

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÇOKLU İLACA DİRENÇLİ GRAM NEGATİF BAKTERİLERDE
KOLİSTİN DUYARLILIĞININ SAPTANMASINDA SIVI
MİKRODİLÜSYON VE TİCARİ MİKRODİLÜSYON
YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Merve AYYILDIZ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Yasemin BULUT**

**ELAĞIĞ
2022**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Metin Kaya GÜRGÖZE

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Adnan SEYREK

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanı

Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yasemin BULUT _____ Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

.....	_____
.....	_____
.....	_____
.....	_____
.....	_____

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitim hayatım ve tez çalışma sürecimde tecrübe ve bilgi birikimleriyle her zaman bana destek olan, tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yasemin BULUT'a, asistanlık eğitimi boyunca üzerimde emeği geçen değerli hocalarım; Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Adnan SEYREK'e, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Zülal AŞÇI TORAMAN'a ve eski Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanı, emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Mustafa YILMAZ'a, birlikte çalıştığımız asistan arkadaşlarıma ve laboratuvar çalışanlarına, destekleriyle hayatımın her döneminde, her anımda yanımda hissettiğim, bugünlere gelmemde emekleri sonsuz canım aileme teşekkür ederim.

ÖZET

Dirençli Gram negatif bakteri enfeksiyonlarıyla mücadelede son antibiyotik seçeneklerinden olan kolistine direcin giderek atması, insan sağlığı üzerine ciddi tehdit oluşturmaktadır. İzolatların kolistin duyarlılığının doğru ve hızlı bir şekilde belirlenmesi, tedavinin başarısı için çok önemlidir. Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) ve Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)'nın, kolistin duyarlılığının tespiti için ortak önerisi, sıvı mikrodilüsyon (BMD) yöntemidir. BMD, hazırlanması yoğun emek ve zaman isteyen bir duyarlılık test yöntemi olduğundan laboratuvarlarda rutin kullanımı zordur. Günümüzde bu amaçla geliştirilmiş, uygulaması kolay birçok ticari mikrodilüsyon testi bulunmaktadır. Laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan otomatize sistemler ve diğer test yöntemlerinin kolistin duyarlılığını belirlemedeki güvenilirliğini araştıran çok sayıda çalışma mevcut olmakla birlikte, BMD dışındaki yöntemler halen tartışmalıdır.

Phoenix™ M50 otomatize sistemiyle çoklu ilaca dirençli (MDR) saptanan ve kolistin MİK değeri ≤ 1 µg/mL belirlenen, 25 adet *P. aeruginosa*, 25 adet *E. coli*, 25 adet *A. baumannii* ve 25 adet *K. pneumoniae* çalışmaya dahil edilmiştir. Toplam 100 izolatta kolistin duyarlılığı Sensititre™ testiyle de çalışılmış ve sonuçlar BMD yöntemiyle karşılaştırılarak bu testlerin performansları araştırılmıştır.

Tüm izolatlar için, Phoenix™ otomatize sisteminin sonuçları BMD yöntemiyle kıyaslandığında 4 izolatta çok büyük hata (ÇBH) saptandı. Kategorik uyum (KU) %96 ve ÇBH %100 olarak belirlendi. Tüm izolatlar için Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yönteminin sonuçları BMD yöntemiyle kıyaslandığında 1 büyük hata (BH) bulundu, KU %99, esansiyel uyum (EU) %69, ÇBH %0 ve BH %1,04 olarak hesaplandı.

Bu çalışmada kolistin duyarlılığını belirlemede referans BMD yöntemi ile karşılaştırılan iki duyarlılık test yönteminin de kabul edilebilir antimikrobiyal duyarlılık testi performansı kriterlerini karşılamadığı gözlenmiştir. Buna göre kolistin duyarlılığının, uygulaması zor da olsa, BMD ile belirlenmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Sıvı mikrodilüsyon, Antimikrobiyal duyarlılık testi, Kolistin

ABSTRACT

COMPARISON OF BROTH MICRODILUTION AND COMMERCIAL MICRODILUTION METHODS TO DETECT THE COLISTIN SUSCEPTIBILITY IN MULTIDRUG-RESISTANT GRAM-NEGATIVE BACTERIA

The increasing resistance to colistin, which is one of the last antibiotic options in the fight against resistant Gram-negative bacterial infections, poses a serious threat to human health. Accurate and rapid determination of colistin susceptibility of isolates is very important for the success of treatment. The joint recommendation of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) for the detection of colistin susceptibility is the broth microdilution (BMD) method. Since BMD is a susceptibility test method that requires intensive labor and time to prepare, its routine use in laboratories is difficult. Today, there are many commercial microdilution tests developed for this purpose that are easy to apply. Although there are many studies investigating the reliability of automated systems and other test methods frequently used in laboratories in determining colistin susceptibility, methods other than BMD are still controversial.

25 *P. aeruginosa*, 25 *E. coli*, 25 *A. baumannii* and 25 *K. pneumoniae* isolates, which were found multi-drug resistant (MDR) and colistin MIC value was ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$ with the Phoenix™ M50 automated system, were included in the study. Colistin susceptibility was also studied in 100 isolates with the Sensititre™ test, and the performances of these tests were investigated by comparing the results with the BMD method.

For all isolates, the results of the Phoenix™ automated system were compared with the BMD method, and 4 isolates had very major error (VME). The categorical agreement (CA) was determined as 96% and MDR 100%. For all isolates, 1 major error (ME) was found when the results of the Sensititre™ commercial microdilution method were compared with the BMD method. CA was calculated as 99%, essential agreement (EA) as 69%, VME 0% and ME 1.04%.

In this study, it was observed that both susceptibility test methods compared with the reference BMD method in determining colistin susceptibility did not meet the

criteria for acceptable antimicrobial susceptibility test performance. Accordingly, colistin sensitivity should be determined by BMD, even if it is difficult to apply.

Keywords: Broth microdilution, Antimicrobial susceptibility testing, Colistin



İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vii
TABLO LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xii
RESİM LİSTESİ	xiii
KISALTMALAR LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Acinetobacter baumannii</i> (<i>A. baumannii</i>)	4
1.1.1. Tarihçe ve Sınıflandırma	4
1.1.2. Mikrobiyolojik Özellikleri	5
1.1.3. Virülans Faktörleri	6
1.1.3.1. Lipopolisakkarit (LPS)	6
1.1.3.2. Biyofilm	6
1.1.3.3. Dış Membran Proteini A (OmpA)	7
1.1.3.4. Demir Toplama Sistemleri	7
1.1.3.5. Kapsül	7
1.1.3.6. Fosfolipaz	7
1.1.4. <i>Acinetobacter baumannii</i> Enfeksiyonları	7
1.1.5. Antimikrobiyal Direnç ve Tedavi	9
1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>P. aeruginosa</i>)	11
1.2.1. Tarihçe ve Sınıflandırma	11
1.2.2. Mikrobiyolojik Özellikleri	11
1.2.3. Virülans Faktörleri	12
1.2.3.1. Lipopolisakkarit	12
1.2.3.2. Aljinat	13
1.2.3.3. Flagella	13
1.2.3.4. Tip IV Pili	13

1.2.3.5. Tip I Sekresyon Sistemi (T1SS)	13
1.2.3.6. Tip II Sekresyon Sistemi (T2SS)	14
1.2.3.7. Ekzotoksin A	14
1.2.3.8. Elastaz	14
1.2.3.9. Proteaz IV	14
1.2.3.10. Hemolizinler	14
1.2.3.11. Piyosiyenin	15
1.2.3.12. Tip III Sekresyon Sistemi (T3SS)	15
1.2.3.13. Antioksidan Enzimler	15
1.2.3.14. Demir Toplama Sistemleri	16
1.2.3.15. Biyofilm	16
1.2.3.16. Quorum Sensing	16
1.2.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Enfeksiyonları	17
1.2.5. Antimikrobiyal Direnç ve Tedavi	19
1.3. <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	21
1.3.1. Tarihçe ve Sınıflandırma	21
1.3.2. Mikrobiyolojik Özellikleri	21
1.3.3. Virülans Faktörleri	22
2.3.4. Kommensal <i>E. coli</i>	23
1.3.5. Ekstraintestinal <i>E. coli</i> (ExPEC)	23
1.3.6. Diyarejenik (İntestinal) <i>E. coli</i> (DEC)	24
1.3.6.1. Enteropatojenik <i>E. coli</i> (EPEC)	24
1.3.6.2. Enterotoksijenik <i>E. coli</i> (ETEC)	25
1.3.6.3. Enteroagregatif <i>E. coli</i> (EAEC)	26
1.3.6.4. Enteroinvaziv <i>E. coli</i> (EIEC)	26
1.3.6.5. Diffüz aderan <i>E. coli</i> (DAEC)	27
1.3.6.6. Enterohemorajik <i>E. coli</i> /Shiga Toksin Üreten <i>E. coli</i>	27
1.3.7. Antimikrobiyal Direnç ve Tedavi	28
1.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> (<i>K. pneumoniae</i>)	30
1.4.1. Tarihçe ve Sınıflandırma	30
1.4.2. Mikrobiyolojik Özellikleri	30
1.4.3. Virülans faktörleri	31

1.4.3.1. Kapsül	31
1.4.3.2. Demir Toplama Sistemleri	31
1.4.3.3. Pili	32
1.4.3.4. Lipopolisakkarit	32
1.4.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> Enfeksiyonları	32
1.4.5. Antimikrobiyal Direnç ve Tedavi	33
1.5. Kolistin (Polimiksin E)	35
1.5.1. Kolistinin Kimyasal Yapısı	35
1.5.2. Kolistin Etki Mekanizması	36
1.5.3. Kolistinin Etki Spektrumu	37
1.5.4. Kolistinin Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri	38
1.5.5. Klinik Kullanım ve Endikasyonlar	38
1.5.6. Toksisite ve Olumsuz Etkiler	39
1.5.7. Kolistin Duyarlılık Testleri	39
1.5.8. Kolistine Karşı Direnç Mekanizmaları	40
1.5.9. Kolistin Heterodirenci	42
2. GEREÇ VE YÖNTEM	44
2.1. Bakteri İzolatlarının Toplanması	44
2.2. Kültür işlemleri ve Bakterilerin İzolasyonu	44
2.3. Bakterilerin Tanımlanması ve Antimikrobiyal Duyarlılık Testi	44
2.4. Bakteri İzolatların Saklanması ve Canlandırılması	46
2.5. İzolatların Kolistin Duyarlılığının Belirlenmesi	47
2.5.1. Sensititre™ Ticari Mikrodilüsyon Yöntemi	47
2.5.2. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi	48
2.5.2.1. Besiyerinin Hazırlanması	48
2.5.2.2. Antibiyotiğin Hazırlanması	49
2.5.2.3. Bakteri İnokulumunun Hazırlanması	49
2.5.2.4. Mikroplak Uygulama Aşaması	49
2.5.2.5. MİK Değerlerinin Belirlenmesi	50
2.6. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizi	51
3. BULGULAR	53
3.1. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi Sonuçları	56

3.2. Sensititre™ Ticari Mikrodilüsyon Yöntemi Sonuçları	60
4. TARTIŞMA	67
5. KAYNAKLAR	82
6. ÖZGEÇMİŞ	108



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Kappa değerlerinin gösterdiği uyum düzeyleri	52
Tablo 2. Bakterilerin izole edildiği örneklerin dağılımı	54
Tablo 3. Bakterilerin izole edildiği örnek, gönderen birim ve saptanan kolistin MİK değerleri	54
Tablo 4. Sensititre™ ticari mikrodilüsyon testinin izolatlar için duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD ve kappa değerleri	65
Tablo 5. Phoenix™ otomatize sistemi ve Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yöntemlerinin BMD yöntemiyle karşılaştırıldığında, EU, KU, BH ve ÇBH oranları	66

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Sırasıyla kolistin ve kolistimetat sodyuma ait kimyasal yapılar	36
Şekil 2.	Kolistinin antimikrobiyal etki mekanizması	37
Şekil 3.	Bakterilerin izole edildiği hastaların cinsiyet ve yaş grubu dağılımı	53
Şekil 4.	Phoenix™ otomatize sistemi ve referans BMD yöntemiyle belirlenen kolistin MİK değerlerine sahip izolat sayıları	57
Şekil 5.	E. coli izolatları için, Phoenix™ otomatize sistemi ve referans BMD yöntemiyle belirlenen kolistin MİK değerlerine sahip izolat sayıları	58
Şekil 6.	K. pneumoniae izolatları için, Phoenix™ otomatize sistemi ve referans BMD yöntemiyle belirlenen kolistin MİK değerlerine sahip izolat sayıları	58
Şekil 7.	P. aureginosa izolatları için, Phoenix™ otomatize sistemi ve referans BMD yöntemiyle belirlenen kolistin MİK değerlerine sahip izolat sayıları	59
Şekil 8.	A. baumannii izolatları için, Phoenix™ otomatize sistemi ve referans BMD yöntemiyle belirlenen kolistin MİK değerlerine sahip izolat sayıları	59
Şekil 9.	Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yöntemi ve referans BMD yöntemiyle belirlenen kolistin MİK değerlerine sahip izolat sayıları	60
Şekil 10.	E. coli izolatları için, Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yönteminin BMD yöntemiyle EU ve KU grafiği	61
Şekil 11.	K. pneumoniae izolatları için, Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yönteminin BMD yöntemiyle EU ve KU grafiği	62
Şekil 12.	P. aureginosa izolatları için, Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yönteminin BMD yöntemiyle EU ve KU grafiği	63
Şekil 13.	A. baumannii izolatları için, Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yönteminin BMD yöntemiyle EU ve KU grafiği	64

RESİM LİSTESİ

Resim 1.	EMB agarda <i>A. baumannii</i> kolonileri	6
Resim 2.	EMB agarda <i>P. aeruginosa</i> 'nın R tipi kolonileri	12
Resim 3.	EMB agarda metalik refle veren <i>E. coli</i> kolonileri	22
Resim 4.	EMB agarda mukoid yapıda <i>K. pneumoniae</i> kolonileri	31
Resim 5.	BD Phoenix™ M50 otomatize sistem cihazı	45
Resim 6.	Phoenix™ M50 otomatize sisteminin NMIC/ID tanımlama ve duyarlılık paneli, ID ve AST broth tüpleri	46
Resim 7.	-20°C'de saklanan bakteri izolatları	47
Resim 8.	Sensititre™ testinin mikropakları, ID ve KAMHB tüpleri	47
Resim 9.	Sensititre™ testinin dilüsyon şeması	48
Resim 10.	Katyon ayarlı Mueller Hinton Broth	48
Resim 11.	2560 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan stok kolistin çözeltileri	49
Resim 12.	Sıvı mikrodilüsyon yönteminde kullanılan steril mikropaklar	50
Resim 13.	Kolistin duyarlılığının BMD yöntemiyle değerlendirilmesi	51

KISALTMALAR LİSTESİ

AAF	: Agregatif aderens fimbriaları
ANDRA	: Amplifiye rRNA geni restriksiyon analizi
BH	: Büyük hata
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CDC	: Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezleri
CFA	: Kolonizasyon faktör antijenleri
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
CLSI	: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
CNF-1	: Sitotoksik nekrotizan faktör 1
ÇBH	: Çok büyük hata
EAST	: Enteroagregatif sitotoksin
ECDC	: Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezleri
EMB	: Eozin Methylen Blue Agar
EU	: Esansiyel uyum
EUCAST	: Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi
ExPEC	: Ekstraintestinal <i>E. coli</i>
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GSBL	: Geniş spektrumlu beta-laktamaz
IDSA	: Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği
KAMHB	: Katyon ayarlı Mueller-Hinton Broth
KF	: Kistik fibrozis
KKA	: Koyun Kanlı Agar
KU	: Kategorik uyum
L-Ara4N	: 4-amino-4-deoksi-L-arabinoz
LPS	: Lipopolisakkarit
LT	: Isı labil toksin
MALDI-TOFMS	: Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon-uçuş zamanı kütle spektrometresi

MBL	: Metallo-beta-laktamaz
MDR	: Çoklu ilaca dirençli
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyon
NPD	: Negatif prediktif değer
OmpA	: Dış Membran Proteini A
PAP	: Popülasyon analiz profili
PBP-2	: Penisilin bağlayıcı protein-2
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDR	: Tüm ilaçlara dirençli
PEtN	: Fosfoetanolamin
PPD	: Pozitif prediktif değeri
QS	: Quorum sensing
SHEA	: Amerika Sağlık Epidemiyolojisi Derneği
T1SS	: Tip I Sekresyon Sistemi
T2SS	: Tip II Sekresyon Sistemi
T3SS	: Tip III Sekresyon Sistemi
TSI	: Üç şekerli demirli besiyeri
USHIESA	: Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı
VİP	: Ventilatörle ilişkili pnömoni
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Tarih boyunca enfeksiyöz hastalıklarda etken mikroorganizmalarla mücadelede organik ve inorganik birçok madde kullanılmıştır. 1940'larda penisilinin keşfiyle başlayan, "antibiyotiklerin altın çağı" olarak anılan dönem 1970'lere kadar yoğun çalışmalarla devam etmiş, antibiyotiklerin başlıca sınıfları çoğunlukla bu dönemde keşfedilip klinik tedavide kullanılmaya başlanmıştır (1,2).

Yirminci yüzyılda antimikrobiyallerin ortaya çıkması, enfeksiyöz hastalıkların yayılımını kontrol altına alarak tıp dünyasında yeni bir dönem başlatmıştır (3). 1900 yılında %0,797 olan enfeksiyon hastalıklarından ölüm oranlarının, antibiyotiklerin piyasaya sürülmesinden sonra, 1980'de %0,036'lara kadar gerilediği görülmüştür (2). Ancak antimikrobiyal ajanların kullanılmaya başlamasından sonra kısa süre içinde ortaya çıkan antibiyotik direnç sorunu büyük bir sağlık krizini de beraberinde getirmiştir (3). Antimikrobiyal ajanların uygunsuz kullanımı ve artan tüketimi, uluslararası seyahatler ve insan göçü bakterilerin direnç geliştirmesinde ve dirençli suşların yayılmasında önemli rol oynamaktadır (4).

Bakteriler, bazı antibiyotiklere karşı doğal dirençli olabileceği gibi duyarlı oldukları antibiyotiklere sonradan farklı mekanizmalarla direnç geliştirebilmektedir. Bu durum mikroorganizma tarafından ilacı parçalayan enzimlerin sentezlenmesi ile antibiyotiğin inaktive edilmesi, antibiyotiğin bağlanacağı hedef molekülde değişiklik oluşturulması, dış zar permeabilitesinin azaltılması veya efluks pompaları ile antibiyotiğin hücre içi konsantrasyonlarının azaltılması gibi çeşitli mekanizmalarla sağlanabilmektedir (5).

Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezleri (CDC ve ECDC), nozokomiyal enfeksiyonla ilişkili mikroorganizmalardaki antimikrobiyal direnci karakterize eden spesifik tanımlamalar sunmuştur. Mikroorganizma üç veya üçten fazla antibiyotik sınıfından en az birer ilaca dirençliyse MDR, sadece bir veya iki antibiyotik grubuna duyarlı, diğer antibiyotik sınıflarından en az birer ajana dirençliyse yaygın ilaca dirençli (XDR), tüm antimikrobiyallere dirençli ise de tüm ilaçlara dirençli (PDR) olarak adlandırılmıştır (6).

Çoklu ilaca dirençli bakteriler, hem toplum kaynaklı hem de nozokomiyal enfeksiyon etkenleri arasında gittikçe artmakta ve halk sağlığı üzerine ciddi tehdit oluşturmaktadır (7,8). Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde yıllık 2.8 milyonun

üzerinde antibiyotiğe dirençli bakteriyel enfeksiyon meydana geldiği ve 35.000'den fazla insanın bu enfeksiyonlar nedeni ile hayatını kaybettiği bildirilmektedir (9). Bakterilerin antibiyotik direnci, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından halk sağlığının karşı karşıya olduğu üç temel sorundan biri olarak belirlenmiştir (10). Direnç gelişimi ile ilgili gerekli önlemler alınmazsa, 2050 yılına kadar, antimikrobiyal dirençli enfeksiyonların dünya çapında yılda 10 milyon kadar insanın ölümüne yol açacağı tahmin edilmektedir (11).

Dünya Sağlık Örgütü'nün, halk sağlığı üzerine en büyük tehdidi oluşturan ve yeni antibiyotiklere şiddetle ihtiyaç duyulan dirençli bakterileri bildirdiği raporda, en üst sırada karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ve geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten, karbapeneme dirençli *Enterobacteriaceae* üyeleri yer almaktadır (12). Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (IDSA), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Enterobacter* spp., *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ve *Enterococcus faecium* (*E. faecium*)'u, 'ESKAPE' kısaltmasıyla, hastane enfeksiyonlarının çoğuna neden olmaları, potansiyel çoklu ilaca direnç mekanizmaları ve virülans özellikleri nedeniyle, özellikle tehlikeli olarak tanımlanan bakteriler listesinde bildirmiştir (13,14).

Amerika Sağlık Epidemiyolojisi Derneği (SHEA) ve IDSA tarafından, 2007 yılında antimikrobiyal yönetim programlarının geliştirilmesiyle ilgili yayımlanan ortak rehberde klinik yanıtın artırılması, ilaç yan etkileri ve direnç gelişiminin önlenmesi adına antibiyotik seçimi, uygulama yolu, dozu ve tedavi süresinin doğru şekilde belirlenerek uygunsuz antibiyotik kullanımının azaltılması vurgulanmaktadır (15).

Dünya çapında dirençli bakterilerin giderek yayılması yüksek morbidite ve mortaliteye sebebiyet vermektedir. Bununla beraber, yeni antimikrobiyal ajanların keşfi nispeten yavaştır ve farmasötik araştırmalar klinikteki yeni antibiyotiklere olan ihtiyacı karşılamada yetersiz kalmaktadır. Alternatif olarak, bakteri direncini önleyebilmesi ve kombine kullanımda sinerjistik etki oluşturabilmeleri nedeniyle, geleneksel antibiyotiklerin farklı kombinasyonlarda kullanımlarının daha uygun olduğu düşünülmektedir (16,17).

Polimiksinler 1947’de keşfedilmiş, 1960’larda Gram negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmış, ancak daha sonra özellikle nefrotoksitesi hakkındaki endişeler ve alternatif olabilecek toksisitesi daha az yeni antibiyotiklerin bulunması ile tedavi alanındaki yerlerini farklı antibiyotiklere bırakmıştır. Ancak son yıllarda MDR Gram negatif bakteri enfeksiyonlarının artışı ve bu ajanlara etkili antibiyotiklerin kısıtlılığı, polimiksinlerin tedavi seçeneği olarak kullanımını tekrar gündeme getirmiştir (18,19).

En çok *A. baumannii*, *Enterobacterales* takımı üyeleri ve *P. aeruginosa* olmak üzere, MDR Gram negatif bakteri kaynaklı enfeksiyonlarda kolistin kullanımına duyulan ihtiyaç artışı, kolistin duyarlılık testlerinin öneminin altını çizmiştir (20–22). Antimikrobiyal duyarlılık testlerinin standardizasyonunda takip edilen kurumlar olan CLSI ile EUCAST’ın ortak önerisi kolistin duyarlılık testi için ISO-standart (20776-1) BMD metodunun yapılmasıdır (23). CLSI daha sonra, *P. aeruginosa* ve *Enterobacterales* üyelerinde, agar test ve sıvı disk elüsyon yöntemlerini de onaylamıştır (24).

Laboratuvarlarda kolistin duyarlılığını belirlemede gradyan difüzyon yöntemi, disk difüzyonu ve yarı otomatize sistemler halen yaygın olarak kullanılmaktadır. BMD metodu, uygulaması yoğun uğraş ve zaman gerektiren bir yöntem olması nedeniyle laboratuvarların çoğu tarafından rutinde kullanılmamaktadır. Bu nedenle, BMD yöntemine alternatif olabilecek kullanışlı, ekonomik, hızlı ve doğru kolistin duyarlılık tespit yöntemlerinin geliştirmesi büyük önem taşımaktadır (25,26).

Bu tez çalışması ile Fırat Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Bölümü’ne farklı birimlerden gelen klinik örneklerden izole edilen MDR Gram negatif bakterilerde kolistin duyarlılığının, referans yöntem BMD testi, Phoenix™ M50 (BD®-Becton Dickinson, ABD) otomatize sistemi, Sensititre™ (Thermo Fischer Scientific®, ABD) ticari mikrodilüsyon kitleri kullanılarak tespit edilmesi ve sonuçların referans yöntemle karşılaştırılarak duyarlılık testlerinin performanslarının tanımlanması amaçlanmıştır.

1.1. *Acinetobacter baumannii* (A. baumannii)

1.1.1. Tarihçe ve Sınıflandırma

Acinetobacter cinsi, 20. yüzyılın başlarından itibaren benzer özellikler gösteren *Micrococcus calcoaceticus*, *Diplococcus mucosus*, *Mima polymorpha*, *Alcaligenes haemolysans*, *Herellea vaginicola*, *Moraxella lwoffii*, *Neisseria winogradskyi*, *Bacterium anitratum*, *Achromobacter mucosus*, *Achromobacter anitratum* gibi çok sayıda farklı cins ve tür içinde yer almıştır. Brisou ve Prévot, 1954 yılında yaptıkları çalışmada benzer morfolojik özellikler gösteren *Achromobacter* cinsi içindeki mikroorganizmalardan bazılarının hareketsiz olduklarını fark etmiş ve bu gruba Yunan dilinde hareketsiz anlamına gelen "acinetos" kelimesinden yola çıkarak "*Acinetobacter*" adını önermişlerdir. Baumann ve arkadaşları, 1968'de yayınladıkları çalışma ile listelenen bu farklı türler içinde yer alan *Acinetobacter* adı önerilen grubun, aynı cins özelliklerini taşıdığını bildirmiştir. Bu bulgulara dayanılarak, 1971 yılında *Acinetobacter* cinsi resmi olarak kabul edilmiştir (27).

Günümüzde *Acinetobacter* cinsine ait, geçerli taksonomik kurallara uygun olarak yayınlanmış 68 tür bulunmaktadır (28). Fenotipik ve genotipik olarak birbirlerine benzer özellik göstermeleri ve net ayrımlarının zor olması nedeniyle *Acinetobacter calcoaceticus* (A. calcoaceticus), *Acinetobacter pittii* (A. pittii), *Acinetobacter nosocomialis* (A. nosocomialis), A. baumannii, *Acinetobacter seifertii* (A. seifertii) ve *Acinetobacter dijkschoorniae* (A. dijkschoorniae), A. calcoaceticus-A. baumannii (ACB) kompleksi olarak tanımlanmıştır. Bu suşların fenotipik testlerle ayrımının yapılamaması nedeniyle birçok laboratuvar ACB kompleksine ait üyeleri, ACB kompleksi olarak bildirmektedir. *Acinetobacter* türlerinden en sık izole edileni ve tıbbi yönden en önemli olanı A. baumannii'dir. Bununla birlikte, ACB kompleksinin A. baumannii dışındaki diğer üyelerinin neden olduğu nozokomiyal enfeksiyonlar da giderek artan oranlarda bildirilmektedir (29–31).

Enfeksiyöz potansiyelleri, antimikrobiyal duyarlılıkları ve mortalite oranlarına ilişkin özellikleri birbirinden farklı olan bu türlerin klinik sonuçlarının değerlendirilmesi ve tedavi rehberlerinin oluşturulması, fenotipik temelli olmayan testlerle net ayrımlarını gerektirir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon-uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS),

türe özgü DNA bölgelerinin dizi analizi ve amplifikasyonu, fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), amplifiye rRNA geni restriksiyon analizi (ANDRA), kısmi rpoB gen dizi analizi bu amaçla en yaygın kullanılan yöntemlerdir (29).

1.1.2. Mikrobiyolojik Özellikleri

Acinetobacter baumannii, *Proteobacteria* şubesi, *Gammaproteobacteria* sınıfı, *Pseudomonadales* takımı, *Moraxellaceae* ailesi *Acinetobacter* cinsi içinde yer alır (32). *Acinetobacter* cinsi bakteriler, nonfermentatif, zorunlu aerobik, oksidaz negatif, hareketsiz, sporsuz, Gram negatif kokobasillerdir. Logaritmik üreme fazında 1-1.5 µm eninde 1.5-2.5 µm boyunda basil şeklinde, diğer dönemlerde ise kok veya kokobasil olarak, ikili, küme oluşturmuş veya kısa zincirler şeklinde gözlenebilirler. Benzer morfolojik özellikler gösteren *Haemophilus* ve *Neisseria* türlerinden oksidaz testinin negatif oluşu ile ayırt edilirler. Pozitif sinyal veren kan kültürü şişesinden veya klinik örneklerden hazırlanan preparatlarda, Gram pozitif boyanmış kok şeklinde görülebilirler. %5 Koyun Kanlı Agar (KKA), MacConkey agar, Eozin Methylen Blue Agar (EMB) gibi rutinde sıklıkla kullanılan besiyerlerinde 35-37 °C'de 24 saatte kolayca ürerler. %5 KKA'da ürediklerinde pigmentsiz, yüzeyden hafif kabarık, 1-2 mm çapında, şeffaf ya da grimsi-beyaz, düzgün yüzeyli, S tipi koloniler oluştururken, EMB ve MacConkey agarda laktoz negatif koloniler oluştururlar. Bazı suşlarda ince bir kapsül yapısı bulunabilir. Katalaz pozitif, deoksiribonükleaz ve indol negatiftirler. Nitratları redükte etmezler, üç şekerli demirli besiyerinde (TSI) asit oluşturmazlar (29,32,33).



Resim 1. EMB agarda *A. baumannii* kolonileri

1.1.3. Virölans Faktörleri

1.1.3.1. Lipopolisakkarit (LPS)

Gram negatif bakterilerde, peptidoglikan tabakanın etrafını saran dış membranın üzerinde bulunan LPS tabaka; lipit A, kor polisakkaridi, O antijeninden oluşur. Lipit A, bakterinin endotoksin etkisinden sorumludur. CD14 ve TLR4/MD-2'ye bağlanarak proinflamatuvar sitokinlerin salınımını tetikler ve sepsis patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (34,35).

1.1.3.2. Biyofilm

Biyofilm, birçok bakteri türünün ürettiği, organik polimerlerden oluşan, mikroorganizmaların yüzeye ve birbirlerine yapışmasını sağlayan yapıdır. Mikroorganizmaları sınırlı besin mevcudiyeti gibi çevresel streslere, antimikrobiyal ajanlara ve konağın immün yanıtına karşı koruyarak hayatta kalma yeteneklerini artırmaktadır. *A. baumannii*, biyofilm oluşturma özelliği ile hastane ortamında canlılığını uzun süre sürdürebilmekte ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol açmaktadır. Biyofilm ilişkili protein (Bap) ile tip IV pili, bakterinin adezyonu, kolonizasyonu, biyofilm yapısının oluşumu ve olgunlaşmasında rol oynamaktadır (36,37).

1.1.3.3. Dış Membran Proteini A (OmpA)

Bakterinin epitelyal yüzeylere yapışması ve biyofilm yapısının oluşumu için gerekli proteindir. OmpA, ayrıca sitokrom c salınımını uyarak konak epitel hücrelerini apoptoza sürüklemektedir (36).

1.1.3.4. Demir Toplama Sistemleri

Demir, hücre içinde hemoglobin, ferritin, hücre dışında transferrin ve laktoferrin gibi afinitesi yüksek demir bağlayan proteinlere bağlandığından, konakçı ortamda az miktarda serbest halde bulunmaktadır. Bu da bakterilerin üreyebilmesi için yetersiz kalır. Bu nedenle bakteriler hayatta kalabilmek ve çoğalabilmek adına konak ile demir rekabetine girmek zorundadır. Siderofor, birçok bakteride virülans için kritik olan, çok yüksek afiniteli demir şelatlayıcı moleküllerdir (38). *Acinetobactin*, *achromobactin*, *fimsbactins A-F* ve *baumannoferrin A-B*, *A. baumannii* suşlarının ihtiyaç duyduğu demiri sağlamak için salgıladığı sideroforlardır (39).

1.1.3.5. Kapsül

D-mannoz, D-glukuronik asit ve L-ramnozdan oluşan bir polisakarit kapsülünün varlığı hücre yüzeyini daha hidrofilik hale getirir. Bakterinin immünojenik yüzey yapıları ve konak savunmaları arasındaki etkileşimleri sınırlandırarak konak immün yanıtından kaçışa aracılık eder. Aynı zamanda antimikrobiyal bileşiklere ve olumsuz ortam koşullarına karşı bakteriyi korumaktadır (35,40).

1.1.3.6. Fosfolipaz

Acinetobacte baumannii'nin diğer önemli virülans faktörleri Fosfolipaz C ve D'dir. Bu proteinler, konakçı hücre zarında bulunan fosfolipitleri parçalayarak hücrelerin lizisine aracılık eder ve bakteri invazyonunu kolaylaştırmaktadır (41).

1.1.4. *Acinetobacter baumannii* Enfeksiyonları

Acinetobacter türleri sağlıklı kişilerin koltuk altı ve kasık gibi nemli cilt bölgeleri, ağız boşluğu ve solunum sistemi florasında bulunabilir. Canlılıklarını koruyabilmek için ihtiyaç duyduğu minimum besin ortamı gereksinimi, farklı sıcaklık ve pH değerlerine uyum sağlama yetenekleriyle kuru yüzeylerde haftalarca hayatta kalabilmektedir (42, 43).

Acinetobacter cinsi bakteriler daha çok hastane kökenli fırsatçı enfeksiyonlara yol açmaktadır. Malignite, yanık, immün sistemi baskılayan durumlar, mekanik ventilasyona bağlı olma, yakın zaman önce geçirilen cerrahi operasyonlar, damar içi kateter, hastanede uzun yatış süresi, trakeostomi veya endotrakeal tüp varlığı, idrar sondası, yoğun bakımda kalma, enteral beslenme, uzun süre devam eden antibiyotik kullanımı hem kolonizasyon hem de enfeksiyon gelişimi için risk oluşturmaktadır. Hastalara ait kontamine sıvıların damlacıkları kısa mesafede hava yoluyla yayılabilmekte, çevresel kontaminasyona ve bulaşa neden olabilmektedir. Ancak en yaygın bulaş şeklinin hastane personelinin elleriyle olduğu bildirilmiştir (44,45).

Acinetobacter türleri dünya genelinde nozokomiyal enfeksiyonlarla ilişkili başlıca etken olarak tanınmakta ve özellikle de yoğun bakımlarda ciddi yayılım göstermektedir. En sık alt solunum yolunu etkilemekle birlikte, başta ventilatörle ilişkili pnömoni (VIP), idrar yolu enfeksiyonu, kateter kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonu ve cerrahi alan enfeksiyonu; daha nadir olarak endokardit, menenjit, peritonit, konjonktivit, osteomyelit ve sinovit gibi çok çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır (27,29,46).

Acinetobacter türlerinden *A. baumannii*, en sık, en dirençli ve en virülan olanıdır. Aynı zamanda dünya genelinde nozokomiyal enfeksiyonlarla ilişkili en önemli etkindir (29,46–48). En sık ventilatörle ilişkili pnömoni olmak üzere, *Acinetobacter*'e bağlı gelişen sağlık hizmetleriyle ilişkili enfeksiyonların çoğuna neden olabilmektedir. *A. baumannii*'nin neden olduğu MDR enfeksiyonlar, hastanede kalışın uzamasına, ölüm oranlarının ve maliyetlerin artmasına neden olmakta, hasta güvenliği için ciddi tehdit oluşturmaktadır (43,46).

Acinetobacter cinsi, tüm kan dolaşımı enfeksiyon etkenlerinden yaklaşık %2'sini oluşturmakta olup *A. baumannii* bunlardan en sık görülenidir. Bakteriyemi ile ilişkili en yüksek ölüm oranı yine *A. baumannii*'de görülmektedir (46). *A. baumannii* kaynaklı bakteriyemi, en sık intravasküler kateterler ve solunum yolu kateteri, pnömoni; daha nadir olarak da cerrahi yaralar, yanıklar, endokardit ve üriner sistem kaynaklıdır. Olguların %21-70'inde ise bakteriyeminin kaynağı tespit edilememiştir (32,49). *A. baumannii*'ye bağlı bakteriyemi, daha çok yoğun bakım ünitelerindeki kritik hastalarda meydana gelmektedir (49).

Acinetobacter baumannii'nin, idrar yolu enfeksiyonu etkeni olarak görülme sıklığı azdır. Ancak her zaman MDR olması tedavide zorluğa neden olmaktadır (43). Kalıcı kateterlere bağlı idrar yolu enfeksiyonlarının rehabilitasyon merkezlerinde görülme sıklığı, yoğun bakımlara göre genellikle daha fazladır. Yara enfeksiyonları, askeri operasyonlar sırasında yaralanan askerler gibi ciddi yanık veya travması olan hastalarda bildirilmiştir (44,46).

Acinetobacter baumannii'nin yol açtığı toplum kökenli pnömoni nadirdir ancak giderek daha fazla sayıda bildirilmektedir. Vakalar sıklıkla, hastanın özgeçmişindeki kronik obstrüktif akciğer hastalığı, alkol, diyabet veya sigara gibi durumlarla ilişkilendirilmiştir (44).

1.1.5. Antimikrobiyal Direnç ve Tedavi

Acinetobacter baumannii'nin, sınırlı virülans potansiyeline sahip bir patojen olduğu kabul edilmiş, fakat sonrasında enfeksiyonlarının yüksek morbidite ve mortalite ile seyrettiği belirlenmiştir. Bu durum, patojenin gerçek virülansının yeterli tedavinin mevcudiyeti tarafından gizlenmiş olabileceğini ortaya koymuştur. Bu bağlamda dirençli *A. baumannii* suşların hızla yayılması önemli bir endişe kaynağı olmaktadır (45,50).

Acinetobacter baumannii'nin neden olduğu hastane enfeksiyonları, dünya çapında giderek yaygınlaşmakta olup, nozokomiyal enfeksiyonlara sebep olan en önemli dirençli bakterilerden biri haline gelmiştir (40,45). *Acinetobacter* cinsi bakteriler bazı antibiyotiklere dış membran geçirgenliğinin değişikliği, eflüks pompalarının etkisi ile doğal dirençli olabileceği gibi plazmit, transpozon ve integronlar aracılığıyla genetik unsurların kazanılması gibi çok çeşitli mekanizmalarla sonradan da son derece hızlı direnç geliştirebilmektedir (42, 49, 51).

Acinetobacter türleri amoksisilin-klavulanat, amoksisilin, ampisilin, aztreonam, seftriakson, sefotaksim, fosfomisin, ertapenem, trimetoprim, doksisiklin ve tetrasikline doğal direnç göstermektedir (52). *A. baumannii* suşlarının bu kadar tehlikeli olması bu doğal ve edinilmiş geniş antibiyotik direnci nedeniyle tedavilerinin oldukça zor olmasından kaynaklanmaktadır (53).

Çoklu dirençli *A. baumannii* kaynaklı enfeksiyonlarda etkili olabilecek sadece birkaç antibiyotik seçeneği bulunmaktadır. Karbapenemler, bu tür enfeksiyonlarda

kullanılabilmesine rağmen, artık karbapeneme direnç oranları da giderek artmaktadır (51,54). WHO, karbapenem dirençli *A. baumannii*'yi, tedavisinde kullanılacak yeni antimikrobiyallerin geliştirilmesine kritik ihtiyaç duyulan üç bakteriden biri olarak belirlemiştir (55).

Karbapenem dirençli *A. baumannii* suşları genellikle diğer sık kullanılan antibiyotiklere de dirençli saptanmakta olup, yalnızca polimiksin, tigesiklin ve minosiklin gibi çok az sayıda antibiyotiğe duyarlı olabilmektedir (51, 54).

Antimikrobiyal kombinasyonlar, MDR *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde uygun bir alternatif olarak görülmektedir. Kombinasyon tedavilerinin etkinliği üzerine birçok araştırma yapılmış olmakla birlikte, bu konuyla ilgili klinik deneyim sınırlıdır (44,51).

Bakteriler beta-laktam ajanlara, sentezlediği beta-laktamazlar yoluyla direnç geliştirebilmektedir. Bu direnci kırmaya yönelik beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonları kullanılır. Sulbaktam, bir beta-laktamaz inhibitörüdür. Bununla birlikte penisilin bağlayıcı protein-2 (PBP-2)'nin inhibisyonu yoluyla *A. baumannii*'ye karşı antimikrobiyal aktiviteye de sahiptir. Tedavide ampisilin-sulbaktam veya sefoperazon-sulbaktam kombinasyonu şeklinde uygulanmaktadır (56,57).

Karbapenem, sulbaktam veya ampisilin, sulbaktam, karbapenem kombinasyonlarının karbapenem dirençli izolatlarda bile etkili olduğu görülmüştür (54,56). Sefoperazon-sulbaktam ile kombine edilen tigesiklinin PDR *A. baumannii* enfeksiyonlarında etkili olduğu bildirilmiştir. Sulbaktam veya polimiksin ile kombine edilen imipenem, tedavide başarıyla kullanılmıştır (43,57). İmipenem ve amikasin; imipenem, rifampin ve kolistin, önerilen kombinasyonlar arasında bulunmaktadır (44).

Dirençli *A. baumannii* kökenli enfeksiyonlarda kullanılan kombinasyon tedavilerinin önemli bir bileşeni kolistindir. Kolistin/sulbaktam, kolistin/rifampisin, kolistin/karbapenem, kolistin/minosiklin, kolistin/tigesiklin, kolistin/daptomisin, kolistin/teikoplanin kolistin/fusidik asit gibi kombinasyonların sinerjik etkili olduğu belirlenmiştir (44,54).

Acinetobacter baumannii enfeksiyonlarında işe yarayan karbapenem, tigesiklin, kolistin gibi son birkaç antibiyotiğe de giderek artan oranda direnç geliştiği bildirilmekte ve bu durum hastaların tedavisini neredeyse imkansız hale getirmektedir (50,53,54). Kolistine dirençli *A. baumannii*'ye karşı birçok antibiyotik

kombinasyonunun in vitro aktivitesi araştırılmış, kolistin-rifampin ve kolistin-teikoplanin en etkili olduğu gösterilmiştir (54).

1.2. *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)

1.2.1. Tarihçe ve Sınıflandırma

Pseudomonas'ın tarihi, 1850 yılında Fransız askeri cerrah Sédillot'un, askerlerin pansumanlarındaki mavi-yeşil renk bozulmasının enfeksiyöz bir ajanla ilişkili olduğunu gözlemlemesiyle başlamıştır. 1860'ta Fordos tarafından bu mavi renklenmeden sorumlu pigment tespit edilip, 1862'de Lucke tarafından bu pigmentin basil şeklindeki mikroorganizmalarla ilişkili olduğu belirlenmiştir. 1882'de Carle Gessard yayınladığı çalışmayla iki hastanın mavimsi-yeşil irinli deri yaralarından organizmayı izole ettiğini bildirmiştir. Bakteriye ilk önce 1880'lerde *Bacillus pyocyaneus* ismi verilmiş, daha sonra 1900 yılında Migula tarafından *Pseudomonas* olarak adlandırılmıştır. *Pseudomonas* ismi, Yunan dilinde yalandan anlamına gelen “pseudes” ve birim anlamına gelen “monas” kelimelerden türetilmiştir. *P. aeruginosa*'nın tür adı ise oluşturduğu mavi-sarı pigmentasyon nedeniyle Latince anlamı bakır pası-yeşil renk olan “aeruginosa” dan gelmektedir (58,59).

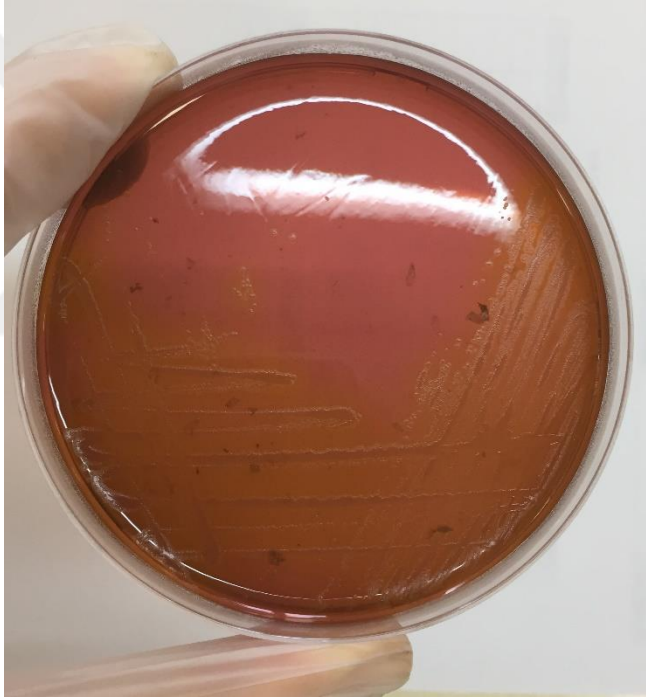
1.2.2. Mikrobiyolojik Özellikleri

Pseudomonas, *Pseudomonadaceae* familyasında yer alır. İnsanlarda, hayvanlarda, bitkilerde, toprakta, doğada hemen her ortamda bulunabilen, 200'den fazla tür içeren bakteri cinsidir (60,61).

Pseudomonas aeruginosa, değişken uzunlukta, nonfermentatif, tek polar flagellasıyla hareketli, oksidaz pozitif, Gram negatif basildir. En dikkat çekici bakteriyolojik özelliği, renkli pigmentler üretmesidir. *P. aeruginosa*'nın, büyüme ve enerji gereksinimini karşılamak için nitrojen ve karbon kaynağı olarak amonyak ve karbon dioksit gibi basit molekülleri kullanabildiğinden zenginleştirilmiş ortama ihtiyaç duymaz. Hemen hemen her ortam şartlarında ve geniş bir sıcaklık aralığında (10-44°C) yaşayıp çoğalabilir. Ancak optimum büyüme 35 °C'de gerçekleşir. Zorunlu aerobtur, ancak son elektron alıcısı olarak nitratı kullanabilir, bu yüzden anaerobik koşullarda da yaşayabilmektedir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan birçok kültür ortamında kolayca üreyebildikleri için rahatlıkla izole edilebilir. Agar plağında

karakteristik bir metalik parlaklığa sahip, yoğun meyveli koku yayan, R tipinde koloniler oluşturur. %5 KKA'da genellikle hemoliz yapar. Bazı suşları aljinat üretimine bağlı olarak mukoid koloniler şeklinde görülebilir (58,62,63).

Pseudomonas aeruginosa suşlarının çoğu kültür ortamında karakteristik mavi-yeşil renk veren piyosiyenin ve sarı renk veren piyoverdin pigmentlerini oluşturmaktadır. Piyosiyenin pigmenti *P. aeruginosa*'ya özgüdür. Daha nadir olarak bazı suşlar ise kahverengimsi siyah pigment piyomelanin ve koyu kırmızı pigment piyorubini üretmektedir (58). 42°C'de üreme özelliği, diğer *Pseudomonas* türlerinden ayırt edilmesinde yardımcıdır. Katalaz testi pozitif, indol testi negatiftir. Laktoz ve sükrozu fermente etmez. H₂S oluşturmazlar, genellikle nitratları redükte ederler (64).



Resim 2. EMB agarda *P. aeruginosa*'nın R tipi kolonileri

1.2.3. Virülans Faktörleri

1.2.3.1. Lipopolisakkarit

Gram negatif bakteri dış membranının temel bileşeni olan LPS tabaka, lipid A, O antijeni ve kor polisakkaritinden oluşmaktadır. Bakteri için fiziksel bir bariyer oluşturur, doğal antibiyotik direncinde rol oynar, konak reseptörleri ile etkileşimlere

aracılık eder. LPS yapı ayrıca dış zar veziküllerinin üretiminde ve biyofilm oluşumunda rol oynamaktadır (65).

1.2.3.2. Aljinat

Aljinat, bakterinin biyofilm oluşturmada sağlayan, kapsülde yer alan polimannuronik poliguluronik asitten oluşan mukoid bir ekzopolisakkarittir. Opsonizasyon ve fagositoza karşı koruma sağlar, bakterinin adezyonunda rol oynar. *P. aeruginosa*'nın solunum yolu epiteline tutunarak kolonize olmasını sağlar. Bununla birlikte antimikrobiyallere karşı polianyonik bir engel oluşturup penetrasyonlarını bozarak antibiyotik direncine neden olmaktadır. Özellikle beta-laktam antibiyotiklerin hücreye girişini engelleyerek tedaviyi zorlaştırmaktadır. Kistik fibrozis (KF) hastalarının solunum sisteminde gözlenen *P. aeruginosa* suşları sıklıkla aşırı aljinat üretimi nedeniyle mukoid fenotiptedir ve bu suşlar KF hastalarında kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (63,64,66).

1.2.3.3. Flagella

Pseudomonas aeruginosa'nın yüzeyinde polar yerleşim gösteren filamentöz uzantıdır. Bakteriye ileriye doğru hareket ettiren bir kuvvet oluşturarak *P. aeruginosa*'nın yüzme şeklindeki hareketini sağlar. Motilitenin yanı sıra, akciğer epitel hücre membran komponenti olan asialo-GM1'e bağlanarak adezyona yardımcı olur (67,68).

1.2.3.4. Tip IV Pili

Pili, flagellaya göre daha küçük, genellikle birden fazla filamentöz yüzey uzantılarıdır. *P. aeruginosa*'nın seğirme şeklindeki hareketini sağlayarak hava yollarına hızla yayılmasını ve kolonize olmasını kolaylaştırır. Flagella gibi konak epitel hücre membranının asialo-GM1'ine bağlanarak adezyonda önemli rol oynamaktadır (69,70).

1.2.3.5. Tip I Sekresyon Sistemi (T1SS)

Tip I sekresyon sistemiyle toksinlerin hücre dışındaki boşluklara salgılanma süreci tek aşamalıdır. T1SS'de çalışılan en önemli toksin alkalın proteazdır. Alkalın proteaz, fibrin oluşumunu engeller, *P. aeruginosa*'nın yayılımını destekler.

Kompleman C1q, C3, IFN- γ , TNF- α , IL-6 gibi konakçı immün sisteminin çeşitli bileşenlerini parçalar. Ayrıca nötrofil fonksiyonlarını inhibe ederek antifagositik etki göstermektedir (66,71,72).

1.2.3.6. Tip II Sekresyon Sistemi (T2SS)

Tip II sekresyon sistemi, toksinleri öncü proteinler olarak sentezlendiği ve ardından parçalandığı iki aşamalı bir süreçte salgılar. Sitotoksik etkilere, inflamatuvar süreçlere ve kolonizasyona aracılık eden eksotoksin A, fosfolipaz C, proteaz IV ve elastaz T2SS tarafından salgılanan toksinlerdir (66).

1.2.3.7. Ekzotoksin A

Pseudomonas aeruginosa'ya ait en önemli virulans faktörlerinden olan ekzotoksin A, ADP-ribozil transferaz aktivitesiyle ökaryotik elongasyon faktör-2 (EF-2) inhibisyonu yaparak konakçı protein sentezine engel olur. Bu şekilde hücre ölümüne yol açmaktadır (73). Hücresel aktivitenin ve makrofaj yanıtının bozulmasıyla doku hasarının oluşumunda görevlidir (64).

1.2.3.8. Elastaz

Elastin, kolajen ve kolajen olmayan konakçı proteinlerinin proteolitik yıkımını gerçekleştirmektedir. Akciğer sürfaktan proteinleri A ve D, immünoglobülinler ve kompleman komponentlerini parçalar. Nötrofil aktivitesinin bozulması ve monosit kemotaksisinin inhibisyonunda görevlidir (64,74).

1.2.3.9. Proteaz IV

Laktoferrin, transferrin, elastin, dekorin ve kazeinin proteolitik yıkımını sağlar (74).

1.2.3.10. Hemolizinler

Ramnlipid molekülleri ve fosfolipaz C, *P. aeruginosa*'da bulunan hemolizinlerdir. Konak hücre zarlarına hasar vererek gözenek oluşturan toksinler olup eritrositleri hemolize uğratırlar (74,75).

1.2.3.11. Piyosiyenin

Tip II sekresyon sistemi tarafından salgılanan, *P. aeruginosa*'nın mavi-yeşil pigment metaboliti olan piyosiyenin, proinflamatuar etkileriyle hastalık şiddeti ve akciğer fonksiyonunda azalma ile ilişkilidir. Oksidatif stresi tetikler, hücre içi serbest oksijen radikallerini artırır. Hücre döngüsünün bileşenlerine, çeşitli enzimlere, DNA'ya zarar vererek hücre ve dokuyu hasara uğratar. Piyosiyenin ayrıca silyalı solunum yolu epitelinin siliyer fonksiyonlarını bozar ve solunum yollarında mukus salgısını artırarak bakterinin akciğer kolonizasyonuna katkıda bulunmaktadır. KF hastalarının akciğerlerinde *P. aeruginosa*'nın, büyük miktarlarda piyosiyenin ürettiği belirlenmiştir (74,76).

1.2.3.12. Tip III Sekresyon Sistemi (T3SS)

Tip III sekresyon sistemi, hücrede porlar oluşturan karmaşık pilus benzeri bir uzantı yoluyla bakteriyel efektör proteinlerin doğrudan konakçı hücre sitoplazmasına yer değiştirmesini sağlar (109). Hücre iskeletinin temel elemanlarını ve protein sentezini etkileyerek epitel hücre hasarı oluşumu, doku invazyonu ve bakterinin kan dolaşımına yayılmasını sağlar. Konak hücre immün yanıtını baskılayarak hastalık şiddetini artırır. Ekzoenzim (Exo) T, Exo Y, Exo U ve Exo S olmak üzere dört major efektör proteinin T3SS yoluyla salındığı ve farklı suşlarda değişken olarak ifade edildiği bilinmektedir. Exo S ve T, DNA sentezini inhibe eden, hücre iskeleti ve hücre morfolojideki değişiklikleri indükleyen proteinlerdir. Exo U, apoptozu indükleyen, fagosit ve parankimal hücrelerin nekrozuna neden olan bir fosfolipazdır. Exo Y ise, pulmoner endotel hücrelerin bariyer fonksiyonlarını bozan bir adenilat siklazdır. Tüm *P. aeruginosa* suşları T3SS genlerini barındırır da, sadece birkaçı bu efektör proteinleri salgılamaktadır. *P. aeruginosa* izolatlarında T3SS'nin ekspresyonunun, eksprese etmeyenlere göre daha kötü bir klinik sonucun ortaya çıkmasına neden olduğu bildirilmiştir (66,77,78).

1.2.3.13. Antioksidan Enzimler

Pseudomonas aeruginosa, konakçıdaki oksidatif stresin zararlı etkilerinden korunmasını sağlayan katalaz (KatA, KatB ve KatC/KatE), alkil hidroperoksit

redüktaz (AhpA, AhpB, AhpCF ve Ohr) ve süperoksit dismutaz (SodA ve SodB) antioksidan enzimlerini ifade eder (79).

1.2.3.14. Demir Toplama Sistemleri

Demir (Fe^{3+}), bakteri metabolizmasında ihtiyaç duyulan önemli bir moleküldür. Konakçıda demir, transferrin, laktoferrin gibi hücre dışı proteinler tarafından güçlü bir şekilde şelatlandığından serbest olarak kolayca bulunmaz. *P. aeruginosa*, demir gereksinimlerini karşılamak için piyoverdin ve pyochelin sideroforlarını üretir (74,80).

1.2.3.15. Biyofilm

Bakterilerin çoğu, yüzeylerindeki moleküller ve hücre uzantıları aracılığı ile birbirlerine tutunup, salgıladıkları polisakkarit matrikste yerleşerek biyofilm adı verilen kompleks yapıyı oluşturmaktadır. Bu yapı, mikroorganizma, polisakkarit, DNA, protein ve lipidlerden oluşur. Biyofilmler, canlı ve cansız birçok yüzeyde bulunabilmekle birlikte genellikle implante edilebilir cihazlar üzerinde veya osteomyelit, KF gibi kronik enfeksiyonlar sırasında oluşmaktadır. Konakçı immün yanıtına ve antibiyotiklere karşı engel görevi görür. Sıcaklık dalgalanmaları ve besin maddesinin azalması gibi ortam şartlarındaki değişikliklere karşı koruyucu mikroçevre oluşturarak mikroorganizmaların hayatta kalabilme şansını artırır. Ayrıca hücre sinyalizasyonunu kolaylaştırmaktadır (66,81).

1.2.3.16. Quorum Sensing

Bakterinin bulunduğu mikroçevreye uyum sağlaması ve gelen farklı uyaranları algılayıp yanıt oluşturmaları, enfeksiyonlarının patogenezinde önemlidir. Mikroorganizma, ortamdaki bakteri popülasyonu, pH, besin kaynağı, ozmolarite gibi değişimleri kendine ait farklı mekanizmalarla algılayarak metabolizmasında bazı değişiklikler oluştur ve yeni şartlara adapte olmaya çalışır. Quorum sensing (QS) sistemi, mikroorganizmalar tarafından salgılanan küçük sinyal molekülleri aracılığıyla iletişimin kurularak, bakterinin etrafındaki popülasyon yoğunluğunu saptamasını sağlar. Bakteriler, bu sayede belirli bir yoğunluğa ulaşmış olduklarını algılamakta ve yeterli yoğunluğa ulaştıklarında virulans faktörlerinin sentezi gibi birçok genin ekspresyonunu düzenlemektedir. Bu sistem, bakterinin davranışlarını regüle ederek

aynı besin için yarışan diğer bakterilerle savaşmasını, konakçının immün cevabından kaçmasını ve bulunduğu ortama adaptasyon geliştirmesini sağlamaktadır. QS ayrıca biyofilm oluşumunu da kontrol etmektedir (66,82).

1.2.4. *Pseudomonas aeruginosa* Enfeksiyonları

Pseudomonas aeruginosa, minimum besin maddesiyle hayatta kalma ve çoğalma yeteneği, fiziksel koşullara dayanıklı yapısıyla doğada her yerde yaygın şekilde bulunan bir mikroorganizmadır. Çoğunlukla hastanelerde nemli ortamlarda bulunmakta, solunum cihazları, antiseptikler, sabun, ilaçlar, paspaslar, hidroterapi ve fizyoterapi havuzları, lavabolar dahil olmak üzere çeşitli bölgelerden izole edilebilmektedir (59,62). Enfeksiyonları da genellikle insan vücudunda trakeostomi, damar içi kateter, yanık, dış kulak ve akıntılı cilt yaraları gibi nemli bölgelerde görülmektedir. Piyosiyanın üretimi kaynaklı üzüm benzeri koku ve mavi renkli püy sızıntısı *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyonların karakteristik özellikleridir (64).

Pseudomonas aeruginosa, insan normal mikrobiyal florasının çok nadir bir üyesidir. En yaygın olarak, az miktarlarda, gastrointestinal kanalda bulunur. Boğaz ve burnu kolonize edebilir. Ayrıca koltuk altı, perine gibi nemli cilt yüzeylerinde geçici olarak kolonize olabildiği gösterilmiştir. Mekanik ventilasyon, trakeostomi, kateter uygulamaları, cerrahi girişimler, ciddi yanıklar, antimikrobiyal tedavi ve bağışıklığı baskılayan durumlar *P. aeruginosa* kolonizasyonunu arttırmaktadır (59,68).

Pseudomonas aeruginosa, özellikle transplant alıcıları, nötropenik hastalar ve HIV'li hastalar gibi immünsüpresif kişilerde hayatı tehdit edebilen çok çeşitli akut ve kronik enfeksiyona yol açan fırsatçı patojendir. İmmünkompetan bireylerde enfeksiyon oluşturmaları nadirdir. Mukozal bariyerlerin kaybı, geniş spektrumlu antimikrobiyal tedavinin seçici baskısı enfeksiyon gelişimi için önemli risk faktörleridir (83,84).

Pseudomonas aeruginosa, nozokomiyal enfeksiyonlara yol açan patojenlerin başında yer almakla birlikte, özellikle yoğun bakım ünitelerinde ciddi sorun oluşturmaktadır. Lokalize yara enfeksiyonundan, pnömoni ve menenjitte kadar değişen geniş bir hastalık tablosuna neden olmaktadır. Kan dolaşımı enfeksiyonları, üriner kateterle ilişkili enfeksiyonlar, cerrahi alan enfeksiyonları, transplantasyon sonrası enfeksiyonlarla sıklıkla ilişkilidir. Nozokomiyal pnömoni, kronik obstrüktif akciğer

hastalığı veya KF hastalarında yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olmaktadır (75,84,85).

Pseudomonas aeruginosa, solunum sistemi, üriner sistem, gastrointestinal sistem, santral sinir sistemi gibi vücutta birçok sistemi tutabilir, kemik ve eklem enfeksiyonları, bakteriyemi, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, sepsisi, endokardit gibi vücudun hemen her yerinde enfeksiyonlara neden olabilir. Özellikle alt solunum yolu enfeksiyonları, immünsüpresif bireylerde ciddi ve ölümcül seyredebilmektedir (64,75,86).

Pseudomonas aeruginosa, VİP'in en yaygın nedenlerinden biridir. VİP'e çoğunlukla *P. aeruginosa*'nın dirençli suşları neden olmakta, bu da tedavide başarısızlıklara, hastanede kalış süresinde ve mortalite oranlarında artışa sebep olmaktadır. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu VİP'in, diğer bakterilerden daha yüksek vaka ölüm oranları ile ilişkilendirildiği bildirilmiştir (87–89).

Pseudomonas aeruginosa, KF hastalarının solunum yolu enfeksiyonu etkenlerinden en sık rastlanan bakteri türüdür (90). *P. aeruginosa* bu KF hastalığının ortaya çıkış ve ilerleme sürecinde önemli bir etkindir. Tekrarlayan *P. aeruginosa* enfeksiyonları ile kronik hava yolu inflamasyonu, KF hastalarındaki morbidite ve mortalitenin başlıca nedenidir (63,83).

Etkenin *P. aeruginosa* olduğu üriner sistem enfeksiyonları sıklıkla nozokomiyal kökenlidir. Üriner sistemde tıkanıklığa sebep olan hastalıklar, cerrahi girişimler, üriner sistem kateterizasyonu enfeksiyon gelişimi için risk oluşturmaktadır. Orta büyüklükteki renal damarların tutulması, çok sayıda olan renal infarkt alanları, renal pelvis, mesane mukozası ve üreterde ülserasyonlar *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında görülen bulgulardır. *P. aeruginosa* bakteriyemisinin yaklaşık %40'ında üriner sistem birincil odağı oluşturmaktadır (75).

Pseudomonas aeruginosa bakteriyemisi özellikle immünyetmezlikli hastalarda meydana gelir. Bazı *P. aeruginosa* bakteriyemilerinde, organizma tarafından kan damarı duvarlarının doğrudan istilası ve tahrip edilmesiyle ektima gangrenozum denilen siyah, nekrotik ülserlere ilerleyen kutanöz papüller gelişmektedir (62,75).

Endokardit, menenjit, beyin apsesi veya hematojen yayılımla gelişen kemik ve eklem enfeksiyonu olguları düzenli olarak bildirilmektedir. *P. aeruginosa* ilaç bağımlılarında hem doğal hem de protez kalp kapaklarına yerleşip enfektif endokardit

gelişimine yol açabilir. *P. aeruginosa* nedenli endokarditler, enfeksiyonun eradikasyonu güç olduğundan sıklıkla kapak replasmanı gerektirmektedir (64,75).

Bakteriyel keratitin en yaygın etkenlerinden biri *P. aeruginosa*’dır. Kontak lens kullanımı ve travma keratit riskini artırmaktadır. Bakteri aynı zamanda gözde hasar oluşturan enfeksiyonlara da neden olabilmektedir. *Pseudomonas* kaynaklı keratit, endoftalmi ve kornea ülserleri, kalıcı görme kaybına gidebilen tıbbi acil durumlar olarak değerlendirilmelidir (62,64,75).

Pseudomonas aeruginosa dış kulakta yaralanma, maserasyon, inflamasyon gibi durumlarda eksternal kanala rahatlıkla yerleşerek otitis eksterna, kronik otitis media gibi tablolara neden olabilir. Sıcak su küvetleri ve yüzme havuzlarıyla ilişkili *P. aeruginosa* dermatiti ve eksternal otit salgınları tanımlanmıştır. Eksternal otit sıklıkla yüzücülerde görüldüğünden “yüzücü kulağı” denmiştir. Kulak delinmesini takiben ortaya çıkan sporadik *P. aeruginosa* enfeksiyonları da bildirilmiştir. Ayrıca yaşlı diyabet hastalarında malign eksternal otit gelişimine de neden olabilmektedir (62,64,75).

1.2.5. Antimikrobiyal Direnç ve Tedavi

Pseudomonas aeruginosa, her yerde bulunan doğası ve potansiyel virülansı nedeniyle sağlık bakım ortamlarında kontrolü zor bir patojendir. *P. aeruginosa* antibiyotiklere düşük dış zar geçirgenliği, antibiyotiği inaktive eden enzimlerin üretimi ve antibiyotikleri hücreden dışarı atan efluks pompa sisteminin ekspresyonu gibi mekanizmalarla içsel; mutasyonel değişiklikler veya direnç genlerinin plazmit, transpozon, integron ve profajlar üzerinde yatay transferi yoluyla kazanılmış; bakteriye antibiyotik erişimini sınırlayan biyofilm oluşumu gibi geçici değişikliklerle adaptif direnç gösterebilmektedir (91–93).

Dünya çapında MDR *P. aeruginosa* suşların sayısı giderek artmaktadır. *P. aeruginosa*, sefalosporinlerden birinci ve ikinci kuşaktakiler, sefiksim, sefotaksim, seftriakson, penisilin G, aminopenisilinler, ertapenem, kanamisin, tetrasiklin, trimetoprim, tigesiklin, kloramfenikole doğal dirençlidir. Bununla birlikte, antimikrobiyal ajanlara maruziyetten sonra kolayca farklı mekanizmalarla direnç geliştirebilmesi enfeksiyonlarının tedavisini zorlaştırmaktadır. Bununla birlikte

günümüzde beta-laktam, aminoglikozit, karbapenem gruplarından sıklıkla kullanılan birçok ajana dirençli suşlar bildirilmektedir (52,60,94,95).

Pseudomonas aeruginosa'daki çoklu antibiyotik direnci aktaran plazmidler, bakterinin mevcut tüm antibiyotiklere direnç göstermesine neden olabilmektedir. Birçok ülkede *K. pneumoniae* karbapenemazı (KPC) üreten *P. aeruginosa* izolatları bildirilmiştir. Ayrıca hem KPC hem de metallo-beta-laktamaz (MBL) bulunduran PDR *P. aeruginosa* izolatları da rapor edilmiştir (64). WHO, karbapenem dirençli *P. aeruginosa*'yı, tedavisi için yeni antimikrobiyallere kritik ihtiyaç duyulan dirençli bakteri enfeksiyon etkenleri arasına almıştır (55).

Penisilinlerden piperasilin, karbenisilin, tikarsilin; piperasilin-tazobaktam, üçüncü kuşak sefalosporinlerden seftazidim, sefaperozon; sefepim, aztreonam, imipenem, meropenem, aminoglikozidlerden tobramisin, amikasin, gentamisin; kinolonlardan siprofloksasin, levofloksasin *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisi için yaygın kullanılan antibiyotiklerdir (91,95).

Kombinasyon tedavisinin, patojenin antimikrobiyallerden en az birine duyarlı olma olasılığını artırması, bakteriye farklı mekanizmalarla etki etmesi, ilaç direncinin ortaya çıkmasını önlemesi, antibiyotiklerin sinerjik etkisi gibi farklı avantajları olsa da hiçbir randomize kontrollü çalışma, iki in vitro aktif ajanla tedavinin, tek bir ajana göre sonuçları iyileştirdiğini veya direnç gelişimini azalttığını belirlememiştir (94,96).

Kombinasyon tedavisi uygulanacaksa, *P. aeruginosa*'ya karşı in vitro aktiviteye sahip, farklı sınıftan iki ajan kullanılması önerilir. Genellikle, bir beta-laktam antibiyotik, aminoglikozit, polimiksin veya florokinolonlardan biriyle kombinasyon halinde kullanılır (91,94,96).

Fosfomisin, kolistin ve polimiksin B, MDR *P. aeruginosa* tedavisi için etkili alternatif ajanlar olabilir. MDR *P. aeruginosa*'ya karşı kolistin imipenem, piperasilin, aztreonam, seftazidim, azlosilin, rifampin veya siprofloksasin gibi bir antipsödomonas ajanı ile kombinasyonunun, tek başına kolistinden daha etkili olduğu bildirilmiştir (95,96).

Seftazidim-avibaktam ve seftolozan-tazobaktam, MDR *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde giderek daha fazla kullanılmaktadır. İmipenem-rebeaktam ve sefidrokol de MDR *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına karşı kullanılan en yeni ajanlardandır (94).

1.3. *Escherichia coli* (*E. coli*)

1.3.1. Tarihçe ve Sınıflandırma

Escherichia cins adı, 1885 yılında yenidoğan bağırsak florası üzerine yaptığı çalışmalarda *E. coli* bakterisini tanımlayan Theodore Escherich'ten gelmektedir. *E. coli*, gastrointestinal sistemdeki en yaygın fakültatif anaeroptur (97,98).

Escherichia coli, doğada her yerde bulunabilmesi, dayanıklı yapısı, kolay kültür koşulları, hızlı çoğalması, hakkında bilinen bilgi zenginliği ile biyolojideki en önemli model mikroorganizma olup, endüstriyel alan ve laboratuvar uygulamalarında en sık kullanılan prokaryottur. Genetik kod, transkripsiyon, translasyon ve replikasyon gibi moleküler biyoloji temellerinin ilk kez üzerinde çalışıldığı organizma olmuştur (99,100).

Escherichia coli suşları H (flagella), K (kapsül) ve O (somatik) yüzey antijenlerine göre sınıflandırılmaktadır. O antijenleri, LPS yapıdadır. Isıya ve alkole direnç gösterir, formole dayanıksızdır. 170'ten fazla sayıda O serogrubu saptanmıştır. Protein yapıdaki H antijenleri hareketli suşlarda bulunur. Isıya ve alkole dayanıksızdır. Günümüzde 60'a yakın H antijeni saptanmıştır. O ve H antijenlerinin spesifik kombinasyonları, *E. coli* izolatının serotipini tanımlamaktadır. Polisakkarit yapıdaki K antijeni ısıya dayanıklıdır. K antijeninin yaklaşık 80 çeşidi belirlenmiştir. Bu antijenler spesifik virülen klonlarla ilişkili kromozomal göstergeler olup tek başlarına virülansı göstermezler. Örneğin, 086 serogrubu insan bağırsak florasında bulunurken, serogrup 055 genellikle hastalıkla ilişkilidir. O157: H7 serotipi bağırsak enfeksiyonuyla ilişkilirken, K1 antijeni içeren *E. coli* suşlarının yenidoğanlarda sistemik enfeksiyonlara yol açtığı bildirilmiştir (101–103).

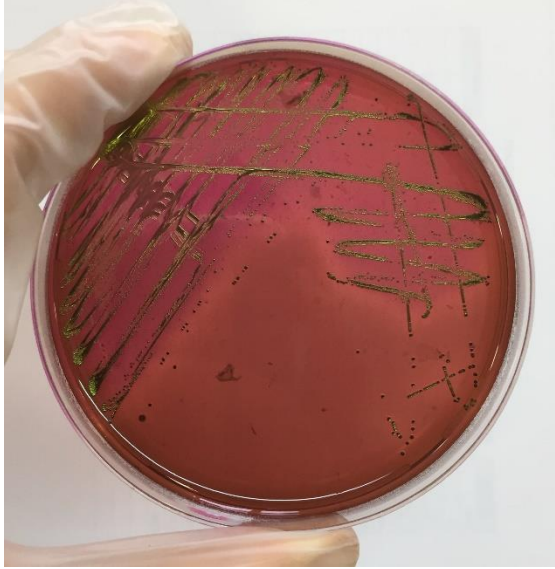
1.3.2. Mikrobiyolojik Özellikleri

Escherichia coli, *Proteobacteria* filumu, *Gammoproteobacteria* sınıfı, *Enterobacteriales* takımı, *Enterobacteriaceae* familyası ve *Escherichia* cinsinde yer alır. Çoğunlukla peritrik flagellalarıyla hareketli, sporsuz, fakültatif anaerop, ortalama 1 µm en ve 2-6 µm boya sahip, Gram negatif basillerdir. Oksidaz negatiftir, glikozu fermente eder, katalaz testi ise pozitifdir (101,104).

Escherichia coli, laboratuvarlarda en sık rastlanan bakteri türüdür. Aerobik koşullarda, 37°C'de inkübe edildiğinde, rutinde sıklıkla kullanılan besiyerlerinde

kolayca ürer. Besiyerinde, S tipi, ortalama 1-2 mm çaplı koloniler oluşturur. 15-45°C aralığında üreyebilir. 44°C’de üreyebilme özelliği ile *Enterobacter* ve *Serratia* türlerinden ayırt edilebilir. Diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinin de ürediği MacConkey veya EMB agarda *E. coli* suşlarının %90 kadarı laktoz pozitif koloniler oluşturur. Enteroinvaziv *E. coli*’nin (EIEC) de dahil olduğu bazı intestinal *E. coli* tipleri laktoz negatiftir. Birçok köken, M ve K antijenlerine sahip mikrokapsül oluşturabilmektedir (101,103).

Escherichia coli’lerde indol testi %99 pozitifdir. Bu test *E. coli*’leri diğer *Enterobacteriaceae* türlerinden ayırt etmede en faydalı testtir. Sitrat ve Voges Proskauer testleri negatif iken, Metil Red testi pozitifdir. Genellikle H₂S oluşturmazlar. Fenil alanin deaminaz ve üreaz testleri negatiftir. *E. coli* suşları, glikozdan asit ve gaz oluşturur. D-mannoz, maltoz, D-ksiloz, laktoz, D-mannitol, D-sorbitol, trehaloz, L-arabinoz, L-ramnozu fermente eder. Adonitol, inositol, selobioz, D-arabinol, eritrolü fermente etmez. Nitratı nitrite indirgerler ve bazı kökenleri dışında üreyi parçalamazlar (101,103).



Resim 3. EMB agarda metalik refle veren *E. coli* kolonileri

1.3.3. Virülans Faktörleri

Escherichia coli, *Enterobacteriaceae*’larda bulunan, gözenek oluşturucu sitotoksinler, protein sentezi inhibitörleri, konakçı hücrelerde haberci yolları değiştiren toksinler gibi her türlü protein ekzotoksini üretebilmektedir (105). Dış membran yüzeyindeki LPS, ısı labil (LT) ve ısı stabil (ST) toksinler, hemolizin,

sitotoksik nekrotizan faktör 1 (CNF-1), Shiga toksin (Stx) gibi çeşitli toksin sentezi, kolisin üretimi, fimbrialar, intimin gibi afimbrial adezinler, siderofor salınımı; katalaz-peroksidaz, ekstraselüler serin-proteaz gibi plazmid ile kodlanan faktörler *E. coli* suşlarının virülans faktörleridir (102,106).

2.3.4. Kommensal *E. coli*

Escherichia coli, insan hayatının ilk saatlerinden itibaren sindirim sisteminde kolonize olmaya başlar ve daha sonra burada kommensal olarak yaşar. Ancak sindirim sistemi savunma mekanizmaları veya immün yanıtı baskılayan durumlarda kommensal *E. coli* suşları bile enfeksiyon oluşumuna neden olabilmektedir. Patojen suşların etken olduğu enfeksiyonlar, mukozal yüzeylerde sınırlı kalabildiği gibi tüm vücuda da yayılabilmektedir. Patojen *E. coli*'lerin kommensal suşlardan farkı, her patojenik tip için kromozom, plazmid veya bakteriofaj üzerindeki patojenite adacıklarında kodlanan, özel virülans faktörlerinin varlığından kaynaklanmaktadır. Patojen *E. coli*'lerde, genetik ve klinik özellikleri farklı, intestinal *E. coli* (DEC) ve ekstraintestinal *E. coli* (ExPEC) olarak iki grup bulunmaktadır (101,106,107).

1.3.5. Ekstraintestinal *E. coli* (ExPEC)

Escherichia coli, insan ve memeli hayvan gastrointestinal sisteminin en yaygın flora elemanı ve aynı zamanda en önemli patojenlerinden biridir. *E. coli* suşlarının çoğu, kolonda zararsız bir şekilde yaşamasına ve sağlıklı bireylerde nadiren hastalığa neden olmasına rağmen, bazı patojenik suşlar sağlıklı veya immünsüpresif bireylerde tüm yaş gruplarında, birçok anatomik bölgeyi tutabilmekte, intestinal ve ekstraintestinal olarak enfeksiyonlara neden olabilmektedir (97,108).

İntestinal *E. coli*'nin aksine ExPEC suşları, insan bağırsağında enfeksiyon oluşturmayıp beyin omurilik sıvısı (BOS), kan dolaşımı veya idrar yoluna girdiklerinde ciddi patojenler haline gelebilmektedir. Üropatojenik *E. coli* (UPEC) ve menenjitte ilişkili *E. coli* (MAEC), ekstraintestinal enfeksiyonlarla ilişkili *E. coli* suşlarıdır (98).

Ekstraintestinal *E. coli*'nin konakçıda mukozal yüzeyleri kolonize etmesine, lokal ve sistemik savunma mekanizmalarından kaçmasına olanak tanıyan LPS yapı, kapsül, çeşitli adezinler, toksinler, sideroforlar, proteazlar, invazinler ve serum direnç proteinlerini içeren karakteristik virülans faktörleri bulunmaktadır (106).

En fazla idrar yolu enfeksiyonu olmak üzere, yara enfeksiyonları, immünsüpresif bireylerde pnömoni ve yenidoğan menenjit, *E. coli*'ye bağlı yaygın görülen enfeksiyonlardır. İntrauterin enfeksiyonlar, kan dolaşımı enfeksiyonları, endokardit gibi nozokomiyal ve toplum kaynaklı hemen her türlü enfeksiyona neden olabilmektedir (97,103,108,109).

Escherichia coli, idrar yolu enfeksiyon etkenleri arasında en yaygın görülen bakteridir. Erişkindeki Gram negatif bakteriyemide en sık etken olan türdür. Bununla birlikte kateterle ilişkili idrar yolu enfeksiyonları, neonatal menenjit, neonatal sepsis, Gram negatif sepsis ve endotoksik şokun en yaygın görülen etkenlerinden biridir (103,106,110,111).

1.3.6. Diyarejenik (İntestinal) *E. coli* (DEC)

Kommensal suşların aksine, sağlıklı bireylerin bağırsak florasında DEC suşlarına nadiren rastlanır. Virülans faktörleri bakımından bazı patotipler arasında bir miktar örtüşmeler olsa da, her patotip ayrı patojenik mekanizmalar oluşturan spesifik virülans faktör kombinasyonlarına sahiptir (97,112). Bununla birlikte, EIEC ile *Shigella*'nın invazyon mekanizmalarının benzerliği, enterohemorajik *E. coli* (EHEC) ve *Shigella dysenteriae* (*S. dysenteriae*)'nin Shiga toksin salgılaması, enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) LT'si ile kolera enterotoksininin yapı ve fonksiyon açısından benzerliği, enteropatojenik *E. coli* (EPEC) ve EHEC'lerin *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* türleri gibi T3SS kullanması gibi *E.coli* suşlarının diğer bakterilerle de ortak patojenite mekanizmaları bulunmaktadır (108).

İntestinal *E. coli*'lerde, virülans faktörleri, enfeksiyon mekanizmaları, enterosit ile etkileşim, doku tropizmi ve oluşturduğu hastalığın semptomlarına göre diffüz aderan *E. coli* (DAEC), ETEC, enteroagregatif *E. coli* (EAEC), EHEC, EIEC ve EPEC olarak altı ana patotip tanımlanmıştır (107).

1.3.6.1. Enteropatojenik *E. coli* (EPEC)

Enteropatojenik *E. coli*, özellikle kötü hijyen koşulları altındaki bebeklerde ishale neden olmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde infantil ishalinin önde gelen nedenidir. EPEC enfeksiyonunda subfebril ateş, halsizlik, bol sulu diyare, bulantı ve kusma görülmektedir. Diğer DEC suşlarında olduğu gibi EPEC'in bulaşı da kontamine ürünlerden fekal-oral yollaadır (97,108).

Bağırsak epitel hücrelerine yapışıp tutunma/bozma (A/E) lezyonları olarak bilinen karakteristik histopatolojik lezyonlar oluşturur. İntestinal epitel hücrelerine sıkıca bağlanıp hücre iskeletinde değişiklik oluşturarak, enterositler arası sıkı bağların zayıflamasına, mikrovillus yapılarının silinmesine neden olması sonucunda sıvı kaybı ile birlikte ishal kliniği gelişmektedir (97,103,105,113).

Demet oluşturan piluslar (Bfp) olarak adlandırılan tip IV fimbria ve intimin gibi virülans faktörleri bu patogeneizde rol oynamaktadır. Bfp, EPEC suşlarının kendi kendine kümelenip, mikrokoloni oluşturmalarını sağlar. Tutunma ve bozma etkisi, T3SS, dış membran adezini intimin, transloke intimin reseptörü ve bazı proteinleri kodlayan, enterosit efüzyon lokusu (LEE) denilen bir patojenite adası tarafından yönetilmektedir (112,113).

1.3.6.2. Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC)

Enterotoksijenik *E. coli* enfeksiyonları sıklıkla gelişmekte olan ülkelerde çocukluk çağında veya bu bölgelere seyahat eden bireylerde görülmektedir. Turist diyaresine neden olan en yaygın patojendir (97,108,112).

Enterotoksijenik *E. coli* daha çok kontamine gıda ürünleri ve sudan bulaşır. Kişiden kişiye bulaş bildirilmemiştir. Genellikle ani başlangıçlı, günde on defaya kadar çıkan sıklıkta sulu ishal tablosu görülür. Hastalık birkaç gün sürer ve sıklıkla da kendi kendini sınırlar. Yetersiz beslenen çocuklarda hastalık biraz daha uzun seyirli olabilmektedir (97,108,114).

Enterotoksijenik *E. coli*, kolonizasyon faktör antijenleri (CFA) gibi fimbrial adezinler ve spesifik bağlayıcı reseptörler aracılığıyla intestinal mukoza hücrelerinin mukozal yüzeyine yapıştıktan sonra konakçı üzerindeki patojen etkilerini başlatır. Sonrasında plazmidlerin kodladığı LT ve ST salgılayarak hücre hasarını tetikler. ST guanilat siklazı, LT adenilat siklazı aktive edip hücre içinde siklik guanozin monofosfat (cGMP) ve siklik adenozin monofosfat (cAMP) düzeylerini artırarak klor (Cl^-) sekresyonunda artışa, sodyum (Na^+) ile Cl^- emiliminde azalmaya ve neticede sıvı kaybına sebep olmaktadır. Hem toksin hem de kolonizasyon faktörleri kliniğin oluşumu için şarttır. ETEC enfeksiyonlarında, bağırsak mukozasında histolojik değişiklikler veya inflamasyon bulgusu görülmemektedir (97,98,101).

1.3.6.3. Enteroagregatif *E. coli* (EAEC)

Enteroagregatif *E. coli*, genel olarak persistan ishal etkeni olarak tanınmaktadır. Dünya genelinde çeşitli salgınlarla da ilişkilendirilmiştir. Daha çok gelişmekte olan ülkelerdeki immünsüpresif kişiler ve çocuklarda önemli bir morbidite nedenidir (108,115). EAEC enfeksiyonlarında ateş, kusma ve kanlı ishal kliniği görülmektedir (114).

Enteroagregatif *E. coli*'ler, HEp-2 hücrelerine otoagreatif olarak bağlanıp, karakteristik "tuğla yığını" benzeri adezyon paterni oluşturmaktadır (108). EAEC'nin patojenite mekanizması tam olarak bilinmemektedir. EAEC'nin intestinal mukozaya agregasyonu sağlayan agregatif aderens fimbriaları (AAF/I ve AAF/II) ve salgıladığı enteroagregatif sitotoksin (EAST), virülans faktörleridir. EAST'in enfeksiyon semptomlarından sorumlu olduğu düşünülmektedir (97,113,116).

1.3.6.4. Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC)

Enteroinvaziv *E. coli*, çocuklarda ve erişkinlerde genellikle sulu ishal yapmakla birlikte, *Shigella* ile benzer klinikte dizanteriform ishale de yol açabilmektedir (113,114). *Shigella* türleri karın ağrısı, ateş, kanlı ishale seyreden dizanteri tablosuna neden olurken, EIEC'de genellikle sulu ishal ve inflamatuvar kolit görülmekte, nadiren dizanteriye sebep olmaktadır (108). *Shigella* spp.'nin enfektif dozu (10^3 bakteri), EIEC'den (10^8 bakteri) daha düşüktür. EIEC'in oluşturduğu dizanteri, genellikle *Shigella*'ya bağlı olandan daha hafif seyirlidir (114).

Enteroinvaziv *E. coli* enfeksiyonunda temel patogeneze, T3SS ile hücre içine girme ve ardından hücreden hücreye geçiştir (113). *Shigella* spp. ile bazı patojenik özellikleri benzerdir. Kolonik enterositler içinde bağlanma, endositoz ve çoğalmaya aracılık eden proteinler, plazmitler (pINV plazmiti) üzerinde taşınan bir gen kümesi tarafından kodlanır. EIEC, kolonik enterositlere girerek sitoplazmada çoğalır. Sitoplazma içindeki hareketi ve komşu hücrelere geçişi aktin filamanları ile kontrol edilir. Oluşturduğu inflamatuvar infiltrasyon ile hücre ölümüne ve epitel hücre tabakasının kaybına neden olur. Bu durum kalın bağırsağın nekrozu, ülserasyonu ve dışkıya kan, mukus salınımıyla sonuçlanmaktadır (98,114).

1.3.6.5. Diffüz aderan *E. coli* (DAEC)

Diffüz aderan *E. coli*'ler, HEp-2 hücrelerine diffüz şekilde yapışma paterni nedeniyle bu şekilde adlandırılmıştır. DAEC, hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelerde görülen diyare etkenidir. Su ve gıdaların dışkı ile kontaminasyonu ana bulaş yolunu oluşturur. Enfekte olan kişilerde ateş, kusma, karın krampları, sulu veya kanlı diyare tablosu görülmekte ve hastalık süresi ortalama bir hafta sürmektedir (113,116,117).

Diffüz aderan *E. coli*'nin konak hücrelere yapışmasında başta yaygın yapışmada rol oynayan yapıştırıcı (AIDA-1) ve F1845 fimbria olmak üzere çok sayıda faktör bulunmaktadır. Adezinlerin reseptörlerle etkileşimi hücresel çıkıntıların büyümesini kontrol eden ve bakterilerin hücre yüzeyine sıkı bir şekilde bağlanmasını sağlayan sinyal iletim basamaklarını tetikler. Bakteri hücre yüzeyine sıkıca tutunur, kolonizasyon adımlarını ve sinyal iletim yollarının aktivasyonunu başlatır, bu da inflamatuvar yanıtlarla sonuçlanır (117).

1.3.6.6. Enterohemorajik *E. coli* (EHEC)/Shiga Toksin Üreten *E. coli* (STEC)

Enterohemorajik *E. coli*, bakteriyofaj ile kodlanan Verotoksin (VT) salgılar. Verotoksine, *S. dysenteriae*'nin Shiga toksiniyle benzer antijenik yapı ve biyolojik aktiviteye sahip olduğundan Shiga benzeri toksin (Shiga like toxin) de denmektedir. EHEC'in enfektif dozu düşüktür (<100 bakteri). Hastalarda hafif seyirli ishalden hemorajik kolit veya hemolitik üremik sendroma (HÜS) kadar değişen klinik tablolara neden olabilir (97,101,108). EHEC, özellikle küçük çocuklarda, yaşlılarda ve immünsüpresif kişilerde enfeksiyon oluşturan, zoonotik ve gıda kaynaklı bir patojendir (118). EHEC, hayvan dışkısıyla kontamine olmuş sebze, meyve, sularla veya iyi pişmemiş hamburger köfteleri, çiğ süt tüketimiyle insanlara bulaşabildiği gibi fekal-oral yolla insanlar arasında da bulaş olabilmektedir (97,119). 380'den fazla farklı EHEC OH serotipi izole edilmiştir. Bu serotiplerden O157: H7, hem salgınlar hem de sporadik şiddetli hastalık vakaları ile en sık ilişkili olandır (116,120).

Enterohemorajik *E. coli*'nin iki temel virülans stratejisi, VT üretimi ve bağırsakta kolonizasyondur. Kalın bağırsağın mukozal epitel hücrelerinin kolonizasyonunu, A/E sitopatolojisi ile gerçekleştirir. A/E lezyonu, EPEC ile ilişkili

olana benzer şekildedir ve mikrovilluslar yok edilir. Ancak EPEC suşlarından farklı olarak Bfp üretmezler. Enfeksiyonunun patogeneğinde LEE patojenite adası tarafından kodlanan proteinler ve NleC, NleD, NleF, NleG, NleA, NleB ve NleE gibi LEE dışındaki patojenite adalarında kodlanmış birçok efektör molekül rol oynamaktadır. VT, bağırsak epitel hücrelerinde apoptozu indükler, kanlı ishal, hemorajik kolit, nekroz ve bağırsak perforasyonu ile sonuçlanabilen lokal hasara neden olur. VT ayrıca renal glomerüllerde ve diğer organlarda trombotik mikroanjiyopati oluşturarak, böbrek yetmezliği, mikroanjiyopatik hemolitik anemi ve trombosit sayısında düşüklük bulguları ile seyreden HÜS'e yol açabilmektedir (112,113,120).

1.3.7. Antimikrobiyal Direnç ve Tedavi

Escherichia coli, normal oda sıcaklığında uzun müddet canlılığını koruyabilen, çevre şartlarına oldukça dayanıklı bakterilerdir. *E. coli* suşları dış ortam koşullarına dayanıklı yapısı ve bakteriden bakteriye kolayca aktarılabilen direnç plazmitlerini taşımasıyla, özellikle hastane ortamında çeşitli antimikrobiyallere karşı kolayca direnç geliştirebilmektedir (101).

Escherichia coli suşlarının antimikrobiyallere direnç gelişiminde, antibiyotığın inaktivasyonu, modifiye edici enzimler, porin mutasyonları, efluks pompaları, hedef bölgenin değiştirilmesi, direnç genlerinin kazanılması gibi birçok farklı mekanizma rol oynamaktadır (121,122).

Çoğu *E. coli* ishali, kendini sınırlayıcı ve hafif seyirli olduğundan, genellikle rehidrasyon ve destek tedavisi yeterli olmaktadır. ETEC, EIEC ve EPEC enfeksiyonlarında, trimetoprim-sülfametoksazol veya florokinolonların kullanımı diyare süresini azaltmaktadır. Ancak EHEC'te antimikrobiyal ajanların kullanımı, toksin sentezini ve salınımını hızlandırıp hemorajik kolit veya HÜS riskini artırabileceğinden kontrendikedir (105,123).

Penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları, florokinolonlar, aminoglikozitler ve trimetoprim-sülfametoksazol *E. coli*'nin neden olduğu çeşitli enfeksiyonların tedavisinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (122,124). İdrar yolu enfeksiyonları sıklıkla ampirik olarak tedavi edilir. Nitrofuratoin ve fosfomisin, ampisilin, trimetoprim-sülfametoksazol

veya florokinolonlar bu amaç için kullanılan ajanlardır. Diğer antimikrobiyallerin seçimi ise antimikrobiyal duyarlılık testi ile yapılmalıdır (105,124).

Escherichia coli'nin antibiyotiklere karşı direnci, bildirilen ilk vakalardan bu yana giderek artmakta ve halk sağlığı sistemleri için dünya çapında küresel bir tehdit oluşturmaktadır. Son yirmi yılda beta-laktamlar, kinolonlar, aminoglikozitler, sülfonamidler ve fosfomisin gibi başlıca antibiyotik sınıflarına dirençli *E. coli* suşlarında büyük artışlar bildirilmiştir (109,121).

Çoklu ilaca dirençli *E. coli* enfeksiyonları, terapötik seçeneklerin ciddi şekilde sınırlı olması nedeniyle büyük bir endişe kaynağıdır. Bununla birlikte GSBL üretimi, karbapenem direnci ve son zamanlarda karşılaşılan kolistin direnci, tedavi seçeneklerini önemli ölçüde karmaşıktırmıştır (122,125,126).

Birçok Gram negatif bakteri GSBL üretebilir. Ancak bu enzimleri eksprese eden suşların büyük çoğunluğu *Enterobacteriaceae* ailesine aittir. Bunlar arasında ise *E. coli* ve *K. pneumoniae* en üst sırada yer almaktadır (127). GSBL'ler, penisilinlere, oksimino-sefalosporinlere ve monobaktam antibiyotiklere direnç kazandıran, plazmit aracılı enzimlerin heterojen bir grubudur. GSBL üreten bakteriler ayrıca florokinolonlar, trimetoprim-sülfametoksazol, aminoglikozitler gibi diğer ajanlara da sıklıkla direnç göstermektedir. GSBL üreten *E. coli* enfeksiyonları dünya çapında giderek yaygınlaşmaktadır. Bu durum, hastaların hastanede kalış süresinin uzamasına neden olmakla birlikte, mortalite oranlarını ve maliyetleri olumsuz yönde etkilemektedir (125,128,129).

Karbapenemler, AmpC veya GSBL üreten *E. coli* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılacak antimikrobiyal seçeneklerden biridir. Ancak MDR GSBL üreten *E. coli* enfeksiyon sıklığının artışı, karbapenemlerin kullanımını artırmakta bu da karbapenemaz üreten bakterilerin ve karbapenem direncinin yayılmasına neden olmaktadır (124,125,128,129). Karbapenemaz üreten *E. coli*'ye karşı in vitro olarak en iyi etkinlik gösteren antibiyotiklerin kolistin, tigesiklin, temosilin ve fosfomisin olduğu bildirilmiştir (124).

1.4. *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*)

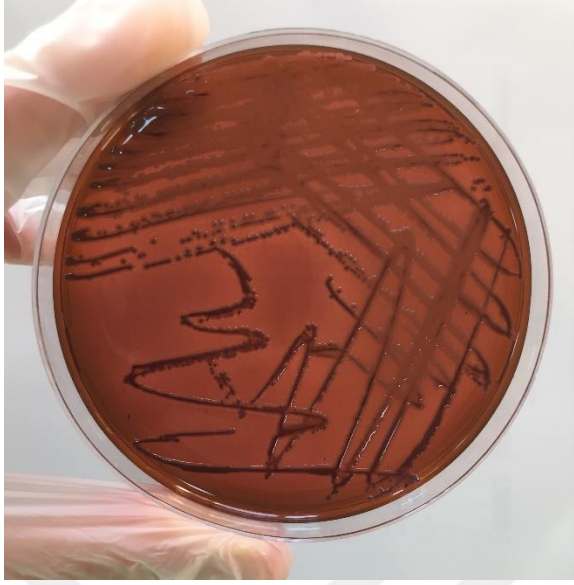
1.4.1. Tarihçe ve Sınıflandırma

Klebsiella, ilk önce 1882’de Carl Friedlander tarafından pnömoni nedeniyle hayatını kaybeden hastaların solunum örneklerinden izole edilmiş, "Friedlander basili" ismiyle, kötü prognozlu ve sıklıkla ölümcül seyreden pnömoni etkeni olarak anılmıştır. *Klebsiella* cins adı ise yine o yıllarda yaşamış olan Alman mikrobiyolog Edwin Klebs’e ithafen verilmiştir (130,131).

İki bin bir yılında dokuz *Klebsiella* türünün *rpoB* genleri ve 16S rRNA’larının karşılaştırmalı dizi analizi gerçekleştirilmiş, *Klebsiella* cinsinin heterojen olduğu ve üç filogenetik küme oluşturan türleri içerdiği doğrulanmıştır. *Klebsiella pneumoniae* subspecies *pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Klebsiella pneumoniae* subspecies *rhinoscleromatis* (*K. rhinoscleromatis*), *Klebsiella granulomatis* (*K. granulomatis*), *Klebsiella pneumoniae* subspecies *ozaenae* (*K. ozaenae*) Grup I’de; *Klebsiella trevisanii* (*K. trevisanii*), *Klebsiella ornithinolytica* (*K. ornithinolytica*), *Klebsiella terrigena* (*K. terrigena*), *Klebsiella planticola* (*K. planticola*) Grup II’de ve *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*) Grup III’te yer almış ancak daha sonra elde edilen genetik veriler sonucu Grup II’de yer alan türler *Raoultella* cinsine aktarılmıştır (130).

1.4.2. Mikrobiyolojik Özellikleri

Klebsiella türleri, *Enterobacteriaceae* ailesinde bulunan, hareketsiz, fakültatif anaerob, 0,3–1 µm eninde, 0,6–6 µm boyunda Gram negatif basillerdir. Çoğu izolat kalın bir polisakkarit kapsül ve fimbriaya sahiptir. MacConkey agarda, büyük, mukoid ve laktoz fermentasyonu ve asit üretimini gösteren mor renkte koloniler oluşturur. Laboratuvarlarda kullanılan izolasyon plaklarında, büyük ve mukoid kolonilerle karşılaşıldığı zaman *Klebsiella* türleri akla gelmeli ancak suşların hepsinin mukoid olmadığı ve bazı *Enterobacter* türlerinin de bu görünümde olabileceği unutulmamalıdır. *Klebsiella* türlerinde çoğunlukla üreaz testi pozitifdir. Christensen üreli eğik agar yüzeyinde pembe renk değişimi oluştururlar. *K. oxytoca* dışında triptofandan indol oluşturmazlar. *K. pneumoniae*’nin Metil red testi negatif, Voges-Proskauer testi pozitifdir. Lizini dekarboksile ederken ornitin ve arjinini dekarboksile etmez. Laktoz, arabinoz, sükroz, adonitol, sorbitol gibi karbonhidratları fermente eder ve H₂S oluşturmazlar (130,132).



Resim 4. EMB agarda mukoid yapıda *K. pneumoniae* kolonileri

1.4.3. Virölans faktörleri

1.4.3.1. Kapsül

Klebsiella pneumoniae, *cps* gen kümesi tarafından kodlanan polisakkarit yapıda kapsüle sahiptir. Kapsül, dış membranı çevreleyerek mikroorganizmayı maskeler. Antifagositik etki gösterir. Antimikrobiyal ajanların etkisine karşı bakteriyi korur. Ayrıca makrofajların farklılaşmasını ve fonksiyonel kapasitesini inhibe etmektedir. *Klebsiella* türleri tarafından üretilen ve suşlar arasında ayırım yapmak için kullanılan 77'den fazla farklı antijenik kapsül tipi vardır. Özellikle de K1 veya K2 serotiplerinin üretimi *K. pneumoniae*'nin ana virölans faktörlerindendir (133–135).

1.4.3.2. Demir Toplama Sistemleri

Sideroforlar, birçok Gram negatif bakteride virölans için kritik olan, çok yüksek afiniteye sahip demir şelatlayıcı moleküllerdir. Bakteriyel çoğalmaya izin vererek dolaylı olarak inflamasyonu, doku hasarını ve bakteriyel yayılmayı artırır. *K. pneumoniae*, enterobaktin, yersiniabaktin, salmokein ve aerobaktin sideroforunu salgılar. Enterobaktin, en yüksek afiniteye sahip olan siderofordur. Bunlara karşılık konakçı nötrofil ve epitel hücreleri, patojenlerin demir alımını engelleyen, siderofor bağlayıcı protein lipokalin-2'yi üretir. Ancak lipokalin-2, sadece enterobaktin

aktivitesini engeller. Bakterilerin salgıladığı diğer sideroforlar lipokalin-2 varlığından etkilenmemektedir (136,137).

1.4.3.3. Pili

Enfeksiyöz süreçte mikroorganizmaların mukozal yüzeyleri kolonize edebilmesi için konak hücrelere bağlanması gerekir. Pililer bu bağlanmanın önemli araçlarıdır (133). *K. pneumoniae* suşlarında iki pili tipi sıklıkla bulunmaktadır. Bunlardan Tip 1 pili, *fim* geni tarafından kodlanır. Tükürük ve idrarda normalde bulunan, çözünür mannoz içeren glikoproteinlere bağlanabilmesiyle ürogenital ve solunum sistemi kolonizasyonunda rol oynamaktadır. Tip 3 pili ise *mrk* operonu tarafından kodlanır. Solunum epiteli, mesane epiteli, böbreklerde tübüler bazal membran, bowman kapsülü, renal damarlara bağlanma ve biyofilm oluşumunda rol oynamaktadır (133,134,138).

1.4.3.4. Lipopolisakkarit

Lipopolisakkarit, Gram negatif bakterileri hücre duvarında bulunan O antijeni, oligosakkarit çekirdek ve lipit A olmak üzere 3 komponentten oluşan, endotoksin özelliğe sahip yapıdır. LPS yapının en dış kısmında O antijeni bulunur. İmmün sistem tarafından karşılaşılan ilk moleküldür. C3b'yi bağlayarak bakteriyi kompleman aracılı öldürmeye karşı korumaktır. O antijeninin farklı serotipleri vardır. Klinik *K. pneumoniae* suşları arasında en yaygın olanı O1 antijenidir (134,136).

1.4.4. *Klebsiella pneumoniae* Enfeksiyonları

Klebsiella türleri doğada ve insan gastrointestinal sistemi, nazofarenks ve daha az sıklıkla diğer bölgelerin flora elemanı olarak bulunabilir. İmmünkompetan bireylerin *K. pneumoniae* ile enfekte olması nadirdir. *K. pneumoniae* çoğunlukla hastanede yatan veya immünsüpresif bireylerde enfeksiyonlara sebep olan fırsatçı bir patojendir. En yaygın görülen enfeksiyonları idrar yolu enfeksiyonu, bakteriyemi ve pnömonidir. Daha nadir olarak yara enfeksiyonları, karaciğer apsesi, intraabdominal enfeksiyonlar, intravasküler kateter enfeksiyonları, neonatal enfeksiyonlar, sepsisemi, menenjit gibi çeşitli bölgelerde enfeksiyonlara neden olmaktadır. Diyabet, malignite, son dönem böbrek hastalığı, immün sistemi baskılayan durumlar, alkol enfeksiyon gelişimi için zemin hazırlamaktadır (133,135,139,140).

Klebsiella türleri, dünya çapında en yaygın hastane enfeksiyon etkenleri arasında bulunmaktadır. *K. pneumoniae*, yenidoğan yoğun bakım üniteleri dahil, yoğun bakım hastalarında enfeksiyonlardan sorumlu en sık Gram negatif bakterilerdendir (132,141). ABD'de *Clostridium difficile* (*C. difficile*) ve *S. aureus*'tan sonra üçüncü sıklıkta hastane enfeksiyon etkeni olarak bildirilmiştir (131).

Klebsiella pneumoniae, akciğerde genellikle üst lobları etkileyen lobar pnömoniye neden olur. Görülme sıklığı, alkol bağımlılarında normal bireylere göre daha yüksektir. Hastaların kliniğinde hemoptiziden kaynaklanan “kuş üzümü jölesi” balgam görülür ancak yine de diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinin oluşturduğu pnömoniden ayırt edilemez. Günümüzde *K. pneumoniae*'ye bağlı gelişen pnömoni için artan mortalite oranları bildirilmektedir. Genellikle yaşlı ve immünsüpresif bireylerde ortaya çıkar. Uzun süreli yoğun bakım yatışları da enfeksiyon gelişimi için risk oluşturmaktadır. Bununla birlikte, *K. pneumoniae*'nin geriatrik hastalarda aspirasyon pnömonisi ile ilişkilendirildiği de bildirilmiştir (132,140,142,143).

Klebsiella pneumoniae idrar yolu enfeksiyonlarında *E. coli*'den sonra ikinci sırada izole edilen bakteri türüdür. Oluşturduğu idrar yolu enfeksiyonlarının patogenezi, diğer *Enterobacteriaceae*'lar ile benzerdir. Bakterinin konak yapılarına tutunma yeteneğinin enfeksiyon gelişiminde gerekli olduğu kabul edilir. Genellikle alt üriner sistemi etkiler. *K. pneumoniae* kaynaklı idrar yolu enfeksiyonları, piyelonefrit, genitoüriner enfeksiyonlar, perinefrik apse ve prostat tutulumu diğer enfeksiyöz etkenlerden klinik olarak ayırt edici özelliklere sahip değildir (140,144,145).

Klebsiella pneumoniae, Gram negatif kan dolaşımı enfeksiyonlarının *E.coli*'den sonra ikinci en yaygın nedenidir. Bakteriyemisi genellikle kötü prognozludur ve mortalite riskini artırabilmektedir. Alkolik karaciğer hastalığı ve diyabet, toplumdan edinilmiş *K. pneumoniae* bakteriyemisi için risk faktörleridir (132,140,146).

1.4.5. Antimikrobiyal Direnç ve Tedavi

Günümüzde tüm *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında *Klebsiella* türleri antimikrobiyal ajanlara en dirençli olanlar arasında yer almaktadır (142). *K. pneumoniae*, penisiline özgü bir beta-laktamazı kodlayan kromozomal gene sahip olduğundan ampisiline doğal dirençlidir. *K. pneumoniae* enfeksiyonlarını tedavi etmek

için penisilin/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları, birinci kuşak sefalosporinler, trimetoprim-sülfametoksazol, kinolonlar ve aminoglikozitler kullanılabilir (140).

Klebsiella pneumoniae izolatlarında 1960'larda ortaya çıkan penisilin direncinden sonra, beta-laktamaz genleri keşfedilmeye başlamıştır. 1980'lerde Almanya'da, yoğun bakımlardan izole edilen *K. pneumoniae* suşlarında, geniş bir beta-laktam antibiyotik toleransı sergileyen ilk GSBL geni tanımlanmıştır. GSBL üreten *K. pneumoniae* daha sonra hastane enfeksiyonu salgınlarında ana GSBL kaynaklı patojen haline gelmiştir (147). Özellikle son yıllarda GSBL üreten, MDR *K. pneumoniae* enfeksiyonları artan sıklıkta bildirilmektedir. Bu bakteriler için terapötik seçeneklerin çok kısıtlı olması tedavilerini zorlaştırmaktadır (148).

Mekanik ventilasyon, arteriyel ve santral venöz kateterizasyon, GSBL üreten diğer organizmalarla gastrointestinal sistem kolonizasyonu, uzun süre yoğun bakımda kalma, yenidoğan bebeklerde düşük doğum ağırlığı, antibiyotik kullanımı GSBL üreten *K. pneumoniae* kolonizasyonu için uygun zemin hazırlamakla birlikte enfeksiyon gelişimi için de risk oluşturmaktadır (148).

Karbapenemler, GSBL pozitif *K. pneumoniae* suşlarının tedavisinde sıklıkla kullanılan ajanlardır. Ancak, karbapenem kullanımının yaygınlaşmasıyla birlikte karbapenem dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonları da giderek artan oranlarda bildirilmektedir (140,149,150).

Enterobacteriaceae ailesinden birçok tür karbapenemaz enzimi üretebilir ve karbapenemlere dirençli hale gelebilir. Karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae*'lar, dünya genelinde önemli bir halk sağlığı problemi olmuştur. CDC, 2013'te karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae*'ları acil önlem gerektiren bir toplum sağlığı tehdidi olarak belirlemiştir (9,151). Karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarının mortalite oranları son derece yüksektir (150,152,153).

Karbapenemaz direnç genleri transfer edilebilir plazmitler yoluyla yayılabildiğinden bu tür suşlarla gelişen enfeksiyonları kontrol etmek zordur (140,150). Ayrıca karbapenemazlar, sadece karbapenemleri değil aynı zamanda penisilinleri, oksimino-sefalosporinleri ve sefamisinleri de hidrolize edebilir ve bu şekilde en geniş antibiyotik direnç spektrumunu sağlarlar. Bu nedenle karbapenemaz üreten izolatlar genellikle MDR veya PDR'dir (154,155).

Klinikte karbapenem dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonlarına yönelik çok az terapötik seçenek bulunmaktadır. Bu enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek ajanlar genellikle polimiksinler, tigesiklin, fosfomisin, aminoglikozitler veya bu ajanlarla yapılan kombinasyon tedavileri ile sınırlıdır (156–158). Ayrıca son yıllarda seftazidim-avibaktam, meropenem-vaborbaktam ve imipenem/silastatin-relebaktam gibi yeni kombinasyonlar da kullanılmaya başlanmıştır (153,156,159).

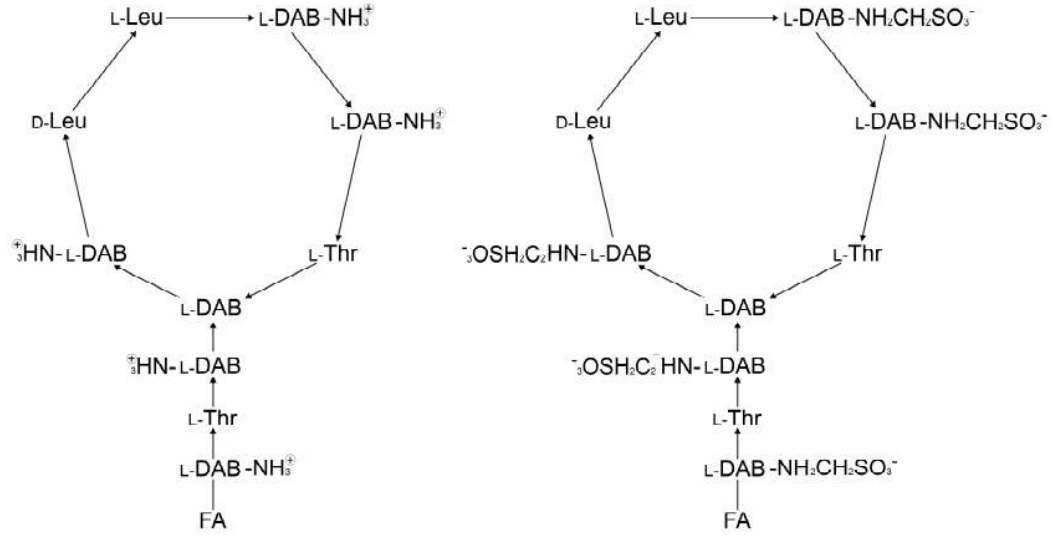
1.5. Kolistin (Polimiksin E)

Polimiksinler, siklik yapıli katyonik polipeptit antibiyotik grubudur. Bu grupta, kimyasal olarak farklı yapıda beş bileşik (polimiksin A-E) bulunmakta olup bunlardan sadece polimiksin E ve polimiksin B klinik kullanım için uygundur.

Kolistin 1947'de keşfedildikten sonra terapötik olarak kullanımı ilk olarak 1950'lerde Japonya ve Avrupa'da başlamıştır (160). O dönemde yaygın şekilde kullanılan bir antibiyotikken, ciddi nefrotoksisite ve nörotoksisite yan etkilerinin ortaya çıkmasıyla 1970'lerde kullanımı bırakılarak, toksik etkileri daha az, yeni kullanıma giren başka antibiyotiklere geçilmiştir (161,162). Günümüzde MDR Gram negatif bakterilerin giderek yayılması ve tedavide kullanılacak alternatif antimikrobiyal ajanların eksikliği, kolistini tekrar gündeme getirmiştir (160–162).

1.5.1. Kolistinin Kimyasal Yapısı

Kolistin, toprak bakterisi *Paenibacillus polymyxa* subspecies *colistinus*'tan izole edilmiştir (160). Kolistin, hidrofilik polikasyonik peptit halkası ve bir hidrofobik yağ asidi kuyruğundan oluşan, 1200 Da ağırlığında, polipeptit yapıli antibiyotiktir. Kolistimetat sodyum ve kolistine ait kimyasal yapılar Şekil 1'de gösterilmiştir (163,164).



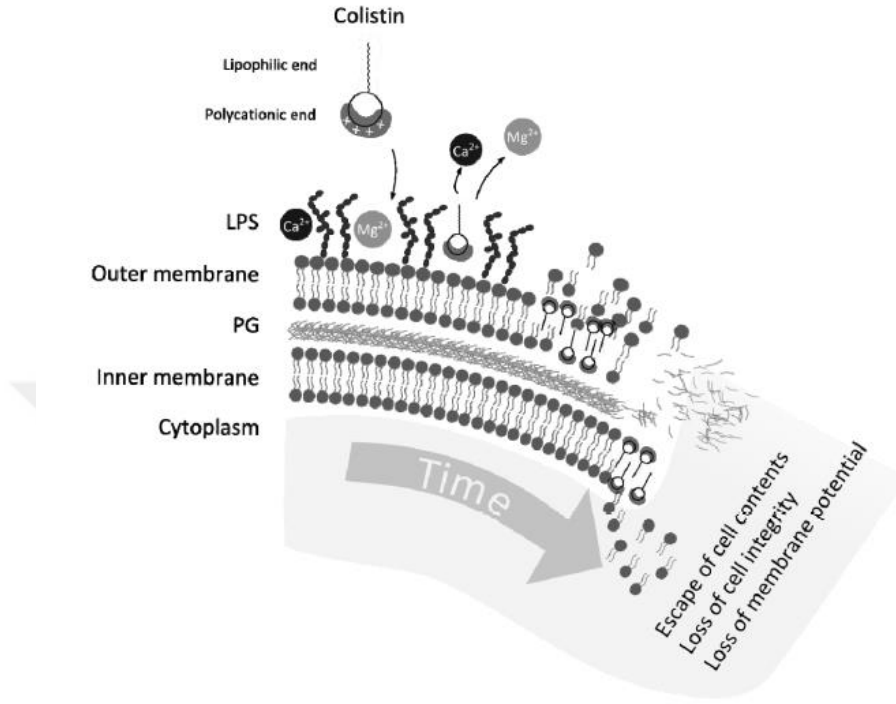
Şekil 1. Sırasıyla kolistin ve kolistimetat sodyuma ait kimyasal yapılar (Thr: treonin, Leu: lösin, DAB: diaminobütirik asit, FA: yağ asidi) (164)

Kolistimetat sodyum (kolistin metansülfonat) ve kolistin sülfat, klinik uygulamalar için temin edilebilen kolistin ticari formlarıdır. Kolistimetat sodyum, kolistin sülfatın nefrotoksik ve nörotoksik etkilerini azaltma amacıyla yapılan çalışmalarla bulunmuş, daha az toksik ama aynı zamanda etkinliği de daha az olan formdur. Kolistimetat sodyum inaktif bir ön ilaçtır. Biyolojik sıvılarda ve sulu çözeltilerde kendiliğinden hidrolize uğrayıp aktif form olan kolistin sülfata dönüşerek etkinliğini gösterir. Kolistin sülfat, oral yolla alındığında gastrointestinal sistem tarafından absorbe edilmediğinden selektif bağırsak dekontaminasyonunda kullanılırken, cilt enfeksiyonlarının tedavisinde topikal olarak uygulanmaktadır. Kolistimetat sodyum, parenteral, intramüsküler, intratekal veya intraventriküler olarak farklı uygulama yollarına sahiptir. Ayrıca bu iki form inhalasyon yoluyla da kullanılabilir (160,162,164).

1.5.2. Kolistin Etki Mekanizması

Kolistin, bakteri hücre zarını hedef alan bakterisidal etkili bir antibiyotiktir. Katyonik polipeptit yapısıyla Gram negatif bakteri dış membranındaki anyonik özellikteki LPS tabakaya elektrostatik etkileşimlerle bağlanır ve bu yapıyı stabilize eden divalen katyonlarla (Mg^{+2} , Ca^{+2}) yer değiştirip dış membrandaki bütünlüğü

bozar. Bu durum membran geçirgenliğinde artış, sitoplazmik içeriğin dışarı sızması ve hücre ölümü ile sonuçlanır. Kolistinin antimikrobiyal etki mekanizması şekil 2’de gösterilmiştir (164,165).



Şekil 2. Kolistinin antimikrobiyal etki mekanizması (164)

Gram negatif bakterilerin endotoksin etkisinden, hücre duvarındaki LPS yapının lipid A kısmı sorumludur. Kolistin bu bölgeye bağlanıp nötralize ederek güçlü anti-endotoksin aktivitesi göstermektedir (165).

Polimiksinlerin bir başka etki şekli de bakteriyel iç zardaki tip II NADH-kinon oksidoredüktaz (NDH-2) solunum enzimlerini inhibe ederek mikroorganizmanın ölümüne yol açmasıdır (166).

1.5.3. Kolistinin Etki Spektrumu

Kolistin, *Citrobacter*, *E. coli*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Enterobacter*; *Pseudomonas* cinsinden *Pseudomonas putida* (*P. putida*), *P. aeruginosa*, *Pseudomonas maltophilia* (*P. maltophilia*), *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*); bunula birlikte *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*), *Moraxella*, *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*), *Bordetella*, *Pasteurella*, *Legionella pneumophila* (*Legionella pneumophila*);

Mycobacterium'lardan *Mycobacterium intracellulare* (*M. intracellulare*), *Mycobacterium xenopi* (*M. xenopi*), *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), *Mycobacterium phlei* (*M. phlei*), *Mycobacterium fortuitum* (*M. fortuitum*), *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*) ve anaerobik türlerden *Bacteroides melaninogenicus* (*B. melaninogenicus*), *Bacteroides oralis* (*B. oralis*)'e etki gösterirken; *Providencia*, *Proteus*, *Morganella*, *Brucella*, *Serratia*, *Nocardia* ve *Campylobacter* türleri, *Pseudomonas pseudomallei* (*P. pseudomallei*), *Pseudomonas cepacia* (*P. cepacia*), *Pseudomonas picketti* (*P. picketti*), *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*), *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*), kolistine dirençli mikroorganizmalardır. Bunun dışında, anaerop bakterilerin çoğu, Gram negatif kok ve Gram pozitif bakterilere de etki göstermemektedir (160,163).

1.5.4. Kolistinin Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri

Kolistin metansülfonat primer olarak renal yoldan elimine edilirken, bir kısmı da metabolize olup kolistin formuna dönüşmektedir. Kolistin ise geniş renal tübüler reabsorbsiyonu nedeniyle ağırlıklı olarak ekstrarenal yolla atılmaktadır (165).

Kolistinin bakterisidal aktivitesi konsantrasyon bağımlı olduğundan inisiyal etkinlikte çok aktif iken 24 saatten sonraki yeniden üremelere engel olmaz. Ayrıca plevral sıvı, biliyer sistem, BOS, sinoviyal sıvılarda dağılımı zayıftır. Tedavide hedeflenen konsantrasyonlara ulaşmada problemler yaşandığından klinikte başka bir ilaçla kombine edilerek kullanılması ve dozlar arasında uzun aralıklardan kaçınılması önerilmektedir (161,167,168).

1.5.5. Klinik Kullanım ve Endikasyonlar

Kolistin, diğer antimikrobiyallere direnç gösteren Gram negatif bakterilerle gelişen ciddi enfeksiyonların tedavisi için son seçenektir. Bu tür bakterilerin etken olduğu, özellikle nozokomiyal pnömoni, cerrahi alan enfeksiyonları, bakteriyemi, kateter enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonlarında; KF hastalarında gelişen MDR *P. aeruginosa* kaynaklı bronşiyal enfeksiyonlarda ve transplant hastalarındaki *P. aeruginosa* kolonizasyonunun tedavisinde kullanılabilir (161,165).

Kolistinin tek başına kullanımı kolistine direnç gelişiminde önem arz etmektedir. Yapılan araştırmalarla kolistinin Gram negatif bakterilere karşı rifampisin, karbapenem, seftazidim, sulbaktam, tigesiklin ve glikopeptid antibiyotiklerle sinerji

oluşturabildiği gösterilmiştir. Birçok çalışma, mikroorganizma diğer antibiyotiklerle dirençli de olsa, bu sinerjistik etkilerden yararlanmak ve direnç gelişimini engellemek amacıyla, kolistinin kombinasyon rejimleri içerisinde tercih edilmesini önermiştir (160,169–171).

1.5.6. Toksisite ve Olumsuz Etkiler

Kolistinin başlıca yan etkileri nefrotoksisite ve nörotoksisitedir. İki durum da doza bağlı ve ilacın kesilmesinden sonra sıklıkla geri dönüşümlüdür. Nefrotoksik etkisi genellikle serum kreatinin artışı, hematüri, proteinüri, silindirüri ve oligüri ile kendini gösteren böbrek hasarıdır. Nefrotoksisite oranları, kullanılan farklı nefrotoksisite tanımları, hasta popülasyonlarının değişkenliği gibi nedenlerle farklılıklar göstermektedir. Yapılan çalışmalarda nefrotoksisite oranları sıklıkla %20-60 aralığında değişmektedir. Nörotoksisite, kas zayıflığı veya apneye neden olabilen nöromusküler blokaj, dudak, dil ve ekstremitelerde parestezi, periferik nöropati ile ortaya çıkabilir. Genellikle semptomların şiddeti hafif olma eğilimindedir. Nörotoksisite oranları da raporlar arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Yayınlanan raporlarda nefrotoksisiteye göre daha az sıklıkta olup, oranlar genel olarak %7'nin altındadır (172–174).

1.5.7. Kolistin Duyarlılık Testleri

Kolistin, özellikle karbapenemaz üreten MDR Gram negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde genellikle tek etkili antibiyotik ajandır. MDR Gram negatif bakterilerin giderek yaygınlaşmasıyla birlikte artan kolistin kullanımı, piyasayı izolatların kolistine duyarlılığını belirlemek için hızlı ve güvenilir yöntemler geliştirmeye sevk etmiştir. Ancak, kolistinin katyonik yapısı, agar içinde zayıf difüzyonu, ticari olarak temin edilebilen güvenilir bir referans yönteminin olmaması ve birçok türde kolistine karşı heterodirenç gelişimi, antibiyotiğin duyarlılığının test edilmesinde zorluklara neden olmaktadır (175,176).

Laboratuvarlarda kullanılan disk difüzyon, gradiyent şerit difüzyon, otomatize sistemler gibi yöntemlerle kolistin duyarlılığı için tutarsız sonuçlar saptandığından, CLSI-EUCAST Polimiksin Sınır Değerleri Ortak Çalışma Grubu, *Enterobacterales* üyeleri, *Acinetobacter* türleri ve *P. aeruginosa*'da kolistin duyarlılığının, ISO-standart (20776-1) BMD yöntemiyle saptanması gerektiğini bildirmiştir. BMD yöntemi,

besiyeri için katyon ayarlı Mueller-Hinton Broth (KAMHB), antibiyotik formu olarak kolistin sülfat tuzu kullanılarak, polisorb-80 gibi yüzey aktif maddeler eklenmemiş, kullanımdan önce herhangi bir işlem görmemiş polistiren tepsilerle yapılmalıdır (23,177).

Ülkemizde antimikrobiyal duyarlılık testleri EUCAST kriterlerine göre yorumlanmaktadır. EUCAST, *Acinetobacter* türleri ve *Enterobacterales* üyelerinde minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) 2 mg/L ve altındaysa duyarlı, 2 mg/L'nin üstündeyse dirençli; *Pseudomonas* türleri için MİK değeri 4 mg/L ve altındaysa duyarlı, 4 mg/L'nin üstündeyse dirençli olarak kabul etmektedir (178).

1.5.8. Kolistine Karşı Direnç Mekanizmaları

Dirençli Gram negatif bakteri enfeksiyonlarının artışıyla birlikte, kolistin artan ve uygunsuz kullanımı, kolistine karşı direnç gelişimine neden olmuştur. Bakterilerin kolistin direnç oranları genellikle %10'un altında bildirilmekle birlikte daha yüksek direnç oranlarının raporlandığı çalışmalar da bulunmaktadır. Kullanılan duyarlılık test yöntemindeki farklılıklar nedeniyle bu varyasyonların var olabileceğine dikkat edilmelidir (179,180).

Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı (USHİESA)'nın 2020 raporuna göre Türkiye'de sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlarda saptanan kolistin direnç oranları *A. baumannii* için %3,88, *K. pneumoniae* için %12,10 olarak tespit edilmiştir (181).

Farklı bakteri türlerinde kolistin direnci ile ilişkili mekanizmalar farklıdır. Polimiksinlerin hedefi Gram negatif bakteri yüzeyinde LPS'nin negatif yüklü lipid A bileşenidir ve temel direnç mekanizmaları, negatif yükü azaltan LPS modifikasyonlarıdır. Ayrıca kolistin bağlanma bölgesini gizleyen kapsül polisakkaritinin aşırı üretimi, dış membran porinlerinin spesifik modifikasyonları ve eflüks pompa sistemlerinin aşırı ekspresyonu da direnç gelişiminde rol oynamaktadır (180,182).

İn vitro olarak polimiksinlere duyarlı mikroorganizmalar LPS'nin modifikasyonuna yol açan kazanılmış gen mutasyonlarıyla direnç geliştirebilir. Modifikasyon temel olarak 4-amino-4-deoksi-L-arabinoz (L-Ara4N) ve

fosfoetanolaminin (pEtN) katyonik moleküllerinin, LPS'nin lipid A veya 3-deoksi-D-mannooktulosonik asit (Kdo) komponentlerine eklenmesiyle gerçekleşir (182,183).

pmrE geni ve *arnBCADTEF* (veya *pmrHFIJKLM*) operonu aktive edildiğinde, LPS'ye eklenecek L-Ara4N sentezlenir. *pmrE* ve *arnBCADTEF* operonları, PhoP/PhoQ ve PmrA/PmrB iki bileşenli sistemler ile düzenlenir. PhoP/PhoQ, *pmrD*'nin aktivasyonu yoluyla dolaylı olarak PmrA/PmrB iki bileşenli sistemini aktive eder. PmrA/PmrB, *pmrE* ve *arnBCADTEF* operonlarını LPS'ye eklenmek üzere L-Ara4N sentezlemesi için up-regüle eder. PhoP/PhoQ ve PmrA/PmrB iki bileşenli sistemleri pEtN sentezine de aracılık eder. PmrA/PmrB eksprese edildikten sonra *pmrC* ve *cptA*'yı, LPS'nin lipid A veya Kdo bileşenlerine eklenecek pEtN'yi sentezlemek üzere aktive eder (184,185).

Bu bahsedilen genlerin veya iki bileşenli sistemlerin birinde oluşan mutasyonlar, L-Ara4N ve pEtN sentezinde düzensizliğe ve aşırı üretimlerine yol açabilir. Aşırı üretilen L-Ara4N ve pEtN'nin LPS'ye eklenmesi, bakteri hücre membranında pozitif yük artışına yol açarak polimiksinin başlangıçtaki yüke dayalı etkileşimini ortadan kaldırır, LPS'nin pozitif yüklü polimiksinlere afinitesini azaltır ve kazanılmış polimiksin direncine neden olur (184,186,187).

Bu mekanizmalar, Gram negatif bakterilerde yaygın olmasına rağmen, türler arası çeşitlilik göstermektedir. Örneğin *P. aeruginosa*'da *PmrD* yoktur, burada PhoP, PmrA/PmrB ile doğrudan etkileşime girer. *P. aeruginosa*'da PhoP/PhoQ ve PmrA/PmrB'den başka polimiksin direncinde rol oynadığı tanımlanan ParR/ParS, ColR/ColS ve CprR/CprS regülatuar sistemleri de bulunmaktadır. *arnBCADTEF* operonu *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve *E. coli*'de bulunur, ancak *A. baumannii*'de yoktur. *A. baumannii*'de PhoP/PhoQ sistemi, L-Ara4N biyosentezi ve bağlanma genleri de bulunmamaktadır. PmrA/PmrB'deki mutasyon *A. baumannii*'nin ana direnç mekanizmasıdır (183,188).

Klebsiella pneumoniae'de, PhoP/PhoQ ve PmrA/PmrB'deki değişikliklerin yanı sıra *mgrB* geni inaktivasyonunun polimiksin direncine neden olduğu bildirilmiştir. *mgrB*, PhoP/PhoQ sinyal sistemini negatif feedback mekanizmasıyla düzenleyerek L-Ara4N sentez yolunu bastırır. *mgrB* inaktivasyonu *K. pneumoniae*'de en sık görülen kolistin direnç mekanizmasıdır (183,189).

PmrA/PmrB sistemi, *crrB*, *crrA* ve *crrC*'yi kodlayan CrrAB iki bileşenli sistem tarafından düzenlenir. *crrB* mutasyonlarının aracılık ettiği *crrC* ekspresyonundaki artış, sırasıyla *arnBCADTEF* operonu ve *pmrC* geni yoluyla pEtN ve L-Ara4N modifikasyonlarını arttırır. *crrB*'deki mutasyonların, *K. pneumoniae*'de polimiksinlere karşı kazanılmış dirençte etkili olduğu belirlenmiştir (186).

Lipopolisakkarit yapının tamamen kaybı, *A. baumannii*'de görülen polimiksin direnç mekanizmalarından bir diğeridir. LPS biyosentez yolundaki *lpxA*, *lpxC*, *lpxD* veya *lpsB* genlerinden birinin mutasyonu, lipid A biyosentezini ve LPS oluşumunu sonlandırmaktadır (188,190).

Kolistin direnci, aktarılamayan kromozomal mutasyonlardan kaynaklanabildiği gibi transpoze olabilen genetik elementler üzerinde de kodlanabilmektedir. Plazmid aracılı kolistin direnci ilk olarak 2015 yılında Çin'de, *E. coli* izolatlarında tespit edilmiştir. Kolistine direnç gelişiminden sorumlu *mcr* geni bir plazmidde kodlanmış durumdadır. *mcr* genleri, pEtN'nin LPS'nin lipid A'sına eklenmesinde görevli pEtN transferazı kodlayarak LPS modifikasyonuna neden olmaktadır. *mcr-1* geninin keşfinden sonra şimdiye kadar, tüm kıtalarda ve çeşitli Gram-negatif bakterilerde, *mcr-10*'a kadar farklı varyantlar tanımlanmıştır (191–193).

1.5.9. Kolistin Heterodirenci

Heterodirenç, bir antibiyotiğe duyarlı saptanan izolatta, o antibiyotiğe karşı dirençli alt popülasyonların da olması olarak tanımlanmakla beraber, klinik önemi tam anlaşılamamıştır. *A. baumannii* için kolistin heterodirenci araştırıldığında, izolatların kolistin MİK değeri 0.25-2 µg/mL olarak saptanırken, dirençli alt popülasyonlarındaki 3-10 µg/mL aralığında bulunmuştur. Kolistine maruziyetin heterodirenç gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir (194,195).

Heterodirenç, antimikrobiyal direnç çalışmalarını karmaşık hale getirmektedir. Heterodirencin enfeksiyon tedavisinde başarısızlıklara neden olabileceğine ve saptanmasının uygun antibiyotik seçiminde oldukça faydalı olacağına dair artan kanıtlar bulunmaktadır (196).

Laboratuvarlarda rutinde kullanılan antibiyotik duyarlılık testleri, bakterilerin kolistin heterodirencini kolaylıkla tespit edememektedir. Popülasyon analiz profili (PAP), heterorezistansın belirlenmesinde altın standarttır. Ancak yüksek maliyeti ve

emek yoğunluğu nedeniyle rutinde uygulanması zordur. Etest ve disk difüzyon testi de diğer sık kullan yöntemlerdir. Etest ve disk difüzyon testlerinde inhibisyon bölgesi içinde büyüyen kolonilerin olması heterodirencin göstergesidir ancak bu testler için standart kılavuzların olmaması, heterorezistansın tespitinde kullanımlarını engellemektedir (194,196).



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Bakteri İzolatlarının Toplanması

Çalışmaya 01 Mart 2021 – 30 Kasım 2021 tarihleri arasında Fırat Üniversitesi Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı'na çeşitli birimlerden gönderilen farklı örneklerde üreyen, MDR saptanan 25'er adet *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* olmak üzere toplam 100 adet Gram negatif bakteri izolatu dahil edilmiştir. Her hastaya ait sadece bir örnek çalışmaya alınmıştır.

2.2. Kültür işlemleri ve Bakterilerin İzolasyonu

Laboratuvara gönderilen klinik örneklerden idrar örnekleri %5 KKA ile EMB agara, idrar dışındaki örnekler %5 KKA, EMB ve çikolata agara ekilip 35-37°C etüvde inkübe edildi. Kan kültürü şişeleri ise Bactec FX (BD®-Becton Dickinson, ABD) otomatize kan kültürü sisteminde beş gün süreyle inkübe edilip, bu süre içinde pozitif sinyal veren şişelerdeki örnekler çıkarılıp %5 KKA, EMB ve çikolata agara ekimleri yapılarak 35-37°C'de inkübasyona bırakıldı. 16-24 saat inkübasyon sonrası bakterilerin koloni yapıları, biyokimyasal özellikleri ve Gram boyamaları dikkate alınarak değerlendirildi.

2.3. Bakterilerin Tanımlanması ve Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Besiyerinde üreyip enfeksiyon etkeni olduğu düşünülen izolatların ileri tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık testi, üretici firmanın önerileri ve cihaza yükleme prosedürü doğrultusunda, Phoenix™ M50 (BD®-Becton Dickinson, ABD) otomatize sistemi ile çalışıldı. Phoenix™ M50 otomatize sistemi, florojenik ve kromojenik substratlarla identifikasyon yapmaktadır. Antibiyotik duyarlılık testi, sıvı bazlı mikrodilüsyon prensibine dayanmaktadır. Kültürden saf izole edilen taze koloniler ile ID Broth içerisinde 0.5 McFarland bakteri süspansiyonu hazırlandı. AST indikatör solüsyonu oda ısısına getirilerek AST broth tüplerine birer damla eklendi ve karışması sağlandı. ID tüpteki bakteri süspansiyonundan 25 µl alıp AST broth tüpüne eklendi ve tüp ters düz edilerek karıştırıldı. Ambalajından çıkarılan Phoenix™ NMIC/ID-433 panelleri panel taşıyıcısı üzerine yerleştirildi. ID tüpteki bakteri süspansiyonu panelin ID tarafına, AST tüpündeki süspansiyon panelin AST tarafına tamamen boşaltıldı ve bu delikler plastik kapaklarıyla kapatıldı. Hasta barkodları,

panel barkodlarıyla birlikte cihaza tanıtılarak yerleştirildi. 24 saat sonra sonuçlar değerlendirildi. Antibiyotik duyarlılık sonuçları cihazın kendi yazılımıyla EUCAST v.10.0 kriterlerine göre değerlendirildi (197). Suşlar, en az üç antimikrobiyal gruptan birer ilaca dirençliyse MDR olarak sınıflandırıldı (6). Phoenix™ M50 otomatize sisteminin biyokimyasal tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık testi sonucunda kolistin duyarlı (*K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *E. coli* için MİK ≤ 2 µg/mL, *P. aeruginosa* için MİK ≤ 4 µg/mL) ve MDR olarak belirlenen *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* ve *E. coli* suşlarının kolistin duyarlılığı BMD ve Sensititre™ yöntemleriyle de araştırıldı.



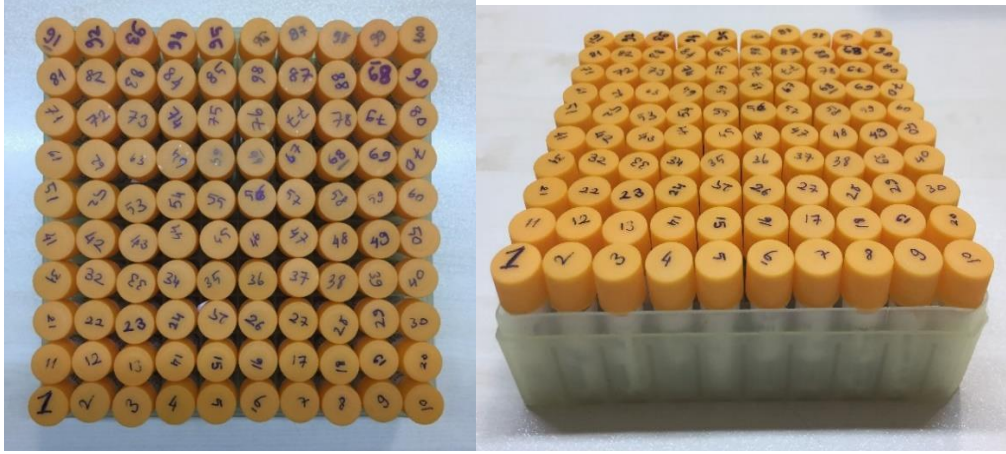
Resim 5. BD Phoenix™ M50 otomatize sistem cihazı



Resim 6. Phoenix™ M50 otomatize sisteminin NMIC/ID tanımlama ve duyarlılık paneli, ID ve AST broth tüpleri

2.4. Bakteri İzolatların Saklanması ve Canlandırılması

Elde edilen bakteri izolatlarının saf pasajları yapıldı ve bu pasajlardan koloniler boncuklu saklama besiyerleri (Or-Bak, Türkiye) içerisine steril bir şekilde alındı ve - 20 °C’de saklandı. Çalışılacağı zaman stok bakteri izolatları derin dondurucudan çıkarılıp oda sıcaklığında çözünmesi sağlandı. Boncuklu saklama besiyerinden birkaç boncuk alınarak Tryptic Soy Broth besiyerinde (Oxoid, İngiltere) 37 °C etüvde inkübasyona bırakıldı. 24 saat inkübasyon sonrası %5 KKA ve EMB agara öze ile tek koloni düşürme tekniğiyle pasajları yapılarak tekrar inkübasyona bırakıldı. Bu işlemle canlandırılmayan bakteri izolatları çalışmadan çıkarıldı.



Resim 7. -20°C’de saklanan bakteri izolatları

2.5. İzolatların Kolistin Duyarlılığının Belirlenmesi

2.5.1. Sensititre™ Ticari Mikrodilüsyon Yöntemi

Elde edilen saf kültürlerden, üretici firmanın önerileri ve uygulama prosedürü doğrultusunda ile ID şişesinde 0.5 McFarland yoğunluğunda inokulum süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyonun 10 µl’si, kitin 11 ml KAMHB içeren tüpüne aktarıldı ve karışmaları sağlandı. Hazırlanan karışımdan 50’şer µl, 11 farklı konsantrasyonda (0.12-128 µg/ml) kolistin içeren kuyucuk ile bir üreme kontrol kuyucuğundan oluşan mikroplakta, aynı satırdaki kuyucuklara inoküle edildi. Mikroplağın üzeri şeffaf yapışkan plastikle kapatılarak 35±1 °C’de inkübasyona bırakıldı. Mikroplaklar 24 saat sonra değerlendirildi. Bulanıklığın görülmediği ilk kuyucuk, bakterinin kolistin MİK değeri olarak kabul edildi.



Resim 8. Sensititre™ testinin mikroplakları, ID ve KAMHB tüpleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
B	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
C	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
D	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
E	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
F	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
G	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
H	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON

Resim 9. Sensititre™ testinin dilüsyon şeması

2.5.2. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

2.5.2.1. Besiyerinin Hazırlanması

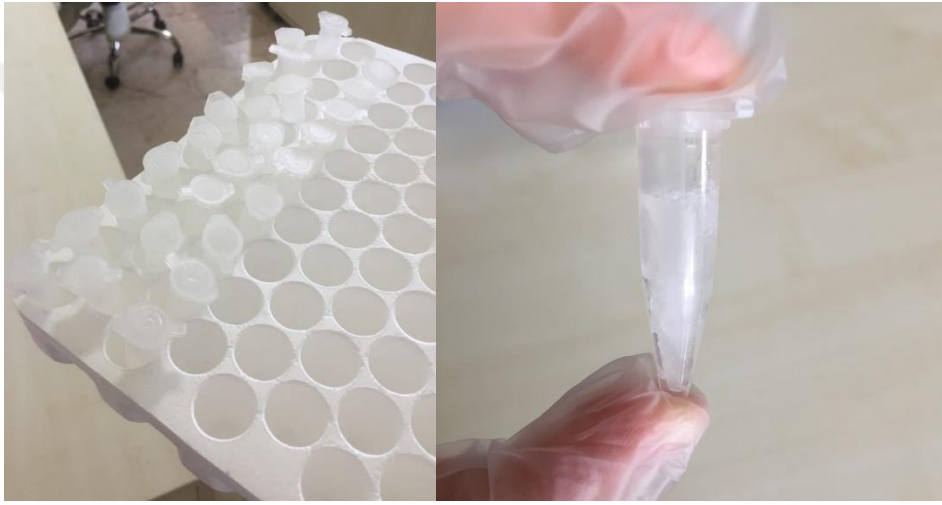
Toz halindeki 11 gr KAMHB (BD®-Becton Dickinson, ABD) balon jojede 500 mL distile suyla tamamen çözdürüldü. Daha sonra otoklavda 121°C’de 10-15 dk sterilize edilip kullanım için uygun hale getirildi.



Resim 10. Katyon ayarlı Mueller Hinton Broth

2.5.2.2. Antibiyotiğin Hazırlanması

Çalışmada potensi 19000 U/mg olan kolistin sülfat (BLDpharm, Çin) kullanıldı. Ağırlık (mg) = Konsantrasyon (mg/L) x Hacim (mL) / Potens (µg/mg) hesaplamasıyla toz haldeki kolistinden 100 mg tartılıp 39 ml steril distile suda çözülerek 2560 µg/mL konsantrasyonda stok hazırlandı. Ependorf tüplere 1'er mL konularak -20°C'ye kaldırıldı. Çalışma zamanı ependorf tüplerden bir tanesi oda sıcaklığında çözdürölüp steril distile suyla 1/10 seyreltilerek 256 µg/mL son antibiyotik konsantrasyonu elde edildi.



Resim 11. 2560 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan stok kolistin çözeltileri

2.5.2.3. Bakteri İnokulumunun Hazırlanması

Serum fizyolojik (SF) içinde 0.5 McFarland bakteri yoğunluğu ayarlandı. Sonrasında tekrar SF ile 1/20 dilüe edildi ve 15 dk'yı geçmeden mikroplak kuyucuklarına inoküle edildi.

2.5.2.4. Mikroplak Uygulama Aşaması

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi için U tabanlı, 96 kuyucuk içeren, steril mikroplaklar (Citotest®, Çin) kullanıldı. Hazırlanan KAMHB besiyerinden tüm kuyucuklara 50 µl dağıtıldı. 256 µg/mL konsantrasyondaki kolistin stok solüsyonundan 50'şer µl ikinci sütundaki kuyucuklara eklendi ve ikinci sütundaki kuyucuklardaki son antibiyotik konsantrasyonu 128 µg/mL olarak elde edildi. 2. kuyucuk ile 11. kuyucuk arasında, 50 µl alıp bir sonraki kuyucuğa aktararak dilüsyona

devam edildi. En son pipete çekilen 50 µl sıvı dışarı atıldı. Bu şekilde 11. kuyucuktaki antibiyotik konsantrasyonu 0,25 µg/mL oldu. 12. kuyucuk dışında aynı satırdaki tüm kuyucuklara hazırlanan bakteri süspansiyonundan 5'er µl dağıtılarak kuyucuklardaki son bakteri inokulumunun yaklaşık 5×10^5 CFU/mL olması sağlandı. Birinci sütun üreme kontrol, 12. sütun besiyeri sterilite kontrol kuyucukları olarak kullanıldı. EUCAST, kolistin için BMD çalışırken kalite kontrolün kolistin dirençli *E. coli* NCTC 13846, kolistin duyarlı *E. coli* ATCC 25922 veya *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşlarıyla gerçekleştirilmesi gerektiğini bildirmiştir (178). Yapılan her çalışmada kalite kontrolü için *E. coli* ATCC 25922 ve *E. coli* NCTC 13846 suşları kullanıldı. En son mikroplağın üzeri şeffaf kapağı ile kapatılarak 35 ± 1 °C etüvde 18-20 saat inkübasyona bırakıldı.



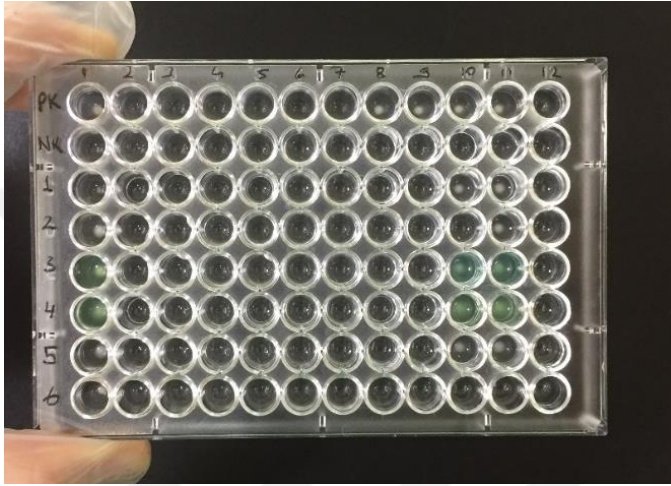
Resim 12. Sıvı mikrodilüsyon yönteminde kullanılan steril mikroplaklar

2.5.2.5. MİK Değerlerinin Belirlenmesi

İnkübasyon sonrası plaklarda kalite kontrol suşlarının beklenen MİK değerlerinde olması, sterilite kontrol kuyucuklarında üreme olmaması, üreme kontrol kuyucuklarında üremenin saptanması durumunda test geçerli olarak değerlendirildi. Bu şartları sağlamayan durumlarda test tekrarına gidildi. Çıplak gözle bakıldığında, bakteri üremesini tamamen inhibe olduğu, bulanıklık gözlenmeyen ilk kuyucuk, o izolatin kolistin MİK değeri olarak kabul edildi. Arada atlayan sadece bir kuyucuk

varsa en yüksek MİK değeri alınırken, birden fazla atlayan kuyucuk varlığında test tekrar edildi.

Bu çalışmada izolatların duyarlılık kategorileri, EUCAST'ın MİK'leri yorumlayan sınır değer tabloları versiyon 12.0 baz alınarak belirlendi. Buna göre *Acinetobacter* türleri ve *Enterobacterales* üyeleri için MİK 2 mg/L ve altındaysa duyarlı, üzerindeyse dirençli; *Pseudomonas* türleri için MİK 4 mg/L ve altındaysa duyarlı, üzerindeyse dirençli kabul edilmektedir (178).



(Pozitif kontrol E. coli NCTC 13846'nın MİK değeri 4 µg/ml, negatif kontrol E. coli ATCC 25922'nin <0.25 µg/ml; 1,3,4,5 numaralı izolatların 1 µg/ml; 2 numaralı izolatın 0.5 µg/ml; 6 numaralı izolatın <0.25 µg/ml)

Resim 13. Kolistin duyarlılığının BMD yöntemiyle değerlendirilmesi

2.6. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizi

Referans BMD yöntemiyle uyumsuz duyarlılık sonuçları elde edilen izolatlar her üç yöntem ile tekrar çalışıldı ve bu sonuçlar değerlendirmeye alındı. Test edilen yöntemle saptanan antibiyotik MİK'inin referans BMD yöntemiyle ± 1 çift kat dilüsyon değeri içindeki uyumu esansiyel uyum (EU), test edilen yöntemle saptanan duyarlılık kategorisinin (duyarlı, dirençli) referans BMD yöntemiyle uyumu kategorik uyum (KU), referans yöntemle dirençli saptanan izolatı test edilen yöntemin duyarlı bulması çok büyük hata (ÇBH), referans yöntemle duyarlı saptanan izolatı test edilen yöntemin dirençli bulması büyük hata (BH) olarak tanımlandı. ÇBH ve BH oranları hesaplamalarında sırasıyla referans yöntemle dirençli ve duyarlı izolatların sayısı payda olarak kullanıldı. ISO 20776-2 standartlarına göre test edilen yöntem için kabul

edilebilir performans, KU ve EU için $\geq 90\%$; BH ve ÇBH için $\leq 3\%$ olarak belirlenmiştir (198,199).

İstatistiksel analizler IBM SPSS Statistics programı versiyon 22.0 ile yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler n ve yüzde (%) değerleri kullanılarak verildi. Enfeksiyon etkenlerinin kolistin duyarlılığına ait test sonuçlarını değerlendiren yöntemler arasındaki uyum Kappa testi ile değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ kabul edildi. Kappa değerlerinin gösterdiği uyum düzeyleri tablo 1’de gösterilmiştir.

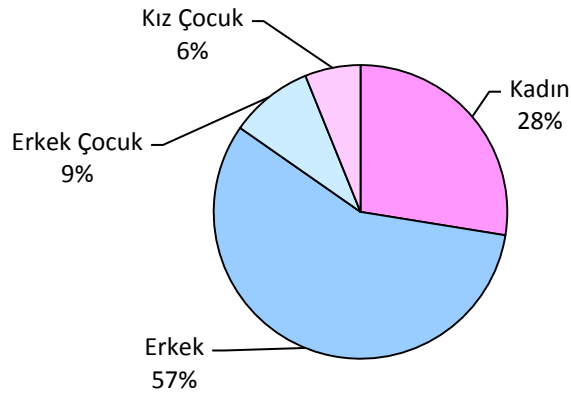
Tablo 1. Kappa değerlerinin gösterdiği uyum düzeyleri (200)

Kappa	Uyum düzeyi
<0,00	Çok zayıf
0,00-0,20	Zayıf
0,21-0,40	Düşük
0,41-0,60	Orta
0,61-0,80	İyi
0,81-1,00	Çok iyi

3. BULGULAR

Çalışmaya Phoenix™ M50 otomatize sistemiyle MDR saptanan ve kolistin MİK değeri ≤ 1 µg/mL olarak belirlenen, 25'er adet *P. aeruginosa*, *E. coli*, *A. baumannii* ve *K. pneumoniae* olmak üzere toplam 100 adet izolat dahil edildi.

Bakterilerin izole edildiği hastaların 85'i yetişkin, 15'i çocuk hastaydı. Cinsiyet dağılımına bakıldığında 66'sı erkek, 34'ü kadın hastaydı. Hastaların yaş aralığı 0-93 arasında değişmekte olup yaş ortalaması 53,2 bulundu. Bakterilerin izole edildiği hastaların cinsiyet ve yaş grubu dağılımı şekil 3'te gösterildi.



Şekil 3. Bakterilerin izole edildiği hastaların cinsiyet ve yaş grubu dağılımı

İzolatların 32'si trakeal aspirat, 27'si yara, 19'u kan, 13'ü balgam, 6'sı boğaz, 2'si eklem sıvısı, 1'i kateter kültüründen izole edildi. *E. coli* izolatları en sık yara (9 örnek) olmak üzere, sırasıyla balgam (5 örnek), trakeal aspirat (4 örnek), boğaz (3 örnek), kan (3 örnek) ve eklem sıvısı kültüründen (1 örnek); *K. pneumoniae* izolatları en sık kan (10 örnek) olmak üzere, sırasıyla trakeal aspirat (7 örnek), balgam (4 örnek), yara (2 örnek), eklem sıvısı (1 örnek) ve kateter kültüründen (1 örnek); *P. aeruginosa* izolatları en sık yara (12 örnek) olmak üzere, sırasıyla trakeal aspirat (6 örnek), kan (4 örnek) ve boğaz kültüründen (3 örnek); *A. baumannii* izolatları ise en sık trakeal aspirat (15 örnek) olmak üzere, sırasıyla balgam (4 örnek), yara (4 örnek) ve kan kültüründen (2 örnek) izole edildi. Bakterilerin izole edildiği örneklerin dağılımı tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Bakterilerin izole edildiği örneklerin dağılımı

Klinik örnek	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	Toplam
Trakeal aspirat	4	7	6	15	32
Yara	9	2	12	4	27
Kan	3	10	4	2	19
Balgam	5	4	-	4	13
Boğaz	3	-	3	-	6
Eklem sıvısı	1	1	-	-	2
Kateter	-	1	-	-	1
Toplam	25	25	25	25	100

Tüm isolatların 47'si servis, 46'sı yoğun bakım, 7'si poliklinik hastalarından gönderilen örneklerden izole edildi. En fazla MDR Gram negatif bakteri izole edilen birim dahiliye yoğun bakım ünitesi (23) olup, bunu anestezi yoğun bakım ünitesi (15) ve genel cerrahi kliniği (6) takip etmekteydi. Bakterilerin izole edildiği örnek, gönderen birim ve saptanan kolistin MİK değerleri tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Bakterilerin izole edildiği örnek, gönderen birim ve saptanan kolistin MİK değerleri

Sayı	Bölüm	Örnek tipi	İzolat	Phoenix™	SMD	Sensititre™
1	Dahiliye Yoğun Bakım	Kan	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	1	0,5
2	Anestezi Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	0,5	1
3	Kulak Burun Boğaz Kliniği	Yara	<i>P. aeruginosa</i>	≤1	1	4
4	Dahiliye Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>P. aeruginosa</i>	≤1	1	2
5	Çocuk Alerji Polikliniği	Boğaz	<i>E. coli</i>	≤1	1	0,5
6	Ortopedi Kliniği	Eklem Sıvısı	<i>E. coli</i>	≤1	<0,25	1
7	Dahiliye Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	0,5
8	Anestezi Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	1
9	Hematoloji Kliniği	Kan	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	<0,25	<0,12
10	Hematoloji Kliniği	Balgam	<i>E. coli</i>	≤1	<0,25	0,5
11	Genel Cerrahi Kliniği	Yara	<i>E. coli</i>	≤1	<0,25	0,25
12	Plastik Cerrahi Polikliniği	Yara	<i>E. coli</i>	≤1	0,5	0,5
13	Plastik Cerrahi Polikliniği	Yara	<i>E. coli</i>	≤1	<0,25	<0,12
14	Anestezi Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	1
15	Plastik Cerrahi Kliniği	Yara	<i>P. aeruginosa</i>	≤1	0,5	1
16	Kalp Damar Cerh. Kliniği	Trakeal Aspirat	<i>E. coli</i>	≤1	<0,25	0,5
17	Dahiliye Yoğun Bakım	Yara	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	<0,25	0,5
18	Dahiliye Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	<0,25	0,5
19	Yenidoğan Yoğun Bakım	Kan	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	<0,25	0,5
20	Dahiliye Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	1
21	Yenidoğan Yoğun Bakım	Kan	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	<0,25	1
22	Yenidoğan Yoğun Bakım	Kan	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	<0,25	0,5
23	Anestezi Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>P. aeruginosa</i>	≤1	0,5	2
24	Dahiliye Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	1

Sayı	Bölüm	Örnek tipi	İzolat	Phoenix™	SMD	Sensititre™
25	Onkoloji Kliniği	Yara	<i>E. coli</i>	≤1	<0,25	0,5
26	Çocuk Cerrahi Kliniği	Yara	<i>P. aureginosa</i>	≤1	2	2
27	Anestezi Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>E. coli</i>	≤1	<0,25	2
28	Anestezi Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>P. aureginosa</i>	≤1	2	2
29	İç Hastalıkları Kliniği	Balgam	<i>E. coli</i>	≤1	<0,25	<0,12
30	Dahiliye Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	<0,25	1
31	Yenidoğan Yoğun Bakım	Kan	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	<0,25	0,5
32	Göz Hastalıkları Kliniği	Yara	<i>P. aureginosa</i>	≤1	<0,25	1
33	Nefroloji Kliniği	Yara	<i>E. coli</i>	≤1	<0,25	0,5
34	Dahiliye Yoğun Bakım	Yara	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	0,5
35	Kalp Damar Cerr Kliniği	Balgam	<i>E. coli</i>	≤1	<0,25	0,5
36	Plastik Cerrahi Polikliniği	Yara	<i>P. aureginosa</i>	≤1	<0,25	1
37	Beyin Cerrahi Kliniği	Balgam	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	<0,12
38	Genel Cerrahi Kliniği	Yara	<i>E. coli</i>	≤1	<0,25	1
39	Kardiyoloji Kliniği	Kan	<i>E. coli</i>	≤1	<0,25	0,5
40	Romatoloji Kliniği	Yara	<i>P. aureginosa</i>	≤1	0,5	1
41	Kardiyoloji Kliniği	Yara	<i>E. coli</i>	≤1	<0,25	0,5
42	Palyatif Bakım Merkezi	Yara	<i>E. coli</i>	≤1	<0,25	0,25
43	Onkoloji Kliniği	Balgam	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	<0,25	0,5
44	Plastik Cerrahi Kliniği	Yara	<i>P. aureginosa</i>	≤1	0,5	2
45	Anestezi Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	0,5
46	Hematoloji Kliniği	Balgam	<i>E. coli</i>	≤1	<0,25	<0,12
47	Onkoloji Kliniği	Balgam	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	<0,25	0,5
48	Dahiliye Yoğun Bakım	Kan	<i>P. aureginosa</i>	≤1	<0,25	2
49	Dahiliye Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>A. baumannii</i>	≤1	128	128
50	Dahiliye Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	1
51	Anestezi Yoğun Bakım	Kan	<i>P. aureginosa</i>	≤1	<0,25	0,25
52	Anestezi Yoğun Bakım	Kateter	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	<0,25	1
53	Çocuk Kliniği	Boğaz	<i>P. aureginosa</i>	≤1	0,5	2
54	Genel Cerrahi Kliniği	Yara	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	128	128
55	Anestezi Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	<0,25	0,5
56	Anestezi Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	0,5
57	Beyin Cerrahi Kliniği	Kan	<i>P. aureginosa</i>	≤1	0,5	1
58	Dahiliye Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>P. aureginosa</i>	≤1	4	2
59	Anestezi Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	0,5
60	Süt Çocuğu Kliniği	Kan	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	<0,25	0,5
61	Anestezi Yoğun Bakım	Kan	<i>P. aureginosa</i>	≤1	1	2
62	Dahiliye Yoğun Bakım	Kan	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	<0,25	0,5
63	Pandemi Kliniği	Balgam	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	<0,25	1
64	Onkoloji Kliniği	Yara	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	0,5
65	Dahiliye Yoğun Bakım	Kan	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	8
66	Anestezi Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	1
67	Çocuk Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	1
68	Dahiliye Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	0,5
69	Genel Cerrahi Kliniği	Yara	<i>P. aureginosa</i>	≤1	0,5	2
70	Gastroenteroloji Kliniği	Trakeal Aspirat	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	0,5

Sayı	Bölüm	Örnek tipi	İzolat	Phoenix™	SMD	Sensititre™
71	Genel Cerrahi Kliniği	Balgam	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	0,5
72	Göğüs Hastalıkları Kliniği	Balgam	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	1
73	Göğüs Hastalıkları Kliniği	Yara	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	0,5
74	Dahiliye Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	0,5
75	Plastik Cerrahi Kliniği	Yara	<i>A. baumannii</i>	≤1	0,5	0,25
76	Genel Cerrahi Kliniği	Yara	<i>E. coli</i>	≤1	<0,25	0,25
77	Palyatif Bakım Merkezi	Yara	<i>P. aureginosa</i>	≤1	0,5	1
78	Çocuk Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>P. aureginosa</i>	≤1	1	1
79	Ortopedi Kliniği	Eklem Sıvısı	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	<0,25	<0,12
80	Çocuk Yoğun Bakım	Boğaz	<i>E. coli</i>	≤1	<0,25	0,25
81	Göğüs Hastalıkları Kliniği	Balgam	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	<0,25	0,5
82	Nefroloji Kliniği	Kan	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	0,5
83	Göğüs Hastalıkları Kliniği	Balgam	<i>A. baumannii</i>	≤1	<0,25	2
84	Ortopedi Polikliniği	Yara	<i>P. aureginosa</i>	≤1	1	2
85	Dahiliye Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>E. coli</i>	≤1	<0,25	0,5
86	Onkoloji Kliniği	Kan	<i>E. coli</i>	≤1	<0,25	<0,12
87	Çocuk Alerji Polikliniği	Boğaz	<i>P. aureginosa</i>	≤1	0,5	2
88	Nöroloji Kliniği	Kan	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	<0,25	1
89	Pandemi Kliniği	Kan	<i>E. coli</i>	≤1	<0,25	0,5
90	Romatoloji Kliniği	Balgam	<i>E. coli</i>	≤1	<0,25	2
91	Dahiliye Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>E. coli</i>	≤1	0,5	1
92	Anestezi Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	<0,25	0,25
93	Çocuk Alerji Polikliniği	Boğaz	<i>P. aureginosa</i>	≤1	<0,25	1
94	Dahiliye Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	16	8
95	Dahiliye Yoğun Bakım	Kan	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	<0,25	1
96	Dahiliye Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>P. aureginosa</i>	≤1	4	2
97	Çocuk Yoğun Bakım	Boğaz	<i>E. coli</i>	≤1	<0,25	0,5
98	Palyatif Bakım Merkezi	Yara	<i>P. aureginosa</i>	≤1	<0,25	<0,12
99	Palyatif Bakım Merkezi	Yara	<i>P. aureginosa</i>	≤1	0,5	2
100	Dahiliye Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat	<i>K. pneumoniae</i>	≤1	16	8

3.1. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi Sonuçları

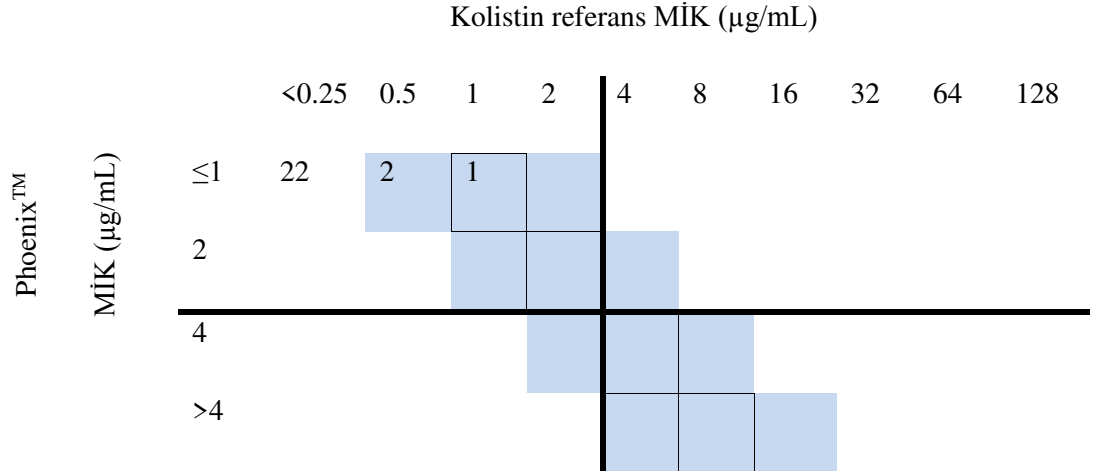
Phoenix™ otomatize sisteminin kolistin MİK değerini ≤1 µg/ml bulduğu 100 MDR izolat, BMD yöntemiyle çalışıldığında, izolatların 96'sı kolistine duyarlı (*E. coli*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* için MİK değeri ≤2 µg/ml; *P. aureginosa* için MİK değeri ≤4 µg/ml), 4'ü kolistine dirençli (*E. coli*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* için MİK değeri >2 µg/ml; *P. aureginosa* için MİK değeri >4 µg/ml) bulundu. Kolistine dirençli saptanan suşların 3'ü *K. pneumoniae*, 1'i *A. baumannii* olup, *P. aeruginosa* ve *E. coli* izolatlarında kolistine direnç saptanmadı. Bakteri türlerinin kolistin direnç oranları *K. pneumoniae* için %12, *A. baumannii* için %4 olarak bulundu.

Tüm izolatlar için Phoenix™ otomatize sisteminin sonuçları BMD yöntemiyle kıyaslandığında KU %96 bulundu. Phoenix™ otomatize sistemi ile BMD arasındaki EU, Phoenix™ antibiyotik duyarlılık panelleri tarafından kolistin için test edilen MİK değer aralığı dar olduğundan (1, 2, 4 µg/mL olmak üzere yalnızca üç dilüsyon değeri) analiz edilemedi. 4 izolatta ÇBH saptanırken, Phoenix™ otomatize sisteminin kolistin MİK değerini ≤ 1 µg/ml olarak belirlediği izolatlar çalışıldığı için ÇBH oranı %100 olarak hesaplandı, BH gözlenmedi ve kappa analizi yapılamadı (Şekil 4).

		Kolistin referans MİK (µg/mL)									
		<0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
Phoenix™ MİK (µg/mL)	≤ 1	71	14	7	2	2		2			2
	2										
	4										
	>4										

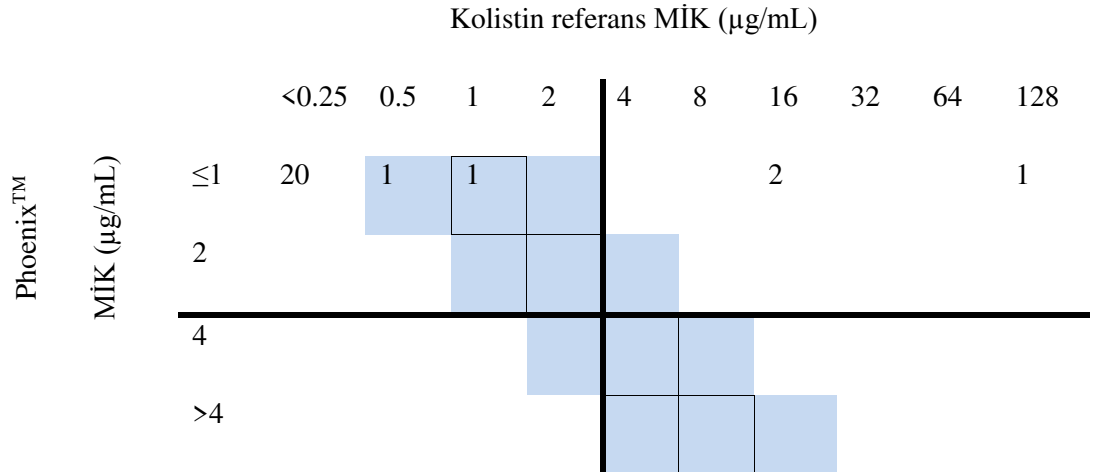
Şekil 4. Phoenix™ otomatize sistemi ve referans BMD yöntemiyle belirlenen kolistin MİK değerlerine sahip izolat sayıları

Referans BMD yöntemi ile 25 *E. coli* izolatının hepsi kolistine duyarlı bulundu. *E. coli* izolatları için Phoenix™ otomatize sisteminin sonuçları BMD yöntemiyle kıyaslandığında KU oranı %100, ÇBH ve BH oranları %0 olarak hesaplandı (şekil 5).



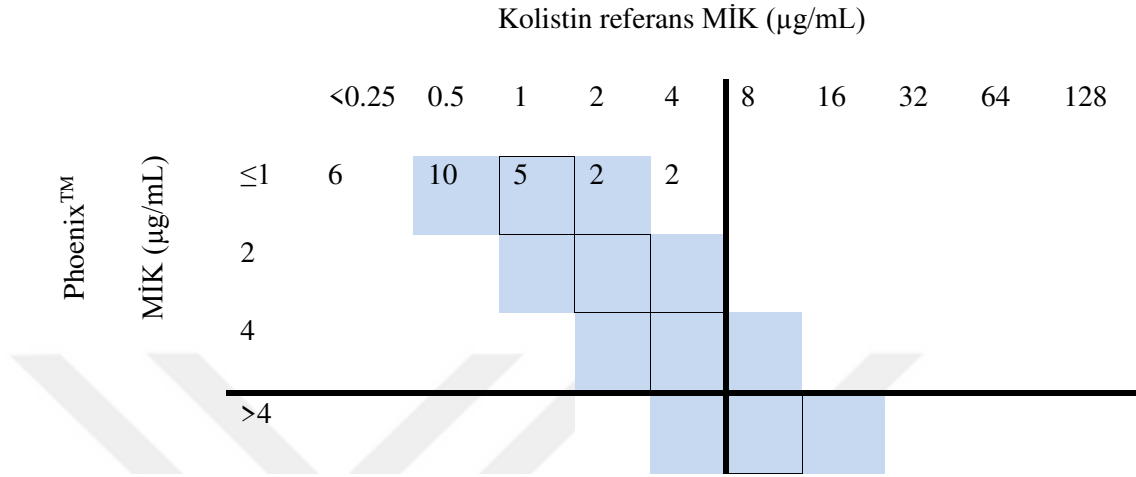
Şekil 5. *E. coli* izolatları için, Phoenix™ otomatize sistemi ve referans BMD yöntemiyle belirlenen kolistin MİK değerlerine sahip izolat sayıları

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile 25 *K. pneumoniae* izolatının 22 (%88)'si kolistine duyarlı bulunurken, 3 (%12)'ü dirençli bulundu. *K. pneumoniae* izolatları için Phoenix™ otomatize sisteminin sonuçları BMD yöntemiyle kıyaslandığında 3 ÇBH elde edildi. KU oranı %88, ÇBH oranı %100 ve BH oranı %0 olarak hesaplandı (şekil 6).



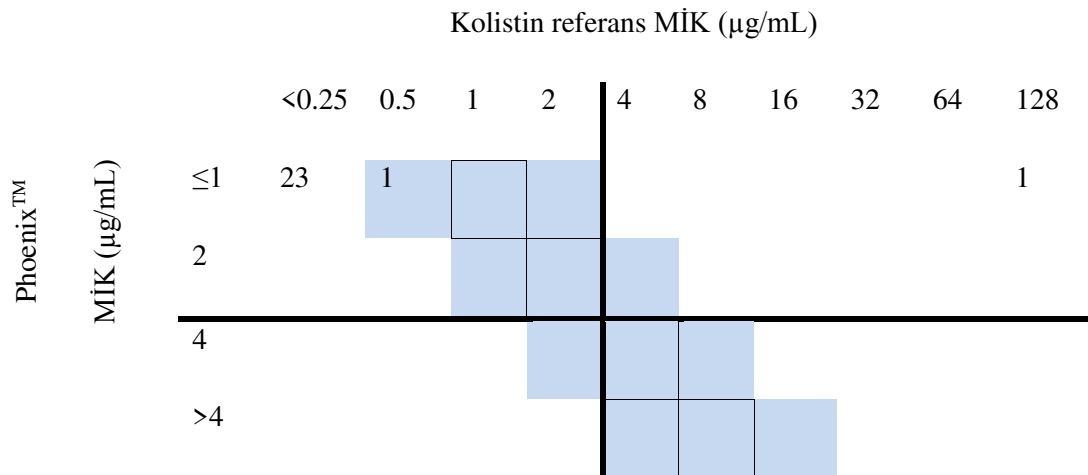
Şekil 6. *K. pneumoniae* izolatları için, Phoenix™ otomatize sistemi ve referans BMD yöntemiyle belirlenen kolistin MİK değerlerine sahip izolat sayıları

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile 25 *P. aureginosa* izolatının tümü kolistine duyarlı bulundu. *P. aureginosa* izolatları için Phoenix™ otomatize sisteminin sonuçları BMD yöntemiyle kıyaslandığında KU oranı %100, ÇBH ve BH oranları %0 olarak hesaplandı (şekil 7).



Şekil 7. *P. aureginosa* izolatları için, Phoenix™ otomatize sistemi ve referans BMD yöntemiyle belirlenen kolistin MİK değerlerine sahip izolat sayıları

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile 25 *A. baumannii* izolatının 24 (%96)'ü kolistine duyarlı, 1 (%4)'i dirençli bulundu. *A. baumannii* izolatları için Phoenix™ otomatize sisteminin sonuçları BMD yöntemiyle kıyaslandığında 1 ÇBH elde edildi. KU oranı %96, ÇBH oranı %100 ve BH oranı %0 olarak hesaplandı (şekil 8).

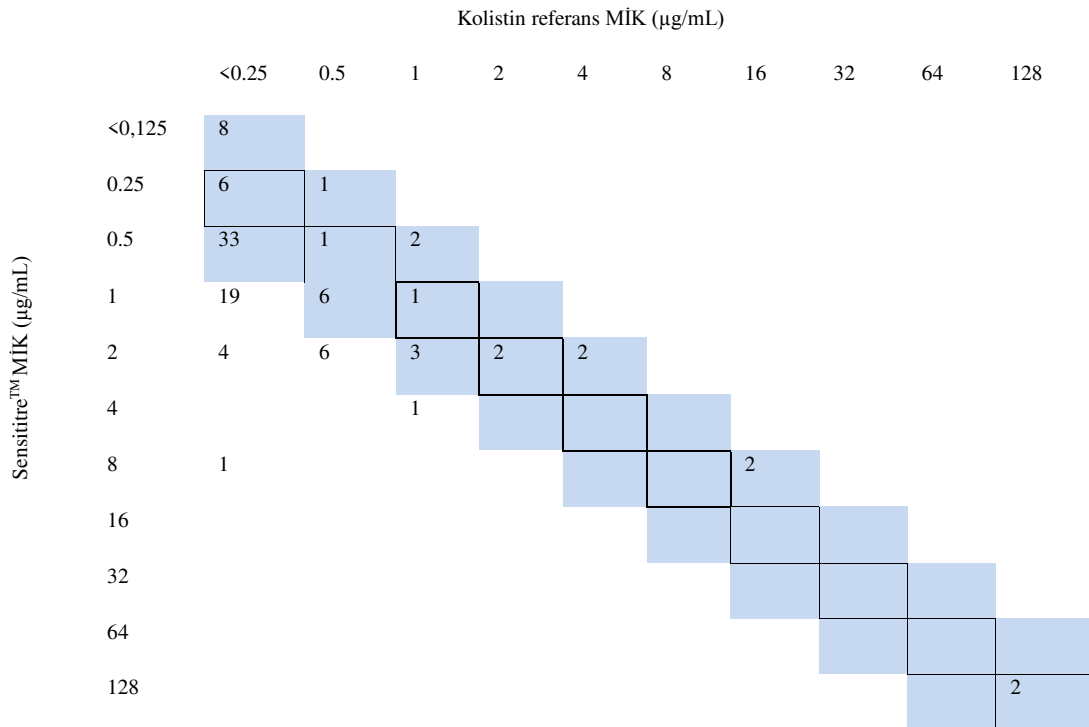


Şekil 8. *A. baumannii* izolatları için, Phoenix™ otomatize sistemi ve referans BMD yöntemiyle belirlenen kolistin MİK değerlerine sahip izolat sayıları

3.2. Sensititre™ Ticari Mikrodilüsyon Yöntemi Sonuçları

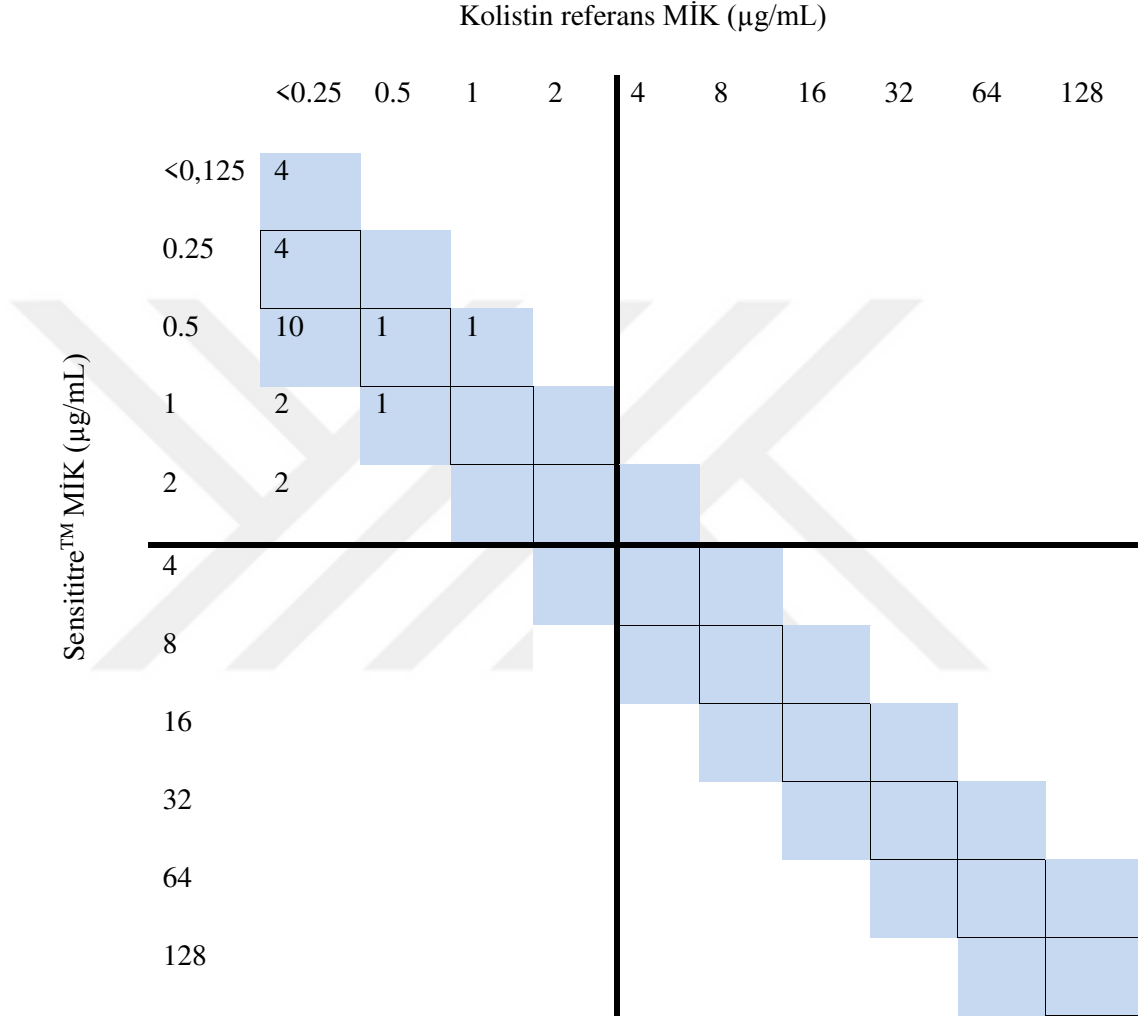
Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yöntemi ile izolatların 5'i kolistine dirençli (*E. coli*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* için MİK değeri >2 µg/ml; *P. aeruginosa* için MİK değeri >4 µg/ml), 95'i kolistine duyarlı (*E. coli*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* için MİK değeri ≤ 2 µg/ml; *P. aeruginosa* için MİK değeri ≤ 4 µg/ml) bulundu. Kolistine dirençli saptanan suşların 3'ü *K. pneumoniae*, 2'si *A. baumannii* olup *P. aeruginosa* ve *E. coli* izolatlarında kolistine direnç saptanmadı. Kolistine dirençli saptanan 5 suştan 3 *K. pneumoniae*, 1 *A. baumannii* izolatı, referans BMD yöntemiyle de dirençli bulunurken, kolistine dirençli saptanan 1 *A. baumannii* izolatı referans BMD yöntemiyle duyarlıydı.

Tüm izolatlar için Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yönteminin sonuçları BMD yöntemiyle kıyaslandığında 1 BH bulundu. KU %99, EU %69, ÇBH %0 ve BH %1,04 olarak hesaplandı (şekil 9). Kolistin duyarlılığını belirlemede Sensititre™ ticari mikrodilüsyon testinin duyarlılığı %99, özgüllüğü %100; pozitif prediktif değeri (PPD) %100, negatif prediktif değeri (NPD) %80 bulundu. Tüm izolatlar için BMD yöntemiyle Sensititre™ testi arasında çok iyi düzeyde uyum tespit edildi, bu uyum istatistiksel olarak anlamlıydı (kappa katsayısı=0,884, $p<0,001$).



Şekil 9. Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yöntemi ve referans BMD yöntemiyle belirlenen kolistin MİK değerlerine sahip izolat sayıları

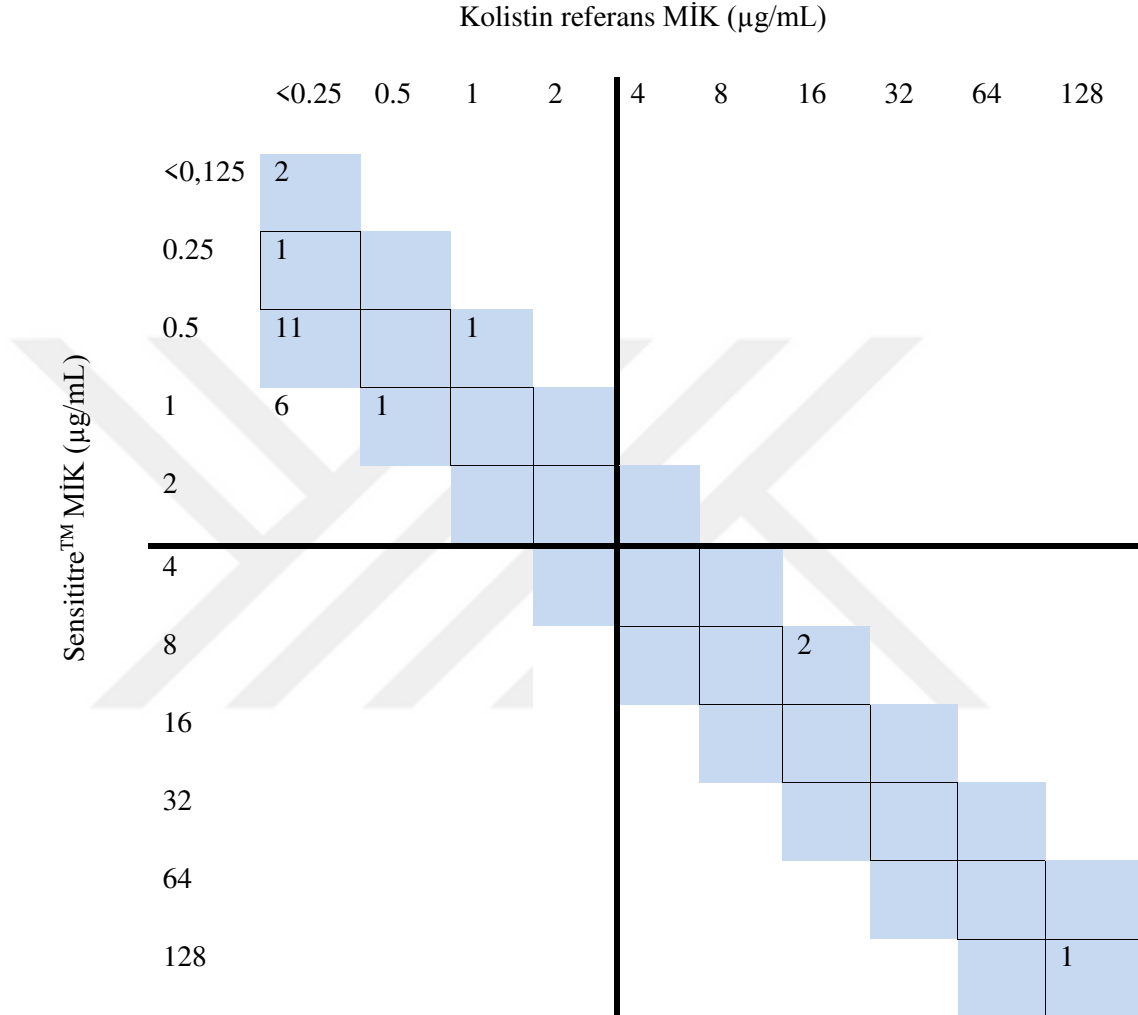
Referans BMD yöntemiyle duyarlı saptanan 25 *E. coli* izolatının hepsi Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yöntemi ile de kolistine duyarlı bulundu. *E. coli* izolatları için Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yönteminin sonuçları BMD yöntemiyle kıyaslandığında KU %100, EU %84, ÇBH %0 ve BH %0 olarak hesaplandı (Şekil 10).



Şekil 10. *E. coli* izolatları için, Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yönteminin BMD yöntemiyle EU ve KU grafiği

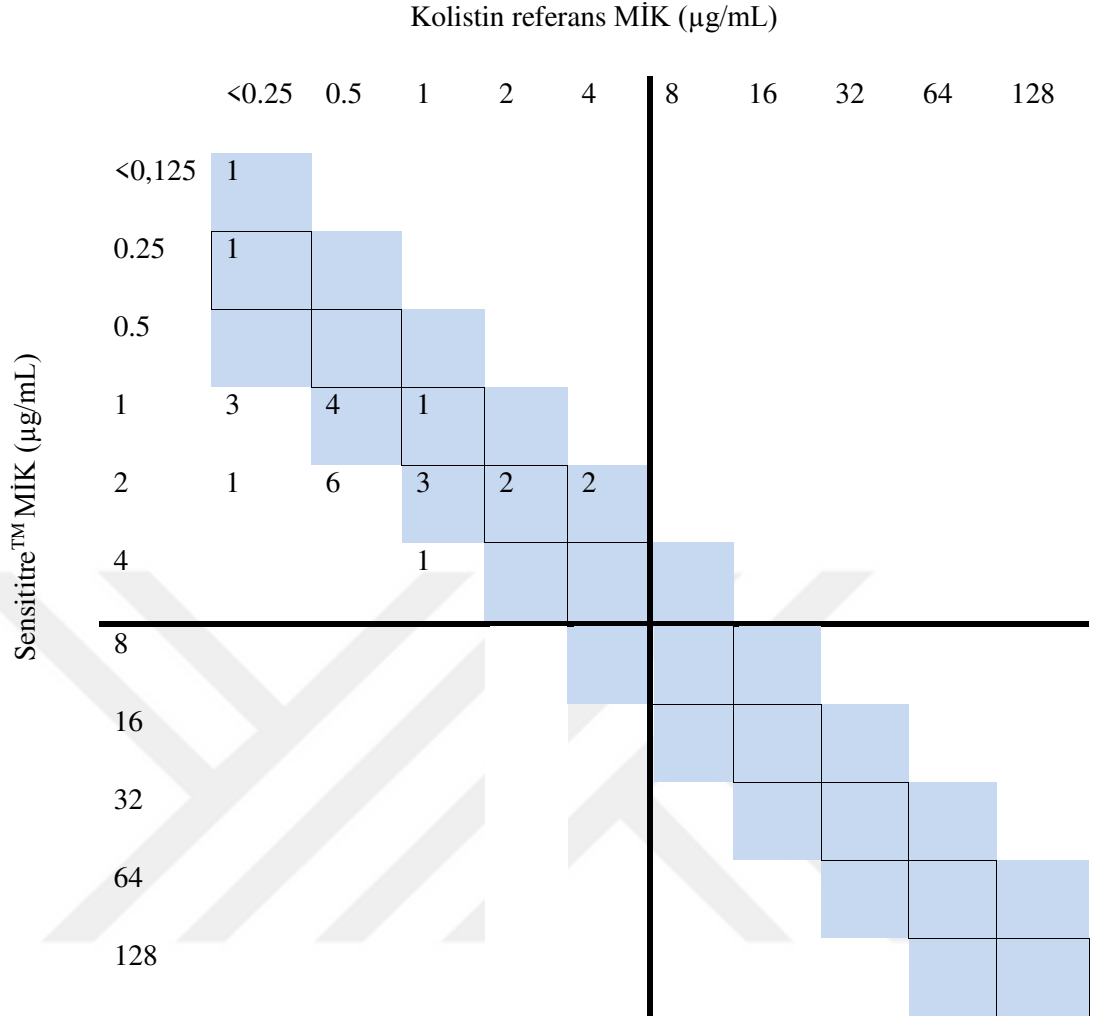
Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle kolistine dirençli saptanan 25 *K. pneumoniae* izolatının 3 (%12)'ü Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yöntemi ile de dirençli; BMD yöntemiyle duyarlı saptanan 22 (%88) izolat Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yöntemi ile de duyarlı bulundu. *K. pneumoniae* izolatları için Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yönteminin sonuçları BMD yöntemiyle kıyaslandığında KU %100, EU %76, ÇBH %0

ve BH %0 bulundu (Şekil 11). *K. pneumoniae* izolatları için BMD yöntemiyle Sensititre™ testi arasında çok iyi düzeyde uyum gözlemlendi, bu uyum istatistiksel olarak anlamlıydı (kappa katsayısı=1, $p<0,001$).



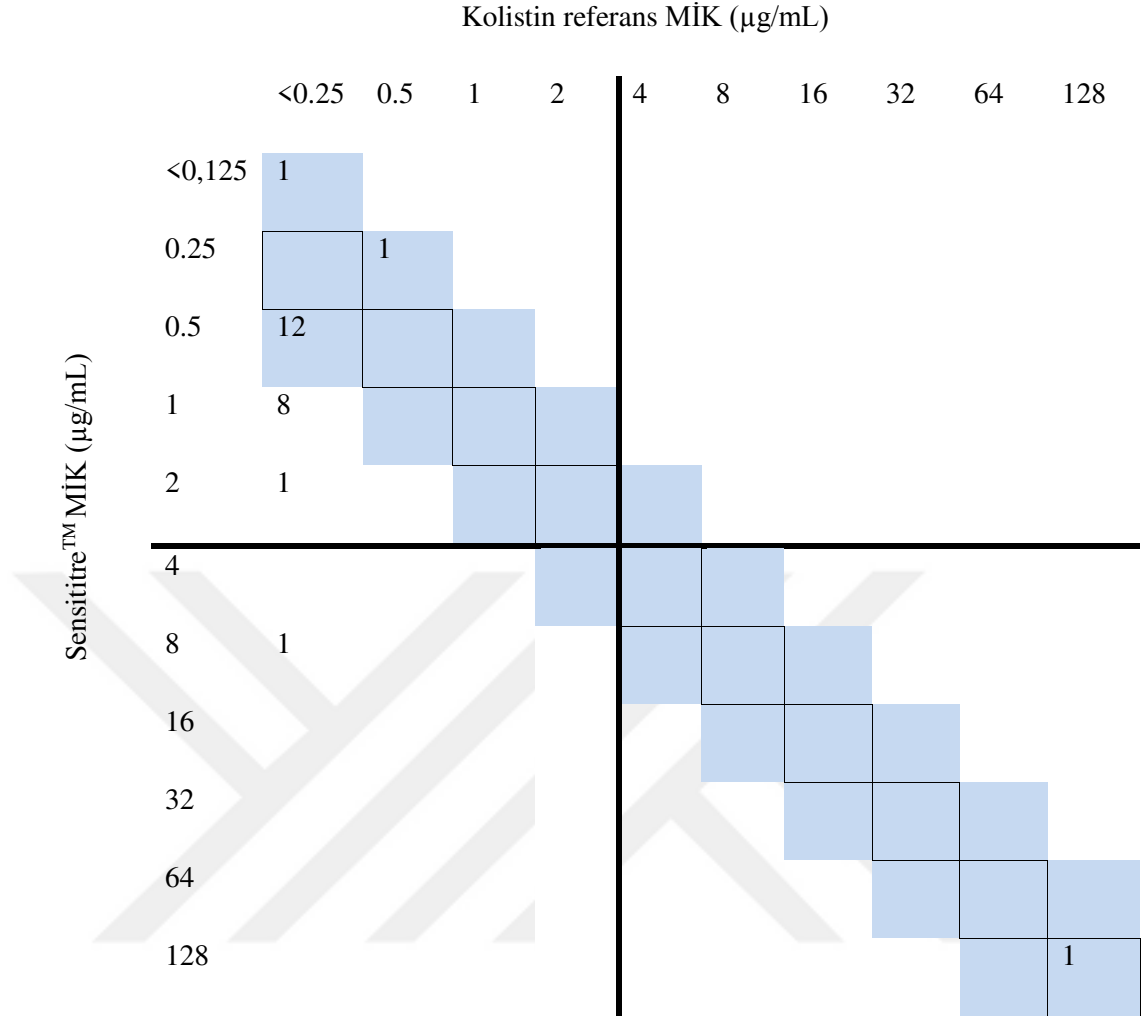
Şekil 11. *K. pneumoniae* izolatları için, Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yönteminin BMD yöntemiyle EU ve KU grafiği

Referans BMD yöntemiyle kolistine duyarlı saptanan 25 *P. aureginosa* izolatının hepsi Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yöntemi ile de duyarlı bulundu. *P. aureginosa* izolatları için Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yönteminin sonuçları BMD yöntemiyle kıyaslandığında KU %100, EU %56, ÇBH %0 ve BH %0 olarak hesaplandı (şekil 12).



Şekil 12. *P. aureginosa* izolatları için, Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yönteminin BMD yöntemiyle EU ve KU grafiği

Sıvı mikrodilüsyon yönteminin 25 *A. baumannii* izolatından, kolistine dirençli saptadığı 1 (%4) izolat Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yöntemi ile de dirençli; BMD yönteminin duyarlı saptadığı 24 izolatın 23 (%92)'ü Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yöntemi ile de duyarlı, 1 (%4)'ü dirençli bulundu. *A. baumannii* izolatları için Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yönteminin sonuçları BMD yöntemiyle karşılaştırıldığında 1 BH elde edildi, KU %96, EU: %60, ÇBH %0 ve BH %4,17 olarak hesaplandı (şekil 13). *A. baumannii* izolatları için BMD yöntemiyle Sensititre™ testi arasında iyi düzeyde uyum belirlendi, bu uyum istatistiksel olarak anlamlıydı (kappa katsayısı=0,648, p=0,001).



Şekil 13. *A. baumannii* izolatları için, Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yönteminin BMD yöntemiyle EU ve KU grafiği

Phoenix™ otomatize sistemiyle tüm izolatlar için kabul edilebilir KU (%96) belirlenmesine rağmen, değerlendirilen bakteri türüne göre farklılıklar gözlemlendi. *K. pneumoniae* için Phoenix™'in KU oranı (%88) kabul edilebilir değerin altındaydı. 3 *K. pneumoniae* ve 1 *A. baumannii* izolatında toplam 4 ÇBH tespit edildi. Çalışmaya Phoenix™ otomatize sisteminin kolistin MİK değerini ≤ 1 µg/ml olarak belirlediği izolatlar dahil edildiği için Phoenix™ otomatize sisteminin ÇBH oranı %100 olarak hesaplandı ve BH gözlenmedi. Sensititre™ testiyle tüm izolatlar için %99 ve farklı bakteri türleri için %96 ile %100 aralığında kabul edilebilir KU oranları belirlendi. Sensititre™ testi ve referans BMD yöntemiyle belirlenen kolisin MİK değerleri arasında tutarsızlıklar vardı. Tüm izolatlar için %69 ve farklı bakteri türleri için %56 -

%84 arasında değişen EU oranları, kabul edilebilir değerin altındaydı. Tüm izolatlar için %1,04 BH ve %0 ÇBH belirlenmiş olup, *A. baumannii* izolatlarında kabul edilebilir sınırın üzerinde ÇBH oranı (%4,17) saptandı. Sensititre™ ticari mikrodilüsyon testinin izolatlar için duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD ve kappa değerleri tablo 4'te, Phoenix™ otomatize sistemi ve Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yöntemlerinin BMD yöntemiyle karşılaştırıldığında EU, KU, BH ve ÇBH oranları tablo 5'te özetlenmiştir.

Bu çalışmada kolistin duyarlılığını belirlemede referans BMD yöntemi ile karşılaştırılan yöntemlerden Sensititre™ testi, Phoenix™ otomatize sistemine göre daha iyi performans gösterdi. Sensititre™ testi ile çok iyi düzeyde uyum tespit edilmesine rağmen (kappa katsayısı=0,884, $p<0,001$), iki yöntem de kabul edilebilir antimikrobiyal duyarlılık testi performansını karşılamadı.

Tablo 4. Sensititre™ ticari mikrodilüsyon testinin izolatlar için duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD ve kappa değerleri

Bakteri türü	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD	Kappa değeri
<i>E. coli</i>	%100	-	%100	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	%100	%100	%100	%100	1
<i>P. aeruginosa</i>	%100	-	%100	-	-
<i>A. baumannii</i>	%96	%100	%100	%50	0,648
Tüm izolatlar	%99	%100	%100	%80	0,884

Tablo 5. Phoenix™ otomatize sistemi ve Sensititre™ ticari mikrodilüsyon yöntemlerinin BMD yöntemiyle karşılaştırıldığında EU, KU, BH ve ÇBH oranları

Metod	Bakteri türü	Duyarlı n (%)	Dirençli n (%)	EU n (%)	KU n (%)	BH n (%)	ÇBH n (%)
SMD	Tüm izolatlar	96 (%96)	4 (%4)				
	<i>E. coli</i>	25 (%100)	0 (%0)				
	<i>K. pneumoniae</i>	22 (%88)	3 (%12)				
	<i>P. aureginosa</i>	25 (%100)	0 (%0)				
	<i>A. baumannii</i>	24 (%96)	1 (%4)				
Phoenix™	Tüm izolatlar	100 (%100)	0 (%0)	-	96 (%96)	0 (%0)	4 (%100)
	<i>E. coli</i>	25 (%100)	0 (%0)	-	25 (%100)	0 (%0)	0 (%0)
	<i>K. pneumoniae</i>	25 (%100)	0 (%0)	-	22 (%88)	0 (%0)	3 (%100)
	<i>P. aureginosa</i>	25 (%100)	0 (%0)	-	25 (%100)	0 (%0)	0 (%0)
	<i>A. baumannii</i>	25 (%100)	0 (%0)	-	24 (%96)	0 (%0)	1 (%100)
Sensititre™	Tüm izolatlar	95 (%95)	5 (%5)	69 (%69)	99 (%99)	1 (%1,04)	0 (%0)
	<i>E. coli</i>	25 (%100)	0 (%0)	21 (%84)	25 (%100)	0 (%0)	0 (%0)
	<i>K. pneumoniae</i>	22 (%88)	3 (%12)	19 (%76)	25 (%100)	0 (%0)	0 (%0)
	<i>P. aureginosa</i>	25 (%100)	0 (%0)	14 (%56)	25 (%100)	0 (%0)	0 (%0)
	<i>A. baumannii</i>	23 (%92)	2 (%8)	15 (%60)	24 (%96)	1 (%4,17)	0 (%0)

4. TARTIŞMA

Dirençli Gram negatif bakterilerin küresel yayılımı, sağlık sistemleri üzerinde artan bir yük oluşturmakla birlikte mevcut terapötik seçenekleri belirgin şekilde sınırlamaktadır. Bu bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilecek antibiyotiklerin kısıtlılığı ve yeni antimikrobiyallerin nispeten az üretimi, yıllar evvel kullanımı terk edilmiş bir antibiyotik olan kolistin yeniden gündeme gelmesine neden olmuştur. Kolistin, *P. aeruginosa*, karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae*, *A. baumannii* gibi etkenin dirençli Gram negatif bakteriler olduğu ciddi enfeksiyonlarda son seçenek antibiyotiktir (22,201–203). Ancak günümüzde bakterilerin kolistin direnci giderek artmaktadır (204,205).

Kolistine karşı artan direnç oranları ve ilaç toksisitesine ilişkin endişeler, kullanımının gerekli olması durumunda uygun tedaviyi sağlamak adına, klinik laboratuvarlarda hızlı ve güvenilir antimikrobiyal duyarlılık testlerinin uygulanmasını çok önemli hale getirmiştir (204–206). Kolistin duyarlılığının tespitinde kullanılan çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Antibiyotiğin katyonik yapısı, büyük moleküler boyutu nedeniyle agarda zayıf difüzyonu ve heterodirenç kavramı, duyarlılık testleriyle ilgili zorluklara neden olmaktadır (202,205,207,208).

Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi, disk difüzyon ve gradient testlerin kolistin duyarlılığını saptamada kullanılmaması uyarısında bulunmuştur (208). CLSI-EUCAST Polimiksin Sınır Değerleri Ortak Çalışma Grubu tarafından 22 Mart 2016'da yayınlanan raporda, *Enterobacterales* üyeleri, *Acinetobacter* türleri ve *P. aeruginosa*'da kolistin duyarlılığının saptanmasında, ISO-standart (20776-1) BMD yönteminin uygulanması gerektiği bildirilmiştir (23,208).

Referans kabul edilen BMD yöntemi zahmetli ve zaman alıcı olduğundan mikrobiyoloji laboratuvarlarında nadiren uygulanmakta olup disk difüzyon testi, gradient testleri ve otomatize sistemler, bildirilen sorunlara rağmen sıklıkla uygulanmaktadır. Bununla birlikte son dönemlerde kullanımı kolay sıvı mikrodilüsyon yöntemine dayalı ticari testler kullanıma sunulmuştur (206,207).

Bu çalışmada kolistin duyarlılığını belirlemede, BMD yöntemine alternatif olabilecek, güvenilir ve zahmetsiz bir test belirlemek amacıyla, MDR Gram negatif bakterilerin kolistin duyarlılığını Phoenix™ M50 otomatize sistemi ve Sensititre™

ticari sıvı mikrodilüsyon testiyle belirleyip, referans BMD yöntemi ile karşılaştırarak bu yöntemlerin verimliliğini araştırdık.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde yüksek kolistin direç oranları göze çarpmaktadır. Yunanistan'da yapılan bir çalışmada (2015), 41'i *K. pneumoniae*, 20'si *A. baumannii* toplam 61 karbapenem dirençli izolattan, 40 *K. pneumoniae*, 18 *A. baumannii* olmak üzere 58 (%95,1)'inde kolistin direnci belirlenmiştir (204). Vietnam'daki bir çalışmada (2015), 99 *Enterobacteriaceae*, 102 *A. baumannii* ve 40 *P. aeruginosa*'dan oluşan 241 adet MDR Gram negatif bakteri izolatından 1 *P. aeruginosa* ve 13 *Enterobacteriaceae* olmak üzere toplam 14 (%5,8)'ünde kolistine direnç saptanmıştır (209). 2017 yılına ait bir çalışmada, 143 klinik izolatta (60 *A. baumannii*, 44 *P. aeruginosa*, 11 *Enterobacter* spp., 13 *E. coli*, 15 *Klebsiella* spp.), BMD ile %11 oranında kolistin direnci tespit edilmiştir (210). Yunanistan'da yapılan başka bir çalışmada (2017), BMD yöntemi ile 117 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatının 29 (%24,8)'unda kolistin direnci bulunmuştur (211). 2018'deki bir çalışmada, 120'si *A. baumannii*, 121'i *K. pneumoniae* toplam 241 izolatta, referans BMD yöntemiyle belirlenen kolistin direnç oranı %15'tir (212). 2018'de 34 *K. pneumoniae*, 20 *E. coli*, 17 *A. baumannii* ve 38 *P. aeruginosa* olmak üzere 109 Gram negatif bakteri dahil edilerek yapılan bir çalışmada, 2 *A. baumannii*, 14 *K. pneumoniae*, 5 *P. aeruginosa*'dan oluşan 21 (%19,3) izolatta kolistin direnci saptanmıştır (213). Slovenya'da yapılan bir çalışmada (2019), 82 *A. baumannii*'den 37 (%45,1)'sinde BMD yöntemiyle kolistin direnci tespit edilmiştir (214). 2019'daki bir çalışmada, 22'si *E. coli*, 109'u *K. pneumoniae*, 52'si *P. aeruginosa* ve 42'si *A. baumannii* olan 225 izolatın, 2 *E. coli*, 52 *K. pneumoniae*, 14 *P. aeruginosa* ve 5 *A. baumannii* olmak üzere, toplam 73 (%32,4)'ünde kolistin direnci bulunmuştur (215). 2019 yılına ait başka bir çalışmada, 320 karbapenem dirençli ve 44 karbapenem duyarlı olmak üzere toplam 364 Gram negatif bakteri izolatında belirlenen kolistin direnç oranı %13,5'tir (216). Ülkemizdeki bir çalışmada (2019), 199 *K. pneumoniae* izolatının 110 (%55,3)'u, 163 *A. baumannii* izolatının 52 (%31,9)'si, 34 *E. coli* izolatının 7 (%20,6)'si, 20 *Enterobacter* spp. izolatının 8 (%40)'i ve 3 *Citrobacter* spp. izolatının 1 (%33,3)'i referans BMD yöntemi ile kolistine dirençli saptanmıştır (217). Ülkemizdeki başka bir çalışmada (2020), 97 *A. baumannii*'de BMD yöntemiyle %8,2 oranında kolistin direnci tespit edilmiştir (218). Yine ülkemizde yapılan bir çalışmada

(2021), MDR 657 Gram negatif bakterideki kolistin direnci %53,9 bulunmuştur (219). Hindistan'da yapılan bir çalışmada (2021), 200 karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae*'dan BMD yöntemi ile saptanan kolistin direnç oranı %13,5'tir (220). Yaptığımız bu çalışmada belirlediğimiz kolistin direncinin (%4) diğer çalışmalara kıyasla az olmasının sebebi, çalışmaya Phoenix™ M50 otomatize sistemiyle kolistin MİK değeri ≤ 1 µg/mL saptanan izolatların dahil edilmiş olmasıdır.

Yapılan çalışmalarda MDR Gram negatif bakteri örnekleri incelendiğinde benzer dağılım görülmektedir. Mısır'da yapılan bir çalışmada, dahil edilen 60 MDR Gram negatif bakteri izolatının (26 *K. pneumoniae*, 19 *P. aeruginosa*, 14 *A. baumannii*, 1 *E. coli*), %41,67'si yara, %30'u solunum örnekleri, %20'si idrar, %8,33'ü kan kültürlerinden elde edilmiştir (221). Dafopoulou ve ark.'larının (204) çalıştığı, 41'i *K. pneumoniae*, 20'si *A. baumannii* toplam 61 karbapenem dirençli izolatın %42,6'sı kan, %16,4'ü solunum yolu, %16,4'ü idrar, %11,5'i deri ve yumuşak doku ve %13,1'i diğer klinik örneklerdendir. Uğraklı ve ark.'larının (219) çalışmasında MDR 657 Gram negatif bakteri (538 *K. pneumoniae*, 90 *A. baumannii* complex, 14 *P. aeruginosa*, 11 *E. Coli*, 4 *Enterobacter cloacae*), sırasıyla en çok kan (%46,1), bronkoalveolar lavaj (%28,9) ve idrar (%9,3) örneklerinden izole edilmiştir. Ülkemizde Tüzemen ve ark.'larının (222) yaptığı 2018 yılına ait bir çalışmada, Phoenix™ 100 otomatize sistemiyle kolistine dirençli bulunan 5 *P. aeruginosa*, 9 *A. baumannii* ve 36 *K. pneumoniae*, toplamda 50 izolatın dağılımı %36 yara akıntısı/pü, %26 solunum, %22 idrar ve %16 kan olarak bildirilmiştir. Simar ve ark.'larının (210) çalıştığı 143 klinik izolatın (60 *A. baumannii*, 44 *P. aeruginosa*, 11 *Enterobacter* spp., 13 *E. coli*, 15 *Klebsiella* spp.) örnek tipine göre dağılımı %30 solunum sistemi, %26 yara/apse, %21 idrar, %13 kan, %5 deri/doku, %6 diğer kültürler şeklindedir. Yaptığımız bu çalışmada da benzer dağılım görülmüş, 100 MDR Gram negatif bakteri izolatının 32'si trakeal aspirat, 27'si yara, 19'u kan, 13'ü balgam, 6'sı boğaz, 2'si eklem sıvısı, 1'i kateter örneğinden izole edilmiştir.

Önceki çalışmalarda, dahil edilen MDR Gram negatif bakterilerin kliniklere göre dağılımına bakıldığında, Shabban ve ark.'larının (39) yaptığı çalışmada, 60 MDR Gram negatif bakteri izolatının %76,67'si yoğun bakım, %23,3'ü farklı servislerinden gelen örneklerden izole edilmiştir. Uğraklı ve ark.'larının (219) çalışmasında, MDR 657 Gram negatif bakteriden, 459 (%69,9)'unun birimi yoğun bakım ünitesidir.

Tüzemen ve ark.'larının (222) çalışmasında, Phoenix™ 100 otomatize sistemiyle kolistin direnci saptanan, 36 *K. pneumoniae*, 5 *P. aeruginosa* ve 9 *A. baumannii*'den oluşan toplam 50 izolatin %46'sı reanimasyon yoğun bakım, %30'u genel cerrahi kliniği ve %24'ü diğer kliniklerden gönderilmiştir. Yaptığımız bu çalışmada da diğer çalışmalarla uyumlu olarak, 100 MDR Gram negatif bakterinin %47'si servis, %46'sı yoğun bakım, %7'si poliklinik hastalarının örneklerinden elde edilmiştir. En fazla MDR Gram negatif bakteri izole edilen birim dahiliye yoğun bakım ünitesi (%23) olup, bunu anestezi yoğun bakım ünitesi (%15) ve genel cerrahi kliniği (%6) takip etmektedir.

Duyarlılık test yöntemlerinin kolistin duyarlılığını belirlemedeki performansını araştıran birçok çalışma bulunmaktadır. Almanya'da Pfennigwerth ve ark.'ları (25), karbapenemaz üreten 325 *Enterobacteriaceae* izolatında, kolistin duyarlılığını Micronaut-S, Sensititre, Vitek 2, Phoenix, MicroScan ve E-test yöntemleri ile araştırmış. Referans BMD ile karşılaştırdıklarında Micronaut-S için %90,6 EU oranı, %98,5 KU oranı, %0,5 BH oranı, %3,8 ÇBH oranı; Sensititre için %81,7 EU oranı, %92,9 KU oranı, %7,3 BH oranı, %6,6 ÇBH oranı; Vitek 2 için %75,9 EU oranı, %90,5 KU oranı, %0 BH oranı, %29,2 ÇBH oranı; MicroScan prompt inokülasyon yöntemi için %90,2 EU oranı, %95,1 KU oranı, %1,8 BH oranı, %9,4 ÇBH oranı; MicroScan türbidite yöntemi için %95,1 EU oranı, %96 KU oranı, %2,3 BH oranı, %5,7 ÇBH oranı; Phoenix için EU hesaplayabilmek adına sınır değerlerini $\leq 1 \geq 8$ µg/mL olarak kabul edip, referans yöntemin de bu sınır dışında saptadığı izolat sonuçlarını hesaplamaya katmamışlar ve %76,1 EU oranı, %92 KU oranı, %0 BH oranı, %24,5 ÇBH oranı elde ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışma sonucuna göre Micronaut-S'nin en iyi performansı gösterdiğini, türbidite yöntemi kullanan MicroScan yarı otomatik sisteminin ikinci en iyi ürün olduğunu ancak bu sistemi, %5,7 ÇBH oranı nedeniyle tavsiye etmediklerini, Sensititre testinin çok fazla yanlış dirençli sonuç gösterdiğini, Vitek 2 ve Phoenix performansının, çok sayıda yanlış duyarlı sonuç nedeniyle kabul edilemez olduğunu, E-test yöntemini birçok yanlış duyarlı sonuç nedeniyle önermediklerini vurgulamışlardır.

Jayol ve ark.'ları (223) çalışmaya dahil ettiği 185 Gram negatif bakterinin kolistin duyarlılığını Sensititre, UMIC ve MicroScan sistemleriyle araştırmış ve referans BMD ile karşılaştırdıklarında, Sensititre testi için %3 ÇBH oranı, %0 BH

oranı, %97,8 KU oranı; MicroScan sistemi için %0,8 ÇBH oranı, %26,9 BH oranı, %91,9 KU oranı; UMIC sistemi için %11,3 ÇBH oranı, %0 BH oranı, %91,9 KU oranı saptamışlardır. Çalışma sonucunda Sensititre testinin kolistin duyarlılığını belirlemek için güvenilir olduğunu belirtmişlerdir.

Singapur'da Chew ve ark.'larının (203) yaptığı 2017 yılına ait çalışmada, 76 *Enterobacteriaceae* izolatında kolistin duyarlılığı referans BMD, Sensititre, MicroScan, Vitek 2 sistemi, E-test yöntemleriyle araştırılmış. Sensititre testinin EU oranı %89,5, KU oranı %90,1, BH oranı %11,8, ÇBH oranı %4; MicroScan sisteminin sınırlı dilüsyon değerleri nedeniyle EU oranı hesaplanmamış olup KU oranı %88,2, BH oranı %15,8, ÇBH oranı %4; Vitek 2 sisteminin EU oranı %93,4, KU oranı %88,2, BH oranı %0, ÇBH oranı %36; E-test yönteminin EU oranı %75, KU oranı %92,1, BH oranı %5,9, ÇBH oranı %12 bulunmuş. Sensititre testi ile Vitek 2 sisteminin saptadığı MİK değerlerinin BMD ile korelasyonunun E-test yönteminden daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Matuschek ve ark.'ları (206) 2018'de, 22 *Acinetobacter* spp., 21 *P. aeruginosa*, 18 *K. pneumoniae* ve 14 *E. coli*'den oluşan toplam 75 Gram negatif bakteri izolatında referans BMD yöntemiyle SensiTest, Sensititre, UMIC, Micronaut-S ve Micronaut MIC-Strip ticari sıvı mikrodilüsyon ürünleri ile E-test ve MIC Test Strip olmak üzere iki gradient testin kolistin duyarlılık sonuçlarını karşılaştırmış. Sensititre testiyle 4 BH, %96 EU, %95 KU; Micronaut MIC-Strip ile 5 BH, 2 ÇBH, %99 EU, %91 KU; Micronaut-S ile 6 BH, 2 ÇBH, %96 EU, %89 KU; UMIC ile 3 BH, 3 ÇBH, %82 EU, %92 KU ve SensiTest™ ile 7 BH, 1 ÇBH, %88 EU, %89 KU elde etmişlerdir. Çalışmanın sonucuna göre ticari sıvı mikrodilüsyon yöntemlerinden, Sensititre, Micronaut MIC-Strip ve Micronaut-S testlerinin referans yöntemle en iyi korelasyona sahip olup iyi performans gösterdiğini, gradient testlerin sonuçlarının ise güvenilir olmadığını belirtmişlerdir.

Yusuf ve ark.'larının (207) yaptığı 2020 yılına ait çalışmada, 70 Gram negatif bakteri izolatı ile kolistin duyarlılığını saptamada Sensititre, SensiTest Colistin, Micronaut MIC-Strip ve UMIC ticari testlerinin kolistin duyarlılığını saptamadaki performansını araştırmış. Referans BMD yöntemiyle karşılaştırdıklarında Sensititre için %92,9 KU, %87,1 EU, %0 BH, %14,7 ÇBH; SensiTest için %95,7 KU, %92,8 EU, %0 BH, %8,8 ÇBH; Micronaut MIC-Strip için %95,7 KU, %82,9 EU, %0 BH,

%8,8 ÇBH ve UMIC için %94,3 KU, %87,1 EU, %0 BH, %5,9 ÇBH saptamışlardır. Sensititre testi sonuçlarına ayrı ayrı bakıldığında *E. coli* izolatlarının EU oranı %100, *K. pneumoniae* izolatlarının EU oranı %78,6, *P. aeruginosa* izolatlarının EU oranı %86,9, *Acinetobacter* spp. izolatlarının EU oranı ise %100'dür. Sonuç olarak, çalışmada incelenen dört ticari yöntemin de referans yöntemle karşılaştırıldığında, kabul edilebilir performans gösterdiğini bildirmişlerdir.

Kansak ve ark.'ları (224), 38 MDR *K. pneumoniae* izolatında kolistin duyarlılığını sıvı mikrodilüsyon temelli Sensititre ve Micronaut MIC-Strip testleriyle araştırmış. Referans BMD yöntemine göre, Sensititre testinin EU oranı %74, KU oranı %97, BH oranı %0, ÇBH oranı %2,8; Micronaut MIC-Strip testinin EU oranı %76, KU oranı %100, BH oranı %0, ÇBH oranı %0 bulunmuştur. Çalışma verilerine göre, iki ticari yöntemin de BH, ÇBH ve KU oranlarının kabul edilebilir sınırlarda iken, EU oranlarının %90'ın altında olduğunu ve bu düşüklüğün çalışmadaki izolat sayısının azlığı ve suşların çoğunun dirençli olmasına bağlı olabileceğini bildirmiş ve her iki testin de, kullanımının kolay olması, ek ekipman ve tecrübe gerektirmemesi, kısa sürede sonuç verebilmesi nedeniyle kolistin duyarlılığını saptamada rutinde kullanılabileceği sonucuna varmışlardır.

Javed ve ark.'ları (205) 2018'deki çalışmalarında, 131 *P. aeruginosa* izolatının kolistin duyarlılığını Sensititre, Micronaut-S, E-test, SensiTest Colistin, Rapid Polymyxin *Pseudomonas* testlerini kullanarak araştırmış. Referans BMD yöntemiyle karşılaştırdıklarında Micronaut-S ile %94,7 KU, %86,7 EU, %5 BH, %6,5 ÇBH; SensiTest ile %93,9 KU, %88 EU, %6 BH, %6,5 ÇBH; Sensititre ile %96,9 KU, %90,7 EU, %2 BH, %6,5 ÇBH; E-test ile 24 saatte %84 KU, %70,5 EU, %0 BH, %67,7 ÇBH, 48 saatte %84,7 KU, %72 EU, %1 BH, %61,3 ÇBH; Rapid Polymyxin *Pseudomonas* test ile %92,4 KU, %9 BH, %3,2 ÇBH elde etmişlerdir. Sonuçlara göre Sensititre testinin en yüksek kategorik uyuma sahip olduğunu (%96,9) ve referans yöntemle iyi korelasyon gösterdiğini, E-test ile referans yöntem arasındaki korelasyonun diğer test yöntemlerinden önemli ölçüde zayıf olduğunu, E-test yönteminin yüksek ÇBH oranlarıyla dirençli izolatları tanıyamadığını, E-test dışındaki tüm yöntemlerin KU oranı >%90 olmasına rağmen, yine de hiçbirinin tüm kategorilerde, özellikle de ÇBH kriteri için beklenen düzeyde olmadığını vurgulamışlardır.

Bu çalışmada Sensititre™ testiyle tüm izolatlar için %99 ve farklı bakteri türlerinde %96 ile %100 aralığında kabul edilebilir KU oranları belirlendi. Tüm izolatlar için %69 ve farklı bakteri türleri için %56-%84 arasında değişen EU oranları kabul edilebilir değerin altındaydı. Tüm izolatlar için %1,04 BH ve %0 ÇBH belirlenmiş olup, *A. baumannii* izolatlarında kabul edilebilir sınırın üzerinde ÇBH oranı (%4,17) saptandı. Sensititre™ testi ile çok iyi düzeyde uyum tespit edilmesine rağmen (kappa katsayısı=0,884, p<0,001), yine de kabul edilebilir antimikrobiyal duyarlılık testi performansı kriterlerini karşılamadığı gözlemlendi.

Vourli ve ark.'ları (211), 117 karbapenem dirençli *A. baumannii* izolatının kolistin duyarlılığını, BMD yöntemini referans alarak, agar dilüsyon yöntemi, Vitek 2 ve Phoenix 100 otomatize sistemleri ile araştırmıştır. Phoenix 100 otomatize sistemini karşılaştırmak için ≤ 1 ve >4 mg/L olan kolistin MİK değeri aralığı, 1 ve 8 mg/L olarak kabul edilmiştir. EU oranı Phoenix 100 için %91,5, Vitek 2 için %88,9 ve agar dilüsyon yöntemi için %93,2; KU oranı Phoenix 100 için %88,9, Vitek 2 için %89,7 ve agar dilüsyon yöntemi için %87,2; BH oranı Phoenix 100 ve Vitek 2 için %1,1 ve agar dilüsyon yöntemi için %15,9, ÇBH oranı Phoenix 100 için %41,4, Vitek 2 için %37,9 ve agar dilüsyon yöntemi için %3,4 olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda, otomatize test yöntemlerinin dirençli suşları belirlemede yetersiz olduğunu ve bunun uygunsuz kolistin uygulamasına yol açabileceğini, özellikle 2 mg/L MİK değerine sahip izolatların referans yöntemle doğrulanması gerektiğini vurgulamışlardır.

Carretto ve ark.'ları (22), 2018'de yaptıkları çalışmada, kolistin duyarlılığını Phoenix 100 sistemi ve SensiTest Colistin ile araştırmış ve referans yöntem BMD ile karşılaştırdıklarında, Phoenix 100 sisteminin kolistin MİK aralığı çok dar olduğundan EU oranının hesaplanmadığını, KU oranının %96,8, BH oranının %0,63 ve ÇBH oranının %10 olduğunu; SensiTest Colistin'in ise %98,9 KU, %96 EU, %1,46 ÇBH ve %0,93 BH gösterdiğini bildirmişlerdir.

Jayol ve ark.'ları (21), 2018'de, referans BMD ile saptadığı, 40'ı kolistin duyarlı, 83'ü dirençli 123 *Enterobacteriaceae* izolatını kullanarak, hızlı polimiksin NP testi ve Phoenix 100 otomatize sisteminin kolistin duyarlılığını belirlemedeki performanslarını araştırmış. Hızlı polimiksin NP testi, polimiksin varlığında bakteri üremesinin, glukoz metabolizmasıyla oluşan asit metabolitlerinin birkaç saatte pH göstergesinde oluşturduğu renk değişimi ile belirlendiği bir yöntemdir. Phoenix 100

otomatize sisteminin ÇBH oranını %12, BH oranını %0; hızlı polimiksin NP testinin ÇBH oranını %1,2, BH oranını %2,5 olarak bulmuşlardır. Sonuçlara göre hızlı polimiksin NP testinin, BMD yöntemiyle iyi uyum gösterdiğini, Phoenix 100 sistemi ile duyarlı elde edilen sonuçların referans BMD yöntemiyle doğrulanması gerektiğini vurgulamışlardır.

Tüzemen ve ark.'larının (222), çalışmasında, Phoenix 100 otomatize sistemiyle kolistin direnci saptanan 36 *K. Pneumoniae*, 9 *A. baumannii*, 5 *P. aeruginosa* olmak üzere toplamda 50 izolatın kolistin duyarlılık test sonuçlarını, gradient difüzyon testi ve BMD yöntemi sonuçlarıyla karşılaştırılmış. Phoenix 100 otomatize sisteminde, BMD yöntemine kıyasla tüm izolatlar için %92 KU, %8 BH; *K. pneumoniae* izolatları için %100 KU, %0 BH; *A. baumannii* izolatları için %77,8 KU, %22,2 BH; *P. aeruginosa* izolatları için %60 KU, %40 BH oranı elde edilmiş ve Phoenix 100'le kolistin direnci tespit edilen izolatlar çalışıldığı için ÇBH saptanmamıştır. Gradient difüzyon testinde tüm izolatlar için %20 KU, %80 ÇBH; *K. pneumoniae* izolatları için %16,7 KU, %83,3 ÇBH; *A. baumannii* izolatları için %22,2 KU, %77,8 ÇBH; *P. aeruginosa* izolatları için %40 KU, %60 ÇBH oranı bulunmuş ve bu yöntemde BH saptanmamıştır. Elde edilen verilerle, kolistin için Phoenix 100 otomatize sisteminin KU, BH ve ÇBH oranlarının, kabul edilebilir değerlerde olduğu, gradient difüzyon testi oranlarının ise standardı karşılamadığı, bu nedenle kolistin direnci BMD yöntemiyle doğrulanamayacaksa, Phoenix 100 otomatize sistem sonuçlarının bildirilmesinin uygun olacağı bildirilmiştir.

Koyuncu Özyurt ve ark.'ları (217), 199 *K. pneumoniae* 163 *A. baumannii*, 34 *E. coli*, 20, *Enterobacter* ve 3 *Citrobacter* spp.'den oluşan toplam 419 izolatta kolistin duyarlılığını belirlemede, referans BMD yöntemine göre Phoenix 100 sistemi ve sıvı disk elüsyon yönteminin performansını araştırmış. Sıvı disk elüsyon yöntemi için %99,3 KU, %0,5 BH ve %0,2 ÇBH; Phoenix 100 sistemi için tüm izolatlar birlikte değerlendirildiğinde %95 KU, %5 ÇBH ve %0 BH; *A. baumannii* izolatlarında %96,3 KU, %3,7 ÇBH; *Enterobacteriaceae* izolatlarında %94,1 KU, %5,9 ÇBH oranı belirlemişlerdir. Elde ettikleri verilerle, sıvı disk elüsyon yönteminin, referans yöntemle yüksek uyumu nedeniyle, kolistine in vitro duyarlılığın saptanmasında kullanılabileceğini, Phoenix 100 sistemi ile ÇBH oranının kabul edilebilir sınırların

üzerinde bulunmuş olması nedeniyle, bu sistemin özellikle kolistine duyarlı olarak belirlediği izolatların sonucunun doğrulanması gerektiği sonucuna varmışlardır.

Giani ve ark.'ları (225) 2012'de, kolistin duyarlılığını saptamada Phoenix otomatize sisteminin performansını 109 *P. aeruginosa* izolatı kullanarak değerlendirmiş ve referans BMD ile kıyasladıklarında EU oranını %99,1, KU oranını %100, BH oranını %0, ÇBH oranını %0 bulmuşlardır.

Yunanistan'da Malli ve ark.'larının (226), 2018'deki çalışmalarında, ComASP Colistin ticari sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenen, 98 kolistine dirençli ve 33 kolistine duyarlı olmak üzere 131 *K. pneumoniae* izolatı kullanarak, hızlı polimiksin NP testi, E-test, Phoenix ve Vitek 2 sistemlerinin dirençli suşları belirlemedeki performansını, bu ticari sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırmış. Sırasıyla duyarlılıkları ve özgüllükleri hızlı polimiksin NP testi için %99-%82, E-test için %97-%85, Phoenix için %95-%94 ve Vitek 2 için %98-%88 bulmuşlardır. Çalışma sonucunda, hızlı polimiksin NP testinin duyarlılığının diğer yöntemlerden daha yüksek, özgüllüğünün ise daha düşük tespit edildiğini, ancak uygulanmasının hızlı ve pratik olması nedeniyle MDR Gram negatif bakteri prevalansının yüksek olduğu yerlerde tarama testi olabileceğini vurgulamışlardır.

Çin'de Zhu ve ark.'larının (227) yaptığı 2020 yılına ait çalışmada, 257 Gram negatif bakteri suşu kullanılarak altın standart BMD yöntemine göre Vitek 2, Phoenix M50 ve Bio-kont antibiyotik duyarlılık test sistemlerinin performansı değerlendirilmiş. Vitek 2 için %64,2 EU, %86,8 KU, %41 ÇBH, %0 BH; Bio-kont için %86,7 EU, %96,5 KU, %7,2 ÇBH, %1,7 BH; Phoenix M50 için %92,9 EU, %92,9 KU, %21,7 ÇBH, %0 BH elde etmişlerdir. Çalışma verilerine dayanarak, sistemlerin hiçbirinin kolistin antibiyotik duyarlılık test standartlarını karşılamadığını, içlerinden en tatmin edici sistemin en yüksek KU ve en az hatayla Bio-kont olduğunu, bunu daha yüksek EU, kabul edilebilir KU, ancak daha fazla hata ile Phoenix M50 sisteminin izlediğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada tüm izolatlar için Phoenix™ otomatize sisteminin sonuçları BMD yöntemiyle kıyaslandığında, KU %96 bulunmuş olup; Phoenix™ otomatize sistemi ile BMD arasındaki EU, Phoenix™ antibiyotik duyarlılık panelleri tarafından kolistin için test edilen MİK değer aralığı dar olduğundan (1, 2, 4 µg/mL olmak üzere yalnızca üç dilüsyon değeri) analiz edilmemiştir. 4 izolatta ÇBH saptanırken,

Phoenix™ otomatize sisteminin kolistin MİK değerini ≤ 1 µg/ml olarak belirlediği izolatlar çalışıldığı için ÇBH oranı %100 olarak hesaplanmış ve BH gözlenmemiştir.

Galani ve ark.'ları (228) 2018'de, Yunanistan'ın altı şehrindeki 15 hastaneden toplanan 392 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşunu alarak, ComASP Colistin panelini referans BMD yöntemiyle karşılaştırmış ve ComASP Colistin panelinin BMD yöntemine göre EU oranını %94,9, KU oranını %97,2, BH oranını %4, ÇBH oranını %0,7 bulmuşlardır. Sonuç olarak, bu testin kolistine dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının çoğunu güvenilir bir şekilde tanımladığını, kabul edilebilir KU ve EU oranlarının olduğunu belirtmişlerdir.

Simner ve ark.'ları (202) 2019 yılına ait çalışmalarında, 6'sının *mcr-1* pozitif *E. Coli* olduğu, *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* ve *Acinetobacter* spp.'den oluşan 172 izolat ile kolistin duyarlılığının belirlenmesinde, sıvı disk elüsyon yönteminin verimliliğini araştırmış. Referans BMD ile karşılaştırdıklarında tüm izolatlar için %98 KU, %99 EU, %8 ÇBH ve %0 BH; 6 *mcr-1* pozitif *E. coli* izolatı için %50 KU, %100 EU ve %50 ÇBH oranlarını elde etmişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre, sıvı disk elüsyon yönteminin kolistin MİK değerini belirlemek için uygulaması kolay bir metod olduğunu, fakat *mcr*-pozitif izolatların MİK değerlerini olduğundan düşük belirlemesi nedeniyle sıvı disk elüsyon yöntemiyle MİK değeri 2 µg/ml saptanan izolatların referans BMD yöntemi ile doğrulanması gerektiğini vurgulamışlar. MİK değeri ≥ 2 µg/ml bulunanların suşların ise *mcr* genleri varlığı açısından değerlendirilmesini önermişlerdir.

Lescat ve ark.'ları (229), 43 *A. baumannii* ve 49 *P. aeruginosa* izolatında, BMD yöntemine göre hızlı resazurin redüksiyon bazlı polimiksin *Acinetobacter/Pseudomonas* NP testin performansını değerlendirmiş. Duyarlılığı %100, özgüllüğü %97 ve 3 izolatta BH bulunurken, ÇBH gözlenmemiştir. Çalışma sonucunda, bu testin MİK değerini belirlemese de duyarlı/dirençli kategorizasyonunu 4 saatten daha kısa sürede yaptığını, kolistin direncini belirlemede güvenilir olduğunu belirtmişlerdir.

Jia ve ark.'ları (26) 2020'de, 253 Gram negatif bakteri izolatında BMD yöntemi ile kıyaslayarak, hızlı resazurin redüksiyon bazlı polimiksin *Acinetobacter/Pseudomonas* NP testinin performansını değerlendirmiş. KU oranını %99,2, duyarlılığını %100 ve özgüllüğünü %99 bulmuşlar. Çalışma verilerine göre

testin, kolistin direnci için doğru bir tespit yöntemi olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Dafopoulou ve ark.'ları (204), 41'i *K. pneumoniae*, 20'si *A. baumannii* toplam 61 karbapenem dirençli izolatı kullanarak, kolistin MİK test yöntemlerinden polisorbata 80 eklenmiş BMD, agar dilüsyon, E-test, MIC Test Strip ve Vitek 2'yi değerlendirmiş. Referans BMD ile kıyasladıklarında polisorbata-80 eklenmiş BMD için %82 KU, %95,1 EU, %18 ÇBH, %0 BH; agar dilüsyon yöntemi için %91,8 KU, %55,7 EU, %3,3 ÇBH, %4,9 BH; E-test için %59 KU, %50,8 EU, %39,3 ÇBH, %1,6 BH; MIC Test Strip testi için %67,2 KU, %65,6 EU, %31,1 ÇBH, %1,6 BH ve Vitek 2 için %96,7 KU, %78,6 EU, %0 ÇBH, %3,3 BH oranı bulmuşlardır. Elde edilen sonuçlara göre, Vitek 2'nin referans yöntemle mükemmel KU sergilediğini, ancak yine de karşılaştırılan yöntemlerin hiçbirinin kabul edilebilir performans kriterlerini karşılamadığını, gradient difüzyon yöntemlerinin yanlış duyarlı sonuçlarla uygun olmayan kolistin tedavilerine yol açabileceğini, klinik laboratuvarların bu tutarsızlıkların farkında olması ve özellikle kolistin tedavisinin gerekli görüldüğü durumlarda duyarlılık testi için referans yöntemin uygulanması gerektiğini belirtmişlerdir.

Lutgring ve ark.'ları (230) 2019'da, 111 *Enterobacteriaceae* izolatı kullanarak, kolistin duyarlılığını belirlemede MicroScan sistemi ve gradyan difüzyon testinin performansını, referans BMD yöntemine kıyasla değerlendirmiş. Gradient difüzyon testinde %86,4 KU, %77,3 EU, %0 BH ve %53,6 ÇBH; MicroScan sisteminde %92,7 KU, %6,1 BH ve %10,7 ÇBH elde etmişlerdir. Çalışma sonucuna göre, MicroScan sisteminin gradient difüzyon testinden daha iyi performans gösterdiğini, MicroScan sisteminin, yüksek kolistin MİK değerleri ve *mcr* geni araştırılacak izolatlar için, tarama testi olabileceğini vurgulamışlardır.

Arroyo ve ark.'ları (231), E-test yönteminin kolistin duyarlılığını saptamadaki güvenilirliğini 115 *A. baumannii* izolatı kullanarak araştırmış. Referans test BMD ile karşılaştırdıklarında >%90 KU, %16,5 EU, iki izolatta ÇBH elde etmişler ve BH saptamamışlardır. Çalışma verilerine göre, *A. baumannii* için kolistin direncinin saptanmasında E-test yönteminin güvenilir olduğunu ve referans yöntemine alternatif olabileceğini, ancak 2 ÇBH saptanan izolattaki gibi MİK değerinin 1 veya 2 µg/ml

olarak belirlendiği durumlarda, E-test sonuçlarının BMD yöntemi ile doğrulanmasını gerektiği sonucuna varmışlardır.

Bakthavatchalam ve ark.'ları (212), 120 *A. baumannii* ve 121 *K. pneumoniae* izolatu kullanarak, referans BMD yöntemine göre E-test ve Vitek 2'nin kolistin duyarlılığını belirlemedeki performansını araştırmış. E-test için %87 KU, %37 EU, %42 ÇBH, %1 BH; Vitek 2 için %95 KU, %74 EU, %11 ÇBH, %0 BH elde etmişlerdir. Sonuçlara göre, E-test ve Vitek 2'nin performansının düşük olduğunu, bu yöntemlerin tedaviyi yanlış yönlendirebileceğini, özellikle de kolistin dirençli izolatların referans yöntemle doğrulanması gerektiğini belirtmişlerdir.

Kar ve ark.'ları (220), 200 karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae*'da kolistin duyarlılığını referans BMD, agar dilüsyon, hızlı kolistin NP testi ve E-test yöntemiyle araştırmış. Referans yöntemine göre agar dilüsyonun %90,5 KU, %22 EU, %11 ÇBH, %9,2 BH; E-test yönteminin %95 KU, %42,5 EU, %37 ÇBH, %0 BH gösterdiğini saptamışlardır. Hızlı kolistin NP testinin özgüllüğünü %97,6, duyarlılığını ise %85 bulmuşlardır. Çalışma sonucuna göre, agar dilüsyon ve E-test yöntemindeki yüksek ÇBH oranlarının, kolistin duyarlılık tespiti için referans yöntemine alternatif olarak kullanılmalarına engel teşkil ettiğini, hızlı kolistin NP testinde uyumsuz sonuçların en fazla *Enterobacter* spp.'de saptandığını, orta derece duyarlılığa ve mükemmel özgüllüğe sahip hızlı kolistin NP testinin, *Enterobacter* spp. dışında karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* izolatlarında kolistin duyarlılığını belirlemek için iyi bir seçenek olabileceğini vurgulamışlardır.

Uğraklı ve ark.'larının (219), çalışmasında, MDR 657 Gram negatif bakteri kullanılarak kolistin duyarlılığını belirlemede referans BMD yöntemine göre E-test ve Vitek 2'nin performansı değerlendirilmiş. Vitek 2 için %92,4 KU, %14,5 ÇBH, %1,7 BH; E-test için %71,9 KU, %36,5 ÇBH, %0 BH bulunmuştur. Sonuç olarak, E-test yönteminin, tüm izolatlar için Vitek 2'den daha düşük performans sergilediğini, her iki yöntemin de ÇBH oranlarının kabul edilebilir sınırların üzerinde olduğunu, laboratuvarların E-test ile Vitek 2'nin kolistin duyarlılık testi sonuçlarına güvenmemeleri gerektiğini bildirmişlerdir.

Haeili ve ark.'ları (213), *K. pneumoniae*, *E. coli*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* suşlarını içeren toplam 109 Gram negatif bakteriyi dahil ettiği çalışmada referans BMD yöntemine göre sıvı makrodilüsyon, agar dilüsyon ve iki farklı ticari disk

kaynağı kullanan disk difüzyon yöntemlerinin performansını araştırmış. Sıvı makrodilüsyon yönteminde %100 KU, %100 EU, %0 BH, %0 ÇBH; agar dilüsyon yönteminde %67,9 KU, %23,8 EU, %39,77 BH, %0 ÇBH; Neo-Sensitabs tabletlerin (Rosco, Taastrup, Danimarka) kullanıldığı disk difüzyon ile %92,6 KU, %3,4 BH, %23,8 ÇBH; BBL Sensi-Disc (Becton Dickinson, Sparks, MD) kullanılan disk difüzyon ile %95,4 KU, %0 BH, %23,8 ÇBH elde etmişlerdir. Sonuçlara göre sıvı makrodilüsyonun çok güvenilir bir yöntem olduğunu, disk difüzyonun yüksek düzeyde kolistin dirençli tüm *K. pneumoniae* ve *A. baumannii* suşlarında direnci saptayabildiğini ve bu nedenle üst düzey dirençli suşların tespiti için ön tarama testi olarak yeniden ele alınabileceğini belirtmişlerdir.

Lellouche ve ark.'ları (216), 364 Gram negatif bakteri izolatında kolistin duyarlılığını belirlemede, referans BMD yöntemiyle Vitek 2 ve agar dilüsyon yöntemlerini karşılaştırmış. Vitek 2 için %87,4 EU, %95,9 KU, %0 BH, %30,6 ÇBH; agar dilüsyon için %91,5 EU, %97,3 KU, %1,6 BH, %10,2 ÇBH saptamışlardır. Vitek 2 ve agar dilüsyon yöntemlerini kombine ettikleri yeni bir strateji denemişler ve bununlada %97,3 KU, %1,6 BH, %10,2 ÇBH tespit etmişlerdir. Buna göre Vitek 2'nin tek başına kullanımının kabul edilemez ÇBH oranıyla sonuçlandığını, Vitek 2 ile dirençli saptanan izolatın dirençli kabul edilebileceğini; Vitek 2 ile duyarlı saptanan izolatın ise agar tarama plağında üreme yoksa duyarlı kabul edilebileceğini, ancak agar tarama plağında üreme varsa sonucu BMD ile doğrulamak gerektiğini, zira bu stratejinin uygulanmasının nispeten kolay olduğunu ve agar tarama plağının Vitek 2 ile yanlış sınıflandırılan dirençli izolatları tanımladığı için ÇBH oranını %30,6'dan %10,2'ye azalttığını bildirmişlerdir.

Wattal ve ark.'ları (215), E-test, Micronaut-S ve Vitek 2'nin kolistin duyarlılığını belirlemedeki güvenilirliğini referans BMD yöntemiyle karşılaştırarak araştırmış. Vitek 2 için %98,2 KU, %92 EU, %1,8 BH, %0 ÇBH; Micronaut-S için %99,6 KU, %92,4 EU, %0,4 BH, %0 ÇBH ve E-test için %96,4 KU, %72 EU, %2,2 BH, %1,3 ÇBH saptamışlar. Elde ettikleri verilere göre Micronaut-S ve Vitek 2'nin kabul edilebilir yöntemler olduğunu, E-test yönteminin düşük EU oranıyla güvenilirmez olduğunu bildirmişlerdir.

Das ve ark.'ları (232), kolistin duyarlılığını belirlemede, E-test ve Vitek 2'nin referans BMD yöntemine göre performansını araştırmış. Vitek 2 için %92,6 KU,

%88,7 EU, %4,3 BH, %17,2 ÇBH; E-test için %95,9 KU, %68,6 EU, %0 BH, %17,2 ÇBH oranları belirlemişler ve iki test yönteminin de güvenilir olmadığı sonucuna varmışlardır.

Germ ve ark.'ları (214), 2019 yılında, referans BMD yöntemine göre resazurin redüksiyon bazlı hızlı polimiksin NP testinin doğruluğunu araştırmış. 82 *A. baumannii* suşu için %95,1 KU, %1,2 ÇBH ve %3,7 BH; 10 *E. coli*, 4 *E. cloacae*, 6 *K. pneumoniae*'den oluşan 20 *Enterobacteriaceae* izolatı için %100 KU elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Nhung ve ark.'ları (209), 102 *A. baumannii*, 40 *P. aeruginosa* ve 99 *Enterobacteriaceae*'den oluşan 241 adet MDR Gram negatif bakteri izolatında BMD yöntemine kıyasla E-test yönteminin kolistin duyarlılığını saptamadaki güvenilirliğini araştırmış. Tüm izolatlar birlikte değerlendirildiğinde 1 BH, 0 ÇBH, %81 EU; *P. aeruginosa* izolatları için %98, *Enterobacteriaceae* ve *A. baumannii* izolatları için %100 KU elde etmişlerdir. Bulgulara göre E-test için BMD yöntemiyle iyi uyum gösterdiğini bildirmişlerdir.

Simar ve ark.'ları (210), 143 klinik izolatta 143 Gram negatif bakteri izolatında E-test ile elde ettikleri kolistin MİK değerlerini BMD yöntemiyle karşılaştırdıklarında %59 EU, %89 KU, 2 BH, 14 ÇBH elde etmişler ve sonuç olarak E-test ile BMD arasında yüksek oranda tutarsızlık olduğunu, kolistin duyarlılığının BMD ile test edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Sonuç olarak;

Bu çalışmada Phoenix™ M50 otomatize sistemiyle MDR saptanan ve kolistin MİK değeri ≤ 1 µg/mL olarak belirlenen, 25'er adet *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve *A. baumannii*'den oluşan toplam 100 izolatta, kolistin duyarlılığı Sensititre™ testiyle de çalışılmış ve sonuçlar BMD yöntemiyle karşılaştırılarak bu testlerin performansları araştırılmıştır.

Phoenix™ otomatize sistemiyle tüm izolatlar için kabul edilebilir KU (%96) belirlenmesine rağmen, değerlendirilen bakteri türüne göre farklılıklar gözlemlendi. *K. pneumoniae* için Phoenix™'in KU oranı (%88) kabul edilebilir değerin altındaydı. 3 *K. pneumoniae* ve 1 *A. baumannii* izolatında toplam 4 ÇBH tespit edildi. Çalışmaya Phoenix™ otomatize sisteminin kolistin MİK değerini ≤ 1 µg/ml olarak belirlediği izolatlar dahil edildiği için ÇBH oranı %100 olarak hesaplandı, BH belirlenmedi ve

kappa analizi yapılamadı. Sensititre™ testiyle tüm izolatlar için kabul edilebilir KU (%99), BH (%1,04) ve ÇBH (%0) belirlenmiş olup; EU (%69) kabul edilebilir değerin altındaydı. *A. baumannii* izolatlarında kabul edilebilir sınırın üzerinde ÇBH oranı (%4,17) saptandı. Bu çalışmada kolistin duyarlılığını belirlemede, referans BMD yöntemi ile karşılaştırılan yöntemlerden Sensititre™ testinin gösterdiği performansın Phoenix™ otomatize sisteminden daha iyi olduğu, Sensititre™ testi ile çok iyi düzeyde uyum tespit edilmesine rağmen (kappa katsayısı=0,884, $p<0,001$), iki yöntemin de kabul edilebilir antimikrobiyal duyarlılık testi performansı kriterlerini karşılamadığı gözlenmiştir. Yaptığımız bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre kolistin duyarlılığının, uygulaması zor da olsa CLSI ve EUCAST'ın ortak önerisi olan BMD ile belirlenmesi gerekmektedir.

5. KAYNAKLAR

1. Wohlleben W, Mast Y, Stegmann E, Ziemert N. Antibiotic drug discovery. Microb Biotechnol 2016; 9(766): 541–548.
2. Walsh CT, Kuhn H, Chemistry B, Pharmacology M, Wright G, Sciences B. Introduction : Antibiotic Resistance. Chem Rev 2005; 105(2): 391–393.
3. Rice LB. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. J Infect Dis 2008; 197(8): 1079–1081.
4. Van Der Bij AK, Pitout JDD. The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother 2012; 67(9): 2090–2100.
5. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nature 2015; 13: 112-117.
6. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 2012; 18(3): 268–281.
7. Zahedi A, Hossein B&, Kafil S, Bialvaei AZ, Kafil HS. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. <https://doi.org/10.1185/0300799520151018989> 2015; 31(4): 707–721.
8. Feng JY, Lee YT, Pan SW, Yang KY, Chen YM, Yen DHT, et al. Comparison of colistin-induced nephrotoxicity between two different formulations of colistin in critically ill patients: a retrospective cohort study. Antimicrob Resist Infect Control. 2021; 10(1): 1–12.
9. Redfield RR. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019; 2019: 1-6.

10. Bassetti M, Ginocchio F, Mikulska M. New treatment options against Gram-negative organisms. *Crit Care* 2011; 15(2): 1–9.
11. O'Neill J. Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations. 2014. Available from: [https://amr-review.org/sites/default/files/AMR_Review_Paper - Tackling a crisis for the health and wealth of nations_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR_Review_Paper_-_Tackling_a_crisis_for_the_health_and_wealth_of_nations_1.pdf)
12. Willyard C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature*. 2017; 543(7643): 15-20.
13. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 48(1): 1–12.
14. Schultz F, Anywar G, Tang H, Chassagne F, Lyles JT, Garbe LA, et al. Targeting ESKAPE pathogens with anti-infective medicinal plants from the Greater Mpigi region in Uganda. *Sci Reports* 2020; 10(1): 1–19.
15. Daneman N, Gruneir A, Newman A, Fischer HD, Bronskill SE, Rochon PA, et al. Antibiotic use in long-term care facilities. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(12): 2856–2863.
16. Li W, Dong K, Ren J, Qu X. A β -Lactamase-Imprinted Responsive Hydrogel for the Treatment of Antibiotic-Resistant Bacteria. *Angew Chemie Int Ed* 2016; 55(28): 8049–8053.
17. Zhu M, Tse MW, Weller J, Chen J, Blainey PC. The future of antibiotics begins with discovering new combinations. *Ann N Y Acad Sci*. 2021; 1496(1): 82–96.
18. Ordooei Javan A, Shokouhi S, Sahraei Z. A review on colistin nephrotoxicity. *Eur J Clin Pharmacol* 2015; 71(7): 801–810.
19. Vaara M. New polymyxin derivatives that display improved efficacy in animal infection models as compared to polymyxin B and colistin. *Med Res Rev* 2018 38(5): 1661–1673.

20. Galani I, Kontopidou F, Souli M, Rekatsina P, Koratzanis E, Deliolaris J, et al. Colistin susceptibility testing by Etest and disk diffusion methods. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31: 434–439.
21. Jayol A, Nordmann P, Lehours P, Poirel L, Dubois V. Comparison of methods for detection of plasmid-mediated and chromosomally encoded colistin resistance in *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24(2): 175–179.
22. Carretto E, Brovarone F, Russello G, Nardini P, El-Bouseary MM, Aboklaish AF, et al. Clinical Validation of SensiTest Colistin, a Broth Microdilution-Based Method To Evaluate Colistin MICs. *J Clin Microbiol* 2018; 56(4): e01523-17.
23. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. 2016:1.
24. Humphries RM, Green DA, Schuetz AN, Bergman Y, Lewis S, Yee R, et al. Multicenter evaluation of colistin broth disk elution and colistin agar test: A report from the clinical and laboratory standards institute. *J Clin Microbiol* 2019; 23; 57(11): e01269-19.
25. Pfennigwerth N, Kaminski A, Pfeifer Y, Simon M, Werner G, Jantsch J, et al. Evaluation of six commercial products for colistin susceptibility testing in *Enterobacterales*. *Clin Microbiol Infect* 2019; 25(11): 1385–1389.
26. Jia H, Fang R, Lin J, Tian X, Zhao Y, Chen L, et al. Evaluation of resazurin-based assay for rapid detection of polymyxin-resistant Gram-negative bacteria. *BMC Microbiol* 2020; 20(1): 7-11.
27. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21(3): 538-542.
28. Genus: *Acinetobacter*. Available from: <https://www.bacterio.net/genus/acinetobacter> Erişim Tarihi 28.12. 2021.

29. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, et al. Koneman's Color Atlas And Textbook Of Diagnostic Microbiology Türkçe Baskısı. 7. Başustaoğlu A, Us AD, (eds). Wolters Kluwer Health; 2017. 385–400.
30. Cosgaya C, Mari-Almirall M, Assche A Van, Fernández-Orth D, Mosqueda N, Telli M, et al. *Acinetobacter dijkschoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. Int J Syst Evol Microbiol 2016; 66(10): 4105–4111.
31. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, Sedo O, Brisse S, Higgins PG. *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol. 2015; 65(Pt_3): 934–942.
32. Almasaudi SB. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. Saudi J Biol Sci 2018; 25(3): 586–596.
33. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. 4th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2017. 1916–1924.
34. King LB, Swiatlo E, Swiatlo A, McDaniel LS. Serum resistance and biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. FEMS Immunol Med Microbiol 2009; 55(3): 414–421.
35. Gillespie SH, Hawkey PM. Principles and Practice of Clinical Bacteriology: Second Edition. John Wiley & Sons, 2006:233.
36. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. *Acinetobacter baumannii*: An emerging opportunistic pathogen. Virulence. 2012; 3(3): 243–249.
37. Mortensen BL, Skaar EP. Host-microbe interactions that shape the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii* infection. Cell Microbiol. 2012; 14(9): 1336–1340.

38. Wilson BA, Winkler ME, Ho BT. Bacterial Pathogenesis A Molecular Approach. 4. Washington, DC: ASM Press, 2019:265–266.
39. Ferreira D, Seca AML, Pinto DCGA, Silva AMS. Targeting human pathogenic bacteria by siderophores: A proteomics review. J Proteomics 2016; 145: 153–166.
40. Singh JK, Adams FG, Brown MH. Diversity and Function of Capsular Polysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. Front Microbiol 2019; 1: 3301.
41. McConnell MJ, Actis L, Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: Human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. FEMS Microbiol Rev 2013; 37(2): 130–155.
42. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2007; 59(6): 1210–1215.
43. Wang X, Qin L-J. A review on *Acinetobacter baumannii*. J Acute Dis 2019; 8(1): 16-20.
44. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol 2007; 5(12): 939–951.
45. Villar M, Cano ME, Gato E, Garnacho-Montero J, Cisneros JM, Alegría CR de, et al. Epidemiologic and Clinical Impact of *Acinetobacter baumannii* Colonization and Infection: A Reappraisal. Medicine (Baltimore) 2014; 93(5): 202–210.
46. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas And Bennett's Principles on Practice of Infectious Diseases. 9. Elsevier, 2020: 2718–2723.
47. Chuang Y-C, Sheng W-H, Li S-Y, Lin Y-C, Wang J-T, Chen Y-C, et al. Influence of Genospecies of *Acinetobacter baumannii* Complex on Clinical Outcomes of Patients with *Acinetobacter* Bacteremia. Clin Infect Dis 2011; 52(3): 352–360.

48. Ayobami O, Willrich N, Suwono B, Eckmanns T, Markwart R. The epidemiology of carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter* species in Europe: analysis of EARS-Net data from 2013 to 2017. *Antimicrob Resist Infect Control* 2020; 9(1): 1–10.
49. Cisneros JM, Rodriguez-Baño J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8(11): 687–693.
50. Spellberg B, Bonomo RA. The deadly impact of extreme drug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Crit Care Med* 2014; 42(5): 1289–91.
51. Garnacho-Montero J, Timsit JF. Managing *Acinetobacter baumannii* infections. *Curr Opin Infect Dis* 2019; 32(1): 69–76.
52. EUCAST. Intrinsic Resistance and Unusual Phenotypes version 3.3. 2021: 13-19.
53. Wilson BA, Winkler ME, Ho BT. *Bacterial Pathogenesis A Molecular Approach*. 4. Washington, DC: ASM Press, 2019: 565–567.
54. Lee C-R, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; 7: 55-62.
55. Organization WH. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections including tuberculosis. 2017.
56. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35(3): 219–226.
57. Lv Q, Deng Y, Zhu X, Ruan J, Chen L. Effectiveness of Cefoperazone-sulbactam alone and Combined with Tigecycline in the Treatment of Multi-drug

Resistant *Acinetobacter baumannii* Pulmonary Infection. J Coll Physicians Surg Pakistan 2020; 30(3): 332–334.

58. Gillespie SH, Hawkey PM. Principles and Practice of Clinical Bacteriology: Second Edition. John Wiley & Sons, 2006; 427–435.
59. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin Microbiol Rev 2009; 22(4): 582–610.
60. Lupo A, Haenni M, Madec J-Y. Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. Microbiol Spectr 2018; 6(3): 1-9.
61. Lalucat J, Mulet M, Gomila M, García-Valdés E. Genomics in Bacterial Taxonomy: Impact on the Genus *Pseudomonas*. Genes (Basel) 2020;11(2): 139-144.
62. Ryan KJ, Ray CG. Sherris Medical Microbiology. 6. McGraw-Hill Medical 2014. 617–623.
63. Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbiol Rev 1996; 60(3): 539-543.
64. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, et al. Koneman's Color Atlas And Textbook Of Diagnostic Microbiology Türkçe Baskısı. 7. Başustaoğlu A, Us AD, (eds). Wolters Kluwer Health, 2017: 334–343 p.
65. Huszczyński SM, Lam JS, Khursigara CM. The role of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in bacterial pathogenesis and physiology. Pathogens. 2020; 9(1):6-11.
66. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas and Bennett's principles on practice of infectious diseases. Elsevier, 2020:2688.

67. Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nat* 2002; 417(6888): 552–555.
68. Moore NM, Flaws ML. Epidemiology and Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clin Lab Sci* 2011; 24(1): 43–46.
69. Mattick JS. Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56: 289-314.
70. Hahn HP. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* - A review. *Gene* 1997; 192(1): 99–108.
71. Iiyama K, Takahashi E, Lee JM, Mon H, Morishita M, Kusakabe T, et al. Alkaline protease contributes to pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 2017; 364(7): 51-55.
72. Laarman AJ, Bardoel BW, Ruyken M, Fernie J, Milder FJ, van Strijp JAG, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease Blocks Complement Activation via the Classical and Lectin Pathways . *J Immunol* 2012; 188(1): 386–393.
73. Michalska M, Wolf P. *Pseudomonas* Exotoxin A: Optimized by evolution for effective killing. *Front Microbiol* 2015; 6: 1–7.
74. Wilson BA, Winkler ME, Ho BT. *Bacterial Pathogenesis A Molecular Approach*. 4. Washington, DC: ASM Press, 2019: 561–564.
75. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi*. 4th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2017. 1896–1910 p.
76. Hall S, McDermott C, Anoopkumar-Dukie S, McFarland AJ, Forbes A, Perkins A V., et al. Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins (Basel)* 2016; 8(8): 1–14.

77. Anantharajah A, Mingeot-Leclercq MP, Van Bambeke F. Targeting the Type Three Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*. Trends Pharmacol Sci 2016; 37(9): 734–749.
78. Sawa T, Wiener-Kronish JP. A therapeutic strategy against the shared virulence mechanism utilized by both *Yersinia pestis* and *Pseudomonas aeruginosa*. Anesthesiol Clin North Am 2004; 22(3): 591-606.
79. Malhotra S, Hayes D, Wozniak DJ. Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: the Host-Microbe Interface. Clin Microbiol Rev 2019; 32(3): e00138-18.
80. Cornelis P, Dingemans J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. Front Cell Infect Microbiol 2013; 4: 1–7.
81. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Int J Mol Sci 2020; 21(22): 1–25.
82. Donabedian H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. J Infect 2003; 46(4): 207–214.
83. Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen–Host Interactions in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2005; 171(11): 1209–23.
84. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. Front Cell Infect Microbiol 2017; 7: 39-44.
85. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. Int J Mol Sci 2021; 22(6): 1–37.
86. Golemi-Kotra D. *Pseudomonas* Infections. xPharm Compr Pharmacol Ref 2008; 1–8.

87. Tsay T Bin, Jiang YZ, Hsu CM, Chen LW. *Pseudomonas aeruginosa* colonization enhances ventilator-associated pneumonia-induced lung injury. *Respir Res* 2016; 17(1): 101-109.
88. Qi X, Qu H, Yang D, Zhou L, He YW, Yu Y, et al. Lower respiratory tract microbial composition was diversified in *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia patients. *Respir Res* 2018; 19(1): 139-142.
89. Alonso B, Fernández-Barat L, Di Domenico EG, Marín M, Cercenado E, Merino I, et al. Characterization of the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strains causing ventilator-associated pneumonia. *BMC Infect Dis* 2020; 20(1): 909-912.
90. LiPuma JJ. The Changing Microbial Epidemiology in Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(2): 299-304.
91. Hancock REW, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat* 2000; 3(4): 247–255.
92. Breidenstein EBM, de la Fuente-Núñez C, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance. *Trends Microbiol* 2011; 19(8): 419–426.
93. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect* 2003; 5(13): 1213–1219.
94. O'Donnell, JN, Bidell, MR, Lodise TP. Approach to the Treatment of Patients with Serious Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther* 2020; 40(9): 952–69.
95. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Drugs* 2007; 67(3): 351–368.

96. Pachori P, Gothwal R, Gandhi P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes Dis* 2019; 6(2): 109–119.
97. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas And Bennett's Principles on Practice of Infectious Diseases. 9. Elsevier, 2020: 2673–2679.
98. Gillespie SH, Hawkey PM. Principles and Practice of Clinical Bacteriology: Second Edition. John Wiley & Sons, 2006; 347–348.
99. Blount ZD. The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife* 2015; 4: e05826.
100. Pontrelli S, Chiu TY, Lan EI, Chen FYH, Chang P, Liao JC. *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering. *Metab Eng*. 2018; 50: 16–46.
101. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. 4th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2017. 1861–1870.
102. Omerovic M, Müştak HK, Kaya İB. *Escherichia coli* Patotiplerinin Virülens Faktörleri. *Etlik Vet Mikrobiyoloji Derg* 2017; 28(1): 1–6.
103. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, et al. Koneman's Color Atlas And Textbook Of Diagnostic Microbiology Türkçe Baskısı. 7. Başustaoğlu A, Us AD, (eds). Wolters Kluwer Health; 2017: 235–254.
104. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas and Bennett's principles on practice of infectious diseases. Elsevier; 2020: 2669.
105. Ryan KJ, Ray CG. Sherris Medical Microbiology. McGraw-Hill Medical, 2014: 583–594.
106. Johnson JR, Russo TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: The other bad *E. coli*. *J Lab Clin Med* 2002; 139(3): 155–162.
107. Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* 2012; 3(2): 71–87.

- 108.** Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998; 11(1): 142–201.
- 109.** Galindo-Méndez M. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. In: E coli Infections - Importance of Early Diagnosis and Efficient Treatment Intech Open, 2020: 20.
- 110.** Breland EJ, Eberly AR, Hadjifrangiskou M. An overview of two-component signal transduction systems implicated in extra-intestinal pathogenic *E. coli* infections. Front Cell Infect Microbiol 2017; 7: 1–14.
- 111.** Mora-Rillo M, Fernández-Romero N, Navarro-San Francisco C, Díez-Sebastian J, Romero-Gómez MP, Fernández FA, et al. Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia. Virulence 2015; 6(1): 93–100.
- 112.** Wilson BA, Winkler ME, Ho BT. Bacterial Pathogenesis A Molecular Approach. 4. Washington: ASM Press, 2019. 550–553.
- 113.** Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2004; 2(2): 123–140.
- 114.** Hart CA, Batt RM, Saunders JR. Diarrhoea caused by *Escherichia coli*. 2016; 13(2): 121–131.
- 115.** Weintraub A. Enteraggregative *Escherichia coli*: Epidemiology, virulence and detection. J Med Microbiol 2007; 56(1): 4–8.
- 116.** Clarke SC. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* - An emerging problem? Diagn Microbiol Infect Dis 2001; 41(3): 93–98.
- 117.** Donnenberg MS. *Escherichia coli* Pathotypes and Principles of Pathogenesis. Elsevier; 2013: 331–334.
- 118.** Karmali MA. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1989; 2(1): 15–19.

119. Raffaelli RM, Paladini M, Hanson H, Kornstein L, Agasan A, Slavinski S, et al. Child care-associated outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 and hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 2007; 26(10): 951–953.
120. Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol*. 2010; 140(3–4): 360–370.
121. Von Baum H, Marre R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *Int J Med Microbiol* 2005; 295(6–7): 503–511.
122. Paitan Y. Current Trends in Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol* 2018; 416: 181–211.
123. Robins-Browne RM, Hartland EL. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17(4): 467–475.
124. Pitout JDD. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: An update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; 10(10): 1165–1176.
125. Park SY, Kang CI, Wi YM, Chung DR, Peck KR, Lee NY, et al. Risk factors and molecular epidemiology of community-onset, multidrug resistance extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* infections. *Korean J Intern Med* 2017; 32(1): 146.
126. Liao W, Lin J, Jia H, Zhou C, Zhang Y, Lin Y, et al. Resistance and Heteroresistance to Colistin in *Escherichia coli* Isolates from Wenzhou, China. *Infect Drug Resist* 2020; 13: 3551–3561.
127. Ghafourian SI, Sekawi ZI, Neela III V, Khosravi AI, Rahbar M V, Sadeghifard NI, et al. Incidence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in patients with urinary tract infection. *Sao Paulo Med J* 2012; 130(1): 37–43.

128. Van Aken S, Lund N, Ahl J, Odenholt I, Tham J. Risk factors, outcome and impact of empirical antimicrobial treatment in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* bacteraemia. 2014; 46(11): 753–762.
129. Fournier D, Chirouze C, Leroy J, Cholley P, Talon D, Plésiat P, et al. Alternatives to carbapenems in ESBL-producing *Escherichia coli* infections. Médecine Mal Infect 2013; 43(2): 62–66.
130. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, et al. Koneman's Color Atlas And Textbook Of Diagnostic Microbiology Türkçe Baskısı. 7. Başustaoğlu A, Us AD, editors. Wolters Kluwer Health, 2017: 269–272.
131. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front Cell Infect Microbiol 2018; 8: 4-8.
132. Gillespie SH, Hawkey PM. Principles and Practice of Clinical Bacteriology Second Edition. John Wiley & Sons, 2006. 377–381.
133. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. Clin Microbiol Rev 1998; 11(4): 589-592.
134. Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. Microbiol Spectr 2016; 4(1): 93-97.
135. Wilson BA, Winkler ME, Ho BT. Bacterial Pathogenesis A Molecular Approach. 4. Washington, DC: ASM Press, 2019. 554–555.
136. Zhu J, Wang T, Chen L, Du H. Virulence Factors in Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Front Microbiol 2021; 1: 734-750.
137. Holden VI, Breen P, Houle S, Dozois CM, Bachman MA. *Klebsiella pneumoniae* Siderophores Induce Inflammation, Bacterial Dissemination, and HIF-1 α Stabilization during Pneumonia. MBio 2016;7(5): e01397.

138. Murphy CN, Mortensen MS, Krogfelt KA, Clegg S. 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. *Infect Immun* 2013; 81(8): 3009.
139. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. 4th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2017. 1870–1872 p.
140. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas And Bennett's Principles on Practice of Infectious Diseases. 9. Elsevier, 2020: 2680–2681.
141. Skowska A, Gospodarek E, Kusza K. The prevalence of infections and colonisation with *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in ICU patients. *Anaesthesiol Intensive Ther* 2014; 46(4): 280–283.
142. Ryan KJ, Ray CG. Sherris Medical Microbiology. 6. McGraw-Hill Medical, 2014. 606–607.
143. Han Phang S, Greysson-Wong J, Somayaji R, Storey DG, Rabin HR, Surette MG, et al. Incidence, impact and natural history of *Klebsiella* species infections in cystic fibrosis: A longitudinal single center study. *Can J Respir Crit Care, SleepMedicine* 2019; 3: 148–154.
144. Varghese A, George S, Gopalakrishnan R, Mathew A. Antibiotic Susceptibility Pattern of *Klebsiella Pneumoniae* Isolated From Cases of Urinary Tract Infection in a Tertiary Care Setup. *J Evol Med Dent Sci* 2016; 5(29): 1470–1474.
145. Foysal MJ, Khan Majlish AN, Islam K, Alam MJ, Ali MH, Momtaz F. Targeting of Virulence Factors and Plasmid Profiling of *Klebsiella pneumoniae* Causing Urinary Tract Infection in Sylhet City of Bangladesh. *Brazilian Arch Biol Technol* 2018; 61: 11-16.
146. Tseng CP, Wu HS, Wu TH, Lin YT, Fung CP. Clinical characteristics and outcome of patients with community-onset *Klebsiella pneumoniae* bacteremia requiring intensive care. *J Microbiol Immunol Infect* 2013; 46(3): 217–223.

147. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. Int J Environ Res Public Health 2020; 17(17): 1–17.
148. Gupta A, Ampofo K, Rubenstein D, Saiman L. Extended Spectrum β Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* Infections: a Review of the Literature. J Perinatol 2003; 23(6): 439–43.
149. Wu D, Cai J, Liu J. Risk factors for the acquisition of nosocomial infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. South Med J 2011; 104(2): 106–110.
150. Liu P, Li X, Luo M, Xu X, Su K, Chen S, et al. Risk Factors for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection: A Meta-Analysis. Microb Drug Resist 2018; 24(2): 190-196.
151. Chen X, Liu Q, Liu WE, Yan Q. Risk Factors for Subsequential Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Infection Among Rectal Carriers with Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. Infect Drug Resist 2020; 13: 1299-1305.
152. Yang D, Xie Z, Xin X, Xue W, Zhang M. A model for predicting nosocomial carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. Biomed Reports 2016; 5(4): 501-510.
153. Gaibani P, Ambretti S, Viale PL, Re MC. In vitro synergistic activity of meropenem/vaborbactam in combination with ceftazidime/avibactam against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 2019; 74(5): 1457–759.
154. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas And Bennett's Principles on Practice of Infectious Diseases. 9. Elsevier; 2020. 225–228 p.
155. Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, Schwartz D, Leavitt A, Carmeli Y. Predictors of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*

Acquisition among Hospitalized Adults and Effect of Acquisition on Mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(3): 1028-1032.

156. Hayden DA, White BP, Bennett KK. Review of Ceftazidime-Avibactam, Meropenem-Vaborbactam, and Imipenem/Cilastatin-Relebactam to Target *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Enterobacterales*. *J Pharm Technol* 2020; 36(5): 202–210.
157. Chiotos K, Han JH, Tamma PD. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections in Children. *Curr Infect Dis Rep* 2016; 18(1): 2-6.
158. Bengoechea JA, Sa Pessoa J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiol Rev* 2019; 43(2): 123-127.
159. Athans V, Neuner EA, Hassouna H, Richter SS, Keller G, Castanheira M, et al. Meropenem-Vaborbactam as Salvage Therapy for Ceftazidime-Avibactam-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia and Abscess in a Liver Transplant Recipient. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; 63(1). e01551-18.
160. Falagas ME, Kasiakou SK, Saravolatz LD. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clin Infect Dis* 2005; 40(9): 1333–1341.
161. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis*. 2006; 6(9): 589–601.
162. Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25(1): 11–25.
163. Boisson M, Gregoire N, Couet W, Mimoz O. Colistin in critically ill patients. *Minerva Anesthesiol*. 2013; 79(2): 200–208.
164. Karvanen M. Optimization of Colistin Dosage in the Treatment of Multiresistant Gram-negative Infections. 2013.

- 165.** Lim LM, Ly N, Anderson D, Yang JC, Macander L, Jarkowski A, et al. Resurgence of Colistin: A Review of Resistance, Toxicity, Pharmacodynamics, and Dosing. *Pharmacotherapy* 2010; 30(12): 1279-1282.
- 166.** Deris ZZ, Akter J, Sivanesan S, Roberts KD, Thompson PE, Nation RL, et al. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *J Antibiot (Tokyo)* 2014; 67(2): 147-152.
- 167.** Michalopoulos AS, Falagas ME. Colistin: recent data on pharmacodynamics properties and clinical efficacy in critically ill patients. *Ann Intensive Care* 2011; 1(1): 30-34.
- 168.** Bergen PJ, Li J, Rayner CR, Nation RL. Colistin Methanesulfonate Is an Inactive Prodrug of Colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(6): 1953-1956.
- 169.** Falagas ME, Kasiakou SK, Michalopoulos A. Treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* pneumonia. *J Cyst Fibros* 2005; 4(2): 149–150.
- 170.** Markou N, Apostolakis H, Koumoudiou C, Athanasiou M, Koutsoukou A, Alamanos I, et al. Intravenous colistin in the treatment of sepsis from multiresistant Gram-negative bacilli in critically ill patients. *Crit Care* 2003; 7(5): 78-86.
- 171.** Biswas S, Brunel JM, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Rolain JM. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; 10(8): 917-934.
- 172.** Wagenlehner F, Lucenteforte E, Pea F, Soriano A, Tavošchi L, Steele VR, et al. Systematic review on estimated rates of nephrotoxicity and neurotoxicity in patients treated with polymyxins. *Clin Microbiol Infect* 2021; 27(5): 671–686.

173. Jafari F, Elyasi S. Prevention of colistin induced nephrotoxicity: a review of preclinical and clinical data. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2021; 14(9): 1113–1131.
174. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas And Bennett's Principles on Practice of Infectious Diseases. Elsevier, 2020: 405–409.
175. Rodríguez-Santiago J, Cornejo-Juárez P, Silva-Sánchez J, Garza-Ramos U. Polymyxin resistance in *Enterobacterales*: overview and epidemiology in the Americas. *Int J Antimicrob Agents* 2021; 58(5): 106426.
176. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev* 2017; 30(2): 557.
177. ISO - ISO 20776-1: 2019 - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. <https://www.iso.org/standard/70464.html> Erişim Tarihi: 21.02.2022
178. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 12.0 2022. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf. Erişim Tarihi: 21.02.2022
179. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaiou DK. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist Updat*. 2010; 13(4–5): 132–138.
180. Mlynarcik P, Kolar M. Molecular mechanisms of polymyxin resistance and detection of *mcr* genes. *Biomed Pap* 2019; 163(1): 28–38.

181. UŞHİESA. Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı Özet Raporu 2021.
182. Bakthavatchalam YD, Pragasam AK, Biswas I, Veeraraghavan B. Polymyxin susceptibility testing, interpretative breakpoints and resistance mechanisms: An update. *J Glob Antimicrob Resist* 2018; 12: 124–136.
183. Baron S, Hadjadj L, Rolain JM, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *Int J Antimicrob Agents* 2016; 48(6): 583–591.
184. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol* 2014; 5: 643-648.
185. Srinivas P, Rivard K. Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. *Curr Infect Dis Rep* 2017; 19(11): 1–9.
186. Mmatli M, Mbelle NM, Maningi NE, Osei Sekyere J. Emerging Transcriptional and Genomic Mechanisms Mediating Carbapenem and Polymyxin Resistance in *Enterobacteriaceae* : a Systematic Review of Current Reports. *mSystems* 2020; 22; 5(6): 112-117.
187. Mohapatra SS, Dwibedy SK, Padhy I. Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions. *J Biosci* 2021; 46(3): 1–18.
188. Jeannot K, Bolard A, Plésiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents* 2017; 49(5): 526–535.
189. Huang J, Li C, Song J, Velkov T, Wang L, Zhu Y, et al. Regulating polymyxin resistance in Gram-negative bacteria: Roles of two-component systems PhoPQ and PmrAB. *Future Microbiol* 2020; 15(6): 445–459.
190. Girardello R, Visconde M, Cayô R, Figueiredo RCBQ de, Mori MA da S, Lincopan N, et al. Diversity of polymyxin resistance mechanisms among

Acinetobacter baumannii clinical isolates. Diagn Microbiol Infect Dis 2017; 87(1): 37–44.

191. Moubareck CA. Polymyxins and Bacterial Membranes: A Review of Antibacterial Activity and Mechanisms of Resistance. Membr 2020, Vol 10, Page 181 2020 Aug 8 [cited 2022 Mar 10]; 10(8): 181-186.
192. Humphrey M, Larrouy-Maumus GJ, Furniss RCD, Mavridou DAI, Sabnis A, Edwards AM. Colistin resistance in *Escherichia coli* confers protection of the cytoplasmic but not outer membrane from the polymyxin antibiotic. Microbiol (United Kingdom). 2021; 167(11): 1104-1108.
193. Hamel M, Rolain JM, Baron SA. The history of colistin resistance mechanisms in bacteria: Progress and challenges. Microorganisms 2021; 9(2): 1–18.
194. El-Halfawy OM, Valvano MA. Antimicrobial Heteroresistance: an Emerging Field in Need of Clarity. Clin Microbiol Rev 2015; 28(1): 191-196.
195. Hawley JS, Murray CK, Jorgensen JH. Colistin Heteroresistance in *Acinetobacter* and Its Association with Previous Colistin Therapy. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(1): 351-356.
196. Andersson DI, Nicoloff H, Hjort K. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance. Nat Rev Microbiol 2019; 17(8): 479–96.
197. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 10.0 Eucast Bacteria. 2020: 0–112.
198. ISO - ISO 20776-2: 2007 - Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 2: Evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. <https://www.iso.org/standard/41631.html> Erişim Tarihi 22.02.2022

- 199.** FDA, U.S Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Devices and Radiological Health. Guidance for Industry and FDA. Class II Special Controls Guidance Document: Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems. 2009; 1–42. <https://www.fda.gov/medical-devices/guidance-documents-medical-devices-and-radiation-emitting-products/antimicrobial-susceptibility-test-ast-systems-class-ii-special-controls-guidance-industry-and-fda>. Erişim Tarihi 22.02.2022
- 200.** Alpar R. Uygulamalı İstatistik ve Geçerlilik-Güvenilirlik. 5. Baskı. Ankara: Detay Yayıncılık; 2018: 572–574.
- 201.** Falagas ME, Rafailidis PI, Ioannidou E, Alexiou VG, Matthaiou DK, Karageorgopoulos DE, et al. Colistin therapy for microbiologically documented multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: a retrospective cohort study of 258 patients. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 35(2): 194–199.
- 202.** Simner PJ, Bergman Y, Trejo M, Roberts AA, Marayan R, Tekle T, et al. Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test To Bacilli. *J Clin Microbiol* 2019; 57(2): 1–7.
- 203.** Chew KL, La M Van, Lin RTP, Teo JWP. Colistin and Polymyxin B Susceptibility Testing for Carbapenem-Resistant and *mcr*-Positive *Enterobacteriaceae*: Comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with Broth Microdilution. *J Clin Microbiol* 2017; 55(9): 2609–2616.
- 204.** Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, Hadjichristodoulou C, Gennimata V, Pournaras S, et al. Comparative evaluation of colistin susceptibility testing methods among carbapenem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(8): 4625–4630.
- 205.** Javed M, Ueltzhoeffer V, Heinrich M, Siegrist HJ, Wildermuth R, Lorenz FR, et al. Colistin susceptibility test evaluation of multiple-resistance-level *Pseudomonas aeruginosa* isolates generated in a morbidostat device. *J Antimicrob Chemother*. 2018; 73(12): 3368–3374.

206. Matuschek E, Åhman J, Webster C, Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin – evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. Clin Microbiol Infect 2018; 24(8): 865–870.
207. Yusuf E, Van Westreenen M, Goessens W, Croughs P. The accuracy of four commercial broth microdilution tests in the determination of the minimum inhibitory concentration of colistin. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2020; 19(1): 1–8.
208. Antimicrobial susceptibility testing of colistin - problems detected with several commercially available products. 2016: 2. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Warnings/Warnings_docs/Warning_-_colistin_AST.pdf Erişim Tarihi 22.02.2022
209. Nhung PH, Miyoshi-Akiyama T, Phuong DM, Shimada K, Anh NQ, Binh NG, et al. Evaluation of the Etest method for detecting colistin susceptibility of multidrug-resistant Gram-negative isolates in Vietnam. J Infect Chemother 2015; 21(8): 617–619.
210. Simar S, Sibley D, Ashcraft D, Pankey G. Colistin and Polymyxin B Minimal Inhibitory Concentrations Determined by Etest Found Unreliable for Gram-Negative Bacilli. Ochsner J 2017; 17(3): 239–242.
211. Vourli S, Dafopoulou K, Vrioni G, Tsakris A, Pournaras S. Evaluation of two automated systems for colistin susceptibility testing of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. J Antimicrob Chemother 2017; 72(9): 2528–2530.
212. Bakthavatchalam YD, Veeraraghavan B, Shankar A, Thukaram B, Krishnan DN. Evaluation of colistin and polymyxin B susceptibility testing methods in *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii*. J Infect Dev Ctries 2018; 12(6): 504–507.

213. Haeili M, Kafshdouz M, Pishnian Z, Feizabadi MM, Martinez-Martinez L. Comparison of susceptibility testing methods for determining the activity of colistin against Gram-negative bacilli of clinical origin. *J Med Microbiol* 2019; 68(1): 60–66.
214. Germ J, Poirel L, Kisek TC, Spik VC, Seme K, Premru MM, et al. Evaluation of resazurin-based rapid test to detect colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019; 38(11): 2159–2162.
215. Wattal C, Goel N, Oberoi JK, Datta S, Raveendran R. Performance of Three Commercial Assays for Colistin Susceptibility in Clinical Isolates and *Mcr-1* Carrying Reference Strain. *Indian J Med Microbiol* 2019; 37(4): 488–495.
216. Lellouche J, Schwartz D, Elmalech N, Ben Dalak MA, Temkin E, Paul M, et al. Combining VITEK® 2 with colistin agar dilution screening assist timely reporting of colistin susceptibility. *Clin Microbiol Infect* 2019; 25(6): 711–716.
217. Koyuncu Özyurt Ö, Özhak B, Ögünç D, Yıldız E, Çolak D, Günseren F, et al. Evaluation of the BD Phoenix100 System and Colistin Broth Disk Elution Method for Antimicrobial Susceptibility Testing of Colistin against Gram-negative Bacteria. *Mikrobiyol Bul* 2019; 53(3): 254–261.
218. Duman Y, Tekerekoğlu MS. Yoğun Bakım Ünitelerinde İzole Edilen *Acinetobacter Baumannii* İzolatlarının Kolistin MİK Değerlerinin ve Direnç Genlerinin İrdelenmesi. *Türk Yoğun Bakım Derg.* 2021; 71–75.
219. Uğraklı S, Doğan M. Comparative Evaluation of Vitek 2 and Etest Methods with the Reference Broth Microdilution for Antimicrobial Susceptibility Testing of Colistin Among Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacteria. *Flora J Infect Dis Clin Microbiol* 2021; 26(3): 518–527.
220. Kar P, Behera B, Mohanty S, Jena J, Mahapatra A. Detection of Colistin Resistance in Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae* by Reference Broth Microdilution and Comparative Evaluation of Three Other Methods. *J Lab Physicians* 2021; 13(03): 263–269.

221. Shabban M, Fahim NAE, Montasser K, Abo El Magd NM. Resistance to colistin mediated by *mcr-I* among multidrug resistant Gram negative pathogens at a tertiary care hospital, Egypt. J Pure Appl Microbiol 2020; 14(2): 1125–1132.
222. Tüzemen NÜ, Efe K, Akalın H, Özakın C. Otomatize Sistemde Kolistin Direnci Saptanan İzolatların Gradyan Difüzyon Yöntemi ve Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemiyle Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi. Klimik Derg 2019; 32(1): 57–61.
223. Jayol A, Nordmann P, André C, Poirel L, Dubois V. Evaluation of three broth microdilution systems to determine colistin susceptibility of Gram-negative bacilli. J Antimicrob Chemother 2018; 73(5): 1272–1278.
224. Kansak N, Aslan M, Adaleti R, Aksaray S. *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Sıvı Mikrodilüsyon Temelli İki Ticari Sistemin Referans Mikrodilüsyon Yöntemine Göre Değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2021; 54(4): 606–612.
225. Giani T, Morosini MI, D’Andrea MM, García-Castillo M, Rossolini GM, Cantón R. Assessment of the Phoenix™ automated system and EUCAST breakpoints for antimicrobial susceptibility testing against isolates expressing clinically relevant resistance mechanisms. Clin Microbiol Infect. 2012; 18(11): 452–458.
226. Malli E, Florou Z, Tsilipounidaki K, Voulgaridi I, Stefos A, Xitsas S, et al. Evaluation of rapid polymyxin NP test to detect colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated in a tertiary Greek hospital. J Microbiol Methods 2018; 153: 35–39.
227. Zhu Y, Jia P, Zhou M, Zhang J, Zhang G, Kang W, et al. Evaluation of the Clinical Systems for Polymyxin Susceptibility Testing of Clinical Gram-Negative Bacteria in China. Front Microbiol 2021; 11: 1–7.
228. Galani I, Adamou P, Karaiskos I, Giamarellou H, Souli M. Evaluation of ComASP™ Colistin (formerly SensiTest™ Colistin), a commercial broth

- microdilution-based method to evaluate the colistin minimum inhibitory concentration for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. J Glob Antimicrob Resist 2018; 15: 123–126.
- 229.** Lescat M, Poirel L, Tinguely C, Nordmann P. A Resazurin Reduction-Based Assay for Rapid Detection of Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol. 2019; 57(3): 1–6.
- 230.** Lutgring JD, Kim A, Campbell D, Karlsson M, Brown AC, Burd EM. Evaluation of the MicroScan Colistin Well and Gradient Diffusion Strips for Colistin Susceptibility Testing in *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol 2019; 57(5): 1–7.
- 231.** Arroyo LA, García-Curiel A, Pachón-Ibañez ME, Llanos AC, Ruiz M, Pachón J, et al. Reliability of the E-test method for detection of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 2005; 43(2): 903–905.
- 232.** Das S, Roy S, Roy S, Goelv G, Sinha S, Mathur P, et al. Colistin susceptibility testing of Gram-negative bacilli: Better performance of vitek2 system than E-test compared to broth microdilution method as the gold standard test. Indian J Med Microbiol 2020; 38(1): 58–65.