



T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***ESCHERICHIA COLI, KLEBSIELLA PNEUMONIAE,
PSEUDOMONAS AERUGINOSA VE
ACINETOBACTER BAUMANNII KLİNİK İZOLATLARINDA
KOLİSTİN DİRENCİ SAPTANMASINDA BD PHOENİX
YARI OTOMATİZE SİSTEM VE SIVI MİKRODİLÜSYON
YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI***

DR. SALİM YAKUT

TIPTA UZMANLIK TEZİ

PROF. DR. KADRI GÜL

DİYARBAKIR 2019

ÖNSÖZ

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DÜBAP) tarafından **TİP.19.001** numaralı proje ile desteklenmiştir.

Kasım, 2019

Salim YAKUT



ÖZET

Giriş-Amaç: Çoklu ilaç dirençli (ÇİD) bakteriyel enfeksiyonlarda kolistin kullanımına duyulan ihtiyaç arttıkça kolistin duyarlılık testleri de önem kazanmıştır. Bu çalışma ile çoklu ilaç dirençli *A.baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında otomatize sistem ile saptanan kolistin minimal inhibitör konsantrasyon değerlerinin (MİK) sıvı mikrodilüsyon (SMD) ile saptanan MİK değerleriyle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç-Yöntem: Çalışmaya Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden üreyen *A. baumannii* (92 izolat), *K. pneumoniae* (68 izolat), *P. aeruginosa* (55 izolat) ve *E. coli* (21 izolat) izolatı dahil edilmiştir. İzolatların antimikrobiyal duyarlılık testleri (ADT) , idrar ve diğer örnekler için sırasıyla Phoenix UNMIC-401/ ID Paneli ve NMİC-400/ID panelleri kullanılarak BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, A.B.D) otomatize sistemi sistemi ve SMD yöntemi ile çalışılmıştır. SMD yöntemi referans kabul edilerek Phoenix 100 otomatize sistemin kolistin duyarlılığını saptama durumu karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen 236 izolatın 65'i trakeal aspirat, 64'ü idrar, 51'i kan, 44'ü yara, 4'ü apse, 4'ü dren, 4'ü de plevra örneklerinden izole edilmiştir. Toplam 236 izolatın 36'sında (%15.3) kolistine direnç saptanmıştır. *A. baumannii*, *K. pneumoniae* , *P. aeruginosa* ve *E. coli* izolatlarında sırasıyla %15.2, %20.6, %5.5 ve %23.8 oranında kolistine direnç saptanmıştır. Phoenix 100 sisteminin çok büyük hata (ÇBH) oranı %75); büyük hata (BH) oranı %0.5 bulunmuştur.

Sonuç: Çoklu ilaç dirençli bakteriyel enfeksiyonlarda kolistin direnç testlerinin sonuçları uygun antibiyoterapi için çok önemlidir. Phoenix 100 sisteminin kolistine dirençli izolatları saptayamadığı görülmüştür. Yeni geliştirilecek testlerin veya otomatize sistemlerdeki modifikasyonların duyarlılıklarının saptanmasında sıvı mikrodilüsyon test sonuçları referans alınmalıdır.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, Kolistin, Phoenix 100, sıvı mikrodilüsyon

ABSTRACT

Objective-Aim: Colistin susceptibility tests have gained importance as the need for colistin use increases in multidrug-resistant (MDR) bacterial infections. The aim of this study was to compare the minimal inhibitor concentration (MIC) of colistin detected by automated system with MICs determined by broth microdilution (BMD) in multidrug resistant *A.baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *E. coli* isolates.

Materials and Methods: *A. baumannii* (92 isolates), *K. pneumoniae* (68 isolates), *P. aeruginosa* (55 isolates) and *E. coli* (21 isolates) strains which were isolated from clinical specimen sent to Dicle University Hospitals microbiology laboratory were included in the study. Antimicrobial susceptibility tests (AST) of the isolates were studied with the BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, USA) automated system by using the Phoenix UNMIC-401 / ID Panel and NMIC-400 / ID panels, for urine and other samples, respectively. The isolates were also studied by BMD method which was taken as the reference method. Colistin sensitivities of Phoenix 100 system were compared with those obtained with BMD system.

Results: Of the 236 isolates included in the study, 65 were isolated from tracheal aspirate, 64 from urine, 51 from blood, 44 from wounds, 4 from abscess, 4 from drains, and 4 from pleural samples. Colistin resistance was found in 36 (15.3%) of 236 isolates. 15.2%, 20.6%, 5.5% and 23.8% colistin resistance were determined in *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *E. coli* isolates, respectively. The Phoenix 100 system has a very major error (VME) rate of 75%; the major error (ME) rate was 0.5%.

Conclusion: The results of colistin susceptibility tests in MDR bacterial infections are very important for appropriate antibiotherapy. The Phoenix 100 system was found to be unable to detect colistin-resistant isolates. SMD results should be referenced to determine the sensitivity of newly developed tests or modifications to automated systems.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, Colistin, Phoenix 100, broth microdilution

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kolistin.....	3
2.1.1. Kolistinin kimyasal yapısı	3
2.1.2. Kolistinin etki mekanizması	4
2.1.3. Kolistinin etki spektrumu	5
2.1.4. Kolistine karşı direnç mekanizmaları.....	5
2.1.5. Kolistin duyarlılık testleri	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	8
3.1. Bakteri İzolatlarının Toplanması	8
3.2. Klinik Örneklerin Kültür İşlemleri	8
3.3. Bakteri İzolatlarının Tanımlanması	9
3.5. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi (ADT).....	10
3.5.1. Phoenix 100 otomatize sistemi ile ADT	10
3.5.2. Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle ADT	10
4. BULGULAR.....	12
5. TARTIŞMA	18
6. KAYNAKLAR	23

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC :	American Type Culture Collection
BH	Büyük hata; referans yöntemle duyarlı izolatu dirençli saptama
BMD	Broth microdilution
CFU/ml :	Colony Forming Unit/mililitre
CLSI :	Clinical and Laboratory Standards Institute
C _{max}	İlk antibiyotik dozu sonrası hasta serumunda bulunan en yüksek ilaç konsantrasyonu
CMS	Colistimetat sodyum
ÇBH	Çok büyük hata; referans yöntemle dirençli olanı duyarlı saptama
ÇİD :	Çoklu İlaç Dirençli
EMB :	Eosin Metilen Blue
EUCAST :	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GSBL :	Geniş Spektrumlu Beta-Laktamaz
KAMHB :	Kasyon Ayarlı Mueller Hinton Broth
KKA	Koyun kanlı agar
LPS :	Lipopolisakkarid
MDR:	Multi Drug Rezistan
MIC	Minimum Inhibitor cConcentration
MİK :	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
SMD	Sıvı mikrodilüsyon
ÜK :	Üreme Kontrol
VME	Very Major Error (Çok Büyük Hata)

ŞEKİLLER VE TABLOLAR

Şekil 1. Polimiksinlerin kimyasal yapısı A: Polimiksin B, B: Kolistin (Polimiksin E).....	3
Tablo 1. Çalışmaya dahil edilen izolatların elde edildiği klinik örnek sayıları.....	13
Tablo 2. Otomatize sistem ve sıvı mikrodilüsyon ile kolistin MİK değerleri belirlenen <i>A. baumannii</i> izolat sayıları.....	14
Tablo 3. Otomatize sistem ve sıvı mikrodilüsyon ile kolistin MİK değerleri belirlenen <i>K. pneumoniae</i> izolat sayıları.....	15
Tablo 4. Otomatize sistem ve sıvı mikrodilüsyon ile kolistin MİK değerleri belirlenen <i>P.aeruginosa</i> izolat sayıları.....	15
Tablo 5. Otomatize sistem ve sıvı mikrodilüsyon ile kolistin MİK değerleri belirlenen <i>E.coli</i> izolat sayıları.....	16
Tablo 6. Ki-kare testi ile tüm izolatların duyarlılık durumunun otomatize sistem ve SMD ile karşılaştırılması.....	17

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Polimiksin grubu bir antibiyotik olan kolistin 1940'lı yıllarda sentezlenmiş, kullanımı 1970'lere kadar devam etmiştir. Yaklaşık otuz farklı polimiksin bileşiklerinden Polimiksin B ve Polimiksin E (kolistin) benzer yapıda olup klinik olarak kullanılmaktadır(1). Polimiksin E, diğer adıyla kolistin 1200 Da ağırlığında olup hidrofilik yapıdaki polikasyonik peptid zincirine hidrofobik yapıda yağ asid kuyruğunun eklenmesiyle sentezlenmiştir(2). Ciddi nefrotoksik ve nörotoksik etkilerinden dolayı 1970'li yıllardan sonra kolistinin parenteral kullanımı giderek azalmıştır. Gram negatif bakterilerde aminoglikozid, ardından karbapenem gruplarına karşı direnç gelişmesi 2000'li yıllarda kolistinin yeniden parenteral kullanıma girmesine yol açmıştır(3,4).

Antibiyotiklerin kullanılmaya başlanmasından kısa bir süre sonra bakterilerde kullanılan antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları devreye girmiştir. Penisiline karşı penisilin bağlayan proteinlerde değişiklikler, beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı beta-laktamaz enzimleri bu direnç mekanizmalarına örnektir. Antibiyotiklerin gerekli-gereksiz kullanımı, klinisyenlerin dar spektrumlu antibiyotikler yerine geniş spektrumlu antibiyotikleri tercih etmeleri gibi yanlış antibiyotik kullanım politikaları sonucunda son dekatların en gözde antibiyotikleri olan karbapenemlere direnç geliştiren Gram negatif bakterilerde ciddi artışlar gözlenmektedir. Bu durum karbapenem dirençli bakterilerin tedavisinde kolistin kullanılmasını veya kombinasyon tedavilerine kolistin eklenmesini kaçınılmaz hale getirmiştir.

Başta çoklu ilaç dirençli (ÇİD) *Acinetobacter baumannii* olmak üzere, karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacterales* takımı üyelerinde kolistin kullanımına duyulan ihtiyaç arttıkça kolistin duyarlılık testleri de önem kazanmıştır. Çoklu ilaca dirençli bu bakteri gruplarında yeni direnç mekanizmalarının kazanılması da kolay olmakta, bu nedenle oluşturdıkları enfeksiyonların tedavisi zorlaşmaktadır.

Gerek *Acinetobacter* türleri gerekse diğer dirençli bakteri türlerinde kolistinin antimikrobiyal etkinliğini test etmek için disk difüzyon, gradient test, agar dilüsyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemlerinin karşılaştırıldığı çalışmalar yapılmıştır(5–7).

Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanım kolaylığından dolayı tercih edilen disk difüzyon ve gradient test yöntemlerinin kolistinin antimikrobiyal duyarlılığını test etmede güvenilir olmadığını gösteren çalışmalardan dolayı gerek Amerikan kaynaklı CLSI, gerekse Avrupa kaynaklı EUCAST, kolistin için bu testleri önermemektedir(5,8,9). Aynı kaynaklar yarı-otomatize sistemlerin de kolistin için valide olmadığını bildirerek kolistin duyarlılığını saptamada tek güvenilir yöntem olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemini önermektedirler (8–10). Ancak kolay uygulanabilirliği nedeniyle ülkemizde birçok laboratuvar da kolistin direnci saptanmasında otomatize sistemler kullanılmaya devam etmektedir.

Bu çalışma ile Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı bakteriyoloji birimine gönderilen klinik örneklerden izole edilen çoklu ilaç dirençli *A.baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında otomatize sistem ile saptanan kolistin minimal inhibitör konsantrasyon değerlerinin (MİK) Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile saptanan MİK değerleriyle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Kolistin ve polimiksin B yapıcı çok benzerdir, peptid zincirindeki bir aminoasit aralarında farka yol açar. Polimiksinler görece büyük lipopeptidlerden oluştuğu için ağız yoluyla emilimleri çok zayıftır (12,13). Parenteral veya nebulizatörle kullanılan, kolistin metansülfonatın sodyum tuzu formundaki formu kolistimetat sodyum(CMS) olarak adlandırılır. Kolistinin diğer formu olan kolistin sülfattan daha az etkin, aynı zamanda daha az toksiktir. Bir ön ilaç olan CMS in vivo olarak hidrolize uğradıktan sonra aktif forma dönüşür. Kolistin sülfatın oral formu da mevcuttur ancak tek kullanım alanı bağırsak dekontaminasyonudur(1,3,4).

Kolistin ve Polimiksin B'nin en önemli farklılıklarından biri de idrar konsantrasyonlarıdır. Polimiksin B'nin çok az kısmı idrarla atılırken CMS'nin büyük kısmı idrar yollarında kolistine dönüşür. Her iki ilacın nefrotoksik etkileri olmakla birlikte CMS'nin Polimiksin B'ye nazaran böbreklere daha fazla toksik etki gösterdiğini bildiren çalışmalar mevcuttur(14).

2.1.2. Kolistinin etki mekanizması

Kolistinin esas olarak Gram-negatif bakterilerinin sitoplazmik membranına etki eder. Membrandaki lipopolisakkarit (LPS) yapıya bağlanarak Ca^{+2} ve Mg^{+2} köprülerinde yer değişikliğine neden olur; böylece membran geçirgenliğinde bozulma ve hücre ölümü gerçekleşir(15,16). Kolistinin etkisi konsantrasyon bağımlıdır. Kolistin ayrıca bakteri hücre membranındaki Lipid A yapısına bağlanarak bakterinin endotoksini nötralize eder (11).

Konsantrasyon bağımlı antibiyotikler için iki farmakodinamik parametre değerlendirilir. İlk antibiyotik doz sonrası hasta serumunda bulunan en yüksek ilaç konsantrasyonunun (C_{max}) minimal inhibitör konsantrasyonuna (MIK) oranı; C_{max}/MIK bu parametrelerden biridir. Diğer farmakodinamik parametre ise 24 saatlik serum konsantrasyonunun eğri altında kalan alanın (AUC), MIK'e oranıdır; AUC/MIK . Bu oranın yüksek olması için antibiyotiğin sık aralıklarla veya yüksek dozda uygulanması önerilmiştir(17). Nefrotoksik etkisi göz önüne alınarak 24 saatlik dozun üçe bölünerek uygulanması önerilmektedir. Direnç gelişme olasılığına karşın kolistinin diğer antibiyotiklerle kombine kullanımı da dikkat edilmesi gereken noktalardandır (1,11,17).

2.1.3. Kolistinin etki spektrumu

Kolistin Gram-negatif bakterilere (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacterales* takımındaki çoğu cinse) ve bazı Mikobakteri türlerine (*M. tuberculosis*, *M. intracelulare*, *M. fortuitum*, *M. xenopi*) etkilidir. Buna karşın Gram-negatif koklar, Gram-pozitif bakteriler, anaerobik bakterilerin büyük kısmına, ayrıca parazit ve mantar türlerine karşı da etki göstermez (11,16).

Enterobaktrales takımının birçok üyesi kolistine duyarlıyken *Proteus* türleri, *Providencia* türleri, *Morganella morganii* ve *Serratia* türleri kolistine doğal dirençlidir. Kolistine dirençli diğer mikroorganizmalar *Nocardia*, *Campylobacter*, *Vibrio* (*cholerae* ve *el tor*) ve *Brucella* türleridir. *Bacteroides fragilis* kolistine dirençliyken *B. melaninogenicus* ve *B. oralis* kolistine duyarlıdır. *Pseudomonas* cinsinde kolistine duyarlı türler (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. maltophilia*) olduğu gibi dirençli türler (*P. pseudomallei*, *P. cepacia*, *P. picketti*) de mevcuttur (2,11).

2.1.4. Kolistine karşı direnç mekanizmaları

Gram-negatif bakterilerde kolistine karşı direnç gelişmesi mutasyon veya adaptasyon mekanizmalarıyla ilişkilidir. Adaptasyonun aksine, mutasyona bağlı gelişen direnç antibiyotik maruziyetinden bağımsızdır. Düşük düzey dirençle karakterize olup kalıtsaldır(3).

Kolistin Gram-negatif bakterilerin hücre membranındaki LPS yapılarına bağlanarak etki gösterdiğinden, kolistine karşı direnç mekanizmaları da esas olarak LPS yapılarındaki değişikliklerle meydana gelir. Ancak antibiyotik molekülünün dışa atımını sağlayan eflux pompaları ve hücre membranına ulaşmasını önleyen kapsül oluşumu gibi yollarla da kolistine karşı direnç geliştiği bildirilmiştir (18).

Lipopolisakkarit değişimlerinden en sık karşılaşılanı L-Ara4N eklenmesi ve bu katyon değişiminin sonucu olarak lipid A'nın net negatif yükünün sıfırlanmasıdır. İkinci LPS değişimi ise PEtN eklenmesidir ki, bu modifikasyonla hücre membranının net negatif yükü -1/-1,5 aralığına düşer. Hücre membranının negatif yükü azaldığında kolistinin bağlanması ve bakteriye etki etmesi engellenmiş olur (13).

Farklı bakteri grupları kolistine karşı farklı genetik modifikasyonlarla direnç geliştirebilmektedir. Bakteri hücre membranlarında regülasyonu sağlayan *pmrA/pmrB* ve *phoP/phoQ* gibi sistemlerde farklı genetik mutasyonlar sonucu aktivasyon artışları olmaktadır. Bu tür aktivasyon artışları LPS modifiye eden genlerin ekspresyonunu arttırarak PEtN ve L-Ara4N gibi moleküllerin yüksek miktarda sentezine yol açmaktadır. Sentezlenen moleküllerin lipid A'ya transferini sağlayan *pmrCAB* ve *arnBCADTEF-pmrE* operonlarının regülasyonunun *phoP/phoQ* sistemini aktive ederek dirence katkı sağladığı gösterilmiştir(18).

Cannatelli ve ark., kolistin dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında *mgrB* geninin delesyona uğradığı veya inaktive olduğunu, bunun sonucunda da *phoP*, *phoQ*, and *pmrK* genlerinin transkripsiyonunun arttığını göstermiş. Bu bulgulara dayanarak *PhoQ/PhoP* sisteminin upregulasyonu ve *pmrHFIJKLM* operonunun aktivasyonunda *mgrB* geninin düzenleyici role sahip olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar tüm bu genetik modifikasyonların bakteride LPS hedef değişiklikleri sonucu kolistin direncine yol açtığı sonucuna varmış(19).

Enterobakterales takımı üyelerinde kolistin direncinde rol oynayan diğer genler *mgrR* ve *micA* genleridir. *Escherichia coli* izolatlarında *mgrR* geninin *eptB* genini baskılayarak LPS yapının PEtN ile modifikasyonuna yol açtığı gösterilmiştir(12,20). Bir başka gen olan *micA* da *phoP* genlerinin baskılanması yoluyla kolistin direncine neden olabileceği gösterilmiştir(21).

Pseudomonas aeruginosa izolatlarındaki direnç mekanizmaları Enterobakterales takım üyelerindekine benzerlik gösterir. *P. aeruginosa* izolatlarında *pmrA* mutasyonları nadir görülürken *pmrB* mutasyonlarının kolistin direncine sıklıkla eşlik ettiği saptanmış(22). Ek olarak *parR/parS* ve *cprR/cprS* sistemlerinin de LPS modifikasyonlarında rolü olduğu belirtilmiş. Regülatör genlerden ColRS and CprRS sistemlerinin varlığının ise *P. aeruginosa*'da yüksek düzey polimiksin direncine neden olabildiği gösterilmiştir(23).

Acinetobacter baumannii izolatlarındaki kolistin direnci büyük ölçüde PEtN molekülü üzerinden olmaktadır. Lipid yapısına PEtN eklenmesine yol açan en önemli mutasyonlar *pmrB* gen mutasyonunun yanısıra *pmrC* benzeri *eptA* gen ekspresyonudur(18). *A. baumannii*'de bir diğer direnç mekanizması da lipid A sentez genlerindeki (*lpxA*, *lpxC* ve *lpxD*) modifikasyonlardır. Bu genlerde delesyon,

nükleotid değişimleri veya insersiyonların LPS kaybı ile sonuçlandığı gösterilmiştir(24).

2.1.5. Kolistin duyarlılık testleri

Uluslararası standardizasyon kuruluşu antimikrobiyal maddelerin minimal inhibitör konsantrasyonlarının test edilmesi için sıvı mikrodilüsyon yöntemini referans yöntem olarak kabul eder. Güvenilir sonuçlar elde etmek için diğer antimikrobiyal duyarlılık test yöntemlerinin (disk difüzyon veya diğer tanı testleri gibi) doğrulanması için bu referans yöntemle karşılaştırılması gerekir(25).

Kolistinin yeniden kullanıma girmesiyle birlikte mikrobiyoloji laboratuvarlarında disk difüzyon yöntemi kullanılarak 10 µg'lık kolistin sülfat diskleri ile kolistin duyarlılıkları test edilmeye başlandı. Eş zamanlı olarak strip üzerinde kolistin sülfatın farklı konsantrasyonlarının bulunduğu gradient testler üretildi. Ancak gerek disk difüzyon gerekse gradient test yönteminde kolistinin agar içine yeterince yayılamamasına bağlı olarak yanlış duyarlılık sonuçları elde edildi. Bu sonuçlara dayanarak gerek disk difüzyon gerekse gradient test yönteminde duyarlı saptanan sonuçların sıvı mikrodilüsyon ile doğrulanması gerektiği bildirildi(3,6,26).

Sıvı mikrodilüsyon temelli otomatize sistemlerle kolistin direnci saptanmasıyla ilgili yapılan çalışmalarda saptanan yanlış duyarlı veya dirençli sonuçlar, EUCAST'ın kolistin direnç testleriyle ilgili uyarıda bulunmasına yol açmıştır(3,26,27). Bu tez çalışması planlandığında otomatize sistemlerle ilgili net bir sonuca ulaşılmadığından biz de laboratuvarımızdaki mevcut sistemle sıvı mikrodilüsyon yöntemini karşılaştırmayı amaçladık.

Ülkemizde 2015 yılından beri antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yorumlanmasında EUCAST kriterleri baz alınmaktadır. EUCAST , Enterobacterales üyeleri, *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* türleri için 2mg/L ve altındaki MİK değerlerini duyarlı kabul ederken, 2mg/L'nin üstündeki MİK değerine sahip isolatları ise dirençli olarak sınıflandırmaktadır(28).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Bakteri İzolatlarının Toplanması

Bu çalışma için Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 06.06.2018 tarih ve 236 sayılı kararla onam alınmıştır.

Çalışmaya Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden üreyen *A. baumannii* (92 izolat), *K. pneumoniae* (68 izolat), *P. aeruginosa* (55 izolat) ve *E. coli* (21 izolat) izolatı dahil edilmiştir.

3.2. Klinik Örneklerin Kültür İşlemleri

Periferik ve kateter kan örnekleri, beyin omurilik sıvısı (BOS), eklem sıvısı ve plevra sıvısı gibi steril vücut sıvıları Bactec Plus aerobic/F veya BD Bactec Peds Plus/F şişelerine alınarak BACTEC FX (Becton Dickinson, A.B.D) sisteminde inkübasyona bırakılmış, üreme olan şişelerden katı besiyerlerine -%5Koyun Kanlı Agar (KKA), Eozin Methylen Blue Agar (EMB), Sabouraud Dextrose Agar (SDA)-subkültürler yapılmıştır. İdrar, nefrostomi, trakeal aspirat ve bronkoalveolar lavaj (BAL) örnekleri kantitatif yöntemle, diğer örnekler seyreltme yöntemiyle besiyerlerine ekilmiştir. Trakeal aspirat ve balgam örnekleri için öncelikle Gram boyama yapılmış ve Bartlett skorlama sistemi kullanılarak Bartlett skoru sıfırdan büyük olan örnekler değerlendirmeye alınmıştır(29). Yara kültürü örneklerinde Gram boyama için Q skorlama sistemi kullanılmış ve Q skoru sıfırdan büyük olan örnekler değerlendirmeye alınmıştır(30). Kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları için eş zamanlı olarak kateter ucu ve/veya kateter kan kültürü ile periferik bir venden kan kültürü alınmıştır. Hem kateter ucu ve/veya kateter kan kültüründe hem de periferik venden alınan kan kültürü örneğinde üreme olması durumunda kateter ilişkili bakteriyemi düşünülüp antibiyogram çalışılmıştır. Sadece kateter ucu ve/veya kateter kan kültüründe üreme olup periferik venden alınan kan kültüründe üreme olmaması durumunda ise kontaminasyon veya kolonizasyon olarak değerlendirilmiştir(31).

3.3. Bakteri İzolatlarının Tanımlanması

Kültürde üreyip enfeksiyon etkeni olduğu düşünülen izolatlar, Maldi Biotyper 3 (Bruker Daltonics, ABD) sistemi kullanılarak kütle spektrometre (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time Of Flight- Mass Spectrometry: MALDI-TOF-MS) yöntemi ile tanımlandı.

Kültürde üreyen koloniler, ön ekstraksiyon işlemi uygulanmadan temiz bir kürdan yardımıyla paslanmaz çelik plağın üzerindeki dairesel alana sürülerek kuruması beklendi. Tanımlama işlemine alınacak örneklerin taze kültür örnekleri olmasına dikkat edildi. Çelik plaktaki örneklerin üzerine sırasıyla 1'er µl formik asit ardından da siyano 4-hidroksisinnaminik asit (HCCA)'ten oluşan matrix çözeltisi eklendi. İşlemler arasında örnekler oda ısısında kurumaya bırakıldı. Matriks çözeltisi, lazer ışınlarının çelik plak üzerindeki örnekler ile iletmesini sağlayarak örnekteki moleküllerin düzgün şekilde iyonizasyonu sağlayan bir ortam oluşturur. İyonize olan ve kütlelerine göre hız kazanan moleküller cihaz içindeki silindirik alanda hareket kazanır ve cihazdaki detektöre ulaşır. Laboratuvarımızda mevcut Microflex LT (Bruker Daltonics, Almanya) sistemi kullanılarak pozitif lineer mod, 2-20 kDa kütle aralığında iyonlar oluşturuldu. Detektöre çarpan iyonların ölçümüyle oluşan spektrumlar MALDI Biotyper 3.1 yazılımı (Bruker Daltonics, Almanya) yardımıyla veri tabanındaki spektrum görüntüleriyle karşılaştırıldı. Her çalışma öncesi tanımlama sisteminin kalibrasyonu için üretici talimatı doğrultusunda Bakteriyel Test Standardı (BTS) kullanıldı.

MALDI-TOF MS sisteminde, mevcut veri tabanındaki spektrumlarla benzerlik oranına göre mikroorganizmaların tanımlama skorları elde edilir. Tanımlama skorlarının yüksekliği, tanımlamanın güvenilirliği ile doğru orantılıdır. Tanımlama skorunun 2 ve üzerinde olması tanımlamanın cins ve tür düzeyinde; 1.7-2 arasında olması cins düzeyinde güvenilir olduğunu gösterir(32). Güvenilir olmayan sonuçlarda örneklerin saf alınıp alınmadığı, kültürün taze olup olmaması, cihazın periyodik bakımlarının yapılıp yapılmaması ve kalibre edilme durumları kontrol edilmesi önerilmektedir(33). Çalışmamızda izole edilen bakteri suşları kütle spektrometre ile cins ve/veya tür düzeyinde güvenilir skorlarla tanımlandı.

3.5. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi (ADT)

3.5.1. Phoenix 100 otomatize sistemi ile ADT

Çalışmaya dahil edilen izolatların antimikrobiyal duyarlılık testleri (ADT) , idrar ve diğer örnekler için sırasıyla Phoenix UNMIC-401/ ID Paneli ve NMİC-400/ID panelleri kullanılarak BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, A.B.D) otomatize sistemi sistemi ile çalışıldı. Kültürde saf üreyen izolatlar 0.5 McFarland bulanıklığında suspanse edildikten sonra otomatize sistemin ilgili panellerine aktarıldı. Yaklaşık 16-18 saat sonra çıkan ADT sonuçları EUCAST v.8.0 kriterleri ve uzman kuralları uyarınca değerlendirildi(28). Otomatize sistemin kolistin duyarlılığı için verdiği duyarlılık sonuçları kayıt altına alındı. Çoklu ilaca dirençli (en az 3 grup antibiyotiğe dirençli) bakterilerde kolistin duyarlılığı otomatize sistemin yanısıra sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemiyle de test edildi.

3.5.2. Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle ADT

Kullanılan Malzemeler:

- Steril U tabanlı plate
- Otomatik çoklu (sekizli) pipet,
- Pipet uçları
- Kasyon ayarlı Mueller Hinton Broth (KAMHB) (Becton Dickinson, A.B.D.)
- Colistin sülfat (Carbosynth, İngiltere)
- Bakteri süspansiyonları
- Steril serum fizyolojik süspansiyonları
- Steril distile su

Dehidrate haldeki KAMHB toz besiyerinden 5.5 gr tartıldı, üzerine 250 ml distile su eklenerek balon joje içinde benmari usulü tamamen çözündü. Üretici talimatlarına uygun şekilde 116-121°C’de 10-15 dakika otoklavlandı. Bu besiyeri Amerikan Klinik Standartlar Enstitüsü M7’nin kantitatif ADT için önerdiği şekilde

Ca ve Mg iyonları ayarlanmış, ayrıca düşük timin ve timidin içeriğine sahip sıvı besiyeridir(34).

Antibiyotik stok solüsyonu hazırlamak için toz haldeki kolistin sülfat, “Ağırlık (mg) = Hacim (mL) x Konsantrasyon (mg/L)/Potens (µg/mg)” formülü uyarınca tartıldı, uygun miktarda distile su içinde çözünerek 256 mg/l konsantrasyonlarda hazırlandı. Sıvı mikrodilüsyon yönteminde stok antibiyotik konsantrasyonu, çalışılacak en yüksek konsantrasyonun iki katı olmalıdır. Porsiyonlara bölünen stok solüsyonu daha sonraki kullanımlar için porsiyonlara bölünerek -20°C’de saklandı.

Bakteri süspansiyonları taze ve saf kültürlerden 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanarak serum fizyolojik (SF) içinde 1/20 oranında dilüe edildi.

SMD çalışmaları Amerikan Klinik Standartlar Enstitüsü M7 talimatlarına uygun olarak yürütüldü(34). İlk olarak, çalışılacak tüm kuyucuklara 100’er µl KAMHB bırakıldı. On birinci sütundaki kuyucuklara antibiyotik stok solüsyonundan 100’er µl eklendi. Pipetaj yapıldıktan sonra 11. sütundaki kuyucuklardan 100’er µl alınarak 10. sütundaki kuyucuklara bırakıldı. Bu şekilde birinci sütundaki kuyucuklara kadar seri dilüsyon yapılmış oldu. Birinci sütundaki kuyucuklardan alınanlar (100’er µl) dışarı atıldı. Böylece kuyucuklardaki son antibiyotik konsantrasyonları sırasıyla 0.125- 1.25- 0.5-1-2-4-8-16-32-64 ve 128 mg/l oldu. Kuyucuklara son olarak 10’ar µl bakteri süspansiyonu bırakıldı, böylece her kuyucuktaki bakteri miktarı 10⁵ CFU/ml olarak belirlendi.

Kalite kontrol izolatları olarak her çalışmada kolistin duyarlı (*E. coli* ATCC 25922) ve kolistin dirençli (mcr-1 taşıyan *E.coli* NCTC 13846) bakteri süspansiyonları kullanıldı. Bakteri süspansiyonları da eklendikten sonra plakların üzeri kapatılarak 35-37 °C inkübatörde 16-18 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kuyucuklarda bulanıklık olup olmadığına bakıldı. Bulanıklık görülmeyen ilk kuyucuk o izolatın MİK değeri olarak kayıt altına alındı.

Her çalışmada birer kuyucuk üreme kontrol (bakteri var, antibiyotik yok) ve besiyeri sterilite kontrol (sadece besiyeri var, bakteri ve antibiyotik yok) kuyucukları olarak saptandı. Plakların değerlendirme aşamasında, besiyeri sterilite kontrol kuyucuğunda bakteri ürememesi, üreme kontrol kuyucuğunda üremenin saptanması,

kalite kontrol izolatlarının MİK değerlerinin beklenen aralıklarda olması durumunda testler geçerli kabul edilerek değerlendirildi.

Üreme kontrol kuyucuğunda üreme olmayan plaklar ile besiyeri sterilite kuyucuğunda üreme olan plaklar değerlendirilmeyerek test tekrarına gidildi.

Çalışmamızda EUCAST'ın *A. baumannii*, *P. aeruginosa* ve *Enterobacterales* üyeleri için belirlediği MİK sınır değerleri referans alınmıştır. Buna göre 2 mg/L ve altındaki MİK değerine sahip izolatlar duyarlı, 2 mg/L'ın üstündeki değerlere sahip izolatlar ise dirençli olarak kabul edilmiştir (28).

ISO standartları temel alınarak, SMD yönteminde duyarlı saptanan izolatların otomatize sistemde dirençli saptanması büyük hata (BH), SMD yönteminde dirençli saptanan izolatın otomatize sistemde duyarlı saptanması ise çok büyük hata (ÇBH) olarak değerlendirildi(25).

Sonuçların analizinde oran ve orantı gibi temel istatistik yöntemler kullanıldı. Ayrıca SMD testi referans alınarak otomatize sistemin geçerlilik ve güvenilirlik test parametreleri (duyarlık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri) hesaplandı.

4. BULGULAR

Çalışmaya toplam 236 çoklu ilaç dirençli izolat dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* izolat sayıları sırasıyla 92, 68, 55 ve 21'di. *A. baumannii* izolatları en sık solunum yolu örneklerinden (46 izolat) izole edildi. Solunum dışı *A. baumannii* izolatları kan (18 izolat), yara (13 izolat), idrar (11 izolat), dren (2 izolat) ve plevra dan (2 izolat) izole edildi. Toplam 68 *K. pneumoniae* izolatının büyük kısmı (37 izolat) idrar, 19'u kan, 6'sı trakeal aspirat, 2'si apse, 2'si dren, 2'si de yara örneklerinden izole edildi. Çoklu ilaç dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının 26'sı yara, 11'i trakeal aspirat, 9'u kan, 9'u da idrar örneklerinden izole edildi. Çalışmaya dahil edilen 21 *E. coli* izolatı idrar (7 örnek), kan (5 örnek), yara (3 örnek), trakeal aspirat (2 örnek), apse (2 örnek) ve dren (2 örnek) örneklerinden izole edildi. Çalışmaya dahil edilen izolatlar ve izole edildikleri klinik örnekler Tablo 1'de özetlendi.

Tablo 1. Çalışmaya dahil edilen izolatların elde edildiği klinik örnek sayıları

Örnek cinsi İzolat	Trakeal aspirat	İdrar	Kan	Yara	Apse	Dren	Plevra	Toplam
<i>A.baumannii</i>	46	11	18	13		2	2	92
<i>K. pneumoniae</i>	6	37	19	2	2	-	2	68
<i>P. aeruginosa</i>	11	9	9	26	-	-	-	55
<i>E. coli</i>	2	7	5	3	2	2	-	21
Toplam	65	64	51	44	4	4	4	236

A.baumannii: *Acinetobacter baumannii*, *K. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*,

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*: *Escherichia coli*

A.baumannii izolatlarının 14'ünde (%15.2) referans yöntem kabul edilen SMD ile kolistin direnç saptandı. Toplam 92 *A. baumannii* izolatının 87'sinde otomatize sistemle kolistin MİK değeri ≤ 1 olarak saptandı. Otomatize sistemde 1 veya 1'in altı MİK saptanan izolatların 65(%74.7)'inde SMD ile 1 veya 1'in altı MİK saptanırken 22 (%25.3)'sinde 1'in üzerinde MİK değerleri saptandı. Otomatize sistemde 5 *A. baumannii* izolatı kolistine dirençli saptanırken SMD yöntemiyle 14 izolatta kolistin direnci mevcuttu. *A. baumannii* izolatlarının BD Phoenix otomatize sistemi ve SMD yöntemiyle saptanan MİK değerleri Tablo 2'de özetlendi.

A. baumannii izolatlarının 14'ü SMD ile dirençli saptanmış, bu izolatların 10'unu Phoenix 100 otomatize sistemi duyarlı (9 izolatta MİK ≤ 1 mg/L, bir izolatta MİK=2 mg/L) bulmuştur. Dirençli izolatların duyarlı bulunmasını ÇBH, duyarlı izolatların dirençli bulunmasını ise BH olarak tanımladığımızda; *A. baumannii* izolatlarında ÇBH oranı %71.4 olarak saptandı, BH ise gözlenmedi (Tablo 2).

Tablo 2. Otomatize sistem ve sıvı mikrodilüsyon ile kolistin MİK değerleri belirlenen *A. baumannii* izolat sayıları

		SMD MİK (mg/L)											Toplam
		<=0.125 n	0.25 n	0.5 n	1 n	2 n	4 n	8 n	16 n	32 n	64 n	>=128 n	
BD Phoenix MİK (mg/L)	<=1 n	1		11	53	13	4	2	1	1		1	87
	2 n											1	1
	>4 n										3	1	4
Toplam		1		11	53	13	4	2	1	1	3	3	92

SMD: Sıvı mikrodilüsyon, MİK: Minimal inhibitör konsantrasyon, n: izolat sayısı

K. pneumoniae izolatları incelendiğinde; otomatize sistemle kolistin MİK değerleri <=1 olarak belirlenen 62 izolatın 45 (%72.6)'inde SMD ile de benzer sonuçlar alınırken 17 izolatta 1'den büyük olarak (7 izolatta 2, 5 izolatta 4, 2 izolatta 8, 2 izolatta 128, 1 izolatta da 32) saptandı. SMD ile kolistine direnç saptanan 14 *K. pneumoniae* izolatının 10'unu Phoenix 100 sistemi duyarlı raporlamıştır. *K. pneumoniae* izolatlarında ÇBH %71.4, BH %1.5 (1 izolat) olarak saptandı. *K. pneumoniae* izolatlarının 14'ünde (%20.6) referans yöntem kabul edilen SMD ile kolistin direnç saptandı (Tablo 3).

P. aeruginosa izolatlarının 3'ü (%5.5) referans yöntem kabul edilen SMD ile kolistine dirençli olarak saptandı. Toplam 55 *P. aeruginosa* izolatının tamamında otomatize sistemle kolistin MİK değerleri 1 ve altında saptandı. SMD yöntemi ile bu izolatların altısında 0.5, otuz dokuzunda 1, yedisinde 2, ikisinde 4, birinde ise 128 ve üzeri olarak gözlendi. SMD ile kolistine dirençli saptanan izolatların üçü de Phoenix 100 ile duyarlı rapor edildi. *P. aeruginosa* izolatları için ÇBH %100 iken BH gözlenmedi (Tablo 4).

Tablo 3. Otomatize sistem ve sıvı mikrodilüsyon ile kolistin MİK değerleri belirlenen *K. pneumoniae* izolat sayıları

		SMD MİK (mg/L)											Toplam
		<=0.125 n	0.25 n	0.5 n	1 n	2 n	4 n	8 n	16 n	32 n	64 n	>=128 n	
BD Phoenix MİK (mg/L)	<=1 n			24	21	7	5	2	-	1		2	62
	2 n				1								1
	>4 n			1				1	1		1	1	5
Toplam				25	22	7	5	3	1	1	1	3	68

SMD: Sıvı mikrodilüsyon, MİK: Minimal inhibitör konsantrasyon, n: izolat sayısı

Tablo 4. Otomatize sistem ve sıvı mikrodilüsyon ile kolistin MİK değerleri belirlenen *P. aeruginosa* izolat sayıları

		SMD MİK (mg/L)											Toplam
		<=0.125 n	0.25 n	0.5 n	1 n	2 n	4 n	8 n	16 n	32 n	64 n	>=128 n	
BD Phoenix MİK (mg/L)	<=1 n			6	39	7	2	-	-	-		1	55
	2 n												
	>4 n												
Toplam				6	39	7	2					1	55

SMD: Sıvı mikrodilüsyon, MİK: Minimal inhibitör konsantrasyon, n: izolat sayısı

E.coli izolatlarının 5'inde (%23.8) referans yöntem kabul edilen SMD ile kolistine direnç saptandı. Otomatize sistemde 21 *E. coli* izolatının 20'sinde kolistin MİK değeri 1 ve 1'in altında saptanırken 1 izolatta kolistin MİK >4 olarak sonuçlandı. BD Phoenix ile >4 saptanan MİK değeri SMD ile de >128 mg/L olarak gözlendi. MİK değerleri otomatize sistemde <=1 olarak kayıt edilen 20 izolatın

11’inde SMD ile ölçülen MİK 0.5, dört izolatta 1, birer izolatta da 2, 4, 16, 32 ve >128 olarak ölçüldü. SMD ile kolistine dirençli bulunan 5 *E. coli* izolatının 4’ü otomatize sistemle duyarlı bulunduğu için ÇBH %80 olarak saptandı, BH saptanmadı (Tablo 5).

Tablo 5. Otomatize sistem ve sıvı mikrodilüsyon ile kolistin MİK değerleri belirlenen *E. coli* izolat sayıları

		SMD MİK (mg/L)											Toplam
		<=0.125 n	0.25 n	0.5 n	1 n	2 n	4 n	8 n	16 n	32 n	64 n	>=128 n	
BD Phoenix MİK (mg/L)	<=1 n			11	4	1	1	-	1	1		1	20
	2 n												
	>4 n											1	1
Toplam				11	4	1	1		1	1		2	21

SMD: Sıvı mikrodilüsyon, MİK: Minimal inhibitör konsantrasyon, n: izolat sayısı

Toplam 236 izolatın 36’sında (%15.3) kolistine direnç saptandı. Çalışmaya dahil edilen çoklu ilaç dirençli *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* izolatlarında kolistin direnci sırasıyla %15.2 (92 izolatın 14’ü), %20.6 (68 izolatın 14’ü), %5.5 (55 izolatın 3’ü) ve %23.8 (21 izolatın 5’i) olarak bulundu.

Çalışmaya dahil edilen tüm izolatlar değerlendirildiğinde; SMD ile dirençli olarak saptanan 36 izolatın 9’unun otomatize sistemde dirençli görüldüğü, 27sinin ise otomatize sistemde duyarlı olarak rapor edildiği gözlemlendi. Dolayısıyla Phoenix 100 otomatize sisteminin ÇBH oranı %75 (27/36) olarak belirlendi. Duyarlı izolatın dirençli çıkması olarak tanımlanan BH ise sadece 1 *K. pneumoniae* izolatında (% 0.5) görüldü.

Referans yöntem olan SMD ile karşılaştırıldığında BD Phoenix otomatize sisteminin duyarlı izolatları saptama yüzdesi %99.5 iken dirençli izolatları saptama oranı %25 olarak belirlendi (Tablo 6). Dirençli izolatları saptama konusunda testin pozitif prediktif değeri (PPD) %25 (9/36), negatif prediktif değeri (NPD) ise %99.5 (199/200) olarak saptandı.

Tablo 6. SMD yöntemi referans alınarak otomatize sistemin geçerlilik ve güvenilirliğinin test edilmesi

Otomatize sistem	SMD		Toplam
	Duyarlı	Dirençli	
Duyarlı	199	27	226
Dirençli	1	9	10
Toplam	200	36	236

SMD: Sıvı mikrodilüsyon

5. TARTIŞMA

Antibiyotiklerin gereksiz ve uygunsuz kullanımı, çoklu ilaca dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları klinisyenler için kabus haline getirmiştir. Yeni antibiyotiklerin araştırılması veya sentezlenmesi bakterilerin direnç geliştirme hızına yetişememektedir(35). Bu durum 1950li yılların antibiyotığı olan kolistin çoklu ilaca dirençli *A. baumannii*, *P.aeruginosa* ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz veya karbapenemaz içeren *Enterobacterales* üyelerinin yol açtığı enfeksiyonlarda yeniden kullanımını gündeme getirmiştir(4,15,36). Nefrotoksik yan etkileri nedeniyle 2000li yıllardan önce kullanımından kaçınılan kolistin dirençli mikroorganizmalara bağlı enfeksiyonlarda lokal veya sistemik, tek başına veya kombine tedavilerde kullanılmaya başlanmıştır(2,3,19).

Kolistinin klinik kullanıma girmesi laboratuvarlarda kolistin için antimikrobiyal duyarlılık testleri kullanımını gerekli kılmıştır. Disk difüzyon testleri rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan ADT yöntemleridir. Amerikan Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) 2007 yılında çıkardığı ek raporda kolistin disk difüzyon testi için yorumlayıcı kriterler belirlemiş; *P. aeruginosa* izolatları için 10 µg'lık kolistin diski ile çalışılan disk difüzyon testinde 10 mm'nin altındaki zon çapının dirençli, 11 mm ve üstündeki zon çaplarının ise duyarlı olarak raporlanması gerektiğini bildirmiştir(37). Disk difüzyon testi için Avrupa kaynaklı standartlardan; British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) 25 µg, French Society for Microbiology (SFM) ise 50 µg'lık kolistin disklerini önermişlerdir(5,38). Disk difüzyon yönteminin gradient test yöntemi ile karşılaştırıldığı bir çalışmada toplam 778 bakterinin (*K. pneumoniae*, *Enterobacter türleri*, *E. coli*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*) kolistine duyarlılığı test edilmiş. Çalışmada *Enterobacterales* üyeleri için 11 mm ve altı dirençli, 14 mm ve üstü duyarlı kabul edilmiş. Bu şekilde çok büyük (dirençli izolatın duyarlı raporlanması) ve büyük hata (duyarlı izolatın dirençli raporlanması) saptanmadığı belirtilmiş ancak izolatların yaklaşık %15'inin ara değerlerdeki zon çaplarına sahi olduğu ve değerlendirilemediği belirtilmiştir. Aynı çalışmada *A. baumannii* izolatları için ise 12 mm ve altındaki zon çapları dirençli, 14 mm ve üstündeki zon çapları

duyarlı sayıldığında çok büyük ve büyük hata saptanmadığı ama izolatların %4'ünün ara değer olan 13 mm'lik zon çapına sahip olduğu rapor edilmiştir(5).

Singapur'da 2006 yılında yapılan bir çalışmada E-test ve Vitek 2 sistemi agar dilüsyon yöntemi referans alınarak karşılaştırılmış. *Acinetobacter* türleri, *Enterobacteriaceae* üyeleri, *P. aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* izolatlarını içeren toplam 172 izolatın dahil edildiği çalışmada izolatların 54'ünün kolistine dirençli olduğu saptanmış. Agar dilüsyon ile E-test yönteminin kategorik uyumu %87 iken Vitek 2 otomatize sistemi ile agar dilüsyon uyum oranı %82 olarak saptanmış. Bu sonuçlara dayanarak Vitek 2 sisteminin kolistin direncinin saptanmasında güvenilirmez olduğu, Etest ile elde edilen sonuçların ise standart bir MİK saptama yöntemi ile doğrulanması gerektiği belirtilmiştir(6). Bizim çalışmada test ettiğimiz otomatize sistemin de ÇBH oranı yüksek olduğundan kolistin duyarlılık sonuçlarının SMD ile doğrulanması gerekmektedir.

Antimikrobiyal sürveyans programı kapsamında SENTRY laboratuvarlarında yapılan bir çalışmada kan kültürlerinden izole edilen toplam 200 *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* izolatı için disk difüzyon, agar dilüsyon ve sıvı mikrodilüsyon testleri uygulanmış. MİK sınır değeri 2 µg/ml olarak alındığında SMD ve agar dilüsyon yöntemleri arasında mükemmel uyum ($r = 0.96$ ile 0.98 arasında) saptanmış; sonuçların %94.3'ü ± 1 log aralığında bulunmuş. MİK sınır değeri 4 µg/ml olarak alındığında ise kolistin için %5, Polimiksin B için %6 oranında çok büyük hata (kabul edilemez yanlış duyarlılık) rapor edilmiş. Disk difüzyon için modifiye edilmiş zon çapları (11 mm ve altı duyarlı, 14 mm ve üstü dirençli) kullanılarak yapılan disk difüzyon testinde de %3.5 ve üzerinde hata oranları saptanmış. Çalışmanın sonucunda disk difüzyon ile duyarlı saptanan tüm izolatların MİK saptayan testlerle doğrulanması gerektiği belirtilmiştir(26).

MİK saptama yöntemlerinden olan E-test, diğer adıyla gradient testlerin güvenilirliği ile ilgili 2015 yılında bir çalışmada Dafopoulou ve ark., 61 karbapenem dirençli izolatı (40'ı karbapenem dirençli *K. pneumoniae*, 21'i *A. baumannii*) test etmiş. SMD yöntem referans alınarak agar dilüsyon (AD), Etest, Vitek-2 otomatize sistem ve MİK test stripleri (MTS) test edilmiş. Testlerde saptanan çok büyük hata (ÇBH) oranları Etest ve MTS'de sırasıyla %39.3 and 31.1% olarak belirtilmiş. AD

yönteminde bu oran %3.3 iken Vitek-2 otomatize sisteminde ÇBH saptanmamış. Büyük hata oranı tüm yöntemlerde çok düşükmüş. Bu sonuçlara dayanarak Dafopoulou ve ark., gradient difüzyon yöntemlerinin (Etest ve MTS) yanlış duyarlı sonuçlarla uygunsuz kolistin tedavilerine yol açacağını belirtmişler(39). Bu çalışmalar üzerine gradient testlerin kolistin direnci saptanmamasında kullanılmaması konusunda EUCAST uyarıda bulunmuştur(27). Farklı ticari kitlerin test edildiği bir çalışmada gradient testlerin toplam 75 izolatın 9-18'inde yanlış duyarlı sonuç verdiği bildirilmiştir(40).

Yunanistan'da 2017 yılında Vourli ve ark.'nın yürüttüğü bir çalışmada 117 *A. baumannii* izolatında kolistin duyarlılığı farklı yöntemlerle çalışılmış. SMD yöntemi referans alınarak mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıkça kullanılan Phoenix 100 ve Vitek-2 sistemlerinin yanısıra AD yöntemi de test edilmiş. Kolistin direnç oranları SMD ile %24.8 olarak saptanırken AD, Vites 2 ve Phoenix 100 ile sırasıyla %35.9, %16.2 ve %15.4 olarak bulunmuş. Her iki otomatize sistemde yüksek oranlarda ÇBH saptanmış; Phoenix100 ile %41.4 ve Vitek2 ile %37.9. Çalışmada BH oranı ise her iki sistem de de %1.1. olarak çok düşük bulunmuş. AD yönteminde ise BH oranı %15.9 olarak bulunmuş. Çalışmada otomatize sistemlerin kolistine dirençli *A. baumannii* izolatlarını saptamada yetersiz kaldığı, özellikle MİK değeri 2 mg/L olan izolatların SMD ile doğrulanması gerektiği önerilmiştir(10). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde BH oranı oldukça düşük (%0.5) bulunmuştur. Çalışmamızda *A. baumannii* izolatlarının yanısıra karbapenem dirençli *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* izolatları da dahil edilmiştir. Toplam 236 izolattan 36'sı SMD ile dirençli saptanmış, bunların 27'si Phoenix 100 ile yanlış duyarlı bulunmuştur. Çalışmamızda saptadığımız ÇBH oranı (%75) Vourly ve ark.'nın bulduğu orandan yüksek bulunmuştur. Sadece *A. baumannii* izolatları değerlendirildiğinde SMD ile dirençli bulunan 14 izolattan 10'u Phoenix 100 ile duyarlı (9'unda MİK≤1, 1'inde MİK=2) bulunmuştur. *A. baumannii* izolatlarında kolistin direnci saptanmasında Phoenix 100 sisteminde ÇBH oranı %71.4 olarak saptanmıştır. *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* izolatlarında sırasıyla %71.4 (14 izolattan 10'u), %100 (üç izolatın üçü) ve %80 (5 izolatın 4'ü) olarak bulunmuştur.

Türkiye’de 2017 yılına ait bir çalışmada Tüzemen ve ark., Phoenix 100 sistemi ile kolistine dirençli olduğu saptanan 36 *K. pneumoniae*, 9 *A.baumannii* ve 5 *P. aeruginosa* izolatı SMD ve gradient test yöntemi ile çalışmış. Altın standart yöntem olarak kabul edilen SMD yöntemiyle karşılaştırıldığında her üç bakteri türünde ÇBH saptanmazken 2 *A. baumannii*, 2 de *P. aeruginosa* izolatında BH saptanmış. *K. pneumoniae* izolatlarında BH saptanmamış. Çalışmada gradient test difüzyon yöntemi ile ÇBH oranı tüm izolatlarda %80, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* izolatlarında sırasıyla %83.3, %77.8 ve %60 olarak bulunmuş. Çalışmaya dahil edilen izolatların Phoenix 100 otomatize sistemi ile dirençli saptanan izolatlar olması, Phoenix 100 sisteminde ÇBH saptanmamasını açıklamaktadır. Bizim çalışmamızda da Phoenix 100 sistemi ile dirençli saptanan izolatların sadece 1’inde SMD ile duyarlılık saptandı. Çalışma, gradient test difüzyon yönteminin kolistin direncini saptamada yetersiz olduğunu göstermekle birlikte; Phoenix 100 sisteminde duyarlı saptanan izolatların çalışmaya dahil edilmemesi nedeniyle otomatize sistemin dirençli izolatları yakalama oranı hakkında net bilgi vermemektedir(41).

Jayol ve ark., 40’ı kolistine duyarlı, 83’ü ise dirençli olan toplam 123 Enterobakteriyel klinik izolatın kolistin duyarlılığını SMD, Phoenix 100 ve Rapid Polimiksin NP test ile çalışmış. SMD referans alındığında Phoenix 100 sistemi ile 10 kolistin dirençli izolatı (7 *Enterobacter spp.*, 1’er *E. coli*, *K.pneumoniae* ve *Salmonella enterica* izolatı) saptayamadığı belirtilmiş. Araştırmacılar Rapid Polimiksin NP testin ise 1 *E. coli* izolatı dışında kolistin dirençli tüm izolatları saptayabildiği ve testin 2 saat içinde hızlı sonuç verdiğini bildirmişler. Phoenix 100 sisteminin ÇBH oranı %12 (83 izolattan 10’u) olarak bulunmuş ve sonuç olarak Phoenix 100 otomatize sistemiyle duyarlı saptanan izolatların SMD ile doğrulanması gerektiği vurgulanmış(7). Giske ve ark., bu çalışma hakkındaki yorumlarında, MİK değeri 2-8 mg/L arasında olan izolat sayısının azlığına ve *K. pneumoniae* izolatlarının MİK değerlerinin yüksek olduğuna dikkat çekmektedir. Rapid Polimiksin NP testinin MİK değeri 8 mg/L olan *E. coli* izolatındaki direnci saptayamadığı ancak 2 *E.coli* ve 1 *Salmonella* izolatında 4 mg/L MİK değeri olan kolistin direncini saptayabildiğini belirtmişlerdir. Hızlı ve kolay uygulanan bir kolistin direnç testi olarak piyasaya sürülen Rapid Polimiksin NP testin uygulanması

zor ve nispeten yavaş olan SMD'nin yerini alıp alamayacağını tartışıldığı yayında hızlı testin hasta yönetimi için avantajları olmakla beraber bazı sınırlılıklarından dolayı henüz SMD'nin yerini alamayacağı sonucuna varılmış(42)

Çalışmaya dahil edilen 236 izolatın 36'sında (%15.3) kolistine direnç saptanmıştır. Bu izolatların çoklu ilaç dirençli izolatlar olduğu göz önüne alındığında tedavi seçenekleri neredeyse sıfırlanan enfeksiyon tabloları karşımıza çıkmaktadır. Çalışmaya dahil edilen çoklu ilaç dirençli *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* izolatlarının sırasıyla %15.2, %20.6, %5.5 ve %23.8'inde kolistin direnci saptanmıştır. Kolistine en yüksek direnç *Enterobacterales* ailesinden *E. coli* (21 izolatın 3'ünde) ve *K. pneumoniae* (68 izolatın 14'ünde) saptanmıştır. Bu durum literatürde karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında kolistin tedavisi sonrası kolistine direnç geliştiğini bildiren çalışmaların bulgularıyla uyumludur(19,43). Galani ve ark. da *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* izolatlarının kolistine daha duyarlı saptarken *K. pneumoniae*, *E. coli* ve *Enterobacter* türlerinde duyarlılığın düşük saptandığını bildirmişlerdir(5).

Sonuç olarak kolistin direnci antibiyotik direncinin tepe noktalarına yaklaşıldığını gösteren ciddi bir alarm niteliğindedir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarının rolü diğer antibiyotik duyarlılık testlerinde olduğu gibi doğru ve olabildiğince hızlı sonuçlar vermektir. Otomatize sistemler tıbbi mikrobiyoloji uzmanlarının ve laboratuvar çalışanlarının işlerini kolaylaştırmakla birlikte doğruluk ve kesinliklerinin test edilmesi gereken sistemlerdir. Antibiyotik duyarlılık testlerinin çoğunda güvenilir sonuç vermekle birlikte kolistin duyarlılık testinde otomatize sistemlerde sorunlar yaşanmaktadır. Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarının çoğunda bulunan ve çalışılma prosedürü nispeten kolay olan otomatize sistemlerden olan Phoenix 100 sisteminin kolistine dirençli izolatları büyük oranda saptayamadığı görülmüştür. Özellikle çoklu ilaç dirençli enfeksiyonlarda kolistin kullanımına karar verirken kolistin direnç testlerinin sonuçları büyük önem arz eder. Uygun antibiyotik tedavisi için doğru ADT sonuçları gerekir. Doğruluğundan emin olunan test sonuçlarının klinisyene bildirilmesi mikrobiyoloji uzmanının sorumluluklarındandır. SMD her ne kadar zahmetli bir test olsa da kolistin duyarlılığının saptanmasında referans yöntem olmaya devam etmektedir. Yeni geliştirilecek testlerin veya

otomatize sistemlerdeki modifikasyonların duyarlılıklarının saptanmasında SMD sonuçları referans alınmalıdır.

6. KAYNAKLAR

1. Li J, Turnidge J, Milne R, Nation RL, Coulthard K. In Vitro Pharmacodynamic Properties of Colistin and Colistin Methanesulfonate against *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(3):781–5.
2. Boisson M, Gregoire N, Couet W, Mimoz O. Colistin in critically ill patients. *Minerva Anesthesiol*. 2013;79(2):200–8.
3. 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):1333–41.
4. Yahav D, Farbman L, Leibovici L, Paul M. Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(1):18–29.
5. Galani I, Kontopidou F, Souli M, Rekatsina P-D, Koratzanis E, Deliolanis J, et al. Colistin susceptibility testing by Etest and disk diffusion methods. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31(5):434–9.
6. Tan TY, Ng SY. Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(5):541–4.
7. 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):175–9.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 23rd informational supplement, document M100-S27. Wayne,PA; 2017.
9. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1 [Internet]. 2017 [cited 2019 Oct 24]. Available from: <http://www.eucast.org>
10. 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):2528–30.
11. Nation RL, Li J, Cars O, Couet W, Dudley MN, Kaye KS, et al. Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. *Lancet*. 2015;15:225–34.

12. Raetz CRH, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE. Lipid A Modification Systems in Gram-Negative Bacteria. *Annu Rev Biochem.* 2007;76(1):295–329.
13. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(4):593–656.
14. Akajagbor DS, Wilson SL, Shere-Wolfe KD, Dakum P, Charurat ME, Gilliam BL. Higher Incidence of Acute Kidney Injury With Intravenous Colistimethate Sodium Compared With Polymyxin B in Critically Ill Patients at a Tertiary Care Medical Center. *Clin Infect Dis.* 2013;57(9):1300–3.
15. 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.
16. Akalın H. Kolistin. *ANKEM Derg.* 2007;21(Ek 2):26–8.
17. Kaye KS, Kaye D. Polymyxins (Polymyxin B and Colistin). In: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier; 2010. p. 496.
18. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 2014;5:643.
19. Cannatelli A, D'Andrea MM, Giani T, Di Pilato V, Arena F, Ambretti S, et al. In Vivo Emergence of Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Producing KPC-Type Carbapenemases Mediated by Insertional Inactivation of the PhoQ/PhoP *mgrB* Regulator. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(11):5521–6.
20. Reynolds CM, Kalb SR, Cotter RJ, Raetz CRH. A Phosphoethanolamine Transferase Specific for the Outer 3-Deoxy-D- *manno* -octulosonic Acid Residue of *Escherichia coli* Lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 2005;280(22):21202–11.
21. Coornaert A, Lu A, Mandin P, Springer M, Gottesman S, Guillier M. MicA sRNA links the PhoP regulon to cell envelope stress. *Mol Microbiol.* 2010;76(2):467–79.
22. Moskowitz SM, Brannon MK, Dasgupta N, Pier M, Sgambati N, Miller AK, et al. PmrB Mutations Promote Polymyxin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Colistin-Treated Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(2):1019–30.
23. Gutu AD, Sgambati N, Strasbourger P, Brannon MK, Jacobs MA, Haugen E, et al. Polymyxin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* *phoQ* Mutants Is Dependent on Additional Two-Component Regulatory Systems. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(5):2204–15.
24. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JDF, Vinogradov E, Seemann T, et al.

Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii* Is Mediated by Complete Loss of Lipopolysaccharide Production. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(12):4971–7.

25. International Standards Organization. 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 [Internet]. Geneva; 2019. Available from: <https://www.iso.org/standard/70464.html>
26. Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary Assessment of Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Polymyxin B and Colistin: Review of Available Interpretative Criteria and Quality Control Guidelines. *J Clin Microbiol.* 2001;39(1):183–90.
27. EUCAST. Warnings Concerning Antimicrobial Susceptibility Testing Products or Procedures—Antimicrobial Susceptibility Testing of Colistin—Problems Detected with Several Commercially Available Products [Internet]. 2016. Available from: http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/warnings/#c13111
28. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters- Version 8.0. 2018.
29. Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği. Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanları için Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Uygulama Rehberi-Solunum Sistemi Örnekleri. Ankara; 2015.
30. Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği. Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanları için Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Uygulama Rehberi-Deri, Deri Ekleri, Yumuşak Doku Örnekleri-Göz Örnekleri. Ankara; 2015.
31. Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği. Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanları için Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Uygulama Rehberi- Kan Dolaşımı Örnekleri. Ankara; 2017.
32. MALDI Biotyper CA System- Clinical Application for Identification of Microorganisms. Billerica, MA; 2014. (Revision A).
33. Veloo ACM, Erhard M, Welker M, Welling GW, Degener JE. Identification of Gram-positive anaerobic cocci by MALDI-TOF mass spectrometry. *Syst Appl Microbiol.* 2011;34(1):58–62.
34. Clinical and Laboratory Standards Institute. Approved standard: M7-A7. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 7th ed. Wayne, PA; 2006.
35. Temiz H, Temiz S, Kaya S. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Kandida Türlerinin Dağılımı ve Antifungal Duyarlılıkları. *Med J Okmeydanı Train Res*

Hosp. 2015 Jan 30;31(1):13–7.

36. Cascio A, Conti A, Sinardi L, Iaria C, Angileri FF, Stassi G, et al. Post-neurosurgical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis successfully treated with intrathecal colistin. A new case and a systematic review of the literature. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2010;14(7):e572–9. Available from: [https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(09\)00319-1/fulltext](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(09)00319-1/fulltext)
37. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth informational supplement. Document M100-S17. Wayne, PA; 2007.
38. British Society for Antimicrobial Chemotherapy. . Methods for antimicrobial susceptibility testing, Version 6.1. 2007.
39. 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):4625–30.
40. 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):865–70.
41. Tuzemen NU, Efe K, Akalin H, Ozakin C. Retrospective Evaluation of Colistin-Resistant Isolates in Automated System by Gradient Diffusion Method and Broth Microdilution Method. *Klimik Derg*. 2019;32(1):57–61.
42. Giske CG, Kahlmeter G. Colistin antimicrobial susceptibility testing-can the slow and challenging be replaced by the rapid and convenient? *Clin Microbiol Infect* . 2018;24(2):93–4.
43. Hrabák J, Niemczykova J, Chudáčková E, Fridrichová M, Študentová V, Červená D, et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Czech patient previously hospitalized in Greece and in vivo selection of colistin resistance. *Folia Microbiol (Praha)*. 2011;56(4):361–5.

