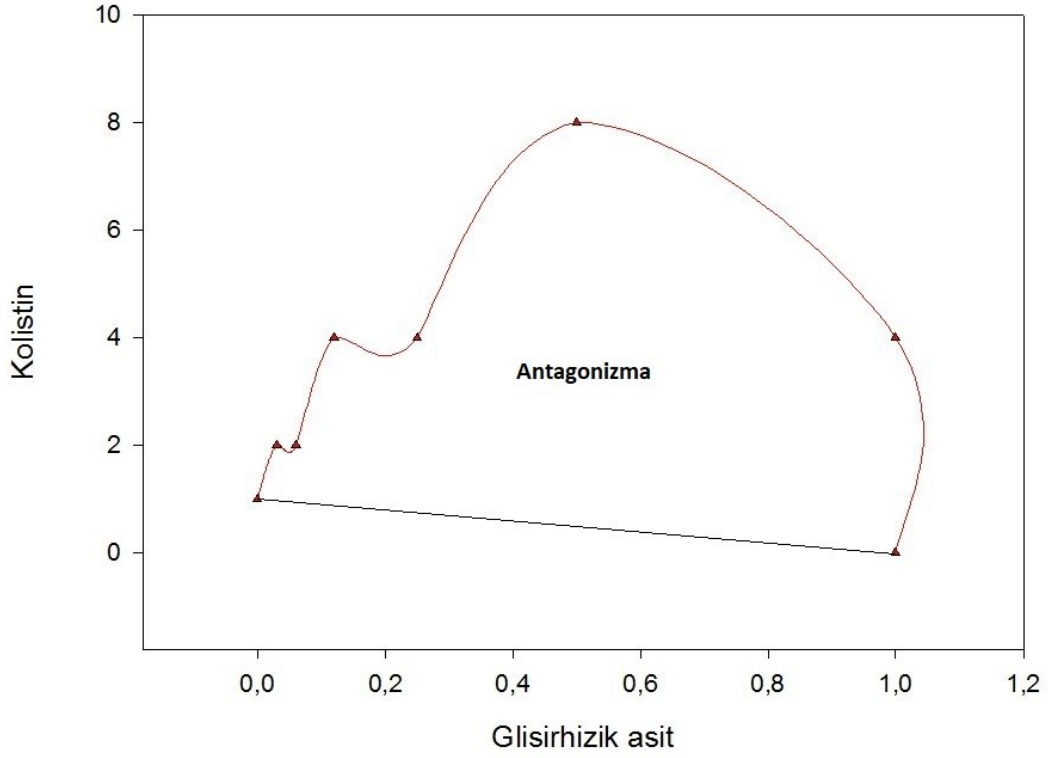


Şekil 4.5: R-16 mikroplate fotoğrafı

(+)	C 0,12	C 0,25	C 0,5	C 1	C 2	C 4	C 8	C 16	C 32	C 64	C 128
GA 12,5									IND		
GA 25									IND		
GA 50										ANT	
GA 100										ANT	
GA 200											ANT
GA 400				IND	IND	IND	IND	IND	IND	ANT	
GA 800			(-)								

Açıklama: Koyu olarak boyanmış kuyucuklar üreme olan kuyucuklar, (+) pozitif üreme kontrol kuyucuğu, (-) negatif üreme kontrol kuyucuğu, IND: İndiferans, ANT: Antagonizma

Şekil 4.6: R-16 mikroplate üreme durumu



Şekil 4.7: R-16 doz yanıt grafiği

Tablo 4.2: Örnek suş R-13 FİK indeksi hesaplama düzeneği

Kuyucuk	Kolistin MİK	Kolistin FİK	Ga MİK	Ga FİK	FİKİ	Yorum
A -11	64	Kolistin MİK	0	Kolistin MİK	Kolistin MİK	MİK
B-11	64	1		0,03	1,03	İndiferans
C-11	64	1	25	0,06	1,06	İndiferans
D-11	64	1	50	0,125	1,125	İndiferans
E-11	64	1	100	0,25	1,25	İndiferans
F-11	64	1	200	0,5	1,5	İndiferans
G-10	32	0,5	400	1	1,5	İndiferans
G-9	16	0,25	400	1	1,25	İndiferans
G-8	8	0,125	400	1	1,125	İndiferans
G-7	4	0,0625	400	1	1,062	İndiferans
G-6	2	0,031	400	1	1,031	İndiferans
G-5	1	0,015	400	1	1,015	İndiferans
G-1	0	Ga MİK	400	Ga MİK	Ga MİK	MİK

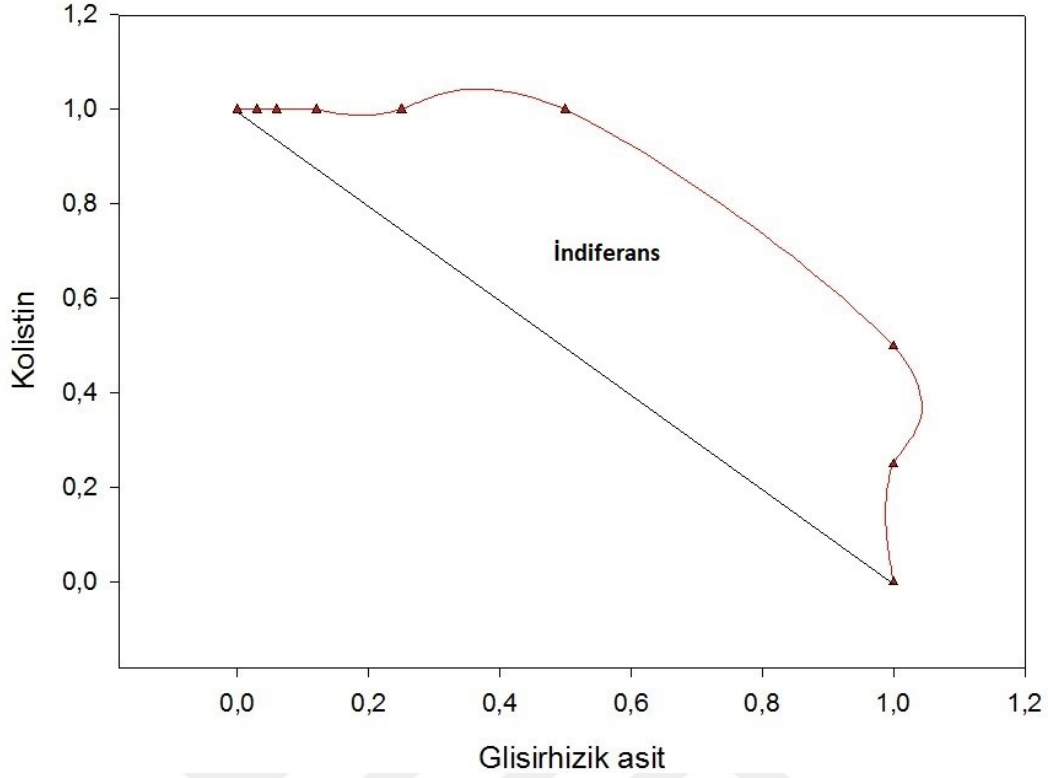


Şekil 4.8: R-13 mikroplate fotoğrafı

(+)	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
GA 12,5										IND	
GA 25										IND	
GA 50										IND	
GA 100										IND	
GA 200										IND	
GA 400				IND	IND	IND	IND	IND	IND		
GA 800			(-)								

Açıklama: Koyu olarak boyanmış kuyucuklar üreme olan kuyucuklar, (+) pozitif üreme kontrol kuyucuğu, (-) negatif üreme kontrol kuyucuğu IND:İndiferans

Şekil 4.9: R-13 mikroplate üreme durumu



Şekil 4.10: R-13 doz yanıt grafiği

Tablo 4.3: Örnek suş S-5 FİK indeksi hesaplama düzeneği

Kuyucuk	Kolistin MİK	Kolistin FİK	Ga MİK	Ga FİK	FİKİ	Yorum
A -6	2	Kolistin MİK	0	Kolistin MİK	Kolistin MİK	MİK
B-5	1	0,5	12,5	0,015	0,515	Additif
C-4	0,5	0,25	25	0,03	0,55	Additif
D-4	0,5	0,25	50	0,0625	0,31	Sinerjizm
E-4	0,5	0,25	100	0,125	0,37	Sinerjizm
F-4	0,5	0,25	200	0,25	0,5	Sinerjizm
G-3	0,25	0,125	400	0,5	0,625	Additif
H-2	0,12	0,06	800	1	1,06	İndiferans
H-1	0	Ga MİK	800	Ga MİK	Ga MİK	MİK

Bulgular

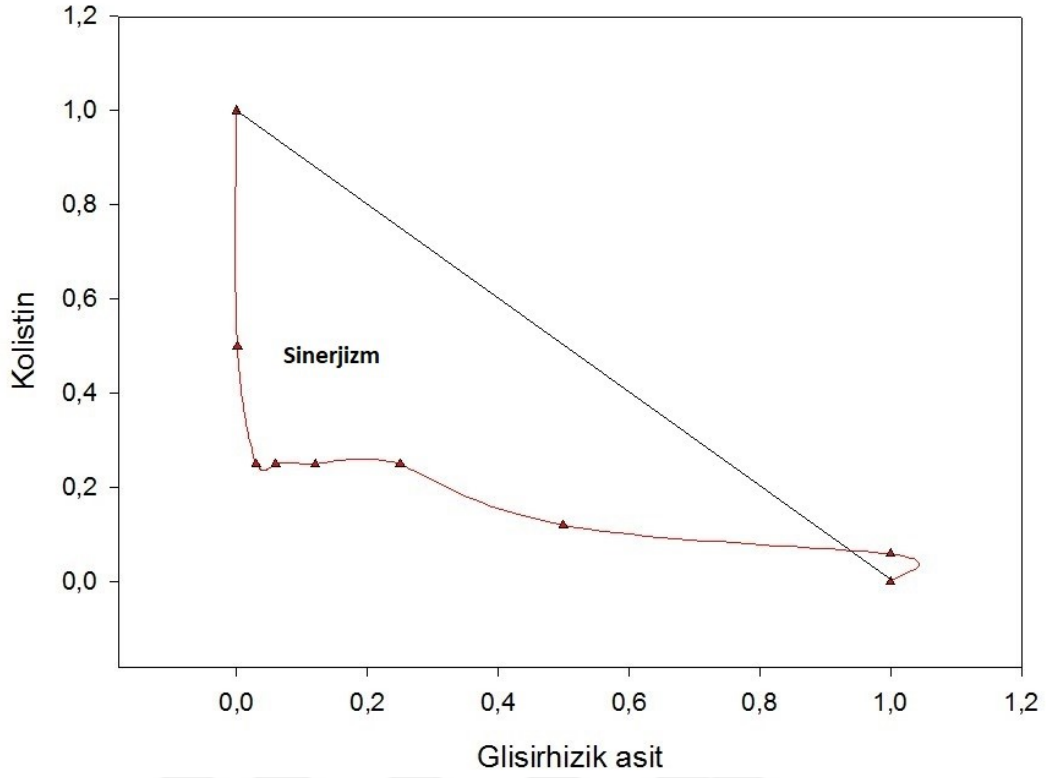
(+)	C 0,12	C 0,25	C 0,5	C 1	C 2	C 4	C 8	C 16	C 32	C 64	C 128
GA 12,5				ADT							
GA 25			ADT								
GA 50			SIN								
GA 100			SIN								
GA 200			SIN								
GA 400		ADT									
GA 800	IND										(-)

Açıklama: Koyu olarak boyanmış kuyucuklar üreme olan kuyucuklar, (+) pozitif üreme kontrol kuyucuğu, (-) negatif üreme kontrol kuyucuğu) IND: İndiferans, ADT: Additif, SIN: Sinerjizm

Şekil 4.11: S-5 Mikroplate üreme durumu



Şekil 4.12: S-5 Mikroplate fotoğrafı



Şekil 4.13: S-5 doz yanıt grafiği

Çalışılan 60 adet suş FİKİ değerlerine göre incelendiğinde 4'ünde (%6,7) FİKİ değeri saptanamadı, 13'ünde (%21,7) indiferans, 13'ünde additif (%21,7), 9'unda (%15) sinerjistik, 21 (%35)suşta ise antagonizma saptandı. Kolistin duyarlı ve dirençli grup kendi içinde değerlendirildiğinde; kolistin duyarlı grupta additif ve sinerjistik etkinlikte, kolistin dirençli grupta ise antagonistik etkinlikte diğer gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p=0,001$).

Tablo 4.4: Duyarlı ve Dirençli grup GA ve Kolistin kombine etkinlik karşılaştırılması

	DİRENÇ GRUBU						
		KOLİSTİN DİRENÇLİ GRUP		KOLİSTİN DUYARLI GRUP		TOPLAM	
		Sayı	Yüzde(%)	Sayı	Yüzde(%)	Sayı	Yüzde(%)
SONUÇ	Additif	3	10,0%	10*	33,3%	13	21,7%
	İndiferans	6	20,0%	7	23,3%	13	21,7%
	Saptanamadı	2	6,7%	2	6,7%	4	6,7%
	Antagonizma	19*	63,3%	2	6,7%	21	35,0%
	Sinerjistik	0	0,0%	9*	30,0%	9	15,0%
TOPLAM		30	100,0%	30	100,0%	60	100,0%

Açıklama:*ile işaretli ögeler istatistiksel olarak anlamlıdır.

Açıklama:*ile işaretli ögeler istatistiksel olarak anlamlıdır.

Her bir suş için sadece bir kuyucuk FİKİ değeri hesaplaması üzerinden (FİKİ hesaplanamayanlar dışarıda tutularak) duyarlı ve dirençli suşların FİKİ ortalamaları alındığında dirençli grup 4,04, duyarlı grup ise 1,05 olarak bulunup iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,001).

Tablo 4.5: Her bir suş için anlamlı FİKİ değeri için duyarlı ve dirençli grup ortalamaları

	Direnç grubu	N	Ortalama	Std Deviation	STd ErrorMean
FİKİ ortalamaları	Kolistin dirençli grup	28	4,04	2,13	0,40
	Kolistin duyarlı grup	28	1,05	1,59	0,30

Her bir suş için FİKİ değeri hesaplaması yapılmış tüm kuyucuklar değerlendirilerek (FİKİ değeri hesaplanamayanlar dışarıda tutularak) duyarlı ve dirençli grup ortalamaları alındığında; Dirençli grupta 301 adet kuyucuk ortalaması 2,01 olurken, duyarlı grupta 171 kuyucukta 1,14 olarak hesaplanmıştır. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,001).

Tablo 4.6: Tüm FİKİ hesaplamalarının duyarlı ve dirençli grup ortalamaları

	Direnç grubu	N	Ortalama	Std Deviation	STd ErrorMean
FİKİ ortalamaları	Kolistin dirençli grup	301	2,01	1,40	0,08
	Kolistin duyarlı grup	171	1,14	0,96	0,07

Kolistin dirençli suşlar grup olarak incelendiğinde n=19(%63,3) antagonizma, n=6(%20) indiferans, N=3(%10) additif ve 2 adet FİKİ değeri saptanamayan izolat bulunmuştur. Suşların kombine etkinlik hesaplaması yapılan kuyucuk değerlendirmeleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Kolistin duyarlı suşlar grup olarak incelendiğinde n=10 (%33) additif, n=9 (%30) sinerjizm, n=7 (%23) indiferans, n=2 (%6,7) antagonizma ve 2 adet FİKİ değeri hesaplanamayan izolat bulunmuştur. Kontrol suşları olarak ise E.coli ATCC® 25922™ suşunda additif etki gözlemlenirken *K.pneumoniae* ATCC® 4352™ suşunda indiferans etkinlik tespit edilmiş, *K.pneumoniae* ATCC® BAA-1705™ suşunda ise FİKİ değerleri hesaplanamamıştır. Suşların kombine etkinlik hesaplaması yapılan kuyucuk değerlendirmeleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 4.7: Dirençli grup anlamlı FİKİ hesaplamaları ve sonuçları

Suş sıra no	Antimikrobiyaller	Mik değerleri		FİK değerleri		Sonuç
		C GA	Kombinasyon	FİK	FİKİ	
R-1	Kolistin Gliserhizik asit	8 400	4 50	0,5 0,125	0,625	Additif
R-2	Kolistin Gliserhizik asit	16 400	32 200	2 0,5	2,5	İndiferans
R-5	Kolistin Gliserhizik asit	128 400	64 400	0,5 1	1,5	İndiferans
R-6	Kolistin Gliserhizik asit	64 400	128 200	2 0,5	2,5	İndiferans
R-7	Kolistin Gliserhizik asit	8 400	32 200	4 0,5	4,5	Antagonizma
R-8	Kolistin Gliserhizik asit	32 400	256 200	8 0,5	8,5	Antagonizma
R-9	Kolistin Gliserhizik asit	32 400	64 200	2 0,5	2,5	İndiferans
R-10	Kolistin Gliserhizik asit	32 400	128 200	4 0,5	4,5	Antagonizma
R-11	Kolistin Gliserhizik asit	16 400	64 200	4 0,5	4,5	Antagonizma
R-12	Kolistin Gliserhizik asit	32 400	128 200	4 0,5	4,5	Antagonizma
R-13	Kolistin Gliserhizik asit	64 400	32 400	0,5 1	1,5	İndiferans
R-14	Kolistin Gliserhizik asit	8 400	4 12,5	0,5 0,03	0,53	Antagonizma
R-15	Kolistin Gliserhizik asit	16 400	8 200	0,5 0,5	1	Additif
R-16	Kolistin Gliserhizik asit	16 400	128 200	8 0,5	8,5	Antagonizma
R-17	Kolistin Gliserhizik asit	32 800	64 400	2 0,5	2,5	İndiferans
R-18	Kolistin Gliserhizik asit	32 400	128 200	4 0,5	4,5	Antagonizma
R-19	Kolistin Gliserhizik asit	32 400	128 200	4 0,5	4,5	Antagonizma
R-20	Kolistin Gliserhizik asit	32 400	128 200	4 0,5	4,5	Antagonizma
R-21	Kolistin Gliserhizik asit	64 400	256 200	4 0,5	4,5	Antagonizma
R-22	Kolistin Gliserhizik asit	32 400	128 200	4 0,5	4,5	Antagonizma
R-23	Kolistin Gliserhizik asit	8 400	32 200	4 0,5	4,5	Antagonizma
R-24	Kolistin Gliserhizik asit	32 400	128 200	4 0,5	4,5	Antagonizma
R-25	Kolistin Gliserhizik asit	16 800	128 400	8 0,5	8,5	Antagonizma
R-26	Kolistin Gliserhizik asit	16 400	64 200	4 0,5	4,5	Antagonizma
R-27	Kolistin Gliserhizik asit	32 400	128 200	4 0,5	4,5	Antagonizma
R-28	Kolistin Gliserhizik asit	16 400	64 200	4 0,5	4,5	Antagonizma
R-29	Kolistin Gliserhizik asit	32 400	128 200	4 0,5	4,5	Antagonizma
R-30	Kolistin Gliserhizik asit	16 400	64 200	4 0,5	4,5	Antagonizma

Tablo 4.8: Duyarlı grup anlamlı FİKİ hesaplamaları ve sonuçları

Suş sıra no	Antimikrobiyaller	Mik değerleri		FİK değerleri		Sonuç
		C GA	Kombinasyon	FİK	FİKİ	
S-1	Kolistin Glisirhizik asit	1 400	0,5 50	0,5 0,125	0,625	Additif
S-2	Kolistin Glisirhizik asit	1 800	8 12,5	8 0,01	8,01	Antagonizma
S-3	Kolistin Glisirhizik asit	2 400	0,5 100	0,25 0,25	0,5	Sinerjizm
S-4	Kolistin Glisirhizik asit	2 400	1 25	0,5 0,06	0,56	Additif
S-5	Kolistin Glisirhizik asit	2 400	0,5 12,5	0,25 0,03	0,28	Sinerjizm
S-6	Kolistin Glisirhizik asit	2 400	1 50	0,5 0,125	0,625	Additif
S-7	Kolistin Glisirhizik asit	0,5 400	2 200	4 0,5	4,5	Antagonizma
S-8	Kolistin Glisirhizik asit	1 400	1 25	1 0,06	1,06	İndiferans
S-9	Kolistin Glisirhizik asit	1 400	0,12 12,5	0,12 0,03	0,15	Sinerjizm
S-10	Kolistin Glisirhizik asit	0,5 400	0,25 12,5	0,5 0,03	0,53	Additif
S-11	Kolistin Glisirhizik asit	0,25 400	0,12 25	0,48 0,06	0,54	Additif
S-12	Kolistin Glisirhizik asit	0,5 400	0,12 25	0,24 0,06	0,3	Sinerjizm
S-13	Kolistin Glisirhizik asit	0,5 400	0,25 12,5	0,5 0,03	0,53	Additif
S-14	Kolistin Glisirhizik asit	0,25 400	0,12 12,5	0,48 0,03	0,51	Additif
S-15	Kolistin Glisirhizik asit	0,5 400	0,12 25	0,24 0,06	0,3	Sinerjizm
S-16	Kolistin Glisirhizik asit	0,25 800	0,12 12,5	0,48 0,01	0,49	Sinerjizm
S-17	Kolistin Glisirhizik asit	1 400	0,5 12,5	0,5 0,03	0,53	Additif
S-21	Kolistin Glisirhizik asit	0,25 400	0,12 25	0,48 0,06	0,54	Additif
S-24	Kolistin Glisirhizik asit	0,12 400	0,12 12,5	1 0,03	1,03	İndiferans
S-25	Kolistin Glisirhizik asit	0,25 400	0,25 12,5	1 0,03	1,03	İndiferans
S-29	Kolistin Glisirhizik asit	0,25 400	0,25 12,5	1 0,03	1,03	İndiferans
S-31	Kolistin Glisirhizik asit	1 400	0,12 12,5	0,12 0,03	0,15	Sinerjizm
S-33	Kolistin Glisirhizik asit	0,5 400	0,12 50	0,24 0,12	0,36	Sinerjizm
S-37	Kolistin Glisirhizik asit	0,5 400	0,12 12,5	0,24 0,03	0,27	Sinerjizm
S-38	Kolistin Glisirhizik asit	0,12 400	0,12 12,5	1 0,03	1,03	İndiferans
S-39	Kolistin Glisirhizik asit	0,12 400	0,12 12,5	1 0,03	1,03	İndiferans
S-40	Kolistin Glisirhizik asit	0,25 400	0,12 200	0,48 0,5	0,98	Additif
S-42	Kolistin Glisirhizik asit	0,12 400	0,12 12,5	1 0,03	1,03	İndiferans
<i>E.coli</i> ATCC® 25922™	Kolistin Glisirhizik asit	0,25 400	0,12 25	0,48 0,06	0,54	Additif
<i>K.pneumoniae</i> ATCC® 4352™	Kolistin Glisirhizik asit	0,25 400	0,25 12,5	1 0,03	1,03	İndiferans

TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. TARTIŞMA

Klebsiella cinsi mikroorganizmalar insanların ve omurgalıların bağırsak florasında sık olarak kolonize olurlar (110). Günümüzde uzun süreli hastane kalım süreleri ve yoğun antibiyotik kullanımlarından kaynaklı nazokomiyal enfeksiyonlara yol açmaktadır. Sadece ampicilin doğal dirençli olan *Klebsiella* cinsi zamanla B-laktamaz, GSBL, Karbapenamaz gibi enzimler sentezleyerek penisilinlere, sefalosporinlere, karbapenemlere ve hatta kolistine direnç mekanizmaları geliştirmiştir.

Kolistin direnç sorununun kromozomal olarak aktarıldığı biliniyordu, 2015 yılında Çin'de yapılan bir çalışmada domuzlardan izole edilen *E.coli*'lerde MCR-1 plazmid aracılığıyla kolistin direncinin yatay olarak da aktarılacağı raporlanmıştır (2). Sonrasında dünyanın değişik yerlerinden kolistin dirençli *K.pneumoniae* suşlarında MCR-1 varlığı gösterilmiştir (3).

Hayvancılık sektöründe kontrolsüz olarak kolistin kullanımları da dahil olmak üzere yanlış antibiyotik kullanım politikaları kolistin direncinin yaygınlaşmasına yol açmıştır.

Dünya sağlık örgütü,yeni antibiyotik geliştirilmesine rehberlik ve teşvik etmek amaçlı 2017 yılında bir bildiri yayınlamıştır. Bu bildiride patojenler öncelik sırasına göre kritik,yüksek ve orta öncelikli olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Kritik öncelikli grupta karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii* , *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacteriaceae* yer almaktadır (1).

GSBL üreten 9 adet *Klebsiella pneumoniae* izolatının time-kill yöntemiyle sinerji çalışıldığı çalışmada kolistin-tigesiklin ve kolistin-fosfomisin kombinasyonları test edilmiştir. Kolistin-tigesiklin kombinasyonu ½ MIC değerlerinde test edildiğinde n=8 (%81,8) suşta sinerjistik etkinlik saptanmış

olup, kolistin-fosfomisin için $\frac{1}{2}$ MIC değerlerinde test edildiğinde n=5 (%55) suşta sinerjistik etkinlik saptanmıştır (111).

Gaibani ve arkadaşlarının 9 kolistin duyarlı ve 8 adet dirençli KPC içeren *Klebsiella pneumoniae* dama tahtası yöntemiyle kolistin ile birlikte tigesiklin, rifampisin, meropenem ve teikoplanin kombine aktivitesini test etmişler. Duyarlı 9 adet suşta tüm antibiyotik kombinasyonlarında indifferans etki gözlenmiştir. Dirençli suşlarda ise kolistin-tigesiklin kombinasyonunda 2 adet suşta, kolistin rifampisin için 8 suşun tamamında sinerjistik etki gözlemlenirken, kolistin-meropenem ve kolistin-teikoplanin kombinasyonlarında 8 suşun tamamında indifferans etki gözlemlenmiştir(112). KPC içeren 13 adet *K.pneumoniae* ile dama tahtası yöntemi kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise kolistin ile birlikte rifampisin, gentamisin, meropenem, imipenem ve tigesiklin kombine etkinliği değerlendirilmiştir. Rifampisinle birlikte etkinliğinde suşların tamamında sinerjistik etkinlik belirlenirken, gentamisin, meropenem, imipenem ve tigesiklin kullanılan kombinasyonlarda 5'er suşta sinerjistik etkinlik saptanmıştır. Hiçbir suşta antagonistik etkinlik tespit edilmemiştir(113). Laisram ve arkadaşlarının 50 adet *K.pneumoniae* dama tahtası yöntemi kullanarak kolistin-meropenem kombinasyonu test ettikleri çalışmada ise 14 (%28) sinerjizm, 36 (%72) indifferans bulunmuştur. 8 adet kolistin dirençli suşun 4 (%50)'ünde, duyarlı suşlarda ise 10 (%45,2)'unda sinerji saptanmıştır (p=1,0) (114). Bizim çalışmamızda ise kolistin direnç grupları arasında anlamlı farklılıklar saptanmıştır.

Dündar ve arkadaşlarının ülkemizde 10 adet *K.pneumoniae* üzerinde dama tahtası yöntemiyle yaptıkları çalışmada ise kolistin-imipenem 4/10 (%40) sinerjizm, kolistin-tigesiklin 7/10 (%70) oranında sinerjizm ve 1/10(%10)'unda antagonizma gözlendi(115).

Evren ve arkadaşlarının ülkemizde yaptıkları bir çalışmada ise OXA-48 içeren 12 adet karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatında dama tahtası yöntemiyle yaptıkları çalışmada fosfomisinin imipenem,meropenem,kolistin ve tigesiklin ile kombine etkisini incelemişlerdir, fosfomisin-kolistin kombinasyonunun tamamında antagonistik etki gözlemlenmişlerdir. Aynı çalışmadaki diğer kombinasyonlarda imipenemde 5 adet sinerjizm,

meropenemde 4 adet sinerjizm, tigesiklinde ise 4 suşta sinerjistik etki tespit edilmiştir (116).

Samonis ve arkadaşlarının 50 adet serin türevi karbapenamaz üreten ve 14 adet GSBL üreten *K.pneumoniae* içeren çalışmasında ise gradient-strip test kullanılarak yapılan sinerjizm çalışmasında ise fosfomisin-kolistin kombinasyonu çalışılmıştır. 14 GSBL içeren *K.pneumoniae*'dan 1 (%7) tanesinde, 50 serin türevi karbapenamaz üreten suşlarda ise 21 (%42)'sinde sinerjizm saptanmıştır, çalışılan 64 *K.pneumoniae*'da antagonizma gözlenmemiştir (117). Fosfomisin kombine çalışmasında farklılıklar *K.pneumoniae*'ların farklı direnç mekanizmaları geliştirmelerinden veya yöntemsel olarak farklı çalışılmasından kaynaklanmış olabilir.

Yunanistanda çok merkezli çalışmayla toplanan 100 adet kolistin dirençli *K.pneumoniae* ile dama tahtası yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada kolistin-azidotimidin kombinasyonu test edilmiştir. 79 adet suşta sinerjizm , 21 adet suşta ise additif etki saptanmıştır. İndiferans ve antagonistik etkili suş saptanmamıştır (118). Hu ve arkadaşlarının *Enterobacteriaceae*'lar üzerinde yaptıkları çalışmada suşlar çok merkezli olarak toplanarak 67 (36 adet *E.coli*, 31 adet *K.pneumoniae*) suş dama tahtası yöntemi kullanılarak kolistin azidotimidin çalışılmıştır. FİKİ değer hesaplamalarına göre *K.pneumoniae*'ların %87,1'inde sinerjizm saptanmıştır (119). Rutinde HIV tedavisinde kullanılan azidotimidini, viral genom replikasyonu inhibe ederek etki göstermektedir, bu çalışmalardaki sinerjizm ve additif etkinin potansiyelinin nedeni kolistinın memran geçirgenlik artışıyla lipofilik olan azidotimidin hücre içine daha fazla girerek genom replikasyon inhibe etmesinden kaynaklı olabilir.

Rahim ve arkadaşlarının NDM içeren MDR 4 adet *K.pneumonia* ile time-kill yöntemi kullanılarak kullanılarak kolistin-kloramfenikol kombinasyonunu test etmişlerdir. Kolistin 0,5-2 mg/ml, kloramfenikol 4-8-16-32 mg/ml konsantrasyonlarında farklı 10 kombinasyon 0-0,5-1-2-4-6-24 saatlik zaman dilimlerinde üremeleri logaritmik olarak değerlendirilmiş ve ölçüm saptanan 28 noktanın 25'inde sinerjistik aktivite gözlemlenmiştir. Bu çalışmada seçilen bir adet suş taramalı elektron mikroskopide bakteri morfolojide kombinasyon

uygulandığında ciddi yüzey hasarı gözlemlendi, sinerjistik aktivite gözle görülür olarak da tespit edilmiştir (120).

Stein ve arkadaşlarının KPC içeren 20 adet *K.pneumoniae*'da dama tahtası yöntemi kullanarak kolistin, tigesiklin ve meropenem 3'lü kombinasyonlarını test etmişlerdir. Kolistin-meropenem kombinasyonu 11 suшта, kolistin-tigesiklin kombinasyonu 13 suшта, kolistin-tigesiklin-meropenem kombinasyonu 10 suшта FİKİ değeri hesaplamasına göre sinerjizm tespit edilmiştir (121).

Özbek ve arkadaşlarının ülkemizde yaptıkları başka bir çalışmada ise *Enterobacteriaceae* (24 *K.pneumoniae*, 6 *E.coli*, 10 *E.cloacae*) ile dama tahtası yöntemi kullanarak kolistin ile birlikte tobramisin ve tigesiklin kombine etkinlik çalışmışlardır. Kolistin-tobramisin 9 (%23) ve kolistin-tigesiklin 4 (%10) suшта sinerjistik etkinlik saptanmıştır (122).

İnvitro çalışmalar dışında kolistin kombine terapi çalışmaları klinik olarak da gerçekleştirilmiştir. Örneğin KPC içeren *K.pneumoniae* ile enfekte 18 hastanın olduğu bir çalışmada tigesiklinle kombine terapi alan hastalar monoterapi alan gruba göre %73-%14 daha fazla sağ kalım oranlarına sahiptir (123). Kolistin-tigesiklin kombine çalışılan 35 hastada yapılan başka bir çalışmada ise invitro duyarlı antibiyotikle tedavi edilmiştir. Kolistin-tigesiklin kombine tedavi alan 9 hasta grubunda ölüm görülmezken monoterapi alan grupta 15 hastanın 7'si (%46,7) ölüm görüldü ($p=0,001$) (124). Retrospektif olarak KPC içeren *K.pneumoniae* 125 hastanın mortalite oranlarının değerlendirildiği bir çalışmada ise monoterapi alan grupta 25/46 (%54,3) kombine terapi alan grupta ise 27/79 (%34,1) mortalite oranları gözlemlenmiştir. Bu çalışmada en çok kullanılan kolistin-tigesiklin (23 hasta) ve kolistin-tigesiklin-meropenem (16 hasta) kombinasyonları olmuştur. Kolistin-meropenem kombinasyonu incelendiğinde meropenem MIC4 olan grupta tedavide daha iyi sonuçlar elde edilmiş (125). Son olarak kan kültüründe *K.pneumoniae* (%79,5 KPC içeren) üreyen 205 hastanın incelendiği bir çalışmada mortalite oranları monoterapide %44,4 iken kombine terapide %27,2 olarak bulunmuştur. Karbapenem kombinasyon rejimleri incelendiğinde Tumbarello ve arkadaşlarının çalışmasındaki gibi düşük MİK değerlerine sahip hastalar daha düşük mortalite oranlarına sahiplerdir (126). İnvitro çalışmalar dışında

invivo çalışmalarda sinerjizmin varlığını desteklemektedir. Kombine antibiyotik kullanımı mortalite oranlarını düşürmesinin yanında direnç gelişimini önleyici ve düşük dozda etkinlik gösterebilmesinden kaynaklı antibiyotiğe bağlı toksisiteyi önleyici etki gösterebilir.

2015 yılında Çin'den yayınlanan MCR-1 plazmid varlığı kolistin direncinin anlaşılmasında önemli bir çalışmadır (2). Zhou ve arkadaşlarının *Cnidium Monnieri* bitkisinin kurutulmuş kökünden elde edilen osthole (7-methoxy-8-(3-methyl-2-butenyl)) maddesini MCR-1 pozitif ve negatif suşlarda kolistinle birlikte dama tahtası yöntemi kullanarak kombine etkinliğini çalışmışlardır. Çalışılan MCR-1 (+) 4 adet *K.pneumoniae* suşunda sinerjistik etkinlik gözlemlenirken , MCR-1(-) 2 adet *K.pneumoniae* suşunda sinerjizm gözlenmemiştir. Osthole MCR-1'e bağlanarak onun biyolojik aktivitesini inhibe etmiştir (127).

Yine Çinde yapılan bir başka çalışmada ise 8 adet *K.pneumoniae* (5 adet MCR-1 (+), 3 adet MCR(-)) time-kill ve invivo enfeksiyon modeli oluşturarak potansiyel MCR-1 inhibitörü olan pterostilben ile birlikte diğer antibiyotikler kombine çalışılmıştır. Sadece kolistin ile kombine olan çalışmada sinerjizm gözlenmiş olup, MCR-1(+) olan grupta 5/5 sinerjizm, MCR-1 (-) 1/3 sinerjizm tespit edilmiştir. İnvivo enfeksiyon modelinde de buna benzer sonuç elde edilmiştir (128).

Fransada Okdah ve arkadaşlarının 55 adet kolistin dirençli *Enterobacteriaceae* üzerinde yaptıkları çalışmada 27 adet *K.pneumoniae* (7 adet MCR-1(+), 20 adet MCR-1(-) dama tahtası yöntemiyle kolistin-sülfadiazin kombinasyonu çalışılmıştır. Kolistin-sülfadiazin kombinasyonunda 18/27 (%66,7) oranında sinerjizm saptanmış olup, 7 adet MCR-1 (+) *K.pneumoniae*'nın 4 tanesinde (%57,1) MCR-1 (-) olan 20 suşta ise 14 (%70)'ünde sinerjizm saptanmıştır (129). Bizim çalışmamızda ise kolistin dirençli suşlarda MCR-1 varlığı çalışılmadığı için glisirhizik asitin MCR-1 ile olası etkileşimlerinden söz etmemiz mümkün değildi.

Betts ve arkadaşlarının İngilterede yaptıkları çalışmada 7 adet çoklu ilaç dirence sahip *E.coli*'yi kolistin ile kombine olarak $[Mn(CO)_3(tpa-\kappa 3N)]Br$ bileşimini dama tahtası ve time-kill yöntemi kullanarak etkinlik çalışmışlardır.

$[Mn(CO)_3(tpa-\kappa^3N)]Br$ bileşigi karbon monoksit salınımı gerçekleştiren bir biyokimyasal bileşiktir. Antibakteriyel etkinlik mekanizması tam olarak bilinmesede hidroksi radikal üretimi, metal iyonu alımının etkileşimi ve sitokromlara karbon monoksit bağlanması nedeniyle zarın bozulması yaparak antibakteriyel etkinlik yaptığı düşünülmektedir. Dama tahtası ve time-kill çalışılan suşların tamamında sinerjizm saptanmıştır (130).

Cerageninler endojen antimikrobiyal peptidlere benzer amfilik morfolojide modifiye edilmiş safra asit türevidir. Antimikrobiyal peptid (AMP)'lere benzer şekilde cerageninlerde çoğu bakteri ailesine karşı bakterisid etkinlik gösterirler. Çelik ve arkadaşlarının farklı direnç gruplarına sahip 6 *K.pneumonia* ile time-kill yöntemiyle yaptıkları çalışmada kolistin ve meropenem ile değişik ceragenin türevlerinin kombine etkinliğini değerlendirmişlerdir. Sinerji ve antagonizma durumları cfu/ml 2 log10 artış veya düşüşe göre hesaplanmıştır. Kolistin ile CSA-13 (katyonik steroid antibiyotik) kombine çalışmasında 6 suştada sinerjizm saptanırken, CSA-131 ile yapılan çalışmada 3 suшта sinerjizm gözlenmiştir. Hiçbir ölçümde antagonizma gözlenmemiştir (131).

Dışa atım pompaları antibiyotiklere direnç mekanizmalarından biridir. Güncel tedavilere direnç gelişimi nedeniyle rutinde kullanılmayan dışa atım pompa inhibitörleriyle alakalı çalışmalar artmaktadır. Karbonil siyanid m-klorofenil hidrazon (CCCP) dışa atım pompa inhibitörlerinden biridir. CCCP – kolistin ile kombine etkinliğin time-kill yöntemiyle 5 adet Gram negatif (*K. pneumoniae* FHM169, *E. coli* 44A (mcr-1 pozitif), *Proteus vulgaris* P97, *Enterobacter asburiae* LH74 ve *K. pneumoniae* KP4CR) ile yaptıkları çalışmada tüm suşlarda bakteriyostatik etkinlik saptamışlardır. İlginç olarak farklı direnç mekanizmalara sahip örnekler arasında time-kill yöntemine göre bir farklılık gözlenmemiştir (132).

Çoklu dirençli izolatlarda antimikrobiyal etkinliği olmayan adjuvan küçük moleküllü bileşikler kombine olarak kullanılmaktadır. AR-12 Ohio state üniversitesinden geliştirilmiş selekoksib türevinde siklooksijenaz-2 (COX-2)'yi inhibe etmeyen ve otofajiye neden olan küçük bir moleküldür (133). Kolistin ile AR-12 kombine etkinliğini time-kill yöntemiyle değerlendirildiği bir

çalışmada *A.baumannii* ve *K.pneumoniae* üzerinde sinerjistik etkinliğinin olduğu tespit edilmiştir (134).

Protegrinler, geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite sergileyen, katisidin ailesine ait bir peptiddir. 15 adet kolistin duyarlı, 4 adet dirençli *A.baumannii* ile dama tahtası ve time-kill yöntemlerini kullanılarak Protegrinler (PG-1) ile yapılan çalışmada suşların tamamında sinerjizm gözlenmiştir (135).

Modifiye prolin bakımından zengin antimikrobiyal peptidlerin Gram negatif bakteriyemiden koruduğu gösterilmiştir (136). A-3 APO'da doz bağımlı olarak *E.coli* ve *Acinetobacter baumannii* etkinliği olan, bakteriyel ısı şok proteini DnaK'yı inhibe ederek toksin üretiminin yanı sıra dirençten sorumlu enzimlerin protein katlanmalarını da inhibe ederek özellik gösterir. *K. pneumoniae* (K97/09) ve *A. baumannii* (BAA-1605) kolistin ile A-3 APO kombine etkinliği dama tahtası yöntemiyle çalışılmış ve sinerjistik etki gösterdiği gözlenmiştir (137).

Meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra*) ayurveda antik tıp tarihinin en yaygın kullanılan bitkilerinden biridir. Antibakteriyel etkinliğinin yanı sıra antiviral, antineoplastik, immünomodülatör, antialerjik etkilerini araştırmalarda son yıllarda artmaktadır. Glisirhizik asit meyan kökündeki saponin türevi asitlerden biridir. *Glycyrrhiza glabra*'nın metanolle ekstrekte edilip glisirhizik asit ile etkinlik karşılaştırmasının yapıldığı bir çalışmada sıvı mikrodilüsyon ve time-kill yöntemiyle çalışılmıştır. MDR'li *P.aeruginosa* kullanıldığı çalışmada sıvı mikrodilüsyon sonucu MİK değerleri glycyrrhiza glabranın ekstraktı için 200 g/ml iken minimum bakterisidal konsantrasyon (MBC) 800 µg/ml bulunmuştur, glisirhizik asit için MİK değeri 100 µg/ml iken MBC 400 µg/ml bulunmuştur. Time-kill yöntemiyle hem ekstraktın hemde glisirhizik asitin etkinliği amikasin kontrolüyle benzer şekilde etki göstermiştir (104). Bizim çalışmamızdaki *K.pneumoniae*'larda saptanan glisirhizik asit MİK değerleri suşlarının tamamına yakınında 400 µg/ml olarak tespit edilmiştir.

Oral mikroorganizmalar ve özellikle *S.mutans* diyet ile alınan sakrozu diş minelerine zararlı laktik aside dönüştürerek ve glukozu glukanlara dönüştüren glukozil transferaz enzimi aracılığıyla dişlere yapışmasını

sağlayarak plak oluşturup diş çürümelerine sebep olur. Segal ve arkadaşlarının invitro olarak yaptıkları çalışmada glisirhizik asidin bir türevi olan glycyrrhizin sükroz varlığında bile *S.mutans* adherensi üzerinde anlamlı engelleyici etkinliğini tespit ettiler. Gıda sektöründe tatlandırıcı olarak kullanılan glisirhizik asitin bu etkisi diş çürüklerini önleyici olabilmesi nedeniyle önemli bir bulgudur (96).

Isıya duyarlı enterotoksin (LT) Entero toksijenik *E.coli* (ETEC)'in başlıca virülans faktörüdür ve iki birimden oluşur. A birimi (LTA) bağırsak epitel hücrelerinde cAMP seviyesini artırarak hücrelerden büyük miktarda sıvı ve iyon kaybına neden olur. B birimi (LTB) ise bağırsak epitelyum hücrelerinde gangliozite (GM-1) reseptörüne bağlanarak toksinin işlev görmesinde önemlidir. Chen ve arkadaşları invitro olarak ETEC toksininin LTB ünitesinin glycyrrhizin ile birlikte yarışmalı reaksiyonunu ELİSA yöntemiyle ölçülmüştür. glycyrrhizin LTB bağlanmasını önemli ölçüde inhibe ettiğini saptamışlardır (IC50 3.26 ± 0.17 mM) (138).

Snowden ve arkadaşlarının birçok farklı medikal önemi olan bitkileri Stafilocoklar üzerinde yaptıkları çalışmada glycyrrhiza glabra kökleri kurutulduktan sonra toz halleri %95 etanolde ekstrakte edilip hazırlandı. Antibakteriyel etkinlik ölçümü için Stafilocok aureus ATCC 11632'nolu suşu kullanılmış olup, antibiyotik kontrolü için vankomisin ve tetrasiklin kullanılmıştır. *Glycyrrhiza glabra* orta düzeyde etkili bulunmuş olup, MİK değeri 2700 µg/ml olarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ise *Glycyrrhiza glabra*'dan elde edilmiş saf saponin türevi glisirhizik asit kullanılmış olup *K.pneumoniae* üzerinde 400 µg/ml MİK değeri göstermiştir (139).

Oral patojenler üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra*) ekstraktı kullanmışlardır. Meyan kökü 25 °C'de kurutulduktan sonra toz haline getirilip, 72 saat boyunca %80 lik etanolla ekstrakte edildi, ardından son kalan kısım konsantre edilerek kullanıldı. Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle çalışılan sonuçlarda *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus* ve *Enterococcus faecalis* için MİK 12.5 mg/ml, *Escherishia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus sanguis* için MİK 50 mg/ml olarak tespit edilmiştir (140).

Brej ve arkadaşlarının klinik örneklerden izole edilen MRSA üzerinde yaptıkları çalışmada ise *G.glabra*'nın ekstrakte edilebilen 18-glisirhetinik asid bileşiminin antibakteriyel etkinliğini dama tahtası yöntemi kullanarak çeşitli antibiyotiklerle kombine etkinliğini değerlendirmişlerdir. Tobramisin, gentamisin, amikasin ve polimiksin B ile sinerjistik etkinlik olduğu tespit edilirken, amoksisilin, metisilin, siprofloksasin ile additif etki gözlenirken, sefuroksim, doksisisiklin, siprofloksasin, eritromisin ile indiferans etkileşim gözlemlendi. Hiçbir antibiyotik ile antagonizma etkileşimi gözlenmemiştir (141).

Bizim çalışmamızda glisirhizik asitin, kolistin duyarlı ve dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında kolistin ile kombine kullanımının etkinliği dama tahtası yöntemiyle çalışılmıştır. Elde ettiğimiz MİK değerleri baz alınarak hesaplanan FİK indekslerine göre; dirençli suş grubundaki 30 suştan 19'unda (%63,3) antagonizma, 6'sında (%20) indiferans, 3'ünde (%10) additif etkinlik saptanırken hiç bir suşta sinerjistik etkinlik saptanmadı. Duyarlı suş grubunda ise 30 suşun 2'sinde (%6,7) antagonistik, 7'sinde (%23,3) indiferans, 10'unda (%33,3) additif, 9'unda (%30) sinerjistik etkinlik gözlemlenmiştir. Bu veriler baz alınarak istatistiksel olarak karşılaştırıldığında dirençli grupta antagonizma, duyarlı grupta ise sinerjistik ve additif etkinlik oranları diğer gruba göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Kolistin duyarlı grupta, kolistin ile glisirhizik asit arasında yüksek oranda sinerjistik veya additif etki gözlenirken, kolistin dirençli grupta bu iki bileşik arasındaki ilişkinin büyük oranda antagonizma yönüne dönmesi çalışmamızın dikkate çeken verilerinden birisidir. Bizim çalışmamızda kolistin dirençli gruptaki suşların hepsi çoklu ilaç direncine sahiptir. Bundan dolayı duyarlı gruptan farklılıkları sadece kolistine dirençli olmaları ile sınırlı kalmayıp, sefalosporinler ve karbapenemler gibi diğer antibiyotiklere de dirençlidirler. Buradan hareketle iki grubun kolistin ile glisirhizik asit kombinasyonlarına farklı şekillerde yanıt vermesi sadece kolistin direncine neden olan bakteri dış membrandaki lipid A kısmındaki net negatif yükün azalmasından kaynaklı olmayıp, sefalosporin ve karbapenem direncine yol açabilen betalaktamaz üretimi, porin defektleri, effluks pompaları gibi ek

diğer mekanizmaların da katkısı ile meydana gelmiş olabilir. Bu farklılığın daha iyi aydınlatılabilmesi için farklı direnç mekanizmalarına göre dizayn edilmiş kontrol grupları ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.



5.2. TEZİN KISITLILIKLARI

Bu çalışmada kısıtlı sayıda köken kullanılmıştır, ileriki çalışmalarda daha fazla sayıda ve antibiyotik direnç profilleri karşılaştırıldığında farklı direnç gruplarındaki içeren çalışmalar yapılabilir. Bizim çalışmamızda kolistin-glisirhizik asit kombine etkinliği sadece ampisilin doğal dirençli ve çoklu ilaç direncine sahip *K.pneumoniae*'lar üzerinde gerçekleştirildi. Gelecekte yapılacak olan çalışmalarda sadece GSBL içeren ve GSBL+karbapenamaz üreten *K.pneumoniae* grupları üzerinde çalışılması direnç yapısına göre kombine etkinlik farkını açıklayabilir.

Antibakteriyellerin etkinliklerini değerlendirirken birden fazla metod kullanılabilir. Disk difüzyon, gradient strip test, dama tahtası mikrodilüzyon, time-kill. Bu yöntemler ve bu çalışmalardaki sonuçların farklı olarak değerlendirilmesi elde edilen sonuçların tartışılabilirliğini zorlaştırmaktadır. Kombine etkinlik çalışmalarında altın standart yöntem time-kill yöntemi olup zamana bağlı öldürme kinetiği tespit edilerek kombine etkinlik daha doğru olarak gözlemlenebilmektedir. Bizim çalışmamızda ise dama tahtası yöntemi kullanılmıştır, gelecekte yapılacak olan çalışmalarda kolistin-glisirhizik asit kombinasyonunun time-kill yöntemiyle de incelenmesi daha doğru sonuçlar verecektir.

Kombine etkinlik çalışılan suşların moleküler olarak (GSBL tipi, karbapenamaz tipi, MCR-1 varlığı) klonal analizinin yapılması gerekmektedir. Bizim çalışmamızda ise suşlar sadece antibiyotik direnç profillerine göre gruplandırılmış olup mevcut antagonizma, sinerji ve aditif etki durumlarının mekanizmaları hakkında sınırlı yorum yapabilmekteyiz. Gelecekte planlanacak olan çalışmalarda suşların moleküler analizinde yapılması *in vivo* çalışmalardaki başarı oranını artıracaktır ve rutin kullanımda kolistin ile birlikte kombine kullanılacak yeni antibakteriyellerin keşfini kolaylaştıracaktır.

5.3. SONUÇ

Günümüzde kolistin nazokomiyal enfeksiyonlarda Gram negatif bakteriler için son defans hattını oluşturmaktadır. Hastalar rutin antibiyogram sonuçlarına göre kolistin dirençli suşlar bile kolistin ile diğer antibiyotikler kombine kullanılarak tedavi edilmeye çalışılmaktadır. Özellikle kolistin-karbapenem, kolistin-amikasin, kolistin- tigesiklin kombinasyonları yoğun bakım ünitelerinde çoklu ilaç direnci barındıran Gram negatif hastalarda sıkça kullanılmaktadır. Artan kolistin direnç oranları ve güncel tedavilere yeni keşfedilen antibiyotik eklenememesi bizi kolistinle birlikte kombine etkinliği bulunan maddeleri araştırma zorunluluğu getirmektedir.

Bizim çalışmamızda kolistin dirençli ve duyarlı *K.pneumoniae* suşları üzerinde kolistin-glisirhizik asit kombine etkinliği değerlendirilmiştir. Kolistin dirençli suşlarda antagonizma, kolistin duyarlı suşlarda ise additif ve sinerjistik etkinlik ön planda saptanmıştır. Buradan yola çıkarak kolistin dirençli enfeksiyonlarda, gıda sektöründe tatlandırıcı olarak kullanımı yaygın olan glisirhizik asitin kullanımının kolistin etkinliğinde antagonistik etkinlik gösterebileceğini söyleyebiliriz. Buna karşın kolistin duyarlı suşlarda sinerjizm ve additif etkinlik ön planda olduğundan glisirhizik asit bileşiği içeren maddelerin tüketimi kolistin etkinliğini arttırabilir.

Son yıllarda kolistin direnç sorununa yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Çoklu antibakteriyel ajanlarla yapılan kombinasyon çalışmalarında, birbiri ile çelişkili sonuçlar görülebilmektedir. Bazı çalışmalarda etkili görülen antibiyotik kombinasyonu, diğer çalışmalarda etkisiz olarak bulunabilmektedir. Bu farklılığın, kullanılan test metodu ve antibakteriyel maddelerin standart bir prosedür içerisinde uygulanmamasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. İleriki çalışmaların daha sağlıklı ve tutarlı sonuç verebilmesi için, direnç mekanizmaları moleküler olarak ispatlanmış suşlarla, aynı özelliklere sahip etken maddeler kullanılarak invivo ve invitro çalışmaların yapılması gerekli olduğu kanaatindeyiz.

Kaynaklar

1. Organization WH. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [Generic]. World Health Organization; 2017.
2. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):161–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26603172>.
3. Sun J, Zhang H, Liu YH, Feng Y. Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. *Trends Microbiol*. 2018;26(9):794–808. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29525421>.
4. Pastorino G, Cornara L, Soares S, Rodrigues F, Oliveira M. Liquorice (*Glycyrrhiza glabra*): A phytochemical and pharmacological review. *Phytother Res*. 2018;32(12):2323–2339. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30117204>.
5. Ustaçelebi e. Temel ve klinik mikrobiyoloji. Güneş kitabevi; 1999.
6. Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51(Pt 3):925–32. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11411716>.
7. Trevisan VJAdAFMSiMS. Caratteri di alcuni nuovi generi di Batteriacee. *Rend Ist Lombardo Accad Sci Lett Sez (ser 2)*. 1885;4(3):92–107.
8. Von Frisch A. Zur aetiologie des rhinoskleroms. *Wien Med Wochenschr*. 1882;32:969–82.
9. Trevisan VJRILASLS. Sul micrococco della rabia e sulla possibilità di riconoscere durante il periodo d'incubazione, dall'esame del sangue della persona morsicata, se ha contratta l'infezione rabbica. *Rend Ist Lombardo Accad Sci Lett Sez (ser 2)*. 1887;20:88–105.

10. Abel RJZBAI. Bakteriologische studien über Ozaena simplex. *Zbl Bakteriol Abt.* 1893;13:161–173.
11. [Generic]; 1923.
12. Friedländer CJVA. Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. *Virchows Archiv.* 1882;87(2):319–324.
13. Brisse S, Grimont F, Grimont PAPVtGS. The genus klebsiella. *Gamma Subclass.* 2006;p. 159–196.
14. Szramka B, Kurlenda J, Bielawski K. [Hemolytic activity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*]. *Med Dosw Mikrobiol.* 1998;50(3-4):207–13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10222735>.
15. Greenwood D, Slack RC, Barer MR, Irving WL. Medical Microbiology E-Book: A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control. With STUDENT CONSULT Online Access. Elsevier Health Sciences; 2012.
16. Bilgehan H. Klinik mikrobiyolojik tanı. Fakülteler Kitapevi, Barış yayınları; 2009.
17. Hansen DS, Mestre F, Albertí S, Hernández-Allés S, Álvarez D, Doménech-Sánchez A, et al. *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide O typing: revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries. *Journal of clinical microbiology.* 1999;37(1):56–62.
18. Ørskov I, FIFE-ASBURY MAJIJoS, Microbiology E. New *Klebsiella capsular* antigen, K82, and the deletion of five of those previously assigned. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 1977;27(4):386–387.
19. Koneman EW, Allen S. Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas. Ed. Médica Panamericana; 2008.
20. Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol.* 2014;9(9):1071–81. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25340836>.
21. Murphy CN, Mortensen MS, Krogfelt KA, Clegg SJI, immunity. Role of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing

- silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. *Infection and immunity*. 2013;81(8):3009–3017.
22. Williams P, Tomas JJRMM. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Med Microbiol*. 1990;1:196–204.
23. Griffiths EJI, infection. The iron-uptake systems of pathogenic bacteria. *Iron and infection*. 1987;p. 69–137.
24. El Fertas-Aissani R, Messai Y, Alouache S, Bakour R. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathol Biol (Paris)*. 2013;61(5):209–16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23218835>.
25. Podschun R, Ullmann UJCmr. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews*. 1998;11(4):589–603.
26. Szilágyi E, Füzi M, Böröcz K, Kurcz A, Tóth A, Nagy K. Risk factors and outcomes for bloodstream infections with extended-spectrum - lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*; Findings of the nosocomial surveillance system in Hungary. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*. 2009;56(3):251–262.
27. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *New England Journal of Medicine*. 2014;370(13):1198–1208.
28. Suetens C, Hopkins S, Kolman J, Diaz Högberg LJPpsohai, ECDC auiEachS. European Centre for Disease Prevention and Control. 2013;.
29. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases: 2-Volume Set. vol. 1. Elsevier Health Sciences; 2014.
30. Heritage J, M'Zali FH, Gascoyne-Binzi D, Hawkey PM. Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 1999;44(3):309–18. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10511397>.
31. Barlow M. In: What antimicrobial resistance has taught us about horizontal gene transfer. Springer; 2009. p. 397–411.

32. Burgess DS, Rapp RPJAJoHSP. Bugs versus drugs: addressing the pharmacist's challenge. 2008;65:S4–S15.
33. Perez F, El Chakhtoura NG, Papp-Wallace KM, Wilson BM, Bonomo RA. Treatment options for infections caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: can we apply “precision medicine” to antimicrobial chemotherapy? *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2016;17(6):761–781.
34. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis*. 1988;10(4):677–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3055168>.
35. Kong KF, Schneper L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS*. 2010;118(1):1–36. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20041868>.
36. Deniz G. β -Laktamazların Sınıflandırılması. *FLORA İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi*. 1997;.
37. Rawat D, Nair D. Extended-spectrum beta-lactamases in Gram Negative Bacteria. *J Glob Infect Dis*. 2010;2(3):263–74. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20927289>.
38. Weldhagen GF. Sequence-selective recognition of extended-spectrum beta-lactamase GES-2 by a competitive, peptide nucleic acid-based multiplex PCR assay. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(9):3402–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15328103>.
39. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Mangold P, Amann S, Akalin E, et al. Characterization of beta-lactamase gene blaPER-2, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Antimicrobial agents chemotherapy*. 1996;40(3):616–620.
40. Nordmann P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(1):104–14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8141562>.
41. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(3):573–81. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10049269>.

42. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(3):622–32. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10681329>.
43. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a Class A -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with Increased Hydrolysis of Imipenem. *Antimicrobial agents chemotherapy*. 2001;45(9):2598–2603.
44. Bonnet R, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, De Champs C, Viallard JL, et al. A novel class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(11):3061–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11036023>.
45. Silva J, Aguilar C, Ayala G, Estrada MA, Garza-Ramos U, Lara-Lemus R, et al. TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(4):997–1003. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10722503>.
46. Matsumoto Y, Inoue M. Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(2):307–13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9925524>.
47. Giakkoupi P, Tzouveleki LS, Tsakris A, Loukova V, Sofianou D, Tzelepi E. IBC-1, a Novel Integron-Associated Class A -Lactamase with Extended-Spectrum Properties Produced by an *Enterobacter cloacae* Clinical Strain. *Antimicrobial agents chemotherapy*. 2000;44(9):2247–2253.
48. Mavroidi A, Tzelepi E, Tsakris A, Miriagou V, Sofianou D, Tzouveleki L. An integron-associated -lactamase (IBC-2) from *Pseudomonas aeruginosa* is a variant of the extended-spectrum -lactamase IBC-1. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001;48(5):627–630.
49. Decousser JW, Poirel L, Nordmann P. Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(12):3595–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11709346>.

50. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(4):1151–61. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257029>.
51. Arnold RS, Thom KA, Sharma S, Phillips M, Johnson JK, Morgan DJ. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing bacteria. *Southern medical journal*. 2011;104(1):40.
52. KILIÇ m, DEMİRAY T, ALTINDİŞ MJAD. Karbapenemaz ureten *Enterobacteriaceae* izolatlarının saptanmasında fenotipik ve genotipik metotlar. *Ankem Derg*. 2016;30(2):62–75.
53. Control CfD, Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Centres for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services; 2013.
54. Daly MW, Riddle DJ, Ledebner NA, Dunne WM, Ritchie DJ. Tigecycline for treatment of pneumonia and empyema caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Pharmacotherapy*. 2007;27(7):1052–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17594211>.
55. Petrosillo N, Giannella M, Lewis R, Viale P. Treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: the state of the art. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013;11(2):159–77. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23409822>.
56. Pournaras S, Vrioni G, Neou E, Dendrinos J, Dimitroulia E, Poulou A, et al. Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Enterobacteriaceae* strains by time-kill assay. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;37(3):244–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21236643>.
57. Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, Di Pilato V, Arena F, Conte V, et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrobial agents chemotherapy*. 2014;58(10):5696–5703.
58. Cannatelli A, Santos-Lopez A, Giani T, Gonzalez-Zorn B. Polymyxin resistance caused by mgrB inactivation is not associated with significant biological cost in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents chemotherapy*. 2015;59(5):2898–2900.

59. Villa L, Feudi C, Fortini D, Garcia-Fernandez A, Carattoli A. Genomics of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 512 clone highlights the role of RamR and ribosomal S10 protein mutations in conferring tigecycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(3):1707–12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24379204>.
60. Stansly PG, Schlosser ME. Studies on Polymyxin: Isolation and Identification of *Bacillus polymyxa* and Differentiation of Polymyxin from Certain Known Antibiotics. *J Bacteriol.* 1947;54(5):549–56. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16561391>.
61. Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *International journal of antimicrobial agents.* 2005;25(1):11–25.
62. Chen LF, Kaye D. Current use for old antibacterial agents: polymyxins, rifamycins, and aminoglycosides. *Infectious Disease Clinics.* 2009;23(4):1053–1075.
63. Yahav D, Farbman L, Leibovici L, Paul M. Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(1):18–29. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22168320>.
64. Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, et al. Bloodstream infections due to extended-spectrum -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for mortality and treatment outcome, with special emphasis on antimicrobial therapy. *Antimicrobial agents chemotherapy.* 2004;48(12):4574–4581.
65. Nation RL, Velkov T, Li J. Colistin and polymyxin B: peas in a pod, or chalk and cheese? *Clin Infect Dis.* 2014;59(1):88–94. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24700659>.
66. Velkov T, Thompson PE, Nation RL, Li J. Structure activity relationships of polymyxin antibiotics. *Journal of medicinal chemistry.* 2009;53(5):1898–1916.
67. He J, Ledesma KR, Lam WY, Figueroa DA, Lim TP, Chow DS, et al. Variability of polymyxin B major components in commercial formulations. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(3):308–10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20045285>.

68. Barnett M, Bushby SR, Wilkinson S. Sodium Sulphomethyl Derivatives of Polymyxins. *Br J Pharmacol Chemother*. 1964;23(3):552–74. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14256814>.
69. Biswas S, Brunel JM, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Rolain JMJeroait. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. 2012;10(8):917–934.
70. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2005;40(9):1333–41. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15825037>.
71. Craig WA, Kunin CM. Significance of serum protein and tissue binding of antimicrobial agents. *Annu Rev Med*. 1976;27(1):287–300. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/180874>.
72. Kunin CM, Craig WA, Kornguth M, Monson R. Influence of binding on the pharmacologic activity of antibiotics. *Ann N Y Acad Sci*. 1973;226(1):214–24. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4358507>.
73. Bergen PJ, Li J, Rayner CR, Nation RL. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents chemotherapy*. 2006;50(6):1953–1958.
74. Gilleland J H E, Lyle RD. Chemical alterations in cell envelopes of polymyxin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J Bacteriol*. 1979;138(3):839–45. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/222726>.
75. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JD, Vinogradov E, Seemann T, et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrobial agents chemotherapy*. 2010;54(12):4971–4977.
76. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67(4):593–656. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14665678>.
77. Petsch D, Anspach FB. Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotechnol*. 2000;76(2-3):97–119. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10656326>.

78. Clausell A, Garcia-Subirats M, Pujol M, Busquets MA, Rabanal F, Cajal Y. Gram-negative outer and inner membrane models: insertion of cyclic cationic lipopeptides. *J Phys Chem B*. 2007;111(3):551–63. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17228913>.
79. Hancock RE. Peptide antibiotics. *Lancet*. 1997;349(9049):418–22. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9033483>.
80. Hancock RE. Antibacterial peptides and the outer membranes of gram-negative bacilli. *J Med Microbiol*. 1997;46(1):1–3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9003734>.
81. Hancock RE, Chapple DS. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(6):1317–23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10348745>.
82. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(3):449–65. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18625681>.
83. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an ‘old’ class of antibiotics. *Future microbiology*. 2013;8(6):711–724.
84. Karabinis A, Paramythiotou E, Mylona-Petropoulou D, Kalogeromitros A, Katsarelis N, Kontopidou F, et al. Colistin for *Klebsiella pneumoniae*—associated sepsis. *Clinical infectious diseases*. 2004;38(1):e7–e9.
85. Koch-Weser J, Sidel VW, Federman EB, Kanarek P, Finer DC, Eaton AE. Adverse effects of sodium colistimethate. Manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. *Ann Intern Med*. 1970;72(6):857–68. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5448745>.
86. Javan AO, Shokouhi S, Sahraei Z. A review on colistin nephrotoxicity. *European journal of clinical pharmacology*. 2015;71(7):801–810.
87. Wolinsky E, Hines JD. Neurotoxic and nephrotoxic effects of colistin in patients with renal disease. *N Engl J Med*. 1962;266(15):759–62. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14008070>.
88. Timmerman J, Long J, Pittinger C. Neuromuscular blocking properties of various antibiotic agents. *Toxicology applied pharmacology*. 1959;1(3):299–304.

89. Helander IM, Kato Y, Kilpelainen I, Kostianen R, Lindner B, Nummila K, et al. Characterization of lipopolysaccharides of polymyxin-resistant and polymyxin-sensitive *Klebsiella pneumoniae* O3. *Eur J Biochem.* 1996;237(1):272–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8620884>.
90. Breazeale SD, Ribeiro AA, Raetz CR. Origin of Lipid A Species Modified with 4-Amino-4-deoxy-1-arabinose in Polymyxin-resistant Mutants of *Escherichia coli* AN AMINOTRANSFERASE (ArnB) THAT GENERATES UDP-4-AMINO-4-DEOXY-1-ARABINOSE. *Journal of Biological Chemistry.* 2003;278(27):24731–24739.
91. Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompart CM, Alberti S, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun.* 2004;72(12):7107–14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15557634>.
92. Cheng HY, Chen YF, Peng HL. Molecular characterization of the PhoPQ-PmrD-PmrAB mediated pathway regulating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *J Biomed Sci.* 2010;17(1):60. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20653976>.
93. Llobet E, Tomas JM, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology.* 2008;154(12):3877–3886.
94. Gao R, Hu Y, Li Z, Sun J, Wang Q, Lin J, et al. Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance. *PLoS Pathog.* 2016;12(11):e1005957. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27893854>.
95. Yuan X, Koh HL, Chui WK. A high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of arctiin, chlorogenic acid and glycyrrhizin in a Chinese proprietary medicine. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;39(3-4):697–704. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15946817>.
96. Segal R, Pisanty S, Wormser R, Azaz E, Sela MN. Anticariogenic activity of licorice and glycyrrhizine I: Inhibition of in vitro plaque formation by *Streptococcus mutans*. *J Pharm Sci.* 1985;74(1):79–81. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3981425>.
97. Ahmad I, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens.

- J Ethnopharmacol.* 2001;74(2):113–23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11167029>.
98. Martins N, Ferreira IC, Henriques M, Silva S. In vitro anti-*Candida* activity of *Glycyrrhiza glabra* L. *Industrial Crops Products.* 2016;83:81–85.
99. Rizzato G, Scalabrin E, Radaelli M, Capodaglio G, Piccolo O. A new exploration of licorice metabolome. *Food Chem.* 2017;221:959–968. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27979300>.
100. Yu JY, Ha JY, Kim KM, Jung YS, Jung JC, Oh S. Anti-Inflammatory activities of licorice extract and its active compounds, glycyrrhizic acid, liquiritin and liquiritigenin, in BV2 cells and mice liver. *Molecules.* 2015;20(7):13041–54. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26205049>.
101. Albermann ME, Musshoff F, Hagemeyer L, Madea B. Determination of glycyrrhetic acid after consumption of liquorice and application to a fatality. *Forensic Sci Int.* 2010;197(1-3):35–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20064700>.
102. Hayashi H, Sudo H. Economic importance of licorice. *Plant Biotechnology.* 2009;26(1):101–104.
103. Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, et al. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D1202–13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26400175>.
104. Chakotiya AS, Tanwar A, Narula A, Sharma RK. Alternative to antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*: Effects of *Glycyrrhiza glabra* on membrane permeability and inhibition of efflux activity and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and its in vitro time-kill activity. *Microbial pathogenesis.* 2016;98:98–105.
105. Yuan H, Ji WS, Wu KX, Jiao JX, Sun LH, Feng YT. Anti-inflammatory effect of Diammonium Glycyrrhizinate in a rat model of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2006;12(28):4578–81. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16874877>.
106. Zhang YH, Yoshida T, Isobe K, Rahman SM, Nagase F, Ding L, et al. Modulation by glycyrrhizin of the cell-surface expression of H-2 class I antigens on murine tumour cell lines and normal cell populations.

- Immunology*. 1990;70(3):405–10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1696243>.
107. Baltina L. Chemical modification of glycyrrhizic acid as a route to new bioactive compounds for medicine. *Current medicinal chemistry*. 2003;10(2):155–171.
108. Saleem MMNM, Mohammad AAW, Al-Tameemi JA, Sulaiman GM. Biological study of the effect of licorice roots extract on serum lipid profile, liver enzymes and kidney function tests in albino mice. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(59):12702–12706.
109. Størmer F, Reistad R, Alexander J. Glycyrrhizic acid in liquorice—evaluation of health hazard. *Food Chemical Toxicology*. 1993;31(4):303–312.
110. Organization WH. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization; 2014.
111. Ku YH, Chen CC, Lee MF, Chuang YC, Tang HJ, Yu WL. Comparison of synergism between colistin, fosfomycin and tigecycline against extended-spectrum -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates or with carbapenem resistance. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2017;50(6):931–939.
112. Gaibani P, Lombardo D, Lewis RE, Mercuri M, Bonora S, Landini MP, et al. In vitro activity and post-antibiotic effects of colistin in combination with other antimicrobials against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(7):1856–65. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24648503>.
113. Tascini C, Tagliaferri E, Giani T, Leonildi A, Flammini S, Casini B, et al. Synergistic activity of colistin plus rifampin against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(8):3990–3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23752510>.
114. Laishram S, Anandan S, Devi BY, Elakkiya M, Priyanka B, Bhuvaneshwari T, et al. Determination of synergy between sulbactam, meropenem and colistin in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* isolates and correlation with the molecular mechanism of resistance. *Journal of Chemotherapy*. 2016;28(4):297–303.

115. Dundar D, Duymaz Z, Genc S, Er DK, İrvem A, Kandemir N. In-vitro activities of imipenem–colistin, imipenem–tigecycline, and tigecycline–colistin combinations against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Journal of Chemotherapy*. 2018;30(6-8):342–347.
116. Evren E, Azap zK, Çolakoğlu u, Arslan H. In vitro activity of fosfomycin in combination with imipenem, meropenem, colistin and tigecycline against OXA 48–positive *Klebsiella pneumoniae* strains. *Diagnostic microbiology infectious Disease Clinics*. 2013;76(3):335–338.
117. Samonis G, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Falagas ME. Synergy of fosfomycin with carbapenems, colistin, netilmicin, and tigecycline against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(5):695–701. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21805292>.
118. Falagas ME, Voulgaris GL, Tryfinopoulou K, Giakkoupi P, Kyriakidou M, Vatopoulos A, et al. Synergistic activity of colistin with azidothymidine against colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates collected from inpatients in Greek hospitals. *Int J Antimicrob Agents*. 2019;53(6):855–858. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30836109>.
119. Hu Y, Liu Y, Coates A. Azidothymidine Produces Synergistic Activity in Combination with Colistin against Antibiotic-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(1):e01630–18. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30373798>.
120. Abdul Rahim N, Cheah SE, Johnson MD, Yu H, Sidjabat HE, Boyce J, et al. Synergistic killing of NDM-producing MDR *Klebsiella pneumoniae* by two ‘old’antibiotics—polymyxin B and chloramphenicol. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015;70(9):2589–2597.
121. Stein C, Makarewicz O, Bohnert JA, Pfeifer Y, Kesselmeier M, Hagel S, et al. Three Dimensional Checkerboard Synergy Analysis of Colistin, Meropenem, Tigecycline against Multidrug-Resistant Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *PLoS One*. 2015;10(6):e0126479. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26067824>.
122. Ozbek B, Mataraci-Kara E, Er S, Ozdamar M, Yilmaz M. In vitro activities of colistin, tigecycline and tobramycin, alone or in combination, against

- carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* strains. *J Glob Antimicrob Resist.* 2015;3(4):278–282. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27842873>.
123. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(6):1119–25. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20378670>.
124. Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P, Dragoumanos V, Pitiriga V, Ranellou K, et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(12):1798–803. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21595793>.
125. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Treccarichi EM, Tumietto F, Marchese A, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clinical infectious diseases.* 2012;55(7):943–950.
126. Daikos GL, Tsaousi S, Tzouveleki LS, Anyfantis I, Psychogiou M, Argyropoulou A, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(4):2322–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24514083>.
127. Zhou Y, Wang J, Guo Y, Liu X, Liu S, Niu X, et al. Discovery of a potential MCR-1 inhibitor that reverses polymyxin activity against clinical mcr-1-positive *Enterobacteriaceae*. *Journal of Infection.* 2019;78(5):364–372.
128. Zhou Y, Wang T, Guo Y, Liu S, Wang J, Shen Y, et al. In Vitro/Vivo Activity of Potential MCR-1 Inhibitor in Combination With Colistin Againsts mcr-1-Positive *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol.* 2018;9:1615. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30065720>.
129. Okdah L, Le Page S, Olaitan AO, Dubourg G, Hadjadj L, Rolain JM. New therapy from old drugs: synergistic bactericidal activity of sulfadiazine with colistin against colistin-resistant bacteria, including plasmid-mediated colistin-resistant mcr-1 isolates. *Int J Antimicrob*

- Agents*. 2018;51(5):775–783. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29421171>.
130. Betts J, Nagel C, Schatzschneider U, Poole R, La Ragione RM. Antimicrobial activity of carbon monoxide-releasing molecule [Mn (CO) 3 (tpa-3N)] Br versus multidrug-resistant isolates of Avian Pathogenic *Escherichia coli* and its synergy with colistin. *PloS one*. 2017;12(10):e0186359.
131. Ozbek-Celik B, Damar-Celik D, Mataraci-Kara E, Bozkurt-Guzel C, Savage PB. Comparative In Vitro Activities of First and Second-Generation Ceragenins Alone and in Combination with Antibiotics Against Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Antibiotics (Basel)*. 2019;8(3):130. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31461867>.
132. Baron SA, Rolain JM. Efflux pump inhibitor CCCP to rescue colistin susceptibility in mcr-1 plasmid-mediated colistin-resistant strains and Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(7):1862–1871. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29718423>.
133. Zhu J, Huang JW, Tseng PH, Yang YT, Fowble J, Shiau CW, et al. From the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib to a novel class of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 inhibitors. *Cancer Res*. 2004;64(12):4309–18. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15205346>.
134. Krishnamurthy M, Lemmon MM, Falcinelli EM, Sandy RA, Dootz JN, Mott TM, et al. Enhancing the antibacterial activity of polymyxins using a nonantibiotic drug. *Infection Drug Resistance*. 2019;12:1393.
135. Morroni G, Simonetti O, Brenciani A, Brescini L, Kamysz W, Kamysz E, et al. In vitro activity of Protegrin-1, alone and in combination with clinically useful antibiotics, against *Acinetobacter baumannii* strains isolated from surgical wounds. *Med Microbiol Immunol*. 2019;p. 1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31214759>.
136. Schmidt R, Ostorhazi E, Wende E, Knappe D, Hoffmann R. Pharmacokinetics and in vivo efficacy of optimized oncocin derivatives. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(4):1003–11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26832757>.
137. Otvos Jr L, Ostorhazi E, Szabo D, Zumbrun SD, Miller LL, Halasohoris SL, et al. Synergy between proline-rich antimicrobial peptides and small

- molecule antibiotics against selected Gram-negative pathogens in vitro and in vivo. *Frontiers in chemistry*. 2018;6:309.
138. Chen JC, Ho TY, Chang YS, Wu SL, Li CC, Hsiang CY. Identification of *Escherichia coli* enterotoxin inhibitors from traditional medicinal herbs by in silico, in vitro, and in vivo analyses. *J Ethnopharmacol*. 2009;121(3):372–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19063958>.
139. Snowden R, Harrington H, Morrill K, Jeane L, Garrity J, Orian M, et al. A comparison of the anti-*Staphylococcus aureus* activity of extracts from commonly used medicinal plants. *The Journal of Alternative Complementary Medicine*. 2014;20(5):375–382.
140. Sedighinia F, Safipour Afshar A, Soleimanpour S, Zarif R, Asili J, Ghazvini K. Antibacterial activity of *Glycyrrhiza glabra* against oral pathogens: an in vitro study. *Avicenna J Phytomed*. 2012;2(3):118–24. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25050240>.
141. de Breij A, Karnaoukh T, Schrumpf J, Hiemstra P, Nibbering P, van Dissel J, et al. The licorice pentacyclic triterpenoid component 18-glycyrrhetic acid enhances the activity of antibiotics against strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*. 2016;35(4):555–562.
-

S.B. İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ GÖZTEPE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU (2013-KAEK-64)
KARAR FORMU

SAYI:

Tarih: 12.03.2019

KONU: Etik Kurul Kararı

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Klinik Örneklerinden İzole Edilen Kolistin Dirençli Klebsiella Pneumoniae Suşları Üzerinde Gliserhizik Asit ve Kolistin Sinerjistik Etkinliğinin Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki			Katılım *	İmza
			E	K	H	E	H		
Prof. Dr. Derya Büyükkayhan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	T.C. Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Aytekin OĞUZ	İç Hastalıkları Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Işıl MARAL	Halk Sağlığı Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Asif Yıldırım	Üroloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Süleyman Daşdağ	Biyofizik	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Asiye KANBAY	Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Şükrü Sadık ÖNER	Tıbbi Farmakoloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Sıdika Şeyma ÖZKANLI	Tıbbi Patoloji	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Hacer Hicran Mutlu	Aile Hekimliği	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Avukat Mahmut ÇELİK	Avukat	Çelik Gönen Hukuk Bürosu	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Saliha Şahin	İşçi		E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

*:Toplantıda Bulunma

Karar: Onaylandı Reddedildi

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Derya Büyükkayhan
İmza:

EK A. Etik Kurul Onay Formu

S.B. İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ GÖZTEPE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU (2013-KAEK-64)
KARAR FORMU

SAYI:

Tarih: 12.03.2019

KONU: Etik Kurulu Kararı

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Klinik Örneklerinden İzole Edilen Kolistin Dirençli Klebsiella Pneumonia Suşları Üzerinde Glisirhizik Asit ve Kolistin Sinerjistik Etkinliğinin Araştırılması	
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Doktor Erkin Cad. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi
	TELEFON	216 570 91 90
	FAKS	216 565 55 26
	E-POSTA	etik@sbgoztepehastanesi.gov.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Dr Öğretim Üyesi Zafer Habip				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi				
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI					
	DESTEKLEYİCİ					
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)					
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ					
	ARAŞTIRMANIN FAZ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>			
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>			
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>			
FAZ 4		<input type="checkbox"/>				
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>				
Tıbbi cihaz klinik çalışması		<input type="checkbox"/>				
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>				
İlaç dışı klinik araştırma		<input checked="" type="checkbox"/>				
Retrospektif		<input type="checkbox"/>				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER		TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama				
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>				
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>				
	İLAN	<input type="checkbox"/>				
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>				
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>				
DİĞER:	<input type="checkbox"/>					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2019/0088	Tarih: 12.03.2019				
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmannın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmannın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.					

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Derya Büyükkayhan
İmza: