

RAMA AL HAMWI

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2021



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN ÇOĞUL
DİRENÇLİ GRAM NEGATİF ÇOMAKLARDA FARKLI
YÖNTEMLERLE KOLİSTİN DİRENCİNİN SAPTANMASI**

RAMA AL HAMWİ

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. LÜTFİYE ÖKSÜZ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

İTHAF

Anneme ve babama ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen eğitimimin her aşamasında anlayışını, vaktini, desteğini cömertçe sunan, bu zor süreçte bana yol gösteren değerli danışman hocam Doç. Dr. Lütfiye Öksüz’e,

Bilgi ve tecrübeleriyle, yüksek lisans eğitimimde büyük emeği geçen Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Ali AĞAÇFİDAN’a ve kıymetli hocalarım; Prof. Dr. Betigül ÖNGEN, Prof. Dr. Meltem UZUN, Prof. Dr. Zayre ERTURAN, Prof. Dr. Özden BÜYÜKBABA BORAL, Prof. Dr. Zerrin AKTAŞ, Prof. Dr. Dilek ŞATANA, Doç. Dr. Yaşar NAKİPOĞLU’ya

Yüksek lisans eğitimim süresince benden yardımlarını esirgemeyen, bu yolculukta manevi destek veren bütün laboratuvar çalışanlarına ve yüksek lisans öğrencisi tüm arkadaşlarıma,

Moleküler deneylerde çok önemli katkıda bulunan doktora öğrencisi arkadaşım Gülşen Günel’e,

Çocukluğumdan beri güzel bir geleceğe sahip olmam için elinden geleni yapan, hep eğitime teşvik eden, kızı olduğum için gurur duyduğum babama, evladı için her şeyi feda eden sabırlı, güçlü ve aynı zamanda sonsuz sevgi ve merhamete sahip olan, örnek aldığım anneme, üniversite eğitimi sürecinde her anlamda destek sağlayan, kendimden daha çok bana inanan ablam Yasemin’e ve ağabeyim Mohammed’e, beni hep ileri çeken, yanımda duran kardeşlerim Omar’a ve Majd’a, küçük yaşlarına rağmen bana zor durumlarda destek veren, beni çok seven sevimli kardeşlerim Abdullah ve Maryam’a, bu yolculukta şeker tadını veren arkadaşım Alaa Alsokkary’a ve bana bu kadar kişiye teşekkür etmeme vesile olana teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36437

İÇİNDEKİLER

Tez Onayı.....	III
Beyan.....	IV
İTHAF.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	XI
KISALTMALAR LİSTESİ.....	XII
ÖZET.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kan Dolaşımı Enfeksiyonları.....	2
2.1.1. Tedavi.....	6
2.2. Bakteriyemi/sepsiste en sık etken olan bakteriler.....	7
2.2.1. <i>Escherichia coli</i>	8
2.2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
2.2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
2.2.4. <i>Acinetobacter baumannii</i>	11
2.3. Bakteriyemi/ sepsis tedavisinde kullanılan antibiyotikler.....	12
2.3.1. Beta laktam antibiyotikler.....	12
2.3.2. Sefalosporinler.....	13
2.3.3. Karbapenemler.....	14
2.3.4. Aminoglikozidler.....	15
2.3.5. Florokinolonlar.....	15
2.3.6. Kolistin.....	17
2.3.6.1. Kimyasal yapısı.....	17
2.3.6.2. Etki mekanizması.....	18
2.3.6.3. Etki spektrumu.....	19
2.3.6.4. Direnç mekanizmaları.....	19
2.3.6.5. Kolistine Duyarlılık Testleri.....	20
2.3.7. Tigesiklin.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23

3.1. Gereç:	23
3.1.1. Örnekler:	23
3.1.1.1. Çalışmaya dahil etme kriterleri	23
3.1.1.2. Çalışmaya dahil etmeme kriterleri	23
3.1.3. Kullanılan Besiyerleri	24
3.1.3.1. Kanlı Agar	24
3.1.3.2. Triptik Soy Agar (TSA)	24
3.1.3.3. Mueller Hinton Agar (MHA)	24
3.1.3.4. Katyon- Ayarlı Mueller Hinton Broth (KAMHB)	24
3.1.3.5. Üre Agar	24
3.1.3.6. Üç şekerli besiyeri	25
3.1.3.7. Sitrat Agar (Simmon's-Citrate Agar)	25
3.1.3.8. Voges Proskauer Broth (VP Broth)	25
3.1.3.9. Lizin Dekarboksilaz/ Deaminaz Besiyeri	25
3.1.3.10. MIO (Hareket, İndol ve Ornitin Dekarboksilaz) besiyeri. 25	
3.1.3.5. Gliserol-triptik soy buyyon	25
3.1.4. Antibiyotikler ve Kitler	26
3.1.4.1. Antibiyotik toz maddeleri	26
3.1.4.2. Antibiyotik Diskleri	26
3.1.4.3. Kolistin MİK mikropalak kiti	27
3.1.5. Diğer kimyasal maddeler	27
3.1.6. Kullanılan sarf maddeler	27
3.1.7. Kullanılan cihazlar ve diğer Gereçler	27
3.1.8. Standart suşlar	28
3.1.9. Mastermix	28
3.1.10. Kullanılan primerler	28
3.1.11. Agaroz jeli hazırlanması	28
3.1.12. Elektroforez tampon çözeltisi	29
3.2. YÖNTEMLER	29
3.2.1. Bakteri izolasyonu	29
3.2.2. Antibiyotik duyarlılık deneyleri	29
3.2.2.1. Disk Difüzyon	29
3.2.2.2. Sıvı mikrodilüsyon	31
3.2.2.3. Makrodilüsyon	32

3.2.2.4. Ticari mikrodilüsyon	33
3.2.2.5. Disk elüsyon.....	34
3.2.2.6. Hızlı testler.....	34
3.2.3. Dama Tahta yöntemi	37
3.2.4. Moleküler testler	40
3.2.4.1. DNA ekstraksiyonu.....	40
3.2.4.2. DNA amplifikasyonu	41
3.2.4.3. Agaroz jel elektroforezi	41
3.2.4.4. Agaroz jel görüntüleme	41
3.2.5. İstatistiksel değerlendirme	42
4. BULGULAR.....	44
4.1 İzolatlar	44
4.1.1. Hastaların yaş ve cinsiyete göre dağılımı.....	44
4.1.2. Hastaların altta yatan hastalıklarına göre dağılımı.....	44
4.1.3. İzolatların kliniklere göre dağılımı	45
4.1.4. İzolat türüne göre dağılımı.....	45
4.2. Disk difüzyon sonuçları	46
4.3. Minimal İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) deneyleri	49
4.3.1. Sıvı mikrodilüsyon sonuçları	49
4.3.2. Sıvı makrodilüsyon sonuçları	53
4.3.3. Ticari mikrodilüsyon sonuçları	54
4.3.4. Disk Elüsyon sonuçları	55
4.3.5. Hızlı testler.....	56
4.3.5.1. Hızlı polimiksin Nordman-Poriel (HPNP) testi sonuçları....	56
4.3.5.2. Rezasurine bağlı hızlı polimiksin NP testinin sonuçları.....	57
4.4. Dama Tahtası yönteminin sonuçları	63
4.5. Moleküler deneyler	65
5. TARTIŞMA.....	66
KAYNAKLAR	86
ETİK KURUL KARARI.....	97
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	98
ÖZGEÇMİŞ	100

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. Sepsis ile ilgili terimlerin kısa tanımları.....	3
Tablo 2-2. Sepsis için risk faktörleri.....	4
Tablo 2-3. <i>Enterobacteriaceae</i> ailesinin ortak virülans faktörleri.....	8
Tablo 2-4. <i>P. aeruginosa</i> 'nın virülans faktörleri.....	10
Tablo 2-5. Sefalosporin grupları	13
Tablo 3- 1. Kullanılan antibiyotiklerin inhibisyon zon çapları.....	30
Tablo 3- 2. CLSI ve EUCAST'a göre breakpoint tablosu.....	32
Tablo 3- 3. ASM ve CLSI'a göre ΣFİK İndeksi'nin yorumlanması.....	38
Tablo 4- 1. Hastaların altta yatan hastalıklarına göre dağılımı	44
Tablo 4- 2. <i>K. pneumoniae</i> izolatlarının disk difüzyon yöntemine göre antibiyotik duyarlılıkları.....	46
Tablo 4- 3. <i>E. coli</i> izolatlarının disk difüzyon yöntemine göre antibiyotik duyarlılıkları.....	46
Tablo 4- 4. <i>A. baumannii</i> izolatlarının disk difüzyon yöntemine göre antibiyotik duyarlılıkları.....	47
Tablo 4- 5. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının disk difüzyon yöntemine göre antibiyotik duyarlılıkları.....	47
Tablo 4- 6. Kolistine dirençli izolatların farklı parametrelere göre dağılımı	51
Tablo 4- 7. Suşların BMD yöntemine göre MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ dilüsyonları.....	52
Tablo 4- 8. Tüm izolatların dört yönteme göre kolistin MİK sonuçları.....	59
Tablo 4- 9. Yöntemlere göre suşların MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri.....	62
Tablo 4- 10. Tüm yöntemlerin karşılaştırmalı sonuçları.....	63
Tablo 4- 11. Dama tahtası sonuçlarını gösteren tablo.....	63
Tablo 4- 12. Dama tahtası yönteminin sonuçları ve yüzde oranları.....	64
Tablo 5-1. Kolistin-duyarlılık testleriyle ilgili literatür karşılaştırması.....	76
Tablo 5-2. R-HPNP ve HPNP ile ilgili literatür karşılaştırması.....	80

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2- 1. Polimiksinin tarihçesi.....	17
Şekil 2- 2. Kolistinin kimyasal yapısı.....	18
Şekil 2- 3. Kolistinin etkisini gösteren elektron mikroskop görüntüsü.	19
Şekil 3- 1. Çift disk sinerji testine örnek resim.	30
Şekil 3- 2. Dama tahtası yönteminin örnek grafiği.....	39
Şekil 3- 3. Dama tahtası yönteminin örnek grafiği.....	40
Şekil 3- 4. Kategorik ve esansiyel uyum için örnek tablo	43
Şekil 4- 1. İzolatların hasta cinsiyetine göre dağılımı	44
Şekil 4- 2. Hastaların kliniklere göre dağılımı	45
Şekil 4- 3. Bakteri türüne göre izolatların dağılım oranı.....	45
Şekil 4- 4. Çalışılan disk difüzyon deneyi sonuçlarına ait örnek plak	47
Şekil 4- 5. Tüm izolatların gruplarını gösteren şekil.	48
Şekil 4- 6. <i>Enterobacteriaceae</i> izolatlarında gruplara göre yüzde oranları.....	48
Şekil 4- 7. <i>K. pneumoniae</i> izolatlarında gruplara göre yüzde oranları.	48
Şekil 4- 8. <i>E. coli</i> izolatlarında gruplara göre yüzde oranları.....	49
Şekil 4- 9. Tüm izolatların karbapenemlere direnç oranları.	49
Şekil 4- 10. Çalışılan BMD test sonucu örnek resmi.	50
Şekil 4- 11. Suşların BMD yöntemine göre dilüsyonlardaki dağılımı	52
Şekil 4- 12. Suşların BMD yöntemine göre dilüsyonlardaki dağılımı	52
Şekil 4- 13. Çalışılan makrodilüsyon tüplerini gösteren örnek resmi.	53
Şekil 4- 14. Makrodilüsyon yöntemin BMD ile KU ve EU grafiği.	53
Şekil 4- 15. Çalışılan ticari mikrodilüsyon mikropiğini gösteren örnek resim.	54
Şekil 4- 16. Ticari mikrodilüsyon yöntemin BMD ile KU ve EU grafiği.	55
Şekil 4- 17. Çalışılan disk elüsyon yöntemine örnek.	55
Şekil 4- 18. Disk elüsyon yöntemin BMD ile KU ve EU grafiği.....	56
Şekil 4- 19. Çalışılan HPNP testine ait mikropiğin örneği.	56
Şekil 4- 20. HPNP testinin BMD ile KU ve EU grafiği.	57
Şekil 4- 21. Çalışılan R-HPNP testine ait mikropiğini gösteren örnek resim.	57
Şekil 4- 22. R- HPNP testinin BMD ile KU ve EU grafiği.....	58
Şekil 4- 23. Çalışılan dama tahtası mikropiğini gösteren örnek resim.	64
Şekil 4- 24: Agaroz jel elektroforez görüntüsü.	65

KISALTMALAR LİSTESİ

ASM	American Society of Microbiology
BH	Büyük hata
BMD	Sıvı mikrodilüsyon
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
C-HPNP	Kolistinli hızlı polimiksin NP
CR-HPNP	Kolistinli rezasurine bağlı hızlı polimiksin NP
ÇBH	Çok büyük hata
DD	Disk difüzyon
EU	Esansiyel uyum
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FİK	Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyonu
GSBL	Genişlemiş-spektrumlu β -laktamaz
HPNP	Hızlı polimiksin NP
KAMHB	Kasyon ayarlı Mueller Hinton broth
KRKP	Karbapeneme dirençli <i>K. pneumoiae</i>
KU	Kategorik uyum
LPS	Lipopolisakkarit
MDR-GNÇ	Çoğul dirençli Gram-negatif çomak
MHA	Mueller Hinton agar
MHB	Mueller Hinton broth
MİK	Minimal inhibitör konsantrasyonu
PBP	Penisilin bağlayan protein
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
R-HPNP	Rezasurine bağlı hızlı polimiksin NP
SPS	Sodyum polianetolsufonat
TSA	Triptik soy agar

ÖZET

Alhamwi R. (2021). Kan Kültürlerinden İzole Edilen Çoğul Dirençli Gram Negatif Çomaklarda Farklı Yöntemlerle Kolistin Direncinin Saptanması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Son yıllarda kan kültürlerinden izole edilen çoğul dirençli bakteriler artmaya ve tedavi seçeneklerini kısıtlamaya başlamıştır. Çoğul dirençli suşların etken olduğu enfeksiyonlarda kolistinin kombinasyon şeklinde kullanılması tercih edilebilmektedir. Kolistin direncinin saptanması için sıvı mikrodilüsyon yöntemi altın standart olarak tavsiye edilmiş yöntemdir. Ancak bu yöntem emek yoğun ve zaman alıcı olması nedeniyle rutin laboratuvarlarda uygulanamadığından yeni ve kolay uygulanabilen yöntemlerin geliştirilmesi ihtiyacı ortaya çıkmıştır.

Bu çalışmada 2019 -2020 yıllarında çeşitli kliniklerden gönderilen kan kültürlerinden izole edilen 102 çoğul dirençli Gram negatif çomaklarının kolistine duyarlılığı, dört farklı yöntem (makrodilüsyon, buyyonda disk elüsyon, ticari mikrodilüsyon ve hızlı polimiksin NP testi) ile yapılarak referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon (BMD) yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Ardından kolistine dirençli izolatlarda kolistin-tigesiklin ve kolistin-meropenem kombinasyonları arasında sinerji olup olmadığı dama tahtası yöntemiyle araştırılmıştır. Ayrıca kolistine dirençli izolatlarda PCR ile *mcr-1* direnç geni araştırılmıştır.

BMD yöntemi ile 15 (%15) izolatta kolistin direnci, $MİK_{50}$ ve $MİK_{90} \leq 0.25 \mu g/ml$ ve 16 g/ml olarak saptanmıştır. Denenen tüm yöntemlerde kategorik uyumun çok iyi (%100) olduğu bulunmuştur. Bu yöntemlerle çok büyük hataya rastlanmamasına rağmen makrodilüsyon ve ticari mikrodilüsyon yöntemi en fazla küçük hata veren yöntemlerdir. En iyi esansiyel uyum oranı veren yöntemin disk elüsyon yöntemi olduğu bulunmuştur. Kolistine dirençli izolatlarda kolistin-meropenem kombinasyonu %100 ve kolistin-tigesiklin kombinasyonu %80 oranda sinerjik etki göstermiştir. Kolistine dirençli suşlar arasında *mcr-1* geni saptanmamıştır.

Son zamanlarda kullanılmaya başlanan yöntemler olan disk elüsyon ve HPNP testlerinin, kolistin direncini saptamada en verimli, en kolay, en düşük maliyetli ve en iyi performans gösteren testler olduğu ve rutin kulanıma uygun olduğu saptanmıştır. Çoğul dirençli bakteriyemi/sepsis enfeksiyonlarında kolistin-meropenem kombinasyonunun iyi bir tedavi seçeneği olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kolistin, disk elüsyon, çoğul direnç, sinerji, *mcr-1*

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36437

ABSTRACT

AlHamwi R. (2021). Detecting of Colistin Resistance Via Different Methods in Multi-Drug Resistant Gram Negative Bacilli isolated from Blood Cultures. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Microbiology. Master Thesis. İstanbul.

The isolation of colistin-resistant bacteria from bloodstream has increased for few years, causing therapy failure. It is recommended to use colistin in combination in infections caused by these bacteria. Broth microdilution method is the recommended as a standard method to detect colistin resistance. However this method could not be used in routine laboratories since it is labor-intensive and time consuming; therefore the requirement for new easy methods has emerged.

In this study, susceptibility to colistin of MDR-GNB was studied by macrodilution, disc elution, commercial microdilution, rapid polymyxin NP tests and compared to broth microdilution to evaluate detecting of colistin resistance in MDR-GNB (n=102) isolated from blood cultures sent from different wards in 2019-2020. The combination of colistin with tigecycline and meropenem were then tested by checkerboard method. Additionally *mcr-1* gene was investigated by PCR in colistin resistant isolates.

Resistance to colistin was found to be 15%, MIC_{50} and MIC_{90} were found to be ≤ 0.25 $\mu\text{g/ml}$ and 16 $\mu\text{g/ml}$ by BMD method. The categorical agreement was very well (100%) in four methods no very major errors. However macrodilution and commercial microdilution (Diagnostica 8011) methods showed the highest minor errors rates amongst the four methods. The best essential agreement rate was detected by disc elution method. Colistin-meropenem combination exhibited 100% synergism and colistin-tigecycline 80%. No *mcr-1* genes were detected in colistin resistant isolates.

In conclusion, disc elution and HPNP which those newly developed methods for detecting resistance to colistin were the easiest, cheapest, most efficient and best performing methods, so they are convenient to use in routine laboratory. Colistin-meropenem combination is thought to be an excellent choice to treat bacteremia/sepsis caused by colistin-resistant bacteria.

Keywords: Colistin, multi-drug resistance, disc elution, synergy, *mcr-1*

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 36437

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kan dolaşımı enfeksiyonları sık rastlanan bakteriyel enfeksiyonlardan biridir. İnsan kan dokusunda herhangi bir canlı bakterinin bulunması, bakteriyemi olarak adlandırılır [128]. Konak savunması normal olan bireylerde immün sistem bakteriyeminin üstesinden gelebildiği halde, risk faktörlerinin olduğu bazı durumlarda bakteriler kan akımına karışarak tüm vücuda yayılabilir. Sepsis olarak adlandırılan bu klinik durum, vücudun enfeksiyona karşı inflamatuvar yanıt oluşturmaya, kendi doku ve organlarına zarar vermesine, dolayısıyla yüksek morbidite ve mortaliteye neden olabilmektedir [95, 166].

Son yıllarda geniş spektrumlu antibiyotiklerin artan oranda kullanımı, kandan izole edilen bakterilerin çeşitli antibiyotiklere direnç kazanmasına ve dirençli bakterilerle oluşan kan akımı enfeksiyonlarında tedavi başarısızlığına neden olmaktadır [129].

Artan antibiyotik direnci nedeniyle çoğul-dirençli Gram-negatif çomak enfeksiyonlarında tedavi seçeneği olarak kolistin kullanılmaya başlanmış, ancak son yıllarda kolistine de direnç gösteren bakteriler izole edilmeye başlanmıştır. Böyle suşların neden olduğu enfeksiyonlarda kolistin kombinasyon şeklinde kullanılması tercih edilmektedir [130].

Kolistin duyarlılığının saptanması için tavsiye edilen altın standart yöntem, sıvı mikrodilüsyon (BMD) yöntemidir. Bu yöntem emek yoğun ve zaman alıcı olması nedeniyle rutin laboratuvarlarda uygulanamadığından yeni ve kolay uygulanabilen yöntem arayışları ortaya çıkmıştır [121].

Bu çalışmada, 2019-2020 tarihleri arasında İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesinin çeşitli kliniklerinden Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen kan kültürlerinden izole edilen 102 çoğul-dirençli Gram negatif çomak izolatında kolistin direncinin makrodilüsyon, buyyonda disk elüsyon ve ticari mikrodilüsyon ve hızlı polimiksin NP testleriyle saptanması ve sonuçların altın standart yöntem olan sıvı mikrodilüsyon ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca kolistine dirençli suşlarda kolistin, meropenem ve tigesiklin ile kombinasyonlarının etkinliği araştırılmış, kolistin direncine neden olabilen *mcr-1* geni varlığı PCR ile araştırılarak veri tabanına katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kan Dolaşımı Enfeksiyonları

Bir mikroorganizma çevreden vektörler aracılığıyla ya da konağın kendi florasından çeşitli yollarla normalde steril olan kan dokusuna girdiğinde, konak savunma sistemi, patojen mikroorganizmaların invazyonuna karşı inflamatuvar yanıt oluşturmaktadır [37, 148]. Enfeksiyon hastalıklarının mortalite ve morbidite oranının yüksek olmasının ana sorumlusu kan dolaşım enfeksiyonlarıdır [78].

Kan dolaşımı enfeksiyonlarında tedaviye erken başlanması mortaliteyi önemli derecede etkilediğinden, etken mikroorganizma tanımlanması ve uygun tedavinin başlanması, tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarının geciktirilemeyecek en önemli işlerinden biridir [32].

İnsan kan dokusunda herhangi bir canlı bakterinin bulunması, bakteriyemi olarak tanımlanmaktadır [160]. Bakteriyemi, geçici, aralıklı ve sürekli bakteriyemi olmak üzere üç şekilde ortaya çıkabilir [148]:

Geçici bakteriyemi: Birkaç dakika ile birkaç saat süren tek epizoddan oluşan bakteriyemilerdir. Bu tür bakteriyemiler dış fırçalama gibi günlük yaşam aktiviteleri, dış çekimi gibi cerrahi girişimler ya da bağırsak hareketleri gibi normal biyolojik olaylar yoluyla az sayıda bakterinin kan akımına girmesiyle oluşmakta olup konağın bağışıklık sistemi tarafından ortadan kaldırılmakta, ancak bazı hastalarda geçici bakteriyemi, endokardite neden olabilmektedir [148, 166].

Aralıklı bakteriyemi: Aralıklı şekilde kan akımına karışan bakteriler ile oluşan bakteriyemilerdir. Bu tür bakteriyemiler etken bakterilerin abse, pnömoni veya kemik enfeksiyonu bölgesinden aralıklı olarak kana geçmesiyle ortaya çıkmaktadır. Bu döngü, enfeksiyon tedavi edilene kadar tekrarlanabilmektedir [130, 148].

Sürekli bakteriyemi: İnfektif endokardit ve enfekte introvasküler kateter başta olmak üzere yabancı cisimler üzerinde oluşan biyofilmler, bakterilerin kan akımına geçmesine yol açarak sürekli bakteriyemilere neden olmaktadır. Bakteriyeminin damar içi enfeksiyonlarla ilgili bu formu klinik açısından tehlikeli bir potansiyele sahiptir [148].

Bakteriyemi, tedavi edilmediği takdirde sepsis gibi komplikasyonlara ilerleyebilmektedir [95].

Yunan dilinden köken alan “sepsis” sözcüğü, “bozulma, çürüme” anlamına gelmektedir. Bu sözcük yaklaşık 2700 yıldır kullanılmasına rağmen sepsis 20.yüzyılda anlaşılıp tanımlanmaya başlamıştır. Sepsis tanımı hakkında fikir birliği oluşturma yaklaşımları yıllarca sürmüştür, son olarak 2016 yılında yeniden tanımlanmıştır (Tablo2-1) [146].

Tablo 2-1. Sepsis ile ilgili terimlerin kısa tanımları.

Terim	Kısa Tanım	Kriterleri
Sepsis	Enfeksiyonla ilişkili olarak gelişen konağın sistemik inflamatuvar yanıtı	- Mental durumda değişiklik. - Sistolik kan basıncı <100mmHg - Solunum hızı >22/dk
Septik Şok	Sepsisin mortaliteyi arttıran, dolaşım ve hücrel metabolizma anormalliği gösteren şekli	Tedaviye rağmen: - Kan laktatı ≥ 22mmol/L - Düşük tansiyon (≥ 65mmHg)
Organ Yetmezliği Sendromu	Konağın organlarında ortaya çıkan hasar	SOFA skoru (≥ 2 puan): -Hipotansiyon ≤ 100 mmHg (1 puan) -Bilinç bozukluğu (1 puan) - Solunum hızı ≥ 22/dk (1 puan)

[136, 154]

Sepsis, “enfeksiyonla ilişkili olarak gelişen konağın sistemik inflamatuvar yanıtı” olarak tanımlanmaktadır. Bu abartılı kontrolsüz yanıt, vücudun kendi doku ve organlarına zarar vererek organ yetmezliğiyle sonuçlanabilmekte, buna bağlı olarak yüksek morbidite ve mortalite oluşmakta, ayrıca hastanede yatış süresinin ve hastane maliyetlerinin artmasına yol açmaktadır [39, 154].

Sepsis nedeniyle meydana gelen can kayıpları her yıl artarak dünya çapında ciddi sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Uluslararası Sepsis Birliği (Global Sepsis Alliance-GSA)’ne göre, her yıl 47-50 milyon kişide sepsis tablosu gelişmektedir. Ayrıca 11 milyon kişinin sepsis nedeniyle hayatını kaybettiği bildirilmiştir. Bu verilere göre sepsis dünyada her 3-4 saniyede bir kişinin hayatını kaybetmesine neden olmaktadır [132]. Ağır bir klinik tablo olan sepsisin Türkiye’de her yıl 150-200 bin kişinin ölümüne sebep olduğu bildirilmiştir [95, 172].

Sepsis, çoğunlukla yoğun bakım ünitelerinde ve hastanede yatan hastalarda (hastane kaynaklı sepsis) gelişmesine rağmen hastane dışındaki (toplum kaynaklı sepsis)

bireylerde de gelişebilmektedir. Hastane kaynaklı sepsis/ bakteriyemi, hastanın hastaneye yatışından sonraki ilk 48 saatte ortaya çıkan enfeksiyonlar olarak tanımlanmaktadır [78]. Diğer yandan hastane-kaynaklı sepsisler aşırı antibiyotik kullanımı, immünosupresif tedavi, transplantasyon ve kateterizasyon gibi prosedürlere bağlı olarak hastane ortamında gelişmektedir [14, 148]. Genel olarak solunum sistemi ve üriner sistem enfeksiyonları toplum-kaynaklı sepsislerin en sık rastlanan kaynağını oluştururken hastane-kaynaklı sepsisler, damar içi ve üriner kateterlere bağlı enfeksiyonlardan kaynaklanmaktadır [148]. Sepsis için risk faktörleri Tablo 2-2’de verilmiştir [174].

Tablo 2-2. Sepsis için risk faktörleri.

Kronik hastalıklar	Maligniteler, diyabet, HIV (insan immün yetmezlik virusu), aspleni
İlaçlar	İmmünosüpresif kemoterapi, geniş-spektrumlu antibiyotikler
Enfeksiyonlar	Üriner sistem, intrabdominal, deri ve alt-solunum-yolu enfeksiyonları, infektif endokardit
Travma	Yanıklar ve yaralar
Hastanede müdahale	Tıbbi girişimle (kateterler, ventriküloatrial şantlar, sondalar, prostetik kalp kapakçıkları gibi), doku ve organ transplantasyonu
Yaş	65 yaş ve üzeri yaşlılar, pediatrik hastalar
Cinsiyet	Genellikle erkeklerde kadınlara göre daha sık görülmektedir
İrk	Beyazlara göre siyah ırkta sepsisin görülme oranı daha yüksektir

Sepsis etiyolojisinde çeşitli bakteriler etken olabilmektedir. Gram-negatif bakterilere bağlı sepsis ve bakteriyemiye 1980’li yıllardan önce sık rastlanmasına rağmen, son 30 yılda sepsiste Gram-pozitif bakteriler daha sık izole edilmeye başlanmıştır. Buna rağmen Gram-negatif bakteriler sepsisteki mortalite ve morbiditenin yüksek oranlarından önemli ölçüde sorumlu olmaya devam etmektedir [95].

Gram-pozitif etkenli sepsisler, genellikle deri florasından, yumuşak doku hasarı, yara enfeksiyonu ve kateterlerden kaynaklanırken, Gram-negatif etkenli sepsisler daha çok üriner sistem ve gastrointestinal sistem enfeksiyonlarından kaynaklanmaktadır. Gram-negatif etkenli sepsislerden en sık izole edilen Gram-negatif bakteriler *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. *Enterobacter* spp., *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* olarak sıralanabilir. Gram-pozitif bakteriler salgıladığı ekzotoksinler ile sepsise neden

olurken, Gram-negatif bakteriler hücre duvar yapısında bulunan endotoksinler ile septik şoka neden olabilmektedir [99].

Geçmiş yüz yıllarda Gram-negatif etkenli sepsisin oluşum mekanizması hakkında yeterli bilgi bulunmamakla beraber 19.yüzyılın sonuna doğru Gram-negatif bakterilerde toksik maddeler bulunduğu ve bu toksinlerin deney hayvanlarında toksik şoka neden olduğu gösterilmiştir. Isı-stabil olan bu toksin, “endotoksin” olarak adlandırılmaktadır [65, 138].

Endotoksin, 1930’li yıllarda Gram-negatif bakteri hücre duvarından izole edildiğinde duvarın lipopolisakkarit (LPS) bileşenlerinden olduğu anlaşılmıştır. Gram-negatif hücre duvarı lipopolisakkaridi, uzun polisakkarit zinciri olan O antijeni, kor polisakkaridi ve lipit A olmak üzere üç immünojenik bileşenden oluşur. Endotoksin olarak da adlandırılan lipit A, estere bağlı glukozamin; hem estere, hem de amide bağlı pirofosfat ve yağ asitlerinden oluşmaktadır, (Şekil 2-1) [91].

Bakteri hücresinin otolizisi sonucunda endotoksinin serbest bırakılması, immün yanıtı uyarak B hücrelerinin aktive olmasını sağlamakta, makrofajlar, monositler ve diğer hücreler indüklenmektedir. Endotoksinler, septik şoka neden olmaktadır. İnsan vücudu endotoksine aşırı maruz kaldığında doku ve organlarda anormalliğe ve dolayısıyla organ fonksiyon bozukluğuna yol açabilmektedir. Bu durum immün sistem dahil tüm sistemlere etki edebilmektedir [95, 99].

Bakteriyemi/sepsis, %25 den fazla oranda mortalite ile sonuçlanabildiğinden, özellikle yoğun bakımdaki hastaların hayatını tehdit etmekte ve hastanede yatış süresini ve maliyetleri arttırmaktadır [95, 128].

Erken tedavinin başlatılması için hasta kanındaki bakteriyel etkenin saptanması ve antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanması son derece önem taşımaktadır [108]. Buna olanak sağlayan kan kültürü, bakteriyemi/sepsiste altın standart olarak kabul edilmektedir [25]. Son zamanlarda geliştirilen farklı moleküler yöntemlere rağmen kan kültürü, bakteriyemi etkenlerini saptayabilen en pratik ve en güvenilir yöntem olmaya devam etmektedir [39, 108].

Kan kültürü yöntemi 20.yüzyılın başında manuel şekilde uygulanarak başlamış, 1970’li yıllarda Johnston Laboratories tarafından otomatize kan-kültür sistemleri geliştirilmiş, daha sonra farklı prensiplere dayalı çeşitli sistemler ortaya çıkmaya

başlamıştır [134]. Bu sistemlerden bazıları (BacT/ALERT, Bactec 9000 serisi) kan-kültür şişesi içinde bakteri ürediğinde CO₂ oluşumuna bağlı olarak değişen pH değerine dayanırken, bazıları da (Versa TREK sistemi) sadece oluşan gazlara değil, aynı zamanda tüketilen gazların konsantrasyonlarına dayalıdır [39, 131]. Yeni geliştirilen Bactec FX sistemleri kan kültürü şişelerinin içinde CO₂ konsantrasyonu arttığında floresan ışık yayabilen algılayıcı madde içermektedir. Sistemin içinde ışık değişimlerini algılayan duyarlı diyot vardır. Bu diyodun yardımıyla sistem, mikroorganizma üremesine bağlı olarak yayılan floresan ışıkları ölçerek pozitif sinyal verir. Bu olay, hastanın kanında bakteri bulunduğunu göstermektedir [39, 108, 131, 165].

Ülkemizde mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakteriyemi tanısında otomatize kan-kültür sistemlerinin ilk kez kullanılması 1998 yılında başlamıştır, daha önceleri yarı-otomatik sistemi kullanılmıştır [141].

Hastadan kan alımı esnasında cilt antisepsisi yetersiz kaldığında, şişe içinde hastanın kanında olmayan, ancak cilt florası bakteriler üreyebilmektedir. Sadece kan alırken değil, laboratuvar işlemleri sırasında da kontaminasyon ortaya çıkabilmektedir. Kan kültürü sistemleri, gerçek patojenleri tanımlamasına rağmen, %2-3 oranında etken olmayan mikroorganizmaların da saptanmasına yol açabilmektedir. Bu mikroorganizmaların kontaminasyon olduğu düşünülmektedir. Ancak bu bakteriler bazı durumlarda etken olabildiğinden etken/kontaminat ayırımının iyi yapılması gerekmektedir [35].

2.1.1. Tedavi

Kan dolaşım enfeksiyonları için uygun ve etkili tedaviyi bulmak, her zaman önemli bir tıbbi öncelik olmuştur [154].

Gram-negatif bakterilerle oluşan sepsis, ilk 48 saatte tedavi uygulanmadığında yaklaşık %50 ölümle sonuçlanabildiğinden, acilen tedaviye başlanması gerekmektedir. Ancak kan kültürü ve antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuçları 48 saatten önce saptanmadığından klinisyenin geniş spektrumlu antibiyotiklerle tedaviye başlaması, daha sonra antibiyotik duyarlılık testleri sonuçlandığında izole edilen bakteriye uygun tedavinin ayarlanması tavsiye edilmektedir [122].

Gram-negatif etkili sepsislerde genellikle aminoglikozid ve geniş spektrumlu sefalosporinler gibi iki ajan kombine şekilde kullanılmaktadır. Öte yandan, antibiyotik kullanımı çok sayıda bakteri hücresinin otolizisine ve dolayısıyla kandaki endotoksin

miktarının artmasına yol açabilmektedir. Bu yüzden septik şokta endotoksini ve sitokinleri nötr hale getirebilen bir tedaviye başvurmak gerekmektedir [154]. Bir hastada sepsis veya septik şok göstergeleri fark edildiğinde başlangıç tedavisi olarak olası patojenlere etki gösterebilen geniş spektrumlu tedavi veya ampirik kombinasyon tedavisinin uygulamasının uygun olduğu düşünülmektedir. Bu tedavinin, bazı hastalarda daha kısa sürebilmekle birlikte, genellikle 7-10 gün devam etmesi uygundur. Ayrıca sepsisin olası kaynağını belirlemede önemli derecede yardımcı olmaktadır. Kaynağın intravasküler kateter olduğu düşünülürse hemen çıkartılması ve başka damar yolunun sağlanmasında fayda görülmektedir [116].

2.2. Bakteriyemi/sepsiste en sık etken olan bakteriler

Daha önce de bahsediliği gibi sepsis etiyojisinde çok çeşitli Gram-negatif bakteriler etken olabilmekle beraber *E. coli* ve *K. pneumoniae* en sık etkenler listesinin başında yer almaktadır [78]. Gram-negatif bakterilerde antibiyotik direnci her geçen gün artmakta olup hastanelerde ve sağlık kurumlarında bakteriyemi ve diğer enfeksiyonların tedavisinde klinisyenler için ciddi zorluklar ortaya çıkmaktadır [147].

Enterobacteriaceae türleri bakteriyemilerin %33'ünden sorumlu tutulmaktadır. Son dönemlerde ciddi anlamda artan antibiyotik direnci, bu bakterilerin dünya çapında önemli sağlık sorunu oluşturmalarına neden olmuştur [58, 103, 127, 130].

Fermentatif Gram negatif çomakların sınıflandırılmasında daha önce kullanılan nükleik asitlere dayalı sınıflandırma yöntemi verimli olmadığından, filogenetik analiz ile korunmuş moleküllere karakteristik analizler uygulanarak yeni bir sınıflandırma yapılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre *Enterobacteriaceae* ailesi, *Gammaproteobacteria* sınıfı ve *Enterobacterales* takımı içinde yer almaktadır. [1, 90, 139].

Mikroskop altında sporsuz Gram-negatif çomaklar şeklinde görünen *Enterobacteriaceae* ailesi bakterileri, 25-37°C'de, 4.0-8.0 pH, %0-5 arası tuz konsantrasyonu içeren, aerob ve anaerob ortamlarda, zengin ve seçici besiyerlerinin yanı sıra basit besiyerlerinde bile üreyebilmektedir. Bu ailenin altında sınıflandırılan tüm bakteri türleri ve alt türleri glukozdan fermentasyonla asit oluşturabilme, nitratı nitrite çevirme, indol oluşumu ve sitokrom C oksidazı üretmeme (*Plesiomonas* türleri hariç) özelliklerini paylaşmaktadır. Ayrıca tümü benzer dış membran yapısına ve virülans faktörlerine sahiptir [58, 103].

Biyokimyasal özellikler, nükleik asit içeriği ve filogenetik özelliklerin yanında somatik O antijeni, kirpik veya kapsül antijeni ile temsil edilen bakteriyel antijenik yapı, *Enterobacteriaceae* türlerinin sınıflandırılmasında önemli rol oynar [58, 103, 127, 130]. *Enterobacteriaceae* ailesinin ortak virülans faktörleri Tablo 2-3’de görülmektedir [26, 103, 159].

Tablo 2-3. *Enterobacteriaceae* ailesinin ortak virülans faktörleri.

Virülans faktörü	Fonksiyonu	
Yüzey organelleri	Fimbria veya pili	Bakterinin mukozaya tutunmasını sağlar
Toksik aktivite	Endotoksin	Ateş ve şoka neden olur
	Enterotoksin	Bağırsak epitel hücrelerine saldırarak diyareye yol açar
	Şiga toksin ve benzeri toksinler	Hedef konak hücrelerinde protein sentezini inhibe ederek diyareye yol açar
	Hemolizinler	Eritrositlerin hücre duvarının parçalanmasına neden olur, lenfositlere ve nötrofillere etki ederek fagositozu önler
Üreme faktörleri sağlama	Sideroforlar	parçalanmış konak hücrelerdeki demiri bağlayarak bakteri metabolizması için gerekli demiri sağlar
Koruma	Kapsül	Bakteriyi fagositozdan korur
Plazmitler	Antibakteriyel direnç	Plazmitler aracılığıyla antibiyotik direncinin ve diğer virülans faktörlerinin yayılımını sağlar
Toksik maddelerin etkili aktarımı	Tip III sekresyon sistemi	Bakterinin, etkili proteinleri hedef hücrenin sitoplazmasına direkt enjekte etmesini sağlar
Çevreye adapte olma	Faz değişimi	Fimbria, pili ve kapsül gibi yüzey organellerinin yapısını değiştirerek ortam değişikliklerine adapte olmayı sağlar

2.2.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli, kan dolaşım enfeksiyonlarının yaklaşık %17-37’sinden sorumludur [98]. Bu oran, *E. coli*’nin bakteriyemi ve sepsiste etken olarak en sık izole edilen Gram-negatif bakteri olduğunu göstermektedir [78]. *E. coli*, ilk defa 1885 yılında Alman çocuk doktoru Theodor Escherich tarafından diyareli çocuğun dışkılarından izole edilerek tanımlanmıştır [93]. İnsan bağırsak florası üyesi olan bu bakteri, sadece kan dolaşım enfeksiyonlarına değil aynı zamanda gastrointestinal sistem enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları ve menenjit gibi çok çeşitli toplum/ hastane-kaynaklı enfeksiyonlara yol açmaktadır. Oluşturduğu hastalıkların çoğu endojen kaynaklı olup lokal enfeksiyonlardan hayatı tehdit eden ciddi enfeksiyonlara kadar ilerleyebilmektedir [93]. *E. coli* hemen hemen her doku ve organda enfeksiyon yapabilmektedir. Bu bakterinin

çeşitli patotipleri diyare, sepsis, gastrointestinal sistem enfeksiyonları ve menenjitin yanı sıra selülit, yara ve yanık enfeksiyonları, kemik iliği iltihabı ve miyozit oluşturabilmektedir. Ayrıca bazen sinüzite, nadiren endokardite ve beyin absesine neden olabilmektedir [118].

2-6 µm boyunda ve 1-1,5 µm eninde basil şeklindeki *E. coli*, glikoz, laktoz ve sukroz gibi şekerleri çoğunlukla gaz oluşturarak fermente etmektedir. Ancak nişasta fermentasyonundan gaz oluşturamamakta ve sülfatları ayrıştıramayıp hidrojen sülfür (H₂S) meydana getirmemektedir. İndol ve metil kırmızısı testleri pozitif olmasına karşın Voges Proskauer testi negatiftir. Sitratlı besiyerinde ürerken üreli besiyerinde üreyememektedir [11, 58, 124].

Kanlı agar besiyerinde 1-2mm çapında S tipi koloniler şeklinde üreyen *E. coli* laktozu kullanmasına bağlı olarak, MacConkey agar besiyerinde pembe kırmızı renkli koloniler şeklinde görünmektedir. Kanlı agarda genellikle hemoliz yapmamasına rağmen bazen hemolizli koloniler gösterebilmektedir [11, 58, 124].

2.2.2. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae Gram-negatif bakteriyemilerde *E. coli*'den sonra en sık izole edilen bakteridir [7].

Klebsiella cinsi bakteriler hareketsiz, spor oluşturmayan kapsüllü bakterilerdir. 1-2 µm boyunda ve 0.5-0.8 µm eninde olan *K. pneumoniae*'nin üremesi için gerekli optimum sıcaklık 37°C ve optimum pH 7,0'dir [58].

Laboratuvarda izolasyonların uygulanan testlerden laktoz ve Voges–Proskauer testi pozitifdir. Diğer *Klebsiella* türlerinden *K. pneumoniae*'yı ayıran indol negatif, ornitin dekarboksilaz pozitif olmasıdır. Ayrıca glukoz fermentasyonu sonucunda gaz oluştururlar. Sitratı kullanır ve üreaz pozitifdir. Koyun kanlı agarda ve üreyebildiği diğer besiyerlerinde mukoid, büyük S tipi, bazen de R tipi koloniler oluşturmaktadır [7, 58, 103].

Klebsiella pneumoniae suşları ampisiline intrinsik dirençli olmasının dışında, geniş spektrumlu β-laktamaz ve karbapenemaz enzimlerini kodlayan genleri plazmitler ile kazanabilmektedir. Bu nedenle hastane kaynaklı ciddi enfeksiyonlara yol açmaktadır [58].

2.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas cinsi *Gammaproteobacteria* sınıfı, *Pseudomonadales* takımı, *Pseudomonadaceae* ailesinde yer almaktadır [139]. *Pseudomonas aeruginosa*, spor oluşturmeyen, polar flagellaya sahip ve 0.5-1.0 µm eninde 1.5-5.0 µm boyunda olup ilk defa 1882 yılında izole edilmiştir [60]. *P. aeruginosa* kulak, göz, yara ve yanık enfeksiyonlarından, üriner sistem enfeksiyonları, pnömoni, bakteriyemi ve menenjitte kadar farklı seviyelerde ciddi hastalıklardan sorumlu tutulmuştur. Geniş bir genoma sahip olan *P. aeruginosa*, virulansını arttıran adezinler, toksinler, enzimler ve antimikrobiyal direnci kodlayabilen çeşitli virülans genleri geliştirmiştir [104]. Bu nedenle tedavide iki farklı antibiyotik grubuna ait ajanların kullanılmasında fayda olduğu düşünülmektedir [12].

Pseudomonas türleri, Gram-negatif bakteriyemi etkenleri arasında üçüncü sırada yer alır. Özellikle kanserli ve bağışıklığı baskılanmış hastalarda hayatı tehdit eden bakteriyemilerden sorumludur. Son yıllarda *P. aeruginosa*'nın sorumlu olduğu bakteriyemilerde, diğer Gram-negatif bakteriyemilere kıyasla yüksek mortalite oranları kaydedilmiştir [12].

Pseudomonas cinsinde 166 tür bulunmaktadır. *P. aeruginosa*, aerop, kapsüllü, non-fermentatif Gram-negatif bakteridir [61]. *P. aeruginosa* hareketli olma, enerjiyi şekerleri fermente ederek değil oksidasyon yaparak temin edebilme, alternatif son elektron alıcısı kullanarak anaerob koşullarda üreyebilme, 25-37°C'de iyi üremesine rağmen 4-42°C'de de üreyebilme ve çeşitli antibiyotiklere doğal dirençli olma yetenekleri nedeniyle bitki, toprak, su, nemli ortamlar, kuru zeminler, respiratörler, hastaneler, dezenfektanlar, musluklar vb ortamlarda uzun süre canlılığını sürdürebilmektedir [104, 164]. *P. aeruginosa*'nın virülans faktörleri Tablo 2-4'de görülmektedir [74, 110].

Tablo 2-4. *Pseudomonas aeruginosa*'nın virülans faktörleri.

Virülans faktörü	Patogeneze	
Adezinler	Flagella ve pili	Kolonizasyon ve epitel hücrelerine tutunma
	LPS	Konak hücrelerine tutunma
	Aljinat	Tutunma, fagositoz ve antibiyotiklerden koruma
Toksinler	Endotoksin A	Konak hücrelerinde protein sentezini inhibe etme
	Piyosiyanin	O ₂ radikallerinin üretimini artırma
	Piyoverdin	Siderofor etkisi

Enzimler	Elastaz	Elastini parçalayarak akciğer hasarına ve nekroza yol açma
	Fosfolipaz C	Eritrositlerin hemolizi ve doku yıkımı
	Ramnolipit	Hemolitik etki
	Ekzoenzim S	Solunum yolu epitel hücrelerine tutunma
Doğal direnç		Ampisilin, amoksisilin –klavulanik asit, ampisilin-sulbaktam, sefazolin, sefalotin, sefalekssin, sefadroksil, sefotaksim, seftriakson, ertapenem, kloramfenikol, trimetoprim, tetrasiklinler, tigesiklin.

Pseudomonas aeruginosa, katı besiyerlerinde aromatik meyve kokusu yayan S tipi koloniler oluşturmaktadır. Floresan özelliğe sahip bu bakteri piyosiyenin, piyoverdin, piyorubin ve piyomelanin olmak üzere dört farklı pigment üretmektedir. *P. aeruginosa*'ya özgü piyosiyenin, mavimsi yeşil renkte görünmekte ve su ile kloroformda erirken, yeşilimsi floresan renkteki piyoverdin sadece suda erimektedir Mueller-Hinton ve Mac Conkey agar üzerinde bu pigmentleri rahatlıkla fark edilmesi, tanımlamada önemlidir. Koyun kanlı agarda hemolizli koloniler ve Mac Conkey agar besiyerinde R tipi mukoid koloniler oluşturmaktadır. Şekerleri fermente edemezken glikozu okside ederek, asit oluşturabilmektedir. Katalaz, oksidaz, arginin dehidrolaz, jelatin hidrolizi testleri pozitifdir. Lizin ve ornitin dekarboksilaz, indol, H₂S oluşumu, metil kırmızısı ve Voges-Proskauer testleri negatifdir [58].

2.2.4. *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter türleri, bakteriyemilerin %8.4'ünden sorumlu tutulmakta ve klinik örneklerden en sık *A. baumannii* izole edilmektedir [16].

Hareketsiz, sporsuz, Gram-negatif kokobasil olan *Acinetobacter* cinsi bakteriler 1800'lü yıllarda keşfedilmesine rağmen, *A. baumannii* 1911'de Berijerinck tarafından ilk defa izole edilmiştir [119]. Bu cinse ait bakteriler 1954 yılında "*Acinetobacter*" olarak isimlendirilene kadar, farklı isimler almış, daha sonra *Moraxellaceae* ailesi içinde yer almıştır. *Acinetobacter* türlerinin *in vitro* tanımlanması, biyokimyasal ve üreme özelliklerine dayanmaktadır. Buna bağlı olarak *A. baumannii*, *Gammaproteobacteria* sınıfı, *Pseudomonadales* takımı, *Moraxellaceae* ailesinde yer almaktadır [13, 106].

Zorunlu aerob, şekerleri fermente etmeyen, 35-37°C'de iyi üreyebilen *Acinetobacter* cinsi bakteriler, hem nemli hem de kuru ortamlarda yaşamını

sürdürebilmesine bağlı olarak doğada, toprakta, suda ve aynı zamanda hastane ortamında da bulunmaktadır. Yüzeyle yapışma yeteneğine sahip olmasından dolayı tıbbi aletlere ve hastane çevresindeki yüzeyle tutunabilmektedir. İnsan normal flora üyesi sayılmamasına rağmen, bazı insanların ağız ve tonsillerinde kommensal olarak yaşamaktadır. Katalaz testi pozitif iken oksidaz ve indol testleri negatiftir, nitratları nitrite indirgemezler [58, 104].

Acinetobacter baumannii'nin genetik yapısı, antibiyotiklere hızlı direnç geliştirmesini sağlamaktadır. Bundan dolayı çoğu antibiyotik gruplarına duyarlı değildir. Ayrıca bakteriyi fagositozden koruyan polisakkarit kapsül, toksik etkiye sahip endotoksin ve bakteriyi kuruluğa karşı koruyan biyofilm oluşumu, bakterinin en önemli virülans faktörleridir. Antibiyotik direnci, virülans faktörleri ile beraber *A. baumannii*'yi zorlu bir bakteri kılmıştır [3, 104].

Nozokomiyal enfeksiyonlarla ilişkili olan *A. baumannii*, bakteriyeminin yanı sıra pnömoni, sepsis, menenjit, endokardit ve idrar yolu enfeksiyonları gibi birçok hastalığa neden olabilmektedir [104].

2.3. Bakteriyemi/ sepsis tedavisinde kullanılan antibiyotikler

Antibiyotiklerin enfeksiyonlara karşı kullanılması, sulfonamidlerin keşfedilmesi ve penisilinlerin tedavide etkisinin anlaşılmasıyla 1940 yıllarında başlamıştır. Bundan sonraki yıllarda farklı gruplara ait yeni antibiyotikler geliştirilmiş ve tedavide kullanılmaya başlanmıştır [149].

2.3.1. Beta laktam antibiyotikler

β -laktamlar, penisilin-bağlayan-proteinleri (PBP) hedef alarak bakteri hücre duvarındaki peptidoglikan sentezini engellemekte ve bakteri hücresinin otolizis ile çözünmesine yol açmaktadır [16, 115].

Bakteriler beta laktam antibiyotiklere karşı çeşitli mekanizmalarla direnç geliştirmektedir. Bunlar;

- β -laktam halkasına bağlanarak ilacı etkisiz hale getiren β -laktamaz enzimlerinin üretimi (Beta laktamazlar; antibakteriyel aktivite için temel

yapısı olan üç karbon ve bir nitrojen atomundan oluşan ve β -laktam halkası olarak adlandırılan yapıya sahiptir), [115].

- Bakteri intraselüler ortamından β -laktamlar gibi antibiyotikleri dışarıya atma yeteneğine sahip transport proteinlerinden oluşan effluks pompaları,
- β -laktamların hedefi olan PBP'lerin yerini değiştirerek onlara ulaşmasını engelleme,
- Antibiyotiğin bakteriyel dış membrana tutunmasını, dolayısıyla membrandan geçişini engelleyerek β -laktamların hedef PBP'lere ulaşmasını engelleyen mekanizmalardır [115, 142].

2.3.2. Sefalosporinler

Sefalosporinler, *Cephalosporium* adlı küf mantarının fermentasyon ürünlerinden izole edilmiştir. Bu ajanlardaki β -laktam halkası dihidrotyazin halkası ile kaynaşmış bulunmaktadır. Geniş-spektrumlu etkisi nedeniyle çok yaygın kullanılan bu antibiyotikler ilk defa 1964 yılında klinik kullanıma sunulmuştur [40, 105].

Sefalosporinler, keşfine ve etki spektrumuna göre Tablo 2-5.'de belirtilen beş gruba ayrılmaktadır [16, 110]

Tablo 2-5. Sefalosporin grupları

Sefalosporin grubu	Etki spektrumu	Örnek ajanlar
Birinci kuşak	<u>Dar-spektrumlu</u> : Gram-pozitif kokların çoğu, Gram-negatif bakteriler	Sefazolin, sefalekssin, sefadroksil
İkinci kuşak	<u>Geniş-spektrumlu</u> : <i>Haemophilus influenza</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Bacterioides spp.</i>	Sefuroksim, sefoksitin, sefakor, sefotetan

Üçüncü kuşak	<u>Genişlemiş-spektrumlu:</u> <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Neisseria spp.</i> , <i>Haemophilus influenza</i>	Sefotaksim, sefiksim, sefopodoksim, seftiofor, seftazidim, sefriakson, sefovesin.
Dördüncü kuşak	<u>Genişlemiş-spektrumlu:</u> β - laktamazlara dirençli Gram-negatif bakteriler	Sefepim
Beşinci kuşak	Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> , penisiline-dirençli <i>S. pneumoniae</i>	Seftarolin, seftobiprole

Birinci ve ikinci kuşak sefalosporinler basit cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, kan dolaşımı, solunum sistemi, kemik, genitoüriner sistemi, safra yolu enfeksiyonları ve orta kulak iltihabı tedavisi için kullanılmaktadır. Bu iki kuşak ajanlara dirençli Gram-negatif bakterilerin ve menenjitin tedavisinde üçüncü kuşak sefalosporinler kullanılmaktadır. Dördüncü kuşak sefalosporin olan sefepim; β -laktamaz üreten Gram-negatif çomakların neden olduğu enfeksiyonlarda kullanılmaktadır [105, 175].

2.3.3. Karbapenemler

Karbapenemler, β -laktam halkasına bağlanan beş-karbonlu tiazolodin halkasından oluşan tienamisin türevileridir. Karbapenemlerin yapısı, geniş-spektrumlu β -laktamazların (GSBL) lizisine karşı korunmasına, bakterinin dış membranından nüfuz edebilmesine ve birçok PBP'ye bağlanma eğiliminin artmasına, dolayısıyla Gram-negatif ve pozitif, aerop ve anaerop bakteriler üzerine geniş-spektrumlu etkiye sahip olmasına neden olmaktadır. Karbapenemleri diğer beta-laktam antibiyotiklerden ayıran kimyasal farklılık beta-laktam halkasındaki tiyazolidin halkasını 4. pozisyonda sulfon yerine karbon içermesidir [16, 115].

Karbapenem ajanlardan biri olan imipenem farklı bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonlarda çok yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak enterik bakterilere karşı meropenem daha etkilidir. Meropenem menenjit tedavisinde kullanımı onaylanmış tek karbapenem ajandır [16, 115].

2.3.4. Aminoglikozidler

Aminoglikozidler ilk defa 1940'lı yıllarda *Streptomyces* ailesinden izole edilmiştir. Bu gruptaki antibiyotikler aminosiklitol halkasından adını almaktadır. Bu halkaya amino-şekerler glikozid bağları ile bağlanmaktadır [48].

Bakterisidal olan aminoglikozidler geniş-spektrumlu antibiyotikler olup aerop Gram-negatif ve pozitif bakterilerin neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinde kullanılmakta, anaerop bakterilerde hücre içine giremeyeceğinden anaerop enfeksiyonlarda kullanılmamaktadır. Bu antibiyotiklerde bakterilere direnç gelişimi hızlı olmamaktadır [16].

Aminoglikozidlerin etki mekanizması, hedef bakterideki protein sentezini engellemesine dayanmaktadır. İlaç Gram-negatif hücrenin dış membranından geçtikten sonra, sitoplazmaya geçip orada 30S ribozomlara dönüşümlü olmayan şekilde bağlanmaktadır. Bu bağlanma, protein sentezi durdurulması ya da anormal proteinlerin oluşmasıyla sonuçlanmakta, dolayısıyla bakteri hücresinin işlev bozukluğuna ve ölümüne yol açmaktadır [16, 48].

Bakteriler aminoglikozidlere karşı kendini korumak için; enzimlerle antibiyotik yapısını değiştirme, ilacın ribozomdaki bağlanma noktasında mutasyonlar, ilacın hücre dışına atılması ve hücre içine alınmama gibi direnç mekanizmaları geliştirmiştir [105].

2.3.5. Florokinolonlar

Florokinolonlar geniş-spektrumlu, yaygın kullanılan sentetik bakterisidal antibiyotik grubudur. Bu gruptaki ilaçlar temelde karboksil, karbonil ve nitrojen içeren çift halkalı kimyasal yapıya sahiptir [16]

Florokinolonlar bakterilerin normal işlevsel faaliyetleri için gerekli DNA topoizomeraazları (tip-II topoizomeraaz, DNA giraz ve tip-IV topoizomeraaz) hedef alarak işlev görmelerini engellemektedir [171]. Florokinolonlar; topoizomeraazları, bakteri kromozomunda anormal çift zincirli molekülleri oluşturan toksik enzimlere dönüştürmektedir [171].

Bu grupta en çok kullanılan ajanlar; levofloksasin, siprofloksasin ve moksifloksasindir. Florokinolonlar oldukça etkili ilaçlar olmasına rağmen bazı

bakterilerde direnç gelişebilmektedir. Bu direnç, kinolonların hedefini değiştiren mutasyonlarla ortaya çıkmaktadır [16, 105].

Florokinolonların bir dezavantajı, toksik yan etkileridir. Bunlar hastada tendon ağrısı, inflamasyon ve dolayısıyla tendon kopması gibi yan etkiler içermektedir. Bu durumlarda florokinolonların tedavisi kesilmediği takdirde toksik epidermal nekroliz, anafilaksi, hepatotoksisite ve Stevens-Johnson sendromuna yol açmaktadır [171].

- **Çoğul-dirençli bakteriler:**

Çoğul-dirençli bakteriler, üç veya daha fazla antibiyotik grubunun birer ajanına karşı duyarlı olmayan bakterilerdir. Çoğul-direnç, genellikle Gram-negatif çomak bakterilerde, zaman içinde artan geniş-spektrumlu antibiyotiklerin kullanımına bağlı olarak sık görölmektedir [92].

Gram-negatif bakteriler, antibiyotiklere karşı korunmak için, farklı antibiyotikleri hidrolize eden enzimlerin (β -laktamaz gibi) üretimi, antibiyotikleri engelleyen çeşitli radikal maddelerin salınımı, antibiyotiklerin hedefinin değişimi, bakteriyel sitoplazmik zarın geçirgenliğinin değiştirilmesi gibi çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmektedir [130, 133].

Çeşitli Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen ve geniş-spektrumlu sefalosporinleri hidrolize edebilme yeteneğine sahip olan, normal replikasyon döngüsü esnasında oluşan nokta-mutasyonları sonucu ortaya çıkan genişlemiş-spektrumlu beta-laktamaz enzimleri, ilk defa 1980’li yıllarda saptanmıştır. Bu enzimlerin penisilinlere ve üçüncü küşak sefalosporinlere karşı bakteri direncini arttırmasından ziyade, plazmit ve transpozon aracılığıyla taşındıklarından, aynı zamanda aminoglikozidlere, kinolonlara ve trimetoprim-sulfametoksazol gibi ajanlara dirençli suşların ortaya çıkmasına yol açması önemli bulunmuştur [18]. Bu tür bakterilerinin oluşturdukları enfeksiyonların tedavisinde GSBL’ların oluşturduğu bakteriyel direnç mekanizmasından etkilenmemesinden dolayı karbapenemler, etkili bir seçim olmuştur [130]. Ancak son yıllarda karbapenemlerin aşırı kullanımı nedeniyle karbapenemlere direnç kazandıran karbapenemez enzimleri sıklıkla saptanmaya başlanmıştır [153].

Karbapenemazlar, karbapenem ve sefalosporinler dahil geniş spektrum-beta-laktamlara karşı aktif olduklarından karbapeneme dirençli bakteriler immünsüprese

hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olmakta ve dünya çapında sorun oluşturmaktadır [157].

Bu durum çoğul-dirençli Gram-negatif çomaklar (MDR-GNÇ)'lerin etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanabilecek antibiyotik seçeneklerinin kısıtlı olmasına neden olmuştur [155].

2.3.6. Kolistin

Kolistin polipeptid yapıya sahip polimiksinler grubunda yer alan bir antibiyotiktir. Polimiksinler, 1947'da *Bacillus* türlerinin ürettiği bir ürün olarak keşfedildikten sonra çoğul-dirençli Gram-negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmıştır. Beş üyeli polimiksin ailesine ait polimiksin E olarak adlandırılan kolistin, polimiksin B ile birlikte bu ailenin klinik tedavide kullanılan ajanlarıdır [23]. Tedavide etkili olmasına rağmen polimiksinler, nefrotoksik ve nörotoksik yan etkiler gösterdiğinden 1960'lı yıllarda kullanımdan kaldırılmıştır. Fakat son yıllarda son tedavi seçeneği olarak tekrar kullanılmaya başlanmıştır. Sekil 2-1.'de polimiksinin tarihçesi göstermektedir [16, 77, 85, 143, 155, 157].

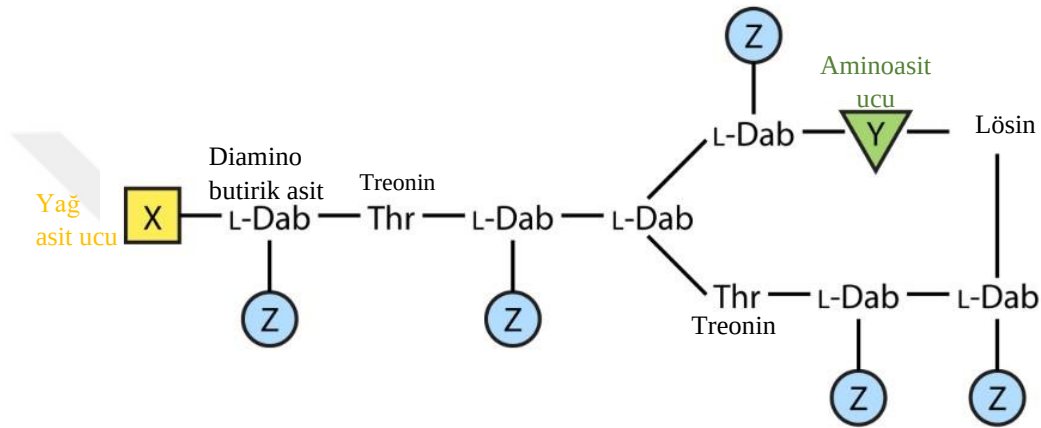
1940'lı yıllarda	<i>Bacillus polymyxa</i> 'dan polimiksinlerin keşif edilmesi
1950	Kolistinin Japonya ve Avrupa'da ilk kullanımı
1959	Gram-negatif çomak enfeksiyonlarının tedavisinde kolistimetat sodyum şeklinde kolistinin kullanılması
1980'li yılların ortası	Polimiksinlerin nefrotoksik ve nörotoksik yan etkileri nedeniyle kullanımdan kaldırılması
1990'lı yıllar	MDR-GNÇ'lere karşı etkili antibiyotik seçeneklerinin kısıtlı olması nedeniyle tekrar kullanılmaya başlanması
Günümüzde	Ciddi MDR-GNÇ'lerin enfeksiyonlara karşı son seçenek olarak kullanılmaktadır

Şekil 2- 1. Polimiksinin tarihçesi
[45]

2.3.6.1. Kimyasal yapısı

Bacillus colistinus tarafından üretilen kolistin; amfipatik ve katyonik özelliklere sahip, yağ asidi zincirine, tripeptit yan zincir aracılığıyla bağlı döngüsel hepapeptit yapıdan oluşmaktadır. Kolistinin, hidrofobik ucundaki yağ asidi zinciri ve hidrofilik ucundaki döngüsel polipeptit, kolistine polar yapısını sağlamakta olup bu sayede kolistin, hedefiyle kararlı bir reaksiyon oluşturabilmektedir [89, 121]. (Şekil 2-2.)

Kolistin, kolistin sulfat ve kolistimetat sodyum (kolistin metansulfonat sodyum) formülasyonu şeklinde bulunabilmektedir. Bu formlar ağız yoluyla alındığında ilacın emilimi gerçekleşmediğinden sadece gastrointestinal kanalı dekontamine etmek için kullanılabilir. Bu yüzden kolistin sulfat ya da kolistimetat, hidrolize edildikten sonra parenteral yoldan inhalasyon yolu ile verilmektedir. Kolistin sulfat sadece oral ve topikal formda kullanılırken kolistimetat sodyum, daha az toksik olması nedeniyle parenteral olarak kullanılmaktadır [41, 89].



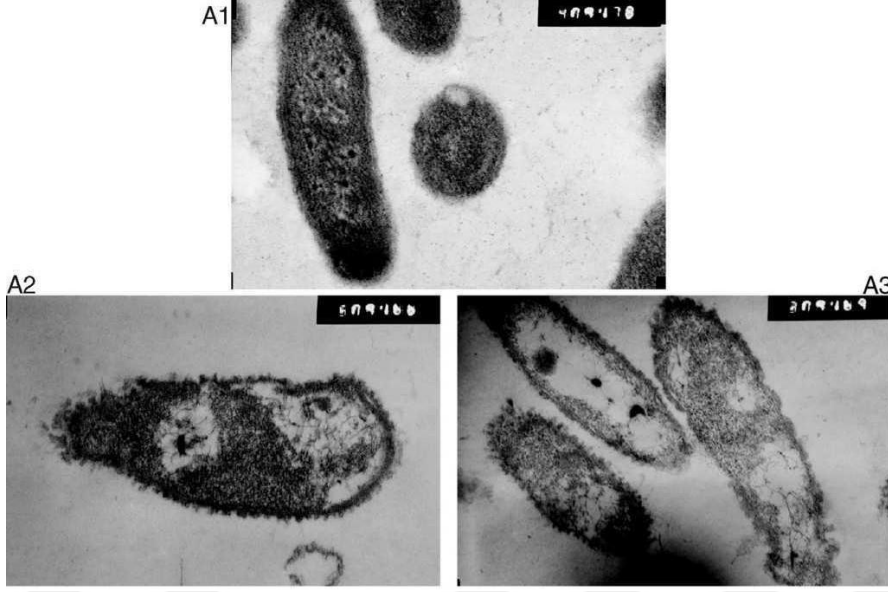
Şekil 2- 2. Kolistinin kimyasal yapısı

(X: yağ asidi ucu; kolistin A ve polimiksin B1 için 6-metilokaranoik asit, kolistin B ve polimiksin B2 için 6-metilheptanoik asit olmaktadır. Y: aminoasit ucu; kolistin için *D-leu* ve polimiksin için *D-phe* olmaktadır. Z: kolistin ve kolistimetat için farklılık gösteren gruplar kolistin için NH_2 , kolistimetat için $\text{NH-CH}_2\text{-SO}_3\text{H}$) [126]

2.3.6.2. Etki mekanizması

Kolistin, Gram-negatif bakteri hücresinin negatif-yüklü dış membran LPS'ini hedef almaktadır. Kolistinin pozitif yüklü hidrofilik peptit ucu, bakterinin LPS'leriyle güçlü bir elektrostatik etkileşime girmektedir. Diğer taraftan da kolistinin negatif-yüklü hidrofobik yağ asidi ucu LPS'lerin lipidlerine bağlanarak, lipidlerin etkileşimini güçlendirmektedir. Bu etkileşim nedeniyle, membran lipidlerinin fosfat gruplarının negatif-yükünü stabilize eden Ca^{2+} ve Mg^{2+} katyonları membrandan ayrılmaktadır. Bu durum, LPS'lerin kararlılığının bozulmasına, membran geçirgenliğinin artmasına, sitoplazma içeriğinin dışarıya sızmasına ve bakteri ölümüne neden olmaktadır [16, 89, 121]. (Şekil 2-3)

Diğer yandan kolistin, bakteriyel dış membranın endotoksinine bağlanarak onun etkisini bloke edebilmektedir [16].



Şekil 2- 3. Kolistinin etkisini gösteren elektron mikroskop görüntüsü.

(Kolistinin *P. aeruginosa* bakteriyal membranında etkisini gösteren elektron mikroskop görüntüsü) [104]

2.3.6.3. Etki spektrumu

Dar-spektrumlu olan kolistin, aerob Gram-negatif çomaklara etki göstermekte, Gram-negatif koklara, Gram-pozitif bakterilere ve çoğu anaeroplara etki göstermemektedir. *Klebsiella*, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacteriaceae* ve *Citrobacter* türleri olmak üzere *Enterobacteriaceae* ailesi türlerine etkili olmasına rağmen *Proteus spp.*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Morganella*, *Serratia* ve *Providencia* türlerine etkili değildir. *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* türlerine, *Moraxella* ve *Haemophilus influenza*'ya karşı etkilidir. *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Edwardsiella*, *Brucella* ve *Vibrio* türleri kolistine doğal dirençlidir [13, 14]. Kolistine doğal direnç, *Proteus mirabilis* ve *Serratia marcescens* suşlarında da görülmektedir. Bu direncin nedeni, kolistinin hedefi olan LPS'lerin negatif-yükün artışı tetikleyerek kolistinin bağlanmasını azaltan değişimlerdir [119].

2.3.6.4. Direnç mekanizmaları

Bakteri kromozomlarında ortaya çıkan mutasyonlar, LPS yapısındaki değişimleri kodlayan çok sayıda operon ve genlerin oluşmasına neden olmaktadır [87, 111, 121].

Son yıllarda artan kolistin kullanımı, plazmit-aracılı kolistin-direnç genlerinin gelişmesine yol açmıştır. Şimdiye kadar 9 (*mcr-1-mcr-9*) plazmit-aracılı kolistin-direnç geni tanımlanmıştır [87, 88].

mcr-1 geni, fosfoetanolamin transferaz enzimini kodlayarak, lipit A'ya fosfoetanolaminin eklenmesine neden olmaktadır. Bu da LPS'lerin katyonik yükünün artması anlamına gelmekte dolayısıyla kolistin LPS'e bağlanmasını bloke etmektedir [49, 87, 121].

Kolistine karşı bakterilerin geliştirdikleri başka direnç mekanizmalarına örnek olarak *K. pneumoniae*'nin polisakkarit kapsülü verilebilir. Bu kapsül, kolistin bakteriyel dış membranla etkileşimini azaltarak LPS'lere ulaşmasını engellemektedir [121].

Transport proteinlerinden oluşan atım pompaları, bakteriyi kolistine karşı koruyan başka bir direnç mekanizmasıdır [2].

A. baumannii'de kolistine direnç mekanizması, kolistin hedefi olan LPS'lerin kaybolması şeklindedir. LPS'lerin yokluğu, lipit A'yı kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır [2, 121].

Çoğul dirençli Gram negatif çomak (MDR-GNÇ) enfeksiyonlarının tedavisinde beta-laktam, aminoglikozid, kinolon ve karbapenemlerin tedavideki başarısızlığından dolayı kolistin tekrar ilgi kazanmıştır. Bu bağlamda tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında kolistin duyarlılık testleri büyük ölçüde önemlidir [62, 86].

2.3.6.5. Kolistine Duyarlılık Testleri

Kolistin moleküler özellikleri nedeniyle rutin antibiyotik duyarlılık testleriyle elde edilen sonuçlardan şüphe duyulması söz konusu olmuştur [51]. Kolistin büyük molekül yapısına bağlı olarak agar difüze olamaması, bakterilerin agar üzerinde oluşturdıkları inhibisyon zon çaplarına güveni azaltmış [96] ve disk diffüzyon (DD) yönteminin kolistine duyarlılık testleri için uygun bulunmamasına yol açmıştır [62]. Bu nedenle, 2016 yılında Avrupa Atimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing-EUCAST) disk diffüzyon testi için breakpoint değerleri sağlamak yerine, hastaların tedavisinde kolistin kullanılmasından önce kesin minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) değeri saptanmasının zorunlu olduğunu belirtmiştir [81]. Kolay uygulanabilen bir test olan gradiyent test (E-test) pahalı bir test olmasından ziyade, yine agar dayalı bir yöntem olduğundan kolistin MİK değerlerini belirlemek için güvensiz olarak görülmektedir [121]. Mueller-Hinton agar besiyeri kullanan bir başka yöntem, agar dilüsyon yöntemidir. Bu yöntem birçok

araştırmada BMD yöntemi ile uyumlu sonuçlar göstermesine rağmen CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) ve EUCAST rehberleri tarafından tavsiye edilmemektedir. Ayrıca bu yöntem taze (bir hafta geçmeyen) besiyeri kullanımına ihtiyaç duyduğundan çok zahmetli olup rutin laboratuvarlarda kullanılması uygun olmamaktadır. Kolistin MİK'lerini saptamak için sıvı mikrodilüsyon (BMD) yöntemi ulusal ve uluslararası rehberler tarafından altın standart yöntem olarak tavsiye edilmektedir [63, 121].

Bunun dışında, kolistin, katyonik yapısı nedeniyle, BMD için kullanılan plastik mikropiplara yapışarak test edilen konsantrasyonların değişmesine neden olmaktadır [72, 156]. Kolistinin plastiğe yapışmasını engellemek için bakteri inokulumuna ya da antibiyotik solüsyonuna polisorb-80 surfaktan eklenebileceği bildirilmiş, ancak polisorb-80 surfaktanın kolistin ile etkileşime girdiği fark edildikten sonra EUCAST ve CLSI polisorb-80 surfaktanın eklenmesine gerek olmadığını bildirmişlerdir [63, 81, 156]. Kolistinin plastiğe yapışmasından kaçınmak için cam tüplerle makrodilüsyon yöntemi uygulanarak doğru MİK değerleri elde edilebilmektedir. Ancak makrodilüsyon yöntemi zahmetli, zaman alıcı ve daha maliyetli olduğundan rutin laboratuvarlarda kullanılması tercih edilmemektedir [156].

Birçok çalışmada otomatize sistemlerle (BD Phoenix 100, VİTEK2 ve MicroScan vb) elde edilen MİK değerleri referans BMD yöntemi ile karşılaştırıldığında kabul edilemeyen çok büyük hata (ÇBH) oranları göstermesi nedeniyle bu sistemlerin kolistine duyarlılığı saptamak için güvenilir olmadığı bildirilmiştir [69, 75, 120, 121].

Bu bilgilerin ışığında tek güvenilir yöntemin altın standart BMD yöntemi olduğu görülmektedir. Ancak BMD yönteminde kullanılacak antibiyotik solüsyonları ve sıvı besiyerinin manual olarak hazırlanmasına gerek duyulması, zahmetli ve zaman alıcı bir yöntem olması ve sonuçların gecikmesinden dolayı tıbbi mikrobiyoloji rutin laboratuvarlarında kullanılamamaktadır [73, 81, 111].

Kolistin duyarlılık testleri uygulamasında rutin laboratuvarlarda hala sorunlar yaşanmaktadır. MDR-GNÇ'ler ile enfekte hastaların tedavisinde yol gösteren pratik ve güvenilir kolistin duyarlılığı belirleyebilen bir yöntemin geliştirilmesi gerekmektedir [120]. Bu kapsamda birçok araştırmalar yapıp Simmner'in Mueller-Hinton buyyona dayalı disk elüsyon yöntemi, Nordman'nın *Enterobacteriaceae* türlerinin glukozu kullanıma dayalı hızlı polimiksin NP (HPNP) testi, Lescat'ın rezasurine bağlı HPNP testi

ve Sadek'in *P. aeruginosa*'nin metabolizmasına dayalı hızlı polimiksin/*Pseudomonas* NP testi gibi birçok yöntem geliştirilmiştir [84, 107, 135, 145]. Simner'in disk elüsyon yöntemi ile yapılan ön çalışmalarda iyi sonuçlar elde edilmesi ve Nordman'nın HPNP ve Lescat'ın rezasurine bağlı HPNP testinin değerlendirilmek istenmesi, bu tezin konusuna karar verilmesine öncülük etmiştir.

2.3.7. Tigesiklin

Glisilsiklin antibiyotik grubunun üyeleri arasında yer alan tigesiklin, vankomisine-dirençli *Enterococcus spp.* ve metisiline-dirençli *Staphylococcus aureus* gibi çoğul-dirençli aerop ve anaerop bakterilere karşı etkili geniş-spektrumlu antibiyotiktir. Tigesiklin, gittikçe artan kolistin-direncine karşı hala etkili olan semisentetik yeni bir antibiyotiktir [16, 28].

Tigesiklin, bakterilerde protein translasyonunu inhibe eden bakteriyostatik etkiye sahiptir. Tigesiklin bakteriyel 30S ribozom birimine bağlandığında, taşıyıcı RNA (tRNA) moleküllerinin bağlanma noktasına girmesini engellemektedir. Bu şekilde amino-asitlerin uzun peptit zinciri oluşturmasını önlemektedir [16].

Tigesiklin *P. aeruginosa*, *Morganella morganii*, *Providendica spp.* ve *Proteus mirabilis* gibi bazı bakterilere karşı etki göstermemektedir. Tigesiklin efluks pompası, β -laktamazlar, hedef enzimin yerinin değişmesi veya hedef değişimi gibi bakteriyel direnç mekanizmalarından etkilenmemesine rağmen son yıllarda tigesikline dirençli bakteriler izole edilmeye başlanmıştır. [130, 137, 162].

Tigesiklin, MDR-GNÇ enfeksiyonlarında etkili olmasına rağmen sadece ağır enfeksiyonlarda son seçenek olarak kullanılmaktadır. Çünkü monoterapi şeklinde kullanıldığında mortalite riskinin artmasına yol açtığı gösterilmiştir [130, 168].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç:

3.1.1. Örnekler:

İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Ocak 2019- Temmuz 2020 arasındaki 18 aylık süreçte gönderilen kan kültürü örneklerinden izole edilen 102 çoğul-dirençli Gram-negatif çomak (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*) çalışmaya dahil edilmiştir.

Çoğul-dirençli Gram-negatif çomaklar (MDR-GNÇ); üç farklı antibiyotik sınıfının bir ya da birden fazla ajanına dirençli bakteriler (üçüncü kuşak sefalosporinlere, aminoglikozidlere ve florokinolonlara dirençli) olarak tanımlanmıştır [92].

Çalışmadaki bakteri izolatları, üç gruba ayrılmıştır:

- Grup 1: GSBL pozitif bakteriler.
- Grup 2: Karbapenemlere dirençli bakteriler
- Grup 3: Kolistin ve tigesiklin hariç tüm antibiyotiklere dirençli (yaygın ilaç dirençli) bakteriler

3.1.1.1. Çalışmaya dahil etme kriterleri

- Çalışmaya, çocuk ve yetişkin hastalar olmak üzere tüm yaş grupları dahil edilmiştir.
- Kolistin direncinin en sık görüldüğü *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* izolatları çalışmaya dahil edilmiştir.
- Her hastadan sadece bir izolat çalışmaya dahil edilmiştir

3.1.1.2. Çalışmaya hariç tutma kriterleri

- Çalışmada üçüncü kuşak sefalosporinlere (CTX) duyarlı bakteriler hariç tutulmuştur.
- Aynı hastaya ait birden fazla izolat olduğunda sadece ilk izolat çalışmaya dahil edilmiştir.
- Çoğul-dirençli olmasına rağmen *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*. cinsi izolatlar sayıca az olmaları ve istatistiksel olarak değerlendirme güçlüğü nedeniyle hariç tutulmuştur.

3.1.3. Kullanılan Besiyerleri

3.1.3.1. Kanlı Agar

$\pm$ %5 Koyun Kanlı Columbia Agar (Beckton Dickinson®, ABD) içeren hazır besiyerleri kullanılmıştır.

3.1.3.2. Triptik Soy Agar (TSA)

Triptik soy agar (Beckton Dickinson®, ABD) toz besiyerinden 40 gr tartılıp, 1000 ml distile su ile çözündürülüp, pH: 7.2-7.4'e ayarlanıp, 121°C'de, 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra besiyerinin 45-50°C'ye soğuması beklendikten sonra 90 mm'lik petri kutularına 4 mm kalınlığında olacak şekilde dökülmüştür. Besiyeri katılaşp kuruduktan sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.3.3. Mueller Hinton Agar (MHA)

Mueller Hinton agar (Condalab®, İspanya) toz besiyerinden 38 gr tartılıp, 1000 ml distile su ile çözündürülüp, pH: 7.2-7.4'e ayarlanıp, 121°C'de, 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra besiyerinin 45-50°C'ye soğuması beklendikten sonra 90 mm'lik petri kutularına 4 mm kalınlığında olacak şekilde dökülmüştür. Besiyeri katılaşp kuruduktan sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.3.4. Katyon- Ayarlı Mueller Hinton Broth (KAMHB)

Kasyon-Ayarlı Mueller Hinton (Beckton Dickinson®, ABD) broth toz besiyerinden 22 gr tartılıp, 1000 ml distile su ile çözündürülüp, pH: 7.2-7.4'e ayarlandıktan sonra cam tüplere dağıtılıp, 121°C'de, 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra tüpler biraz soğuduktan sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.3.5. Üre Agar

Üre agar (Beckton Dickinson®, ABD) toz besiyerinden 15 gr tartılıp, 950 ml distile su ile çözündürülüp, pH: 7.2-7.4'e ayarlandıktan sonra cam tüplere dağıtılıp, 121°C'de, 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra yaklaşık 50°C'ye kadar soğuyan 950 ml hazırlanmış üre besiyerine, daha önce filtre edilen 50 ml %40'lık üre solüsyonu ilave edilmiştir. Hazırlanmış besiyeri tüplere dağıtılıp yatık olarak katılaştırıldıktan sonra +4°C'de saklanmıştır.

3.1.3.6. Üç şekerli besiyeri

Üç şekerli (Triple Sugar Iron Agar, Oxoid, ABD) agar toz besiyerinden 65 gr tartılıp, 1000 ml distile su ile çözündürülüp, pH: 7.4'e ayarlandıktan sonra 121°C'de, 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra cam tüplere dağıtılıp yatık olarak katılaştırıldıktan sonra +4°C'de saklanmıştır.

3.1.3.7. Sitrat Agar (Simmonis-Citrate Agar)

Sitrat (Beckton Dickinson®, ABD) agar toz besiyerinden 23 gr tartılıp, 1000 ml distile su ile çözündürülüp, pH:7.4'e ayarlandıktan sonra 121°C'de, 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra cam tüplere dağıtılıp yatık olarak katılaştırıldıktan sonra +4°C'de saklanmıştır.

3.1.3.8. Voges Proskauer Broth (VP Broth)

Toz (Beckton Dickinson®, ABD) besiyeriden 17 gr tartılıp, 1000 ml distile su ile çözündürülüp, pH:7.4 'e ayarlandıktan sonra cam tüplere 5'er ml dağıtılıp, 121°C'de, 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra +4°C'de saklanmıştır.

3.1.3.9. Lizin Dekarboksilaz/ Deaminaz Besiyeri

Lizin İron agar (Beckton Dickinson®, ABD) toz besiyerinden 28 gr tartılıp, 1000 ml distile su ile çözündürülüp, pH:7'ye ayarlandıktan sonra 121°C'de, 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra cam tüplere dağıtılıp yatık olarak katılaştırıldıktan sonra +4°C'de saklanmıştır.

3.1.3.10. MIO (Hareket, İndol ve Ornitin Dekarboksilaz) besiyeri

Motility indole orintine agar (Beckton Dickinson®, ABD) toz besiyerinden 26 gr tartılıp, 1000 ml distile su ile çözündürülüp, pH: 7.4'e ayarlandıktan sonra cam tüplere dağıtılıp, 121°C'de, 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra +4°C'de saklanmıştır.

3.1.3.5. Gliserol-triptik soy broth

Bakteri stoklama amacıyla kullanılan stoklama besiyerini hazırlamak için triptik soy broth toz (Oxoid, ABD) besiyerinden 30 gr tartılıp, 800 ml distile su ile çözündürülüp, üstüne 200 ml gliserin ilave edilip, 7.2-7.4 pH'ya ayarlandıktan sonra 200 ml'lik balonlara dağıtılarak, 121°C'de, 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan

çıktıktan sonra biraz soğuduktan sonra ependorf tüplere 1 ml olacak şekilde bölünüp +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.4. Antibiyotikler ve Kitler

3.1.4.1. Antibiyotik toz maddeleri

- Kolistin sulfat toz maddesi (Carbosynth, Potens: 770)
- Meropenem toz maddesi (Trihidrat, Potens: 950)
- Tigesiklin toz maddesi (Carbosynth, Potens: 980)

3.1.4.2. Antibiyotik Diskleri

Kullanılan disklerin içeriği, CLSI rehberlerine göre:

- Ampisilin 10 µg (Biyoanalayse®)
- Ampisilin/Sulbaktam 10/10 µg (Biyoanalayse®)
- Amoksisilin/ Klavulanik asit 20/10 µg (Biyoanalayse®)
- Piperasilin+ Tazobaktam 100/10 µg (Biyoanalayse®)
- Sefazolin 30 µg (Biyoanalayse®)
- Sefuroksim 30 µg (Biyoanalayse®)
- Sefoksitin 30 µg (Biyoanalayse®)
- Sefotaksim 30 µg (Biyoanalayse®)
- Seftazidim 30 µg (Biyoanalayse®)
- Sefepim 30 µg (Biyoanalayse®)
- İmipenem 10 µg (Biyoanalayse®)
- Meropenem 10 µg (Biyoanalayse®)
- Ertapenem 10 µg (Biyoanalayse®)
- Siprofloksasin 5 µg (Biyoanalayse®)
- Gentamisin 10 µg (Biyoanalayse®)
- Amikasin 30 µg (Biyoanalayse®)
- Tobramisin 10 µg (Biyoanalayse®)
- Trimetoprim/Sulfametoksazol 1.25/23.75 µg (Biyoanalayse®)
- Kolistin sulfat 10 µg (Biyoanalayse®)

3.1.4.3. Kolistin MİK Mikroplak Kiti

Yedi farklı konsantrasyonda (0.25- 16 µg/ml) kolistin içeren 96 kuyucuktan oluşan bir mikroplaktır. Bu mikroplakların her sütunun sonunda bir adet pozitif üreme kontrolü kuyucuğu içermektedir (Diagonistics®, Slovakya).

Süspansiyon medium (Katyon ayarlı Müller Hinton Broth) bakterilerin rehidrasyonu için kullanılmıştır.

3.1.5. Diğer Kimyasal Maddeler

- Rezasurin (Sigma-aldrich, Almanya)
- Fenol kırmızı (Difco Laboratories, ABD)
- D(+)-Glukoz monohidrat (Riedel-de haen, BK)
- Gliserin (Sigma, Almanya)
- Tris base (Sigma, Almanya)
- Borik asit (Sigma, Almanya)
- 0.5 M EDTA (pH:8) (Sigma, Almanya)
- Etidyum bromür
- Agaroz (Sigma, Almanya)

3.1.6. Kullanılan sarf maddeler

- Ependorf tüpleri (Laposel, Türkiye)
- Steril petri kutuları (Laposel, Türkiye)
- Mikropipet uçları (10'luk, 100'lük ve 1000'lik), (Laposel, Türkiye)
- Mikroplak 96 kuyucuklu, steril kapaklı, (Laposel, Türkiye)
- Steril pamuklu eküvyon, (Laposel, Türkiye)
- Cam tüpler

3.1.7. Kullanılan cihazlar ve diğer gereçler

- Kan kültürü sistemi (BACTEC FX, Becton Dickinson, USA)
- Etüv (Heraeus, Almanya)
- Terazî (Normal ve hassas terazî), (AXİS, Türkiye)
- Ph ayarlama cihazı (Xylem, Almanya)
- Otomatize identifikasyon sistem (Phoenix 100, Becton Dickinson, USA)
- Buzdolabı (4° C), (Arçelik, Türkiye)
- Derin dondurucu (20° C), (Arçelik, Türkiye)

- Vorteks cihazı (İKA, Almanya)
- McFarland Densitometer (Biosan®)
- Tekli mikropipet (10'luk, 100'lük ve 1000'lik), (Hamilton, Romania)
- Çoklu mikropipet (10'luk ve 100'lük), (Ossila, UK)
- Su banyosu (Biosan®)
- DNA amplifikasyon cihazı (Thermofisher, ABD)
- Elektroforez cihazı (E-C Apparatus, UK)
- Santrifüj cihazı (Hettich Zentrifugen, Almanya)
- Translüminatör (Thermofisher, ABD)

3.1.8. Standart suşlar

- *Pseudomonas aeruginosa*: ATCC 27853
- *Escherichia coli*: ATCC 25922
- *Escherichia coli* ATCC 13846 (*mcr-1* taşıyan kolistin-dirençli *E. coli*)

3.1.9. Mastermix

Ticari şekilde mevcut bulunan bu çözelti içerisinde primerler ve DNA hariç PCR için gereken tüm malzemeler (dNTP, MgCl₂, PCR buffer) bulunmaktadır. Çözelti direkt 2X olarak sulandırılmadan kullanılmıştır [2]. (Biomatik, 2XTaq PCR Master Mix, Kanada).

3.1.10. Kullanılan primerler

- *mcr-1* (CRL-F) [2] 5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3' (Oligomer, Türkiye)
- *mcr-1* (CRL-R) 5'-CTTGGTCGGTCTGTAGGG-3 (Oligomer, Türkiye)

3.1.11. Agaroz jel hazırlanması

Agaroz (1 gr), 100 ml 0.5X TBE tamponu içinde çözülüp mikrodalga fırında ısıtılarak % 1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Hazırlanan jel, 55 °C sıcaklığında 10-15 dakika bekletildikten sonra içerisine 5 µl etidyum bromür ilave edilmiştir. Jeli dökmek için içinde tarak yerleştirilmiş kenarları kapatılmış bir kaset hazırlanmıştır. Jel, bu kasete dökülerek üzerinde kuyucuklar oluşturulmuş ve oda ısısında katılaşmaya bırakılmıştır.

3.1.12. Elektroforez tampon çözeltisi

Tris-asetat 242 g ile 100 ml 0.5 M EDTA (pH: 8.0) hazırlanıp oda sıcaklığında saklanmıştır. Daha önce hazırlanılan agaroz jelinin üstünü kapatacak şekilde bu çözelti ile elektroforez tankı doldurulmuştur.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Bakteri izolasyonu

Kliniklerden gönderilen kan kültürü şişeleri otomatize kan kültürü sisteminde (BACTEC FX, Becton Dickinson, USA) beş gün süreyle inkübe edilmiştir, pozitif sinyal veren şişelerden Gram boyama yapılarak üreyen bakterinin morfolojisi tanımlanmıştır. Ardından örnekler koyun kanlı agar besiyerine ekilip 37° C'deki etüvde 18-24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra konvansiyonel ve biyokimyasal yöntemlerle ve gerektiğinde otomatize sistem (Phoenix 100, Becton Dickinson, USA) aracılığıyla identifikasyon yapılmıştır. Bakteri izolatları çalışma yapılana kadar saklama besiyerine (Gliserol-triptik soy broth) alınarak -80°C'de saklanmıştır [80].

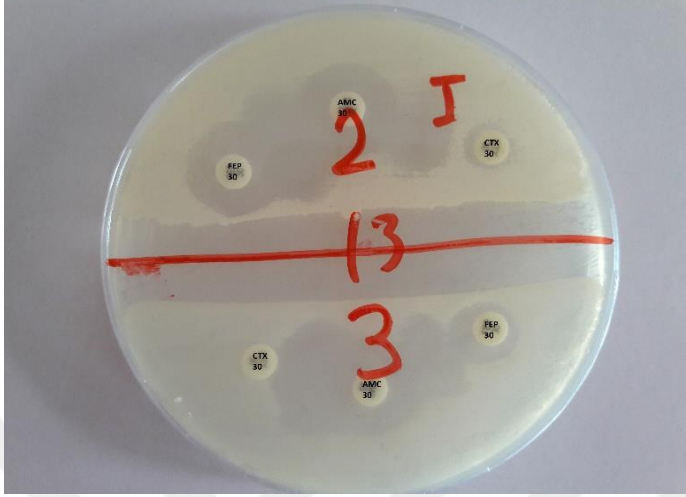
Çalışma zamanında izolatların saflığından emin olmak ve testleri uygulamak üzere taze kolonileri kullanabilmek için triptik soy agara (TSA) iki kez pasajları alınıp 37° C etüvde bir gece inkübe edildikten sonra çalışmaya alınmıştır [80].

3.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri

3.2.2.1. Disk Difüzyon

Her bakteri izolatına, dirençli olduğu antibiyotik grubunu belirlemek için Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal duyarlılık test uygulanmıştır. TSA besiyerine yapılmış taze pasajlardan birer sıvı KAMHB besiyerinde doğrudan koloni süspansiyon yöntemiyle 0.5 McFarland bulanıkta olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonundan steril pamuklu eküvyon aracılığıyla MHA besiyeri yüzeyine yayılmıştır. Ardından 15 dakikayı aşmadan yayılan MHA petripleri üzerine, dispenser aracılığıyla antibiyotik diskleri [ampisilin (AMP), ampisilin+sulbaktam (SAM), amoksisilin+klavulanik asit (AMC), sefazolin (KZ), sefoksitin (FOX), sefotaksim (CTX), seftazidim (CAZ), sefepim (FEP), imipenem (İMP), meropenem (MEM), ertapenem (ERT), gentamisin (CN), tobramisin (TOB), amikasin (AK), kotrimoksazol (SXT), siprofloksasin (CİP), levofloksasin (LEV), piperasilin+tazobaktam (TZP)] her petriye sekiz disk olacak şekilde yerleştirilmiştir.

GSBL varlığını saptamak için çift disk sinerji testi (CTX, AMP, FEP) esas alınmıştır (Şekil 3-1.). Deney sonuçları CLSI önerilerine göre değerlendirilmiştir [64, 80].



Şekil 3- 1. Çift disk sinerji testine örnek resim.
(CTX, AMC ve FEP diskleri arasında oluşan çift disk sinerji)

Tablo 3- 1. Kullanılan antibiyotiklerin CLSI rehberine göre inhibisyon zon çapları

Antibiyotik (µg)	<i>Enterobacteriaceae</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>A. baumannii</i>		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
AMP (10)	≥ 17	14-16	≤ 13	-	-	-	-	-	-
SAM (10/10)	≥ 15	12-14	≤ 11	-	-	-	≥ 15	12-14	≤ 11
AMC (20/10)	≥ 18	14-17	≤ 13	-	-	-	-	-	-
TZP (100/10)	≥ 21	18-20	≤ 17	≥ 21	15-20	≤ 14	≥ 21	18-20	≤ 17
KZ (30)	≥ 23	20-22	≤ 19	-	-	-	-	-	-
FEP (30)	≥ 25	19-24	≤ 18	≥ 18	15-17	≤ 14	≥ 18	15-17	≤ 14
CXM (30)	≥ 18	15-17	≤ 14	-	-	-	-	-	-
FOX (30)	≥ 18	15-17	≤ 14	-	-	-	-	-	-
CTX (30)	≥ 26	23-25	≤ 22	-	-	-	≥ 23	15-22	≤ 14
CAZ (20)	≥ 21	18-20	≤ 17	≥ 18	15-17	≤ 14	≥ 18	15-17	≤ 14
İMP (10)	≥ 23	20-22	≤ 19	≥ 19	16-18	≤ 15	≥ 22	19-21	≤ 18
MEM (10)	≥ 23	20-22	≤ 19	≥ 19	16-18	≤ 15	≥ 18	15-17	≤ 14
ERT (10)	≥ 22	19-21	≤ 18	-	-	-	-	-	-
CN (10)	≥ 15	13-14	≤ 12	≥ 15	13-14	≤ 12	≥ 15	13-14	≤ 12
TOB (10)	≥ 15	13-14	≤ 12	≥ 15	13-14	≤ 12	≥ 15	13-14	≤ 12
AK (30)	≥ 17	15-16	≤ 14	≥ 17	15-16	≤ 14	≥ 17	15-16	≤ 14
SXT (1.25/23.75)	≥ 16	11-15	≤ 10	-	-	-	≥ 16	11-15	≤ 10
CİP (5)	≥ 21	11-15	≤ 10	≥ 21	16-20	≤ 15	≥ 21	16-20	≤ 15

3.2.2.2. Sıvı Mikrodilüsyon

Minimal İnhibitör Konsantrasyonu (MİK); bir gece inkübasyon ardındaki mikroorganizmanın görünebilir üremesi inhibe eden antibiyotiğin en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır [4]. Kolistin MİK değerini BMD yöntemiyle saptamak için ASM (American Society for Microbiology) ve CLSI önerilerine göre kolistin sülfat (Carbosynth AC20542) tozu kullanılmıştır [64]. Antibiyotik toz maddelerinden istenen miktar hassas terazi ile tartılıp çözücülerini olan steril distile su içinde çözündürülmüştür. Hazırlanan antibiyotik solüsyonları ependorf tüplere dağıtılarak -4°C’de muhafaza edilmiştir. Antibiyotik stok solüsyonu hazırlamak için gerekli olan miktar aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır [80]:

$$\text{Antibiyotik Miktarı(mg)} = \frac{\text{Çözücü Hacmi(ml)} \times \text{Antibiyotik konsantrasyonu (}\mu\text{g/ml)}}{\text{Potens (}\mu\text{g/ml)}}$$

$$\text{Kolistin İçin: } \frac{10 \text{ ml} \times 2560 \mu\text{g/ml}}{770} = 33,25 \text{ mg}$$

Potensi 770 olan kolistin sülfat tozundan başlangıçta 2560 µg/ml konsantrasyonda antibiyotik solusyonu hazırlamak için stok solüsyon hazırlama formülüne göre 33,25 mg tartılıp çözücüsü olan 10 ml steril distile su içinde çözündürülüp 1’er ml’lik ependorflara bölünerek -20° C’de muhafaza edilmiştir. Çalışma gününde kullanılacak miktara göre 2560 µg/ml konsantrasyondaki solusyondan 1:10 dilüe ederek sulandırma yapılmıştır. (1 ml alınıp 9 ml steril distile suda çözülerek)

Triptik Soy agar besiyerinde bir gece inkübe edilmiş taze pasajlardan, KAMHB sıvı besiyerine alarak koloni süspansiyon yöntemiyle birkaç koloni aktarılacak 0.5 McFarland (1.5×10^8 CFU/ml) bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandıktan sonra bu süspansiyondan başka bir KAMHB steril tüp içinde 1:10 sulandırım yapılarak nihai bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır [80].

İçinde BMD uygulanacak olan 96 kuyucuklu polistiren mikrolakların her kuyucuğuna, çoklu mikropipet vasıtasıyla 100 µl steril KAMHB sıvı besiyeri dağıtılmıştır. Ardından mikrolaktaki ilk sütunun her kuyucuğuna 256 µg/ml konsantrasyondaki antibiyotik solüsyonundan 100 µl aktarılmakla ilk kuyucukta 128 µg/ml konsantrasyon elde edilmiştir. Her sıradaki birinci kuyucuktan 100 µl alınıp, bir kuyucuk dışında (11.kuyucuk: sadece bakteri süspansiyonu içerecek olan pozitif kontrol kuyucuğu) tüm

kuyucuklara iki kat seri dilüsyon yapılmıştır. 12.kuyucuk; antibiyotik içerecek ama bakteri süspansiyonu içermeyecek şekilde negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Son seri dilüsyonu yapılan kuyucuktan (12.kuyucuk), 100 µl sıvı çekilip dışarıya atılmıştır. Sonra negatif kontrol kuyucuğu dışında tüm kuyucuklara hazırlanan sulandırılmış bakteri süspansiyonundan 10 µl inokule edilmiştir. Mikroplağın birinci sırasına kontrol standart suşlar (*P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 13846 (*mcr-1* taşıyan kolistin-dirençli *E. coli*) inokule edilmiştir. Bu şekilde mikropak içinde 0.25-128 µg/ml aralığındaki antibiyotik konsantrasyonları ve her kuyucukta 5×10^5 CFU/ml bakteri konsantrasyonları elde edilmiştir. Aynı şekilde geriye kalan yedi sıraya diğer bakteri suşları inokule edilmiştir. Testin doğruluğundan emin olabilmek için her mikropak aynı şartlar altında iki defa yapılmıştır.

Mikropaklar steril şeffaf kapaklarıyla kapatılıp 35°C’de, 18- 24 saat inkübasyondan sonra gözle okunup kuyucukların bulanıklığına göre bulanıklık gözlenmeyen ilk kuyucuk, MİK değeri olarak kaydedilip CLSI ve EUCAST breakpoint (Tablo 3-3.) tablolarına göre değerlendirilmiştir [43, 64, 80].

Tablo 3- 2. CLSI ve EUCAST’a göre breakpoint tablosu.

Antibiyotik	CLSI		EUCAST	
	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Dirençli
Kolistin MİK (µg/ml)	≤2	≥4	≤2	>2
Tigesiklin MİK (µg/ml)	≤0.5	>0.5	≤0.5	>0.5
Meropenem MİK (µg/ml)	≤1	>4	≤2	>8

3.2.2.3. Sıvı makrodilüsyon

Kolistin MİK değerini BMD yöntemiyle saptamak için ASM ve CLSI önerilerine göre kolistin sülfat (Carbosynth AC20542) tozu kullanılmıştır [64]. Potensi 770 olan kolistin sülfat tozundan başlangıçta 2560 µg/ml konsantrasyonda antibiyotik solüsyonu hazırlamak için stok solüsyon hazırlama formülüne göre 33,25 mg tartılıp çözücüsü olan steril distile su içinde çözündürülüp 1’er ml’lik ependorflara bölünerek -20° C’de muhafaza edilmiştir. Çalışma gününde kullanılacak miktara göre 2560 µg/ml

konsantrasyondaki solüsyondan 1:10 (1 ml alınıp 9 ml steril distile suda çözülerek) dilüe ederek sulandırma yapılmıştır.

Triptik Soy agar besiyerine yapılmış ve bir gece inkübe edilmiş taze pasajlardan, KAMHB sıvı besiyerine birkaç koloni aktararak 0.5 McFarland (1.5×10^8 CFU/ml) bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandıktan sonra bu süspansiyondan başka bir KAMHB steril tüpü içinde 1:100 sulandırma yapılarak nihai bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır [80].

Her bakteri için 1 ml KAMHB sıvı besiyeri içeren 12 steril cam tüp kullanılmıştır. Birinci tüpe 256 µg/ml konsantrasyondaki antibiyotik solüsyonundan 1 ml aktararak 128 µg/ml konsantrasyonu elde edilmiştir. Ardından birinci tüpten 1 ml alınıp, son iki tüp (11. tüp: sadece bakteri süspansiyonu içerecek olan pozitif kontrol tüpü) tüm tüplere iki kat seri dilüsyon yapılmıştır. 12.tüp: antibiyotik içerecek ama bakteri süspansiyonu içermeyecek şekilde negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Son seri dilüsyonu yapılan tüpten (12.tüp), 1 ml sıvı çekilip dışarıya atılmıştır. Sonra da negatif kontrol tübü dışında tüm tüplere hazırlanan sulandırılmış bakteri süspansiyondan 1 ml inoküle edilmiştir. Aynı şekilde her sıvı makrodilüsyon çalışma setinde uygun kontrol standart suş (*P. aeruginosa*: ATCC 27853, *E. coli*: ATCC 25922, *mcr-1* taşıyan *E. coli* (kolistin-dirençli): ATCC 13846) çalışılmıştır. Bu şekilde tüpler içinde 0.25-128 µg/ml aralığındaki antibiyotik konsantrasyonları ve her tüpte 5×10^5 CFU/ml bakteri konsantrasyonları elde edilmiştir. Tüpler 35°C’de, 18- 24 saat inkübasyondan sonra gözle okunup tüplerin bulanıklığına göre bulanıklık gözlenmeyen ilk tüp, MİK değeri olarak kaydedilip, CLSI ve EUCAST breakpoint tablolarına göre değerlendirilmiştir [43, 64].

Sıvı mikrodilüsyon ile çok büyük/ büyük hata gösteren izolatlar tekrar test edilmiştir.

3.2.2.4. Ticari Mikrodilüsyon

Her test mikropişi yedi farklı konsantrasyonda (0.25-16 µg/ml) kolistin içeren kuyucuk ve bir adet pozitif üreme kontrol kuyucuğundan oluşmaktadır (Diagonistics® 8011, Slovakiya)

TSA besiyerinde pasaji yapılmış 18-24 saatlik saf kültürden iyi izole edilmiş kolonileri alarak, üretici firma önerisi doğrultusunda steril tuzlu su içinde 0,5 McFarland

bulanıklıkta bir süspansiyon hazırlanmıştır. Taze süspansiyondan 60 µl alınarak kit ile beraber sağlanmış süspansiyon medium (KAMHB) besiyerine inoküle edilmiştir. Karışımı 4-5 kez ters düz ederek hafifçe çalkalanmıştır Hazırlanan son süspansiyondan kit içindeki test mikropiğinin her kuyucuğuna 100 µl bakteri süspansiyonu inoküle edilmiştir. Mikrodilüsyon plağı kilitli bir poşet içerisine konduktan sonra 35°C sıcaklıkta 16-20 saat inkübe edilmiştir (CLSI'a göre). Renk değişimine göre bakteri üreyip üremediğine karar verilmiştir (Pembe = Üreme var, Mavi/Mor = Üreme yok).

MİK değeri, kontrol kuyucuğundan belirgin olarak farklı renkte olan ilk kuyucuktaki konsantrasyon olarak kabul edilip, CLSI ve EUCAST breakpoint tablolarına göre değerlendirilmiştir [43, 64].

3.2.2.5. Disk Elüsyon

Çeşitli kolistin duyarlılık testleri bulunmasına rağmen hala BMD yerine rutin laboratuvarlarda kullanılabilecek pratik, kolay ve az masraflı bir yöntem bulunmaması nedeniyle Simmer ve arkadaşları, böyle bir yöntem bulmak amacıyla disk elüsyon yöntemini geliştirmişlerdir [145]. Disk elüsyon yöntemi için, 10 ml KAMHB içeren dört adet cam tüpe, üreme kontrol tüpü hariç sırayla 1, 2 ve 4 adet kolistin diski (10 µg) eklenip, 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra, her tüpe 50 µl bakteri süspansiyonu (0.5 McFarland) ilave edilmiştir. Her testte üreme kontrolü olarak *P. aeruginosa* 27853 ATCC suşu kullanılmıştır. Tüpler 37° C'de 24 saat etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda tüplerin bulanıklığına göre bulanıklık gözlenmeyen ilk tüp, MİK değeri olarak kaydedilmiş CLSI ve EUCAST breakpoint tablolarına göre değerlendirilmiştir. Simner ve arkadaşlarına göre ≥ 2 µg/ml konsantrasyonlar elde edildiğinde sıvı mikrodilüsyon ile doğrulanması gerekmektedir [43, 64, 145].

3.2.2.6. Hızlı Testler

3.2.2.6.1. Hızlı polimiksin Nordman-Poriel Testi (HPNP)

Son yıllarda Nordman ve arkadaşları tarafından geliştirilen bir yöntem, *Enterobacteriaceae* ailesinden bakterilerde kolistin direnci belirleyebilen hızlı polimiksin NP testidir (HPNP) [68, 107].

Bu testte, 225 ml distile su içinde 6.25 g KAMHB besiyeri ile 125 mg fenol kırmızısı çözündürülüp pH'ı 6.7'e ayarlandıktan sonra otoklavda 121° C de 15 dakika süreyle steril edilmiştir. Otoklavdan çıkıp oda ısısına kadar soğuduktan sonra %10 anhydrous D(+)glukoz'dan 25 ml filtre edilip eklenmiştir. Daha sonra, solüsyon, kolistinli hızlı polimiksin NP (C-HPNP) solüsyonu ve kolistin içermeyen hızlı polimiksin NP (HPNP) solüsyonu olmak üzere ikiye bölünmüştür. Kolistin içermeyen hızlı polimiksin NP (HPNP) solüsyonuna hiç antibiyotik katmadan; kolistinli hızlı polimiksin NP (C-HPNP) solüsyonu, kolistin stok solüsyonu (5 µg/ml) eklenerek hazırlanmıştır [68, 107].

Standart suş ve test edilecek izolatların bakteri süspansiyonları 3.0-3.5 McFarland olacak şekilde ayarlanmıştır.

Test, tek bir izolat için 8 kuyucuk kullanılacak şekilde mikropak üzerinde uygulanmıştır. İlk yatay sıradaki dört kuyucuğa (A1'den A4'e) kolistin içermeyen HPNP solüsyonundan 150 µl konup, ikinci yatay sıradaki dört kuyucuğa (B1'den B4'e) kolistin içeren HPNP solüsyonundan 150 µl konmuştur. Ardından ilk dikey sütundaki kuyucuklara (A1 ve B1) 50 µl tuzlu su (%0.85 NaCl) ekleyerek sterilite testi olarak kullanılmıştır. İkinci dikey sütun kuyucuklarına (A2 ve B2), negatif-kontrol olarak kullanılmak üzere, kolistin-duyarlı suş (*E. coli*: ATCC 25922) bakteri süspansiyonundan 50 µl inokule edilmiştir. Üçüncü dikey sütun kuyucuklarına (A3 ve B3), pozitif-kontrol olarak kullanılmak üzere, *mcr-1* taşıyan *E. coli* ATCC 13846 bakteri süspansiyonundan 50 µl inokule edilmiştir. Dördüncü dikey sütun kuyucuklarına (A4 ve B4), test edilecek izolatın bakteri süspansiyonu 50 µl olarak inokule edilmiştir. Böylece her C-HPNP'i içeren kuyucuktaki son kolistin konsantrasyonu **3.75 µg/ml** olarak belirlenmiştir. Diğer bakteri suşları mikropak üzerinde aynı sırada dizilerek inokule edilmiştir. Sonra 37° C'deki etüvde dört saat inkübe edilmiştir [107].

İnkübasyon sonrasında C-HPNP solüsyonu içeren kuyucuklar, kırmızıdan sarıya renk değişimi gösterdiğinde test pozitif (kolistin-dirençli) olarak kabul edilmiştir. Kuyucuğun rengi değişmediğinde (kırmızı renkte kaldığında), test negatif (kolistin-duyarlı) olarak kabul edilmiştir [107].

Bu testte MİK değerleri gözle okunup, CLSI ve EUCAST breakpoint tablolarına göre değerlendirilmiştir [43, 64].

3.2.2.6.2. Rezasurine dayalı hızlı polimiksin NP testi (R-HPNP)

Son yıllarda Lescat ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve non-fermentatif bakterilerde kolistin direnci belirleyebilen rezasurine dayalı hızlı polimiksin NP testidir [84].

Bu testte 225 ml distile su içinde 6.25 g KAMHB besiyeri çözündürülüp pH'ı 7.2'ye ayarlandıktan sonra otoklavda 121° C de 15 dakika süreyle steril edilmiştir. Otoklavdan çıkarılıp oda ısısına gelinceye kadar soğuduktan sonra solüsyon ikiye bölünmüştür: kolistinli polimiksin NP (C-HPNP) solüsyonu ve kolistin içermeyen polimiksin NP (HPNP) solüsyonu. Kolistin içermeyen polimiksin NP (HPNP) solüsyonu hiç antibiyotik eklenmeden, kolistinli polimiksin NP (C-HPNP) solüsyonu kolistin stok solüsyonu eklenerek hazırlanmıştır. C-HPNP solüsyonu **3.75 µg/ml** konsantrasyonda kolistin içerecek şekilde hazırlanmıştır [84].

Standart suş ve test edilecek izolatların bakteri süspansiyonları 3.0-3.5 McFarland olacak şekilde ayarlanmıştır [84].

Test, tek bir izolat için 8 kuyucuk kullanılacak şekilde mikroplak üzerinde uygulanmıştır. İlk yatay sıradaki dört kuyucuğa (A1'den A4'e) kolistin içermeyen R-HPNP solüsyonundan 180 µl konup, ikinci yatay sıradaki dört kuyucuğa (B1'den B4'e) kolistin içeren R-HPNP (CR-HPNP) solüsyonundan 180 µl konulmuştur. Ardından ilk dikey sütündeki kuyucuklara (A1 ve B1) 20 µl tuzlu su (%0.85 Na Cl) ekleyerek sterilite testi olarak kullanılmıştır. İkinci dikey sütun kuyucuklarına (A2 ve B2), negatif-kontrol olarak kullanılmak üzere, kolistin-duyarlı suş (*P. aeruginosa*: ATCC 27853) bakteri süspansiyonundan 20 µl inokule edilmiştir. Üçüncü dikey sütun kuyucuklarına (A3 ve B3), pozitif-kontrol olarak kullanılmak üzere, *mcr-1* taşıyan *E. coli* ATCC 13846 bakteri süspansiyonundan 20 µl inokule edilmiştir. Dördüncü dikey sütun kuyucuklarına (A4 ve B4), test edilecek izolatın bakteri süspansiyonu 20 µl inokule edilmiştir. Böylece her CR-HPNP'i içeren kuyucuktaki son kolistin konsantrasyonu **3.75 µg/ml** olarak belirlenmiştir. Diğer bakteri suşları mikroplak üzerinde aynı sırada dizilerek inokule edilmiş ve 37° C'de üç saat etüvde inkübe edilmiştir. Üç saat inkübasyon sonrasında her kuyucuğa %10 konsantrasyondaki rezasurin solüsyonundan 22 µl eklenmiştir. Sonra tekrar etüve kaldırılıp bir saat boyunca her 15 dakikada bir renk değişimi gözlemlenmiştir. CR-HPNP solüsyonu içeren kuyucuklarda maviden mor veya pembeye renk değişim gözlemlendiğinde

test pozitif (kolistin-dirençli) olarak kabul edilmiştir. Kuyucuğun rengi değişmediğinde (mavi renkte kaldığında) , test negatif (kolistin-duyarlı) olarak kabul edilmiştir [84].

Bu testte MİK değerleri gözle okunup, CLSI ve EUCAST breakpoint tablolarına göre değerlendirilmiştir [43, 64].

3.2.3. Dama Tahta yöntemi

Çalışmada saptanan kolistine dirençli izolatların (n=15), kolistin-tigesiklin ve kolistin-meropenem kombinasyonlarına etkinliği sıvı mikrodilüsyon dama tahtası (Checker board) yöntemi ile araştırılmıştır. Tigesiklin, meropenem ve kolistin stok solüsyonları hazırlanıp ilgili suşlarda MİK değerleri test edildikten sonra mikroplak panelleri hazırlanmıştır. Bu deneyde, sinerjik etkileri araştırılacak her izolat başına biri kolistin-tigesiklin ve biri kolistin-meropenem olmak üzere iki 96 kuyucuklu ve U tabanlı steril polistiren mikroplak kullanılmıştır [80].

Her mikroplakta ilk sıra kuyucuklarına kolistin, ve ilk sütun kuyucuklarına tigesiklin veya meropenem aktarılmıştır. İlk kuyucuk (A1: Pozitif kontrol) ile son kuyucuk (H12: Negatif kontrol) dışında kalan tüm kuyucuklar, iki antibiyotiğin kombinasyonlarını içermektedir [80]. Şekil 3- 2.'de kolistin-meropenem mikroplağı üzerinde kombinasyonların dizilimi ve Σ FİK İndeksi hesaplanmasını gösteren örnek grafik, ve Şekil 3- 3.'de kolistin-tigesiklin mikroplağı üzerinde kombinasyonların dizilimi ve Σ FİK indeksi hesaplanmasını gösteren örnek grafik verilmiştir.

Kombinasyona girecek her antibiyotiğin, denenen izolat için BMD ile belirlenen MİK değerinin dört dilüsyon aşağısından başlayan dilüsyonları kullanılmıştır. Kolistin için 0.25-256 µg/ml arasındaki dilüsyonlar, tigesiklin için 0.007-0.5 µg/ml arasındaki dilüsyonlar ve meropenem için 2- 128 µg/ml arasındaki dilüsyonlar kullanılmıştır. Sadece bir bakteri suşu için (MİK değeri 0.5 µg/ml olarak bulunduğu) meropenemin 0.06-4 µg/ml arasındaki dilüsyonları kullanılmıştır. Antibiyotik stok solüsyonları, ayrı tüplerde çift kat dilüsyonlar şeklinde hazırlanmıştır. Bu tüplerden de ilgili meropenem veya tigesiklin solüsyonları yatay kuyucuklara 50 µl, ardından kolistin solüsyonları 50 µl aktarılmıştır. Bu şekilde her bir test kuyucuğunda son hacim 100 µl olacak şekilde her iki antibiyotik solüsyonundan kuyucuklara 50 µl aktarılmıştır [80].

Bakteri, MHB içinde 0,5 McFarland bulanıklığa kadar süspanse edilip 1:30 oranında dilüe edilmiştir. Bundan sonra bakteri süspansiyonu negatif kontrol kuyucuğu dışındaki tüm kuyucuklara dağıtılmıştır. Farklı bir mikropalak üzerinde ATCC suşu ile aynı deney kalite kontrol için tekrarlanmıştır [80].

Mikropalaklar steril şeffaf kapakla kapatılıp 35°C’de, 18- 24 saat inkübasyondan sonra gözle okunup, kuyucukların bulanıklığına göre bulanıklık gözlenmeyen ilk kuyucuk, MİK değeri olarak kaydedilip CLSI ve EUCAST breakpoint tablolarına göre değerlendirilmiştir [43, 64, 80].

Sinerjizm, indiferans veya antagonizm durumlarını belirlemek için elde edilen her iki antibiyotiğin fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) değerleri hesaplanıp iki antibiyotiğin toplam fraksiyonel inhibitör konsantrasyonları (Σ FİK) CLSI ve ASM rehberlerine göre hesaplanıp değerlendirilmiştir [23]. Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) değerlerini hesaplamak için aşağıdaki formuller kullanılmıştır:

$$FİK = \frac{\text{Antibiyotiğin kombinasyondaki MİK değeri}}{\text{Antibiyotiğin tek başına MİK değeri}}$$

Daha sonra sonuçlar ASM ve CLSI rehberlerine göre aşağıdaki tablodaki gibi yorumlanmış ve denenen konsantrasyonlar arasında antagonizm rastlanmadan sinerjizm rastlandığında, bu kombinasyon sinerjistik etkiye sahip olarak değerlendirilmiştir. Aksi durumda panel üzerinde bir tane kombinasyonda bile antagonizme rastlandığında kombinasyon, antagonistik etkiyi sahip olarak değerlendirmiştir [80]. ASM ve CLSI rehberlerine göre Σ FİK İndeksi’lerin yorumlanması Tablo 3-3.’de verilmiştir.

Tablo 3- 3. ASM ve CLSI’a göre Σ FİK İndeksi’nin yorumlanması.

Σ FİK İndeksi (FİK _a +FİK _b)	Yorum
≤ 0.5	Sinerjik etki
$0.5 - \leq 4$	İndiferans etki
>4	Antagonist etki

Sinerjik etki; iki antibiyotiğin birlikte kullanıldığında artan bakterisidal etkisidir. Bu etki kombinasyona giren her antibiyotiğin bir kat fazla konsantrasyonunun etkisinden daha

hızlıdır. **İndiferans etki**, kombinasyondaki antibiyotiklerin birlikte kullanıldığında, her birinin tek başına gösterdiği bakterisidal etkiden fazla olmayan etkidir. **Antagonist etki**, kombinasyondaki antibiyotiklerin birlikte gösterdiği etkinin, her birinin tek başına gösterdiği etkiden daha az olan etkidir [55].

Pozitif Kontrolu A	Colistin 1 0.25	Col: 0.5 2	Col: 1 3	Col: 2 4	Col: 4 5	Col: 8 6	Col: 16 7	Col: 32 8	Col: 64 9	Col: 128 10	Col: 256 11	Col: 256 12
Meropenem B	Col: 0.25 Mem: 2	Col: 0.5 Mem: 2	Col: 1 Mem: 2	Col: 2 Mem: 2	Col: 4 Mem: 2	Col: 8 Mem: 2	Col: 16 Mem: 2	Col: 32 Mem: 2	Col: 64 Mem: 2	Col: 128 Mem: 2	Col: 256 Mem: 2	Col: 256 Mem: 2
Mem: 4 C	Col: 0.25 Mem: 4	Col: 0.5 Mem: 4	Col: 1 Mem: 4	Col: 2 Mem: 4	Col: 4 Mem: 4	Col: 8 Mem: 4	Col: 16 Mem: 4	Col: 32 Mem: 4	Col: 64 Mem: 4	Col: 128 Mem: 4	Col: 256 Mem: 4	Col: 256 Mem: 4
Mem: 8 D	Col: 0.25 Mem: 8	Col: 0.5 Mem: 8	Col: 1 Mem: 8	Col: 2 Mem: 8	Col: 4 Mem: 8	Col: 8 Mem: 8	Col: 16 Mem: 8	Col: 32 Mem: 8	Col: 64 Mem: 8	Col: 128 Mem: 8	Col: 256 Mem: 8	Col: 256 Mem: 8
Mem: 16 E	Col: 0.25 Mem: 16	Col: 0.5 Mem: 16	Col: 1 Mem: 16	Col: 2 Mem: 16	Col: 4 Mem: 16	Col: 8 Mem: 16	Col: 16 Mem: 16	Col: 32 Mem: 16	Col: 64 Mem: 16	Col: 128 Mem: 16	Col: 256 Mem: 16	Col: 256 Mem: 16
Mem: 32 F	Col: 0.25 Mem: 32	Col: 0.5 Mem: 32	Col: 1 Mem: 32	Col: 2 Mem: 32	Col: 4 Mem: 32	Col: 8 Mem: 32	Col: 16 Mem: 32	Col: 32 Mem: 32	Col: 64 Mem: 32	Col: 128 Mem: 32	Col: 256 Mem: 32	Col: 256 Mem: 32
Mem: 64 G	Col: 0.25 Mem: 64	Col: 0.5 Mem: 64	Col: 1 Mem: 64	Col: 2 Mem: 64	Col: 4 Mem: 64	Col: 8 Mem: 64	Col: 16 Mem: 64	Col: 32 Mem: 64	Col: 64 Mem: 64	Col: 128 Mem: 64	Col: 256 Mem: 64	Col: 256 Mem: 64
Mem: 128 H	Col: 0.25 Mem: 128	Col: 0.5 Mem: 128	Col: 1 Mem: 128	Col: 2 Mem: 128	Col: 4 Mem: 128	Col: 8 Mem: 128	Col: 16 Mem: 128	Col: 32 Mem: 128	Col: 64 Mem: 128	Col: 128 Mem: 128	Sterilite Kontrolu	

Üreme olmayan kuyucuk	Kolistin (Antibiyotik A)		Meropenem (Antibiyotik B)		ΣFik (Fik A +Fik B)	Yorum
	Kons. (µg/ml)	FİK (A)	Kons. (µg/ml)	FİK (B)		
A9	32	A Mik'i	0	A Mik'i	A Mik'i	A Mik'i
B5	2	0.0625	2	0.0625	0.125	Syn
C5	2	0.0625	4	0.125	0.1875	Syn
D5	2	0.0625	8	0.25	0.3125	Syn
E4	1	0.03125	16	0.5	0.53125	ind.
E3	0.5	0.015625	16	0.5	0.515625	ind.
F1	0	B Mik'i	32	B Mik'i	B Mik'i	B Mik'i

Şekil 3- 2. Dama tahtası yönteminin örnek grafiği
Kolistin-meropenem mikroyağı üzerinde kombinasyonların dizilimini ve ΣFİK İndeksi hesaplanmasını gösteren grafik.

Pozitif Kontrolü	Colistin 0.25	Col: 0.5	Col: 1	Col: 2	Col: 4	Col: 8	Col: 16	Col: 32	Col: 64	Col: 128	Col: 256
A	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tigesiklin 0.0078	Col: 0.25 Tig: 0.0078	Col: 0.5 Tig: 0.0078	Col: 1 Tig: 0.0078	Col: 2 Tig: 0.0078	Col: 4 Tig: 0.0078	Col: 8 Tig: 0.0078	Col: 16 Tig: 0.0078	Col: 32 Tig: 0.0078	Col: 64 Tig: 0.0078	Col: 128 Tig: 0.0078	Col: 256 Tig: 0.0078
B											
Tig: 0.0156	Col: 0.25 Tig: 0.0156	Col: 0.5 Tig: 0.0156	Col: 1 Tig: 0.0156	Col: 2 Tig: 0.0156	Col: 4 Tig: 0.0156	Col: 8 Tig: 0.0156	Col: 16 Tig: 0.0156	Col: 32 Tig: 0.0156	Col: 64 Tig: 0.0156	Col: 128 Tig: 0.0156	Col: 256 Tig: 0.0156
C											
Tig: 0.0312	Col: 0.25 Tig: 0.0312	Col: 0.5 Tig: 0.0312	Col: 1 Tig: 0.0312	Col: 2 Tig: 0.0312	Col: 4 Tig: 0.0312	Col: 8 Tig: 0.0312	Col: 16 Tig: 0.0312	Col: 32 Tig: 0.0312	Col: 64 Tig: 0.0312	Col: 128 Tig: 0.0312	Col: 256 Tig: 0.0312
D											
Tig: 0.625	Col: 0.25 Tig: 0.625	Col: 0.5 Tig: 0.625	Col: 1 Tig: 0.625	Col: 2 Tig: 0.625	Col: 4 Tig: 0.625	Col: 8 Tig: 0.625	Col: 16 Tig: 0.625	Col: 32 Tig: 0.625	Col: 64 Tig: 0.625	Col: 128 Tig: 0.625	Col: 256 Tig: 0.625
E											
Tig: 0.125	Col: 0.25 Tig: 0.125	Col: 0.5 Tig: 0.125	Col: 1 Tig: 0.125	Col: 2 Tig: 0.125	Col: 4 Tig: 0.125	Col: 8 Tig: 0.125	Col: 16 Tig: 0.125	Col: 32 Tig: 0.125	Col: 64 Tig: 0.125	Col: 128 Tig: 0.125	Col: 256 Tig: 0.125
F											
Tig: 0.25	Col: 0.25 Tig: 0.25	Col: 0.5 Tig: 0.25	Col: 1 Tig: 0.25	Col: 2 Tig: 0.25	Col: 4 Tig: 0.25	Col: 8 Tig: 0.25	Col: 16 Tig: 0.25	Col: 32 Tig: 0.25	Col: 64 Tig: 0.25	Col: 128 Tig: 0.25	Col: 256 Tig: 0.25
G											
Tig: 0.5	Col: 0.25 Tig: 0.5	Col: 0.5 Tig: 0.5	Col: 1 Tig: 0.5	Col: 2 Tig: 0.5	Col: 4 Tig: 0.5	Col: 8 Tig: 0.5	Col: 16 Tig: 0.5	Col: 32 Tig: 0.5	Col: 64 Tig: 0.5	Col: 128 Tig: 0.5	Sterilite Kontrolü
H											

Üreme olmayan	Kolistin (Antibiyotik A)		Tigesiklin (Antibiyotik B)		ΣFik (Fik A +Fik B)	Yorum
	Kons. (µg/ml)	Fik (A)	Kons. (µg/ml)	Fik (B)		
A7	8	A MİK'i	0	A MİK'i	A MİK'i	A MİK'i
B5	2	0.25	0.0078	0.0156	0.2656	Syn
C5	2	0.25	0.0156	0.0312	0.2812	Syn
D5	2	0.25	0.0312	0.0624	0.3124	Syn
E5	2	0.25	0.0625	0.125	0.375	Syn
F5	2	0.25	0.125	0.25	0.5	Syn
G5	2	0.25	0.25	0.5	0.75	ind.
H1	0	B MİK'i	0.5	B MİK'i	B MİK'i	B MİK'i

Şekil 3- 3. Dama tahtası yönteminin örnek grafiği.

Kolistin-tigesiklin mikroploağı üzerinde kombinasyonların dizilimini ve ΣFİK indeksi hesaplanmasını gösteren örnek grafik.

3.2.4. Moleküler testler

Çalışmaya alınan 102 bakteri suşu içindeki kolistine dirençli bakterilerin (n=15) *mcr-1* direnç genine sahip olup olmadığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır. Literatüre göre ülkemizde sadece *mcr-1* geni bulunduğu için sadece bu gen araştırılmıştır [76].

3.2.4.1. DNA ekstraksiyonu

TSA besiyerinde pasajı yapılmış 18-24 saatlik saf kültürden bir kaç koloni alınarak, 1000 µl filtre edilmiş steril distile suda ependorf içinde süspanse edilmiştir. Süspansiyon su banyosunda 95° C’de 10 dakika kaynatıldıktan sonra 13000 g’de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra dibe çöken pelletin üst kısmındaki sıvıdan, başka bir steril ependorf tüpe 400 µl aktarılmıştır. Elde edilen DNA ekstraktı -20° C’de saklanmıştır [136].

3.2.4.2. DNA Amplifikasyonu

Total hacmi 25 µl olan örnek PCR karışımı hazırlamak için;

- 12,5 µl 2x Taq PCR Master Mix [2]
- 0,5'er µl (10 pmol) primer (CLR5-F, CLR5-R) (Son konsantrasyon 2 µM)
- 10,5 µl dH₂O
- 1 µl DNA

Primerler, üretici firma önerileri doğrultusunda nükleaz-free su ilave edilip pipetaj yapılarak çözünmüştür. 25 µM primer olacak şekilde hesaplama yapıp her 100 µm derişimi stok haline getirebilmek için 649 µl nükleaz-free su ilave edilerek buz üzerinde pepitaj yapılarak sulandırılmıştır. Bu çalışmada kullanılmak üzere primerler ayrı tüplere 12,5 µM'a 37,5 µM su ilave ederek hazırlanmıştır. Daha sonra son konsantrasyon 2 µM olmak üzere her primerden 2 µl kullanılmıştır [2].

Pozitif kontrol olarak *E. coli* ATCC 13846 (*mcr-1* pozitif, kolistin-dirençli, 309 bp) suşundan ekstrakte edilen DNA kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak hedef DNA yerine aynı miktarda distile su kullanılmıştır. Daha sonra elde edilen PCR karışımları, PCR cihazına (Thermofisher, ABD) konarak aşağıdaki amplifikasyon programına göre çoğaltılmıştır.

Amplifikasyon programı:

94 °C'de 30 saniye denatürasyon,

57 °C'de 90 saniye bağlanma,

72 °C'de 60 saniye uzama.

3.2.4.3. Agaroz jel elektroforezi

Bir parafilm üzerine yüklenecek amplifikasyon ürününden 9 µl, bromfenol mavisi 1 µl ile karıştırılıp agaroz jeldeki kuyucuklara yüklendikten sonra, elektroforez cihazında 100 V'da 40 dakika yürütülmüştür [102].

3.2.4.4. Agaroz jel görüntüleme

Agaroz jel, translüminatör (Thermofisher, ABD) üzerine alınarak UV ışık altında görüntülenmiştir.

3.2.5. İstatistiki değerlendirme

Çalışmanın istatistiki olarak anlamlılığını belirlemek için aşağıdaki testler uygulanmıştır:

Elde edilen MİK değerlerinin altın standart yöntem ile uygunluğu için;

1. Esansiyel uyum (EU) ve kategorik uyum (KU),
2. Küçük hata (KH), büyük hata (BH) ve çok büyük hata (ÇBH) oranları,

Kategorik uyum-KA: Denenen test yöntemi, altın standart yöntemle elde edilen sonuçlar ile aynı kategorik sonuçları (duyarlı-dirençli-orta duyarlı) göstermelidir.

$$KU = \frac{\text{Altın standart yöntemle kategorik uyum gösteren izolatların sayısı} \times 100}{\text{Tüm izolatların sayısı}}$$

Esansiyel uyum-EU: Denenen test yöntemi ile elde edilen MİK değerleri, altın standart yöntemle elde edilen MİK değerlerinden ± 1 dilüsyon fark göstermelidir. (KU ve EU % 90'dan büyük olmalıdır)

$$EU = \frac{\text{Altın standart yöntemle elde edilen MİK değerlerinden } \pm 1 \text{ dilüsyon fark gösteren izolatların sayısı} \times 100}{\text{Tüm izolatların sayısı}}$$

Çok büyük hata-ÇBH: Denenen test yöntemi, altın standart yöntem ile elde edilen dirençli sonuçların duyarlı olarak bulunmasıdır (ÇBH % 3'den az olmalıdır) [43].

$$\text{ÇBH} = \frac{\text{Yanlış olarak duyarlılık gösteren izolatların sayısı} \times 100}{\text{Standart yönteme göre dirençli izolatların sayısı}}$$

Büyük hata-BH: Denenen test yöntemi, altın standart yöntem ile elde edilen duyarlı sonuçların dirençli olarak bulunmasıdır. (BH %3 'den az olmalıdır)

$$BH = \frac{\text{Yanlış olarak direnç gösteren izolatların sayısı} \times 100}{\text{Standart yönteme göre duyarlı izolatların sayısı}}$$

Küçük hata-KH: Denenen test yöntemi ile elde edilen MİK değeri, altın standart yöntemle elde edilen MİK değerinden farklı, ancak aynı kategorik sınırlar içinde olmalıdır. (KH %10'dan az ya da eşit olmalıdır)

$$KH = \frac{\text{Aynı kategorik sınırlar içinde ancak farklı MİK değeri gösteren izolatların sayısı} \times 100}{\text{Tüm izolatların sayısı}}$$

Bu değerleri hesaplayabilmek için bir grafik hazırlanmıştır. BMD yöntemi ile karşılaştırılacak olan her yöntem için bir tablo çizilmiştir. Tablonun ilk yatay sırasında BMD'unun MİK değerleri, ilk dikey sütunda denenen yöntemin MİK değerleri sırayla

dizilmiştir. Tablo, kolistin breakpoint aralığında (MİK:2 µg/ml ve MİK: 4 µg/ml arasında) yatay ve dikey çizgilerle dört bölüme ayrılmıştır. Örneğin; 1.bölge (yeşil): Her iki yöntemle göre de duyarlı, 2.bölge (turuncu): sadece BMD'a göre dirençli (ÇBH), 3.bölge (sarı): sadece BMD'a göre duyarlı (BH), 4.bölge (mavi): her iki yöntemle göre de dirençli (KH), toplam izolat sayısı: 15; üç izolat hem BMD hem diğer yöntemle ≤ 0.25 µg/ml, bir izolat BMD ile ≤ 0.25 µg/ml ve diğer yöntemle 0.5 µg/ml vermiştir. Dört izolat. İki büyük hata, beş küçük hata vardır. Referans yöntem ve denenen yöntem ile elde edilen MİK değerleri çaprazlama şekilde tabloya yerleştirilir. Dört izolat BMD'a göre dirençli, diğer yöntemle göre duyarlı bulunmuştur (çok büyük hata). İki izolat, BMD'e göre duyarlı, diğer yöntemle göre dirençli bulunmuştur (büyük hata). Beş izolat referans yöntem ile elde edilenden farklı, ama aynı kategorik sınırlar içinde bir MİK değeri vermiştir (küçük hata)(Şekil 3-4).

		BMD									
		≤ 0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
BMD ile karşılaştırılan yöntem	≤ 0.25	3									
	0.5	1							4 ÇBH		
	1										
	2										
	4										
	8		2 BH						5 KH		
	16										
	32										
	64										
	128										

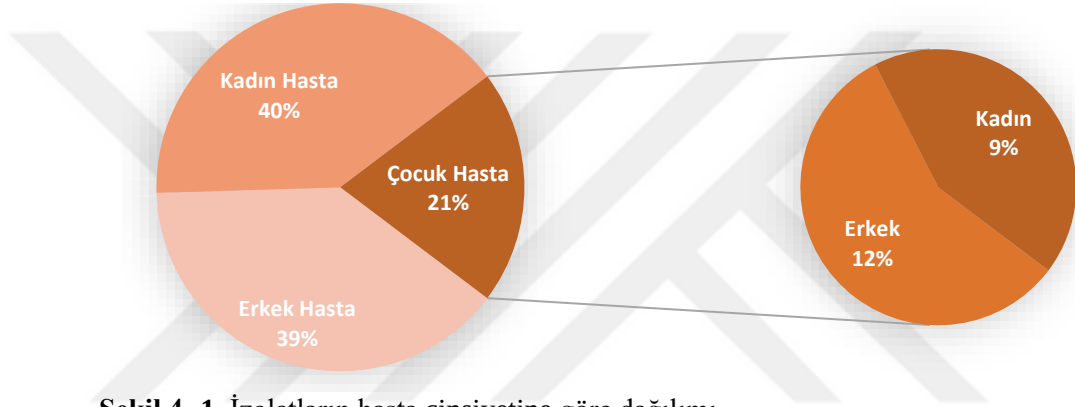
Şekil 3- 4. Kategorik ve esansiyel uyum için örnek tablo

4. BULGULAR

4.1 İzolatlar

4.1.1. Hastaların yaş ve cinsiyete göre dağılımı

Çalışmaya dahil edilen suşların izole edildiği hastaların çoğunun (%79) yetişkin hasta olduğu, ve erkek hasta sayısının (n=52-%51) kadın hasta sayısından (n=49-%50) birbirine yakın olduğu, hastaların yaş aralığının 0-96 arasında ve yaş ortalamasının 50 ± 27 olduğu görülmüştür (Şekil 4-1).



Şekil 4- 1. İzolatların hasta cinsiyetine göre dağılımı

4.1.2. Hastaların altta yatan hastalıklarına göre dağılımı

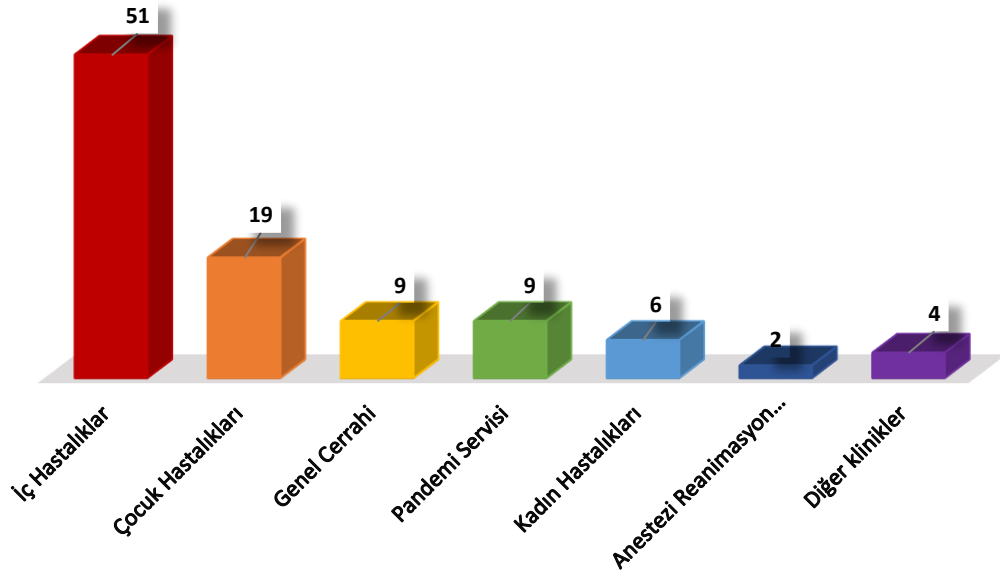
Çalışmaya alınan bakterilerin izole edildiği hastalarda mevcut klinik tanımlar tabloda belirtilmiştir. On beş (%15) hastada tanı belirlenmemiş olup kalan hastalarda altta yatan hastalıklar tabloda belirtilmiştir. (Tablo 4-1.)

Tablo 4- 1. Hastaların altta yatan hastalıklarına göre dağılımı

Altta Yatan hastalık	n	%	Altta Yatan hastalık	n	%
Kanser	14	13	Böbrek yetmezliği	6	6
COVID-19	9	9	Lösemi	5	5
Üriner sistem enfeksiyonu	9	9	Safra kesesi srozu	3	3
Diyabet	8	7.5	Hepatit B	3	3
Karaciğer sirozu	7	6.5	Batı Nil ateşi	3	3
Pnömoni	6	6	Febril nötropeni	2	2
Solid organ transplantasyonu	6	6	Yumuşak doku enfeksiyonu	1	1
Sindirim sistemi hastalıkları	6	6	Tanı belirlenmemiş	15	15
Toplam				102	100

4.1.3. İzolatların Kliniklere Göre Dağılımı

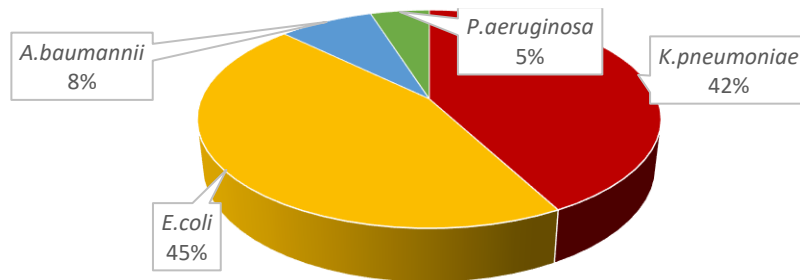
Bu çalışmada kullanılan izolatlar, Ocak 2019- Temmuz 2020 aralığındaki 18 aylık süreçte, çeşitli kliniklerden Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen kan kültürlerinden izole edilen çoğul-dirençli Gram-negatif bakterileri kapsamaktadır. Çoğul dirençli bakteri izole edilen kan kültürlerinin gönderildiği klinikler grafikte gösterilmiştir. En fazla çoğul dirençli bakteri izole edilen kliniğin İç Hastalıklar Birimi olduğu görülmektedir (Şekil 4-2).



Şekil 4- 2. Hastaların kliniklere göre dağılımı

4.1.4. İzolat Türüne Göre Dağılımı

Çalışma kriterlerine uygun 102 çoğul-dirençli Gram-negatif bakteri izole edilmiştir. Bakterilerin çoğunluğunun (%87) *K. pneumoniae* (n=43) ve *E. coli* (n=46), kalanının *A. baumannii* (n= 8) ve *P. aeruginosa* (n=5) olduğu görülmektedir (Şekil 4-3).



Şekil 4- 3. Bakteri türüne göre izolatların dağılım oranı

4.2. Disk Difüzyon Sonuçları

Tablo 4- 2. *K. pneumoniae* izolatlarının disk difüzyon yöntemine göre antibiyotik duyarlılıkları.

Antibiyotikler	Duyarlı		Orta duyarlı		Dirençli	
	n	%	n	%	n	%
Ampisilin+Sulbaktam	8	19	9	21	26	60
Amoksisilin+Klavulanik asit	4	9	15	35	24	56
Piperasilin +Tazobaktam	15	35	3	7	25	58
Sefazolin	0	0	0	0	43	100
Sefuroksim	0	0	0	0	43	100
Sefoksitin	22	51	0	0	21	49
Sefotaksim	0	0	0	0	43	100
Seftazidim	2	5	0	0	41	95
Sefepim	3	7	10	23	30	70
İmipenem	21	49	7	16	15	35
Meropenem	20	46	5	12	18	42
Ertapenem	19	44	1	2	23	54
Gentamisin	17	40	1	2	25	58
Amikasin	22	51	3	7	18	42
Tobramisin	11	25	2	5	30	70
Trimetoprim/Sulfametoksazol	6	14	0	0	37	86
Siprofloksasin	7	16	14	33	22	51

Tablo 4- 3. *E. coli* izolatlarının disk difüzyon yöntemine göre antibiyotik duyarlılıkları.

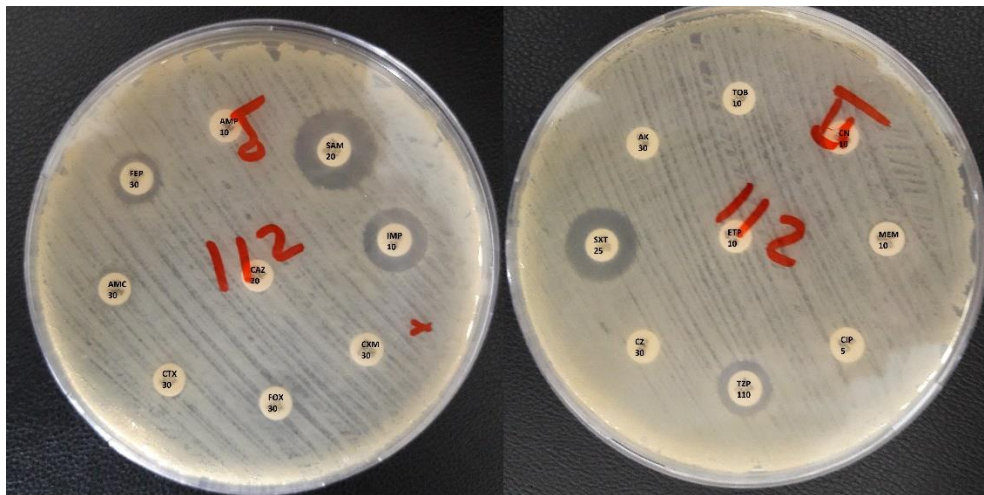
Antibiyotikler	Duyarlı		Orta duyarlı		Dirençli	
	n	%	n	%	n	%
Ampisilin+Sulbaktam	26	56.5	9	19.5	11	24
Amoksisilin+Klavulanik asit	25	54	10	22	11	24
Piperasilin +Tazobaktam	40	87	4	9	2	4
Sefazolin	0	0	0	0	46	100
Sefuroksim	1	2	1	2	44	96
Sefoksitin	39	85	2	4	5	11
Sefotaksim	0	0	0	0	46	100
Seftazidim	0	0	18	39	28	61
Sefepim	6	13	22	48	18	39
İmipenem	45	98	1	2	0	0
Meropenem	46	100	0	0	0	0
Ertapenem	45	98	0	0	1	2
Gentamisin	22	48	1	2	23	50
Amikasin	44	96	0	0	2	4
Tobramisin	27	59	5	11	14	30
Trimetoprim/Sulfametoksazol	18	39	0	0	28	61
Siprofloksasin	11	24	3	6.5	32	69.5

Tablo 4- 4. *A. baumannii* izolatlarının disk difüzyon yöntemine göre antibiyotik duyarlılıkları.

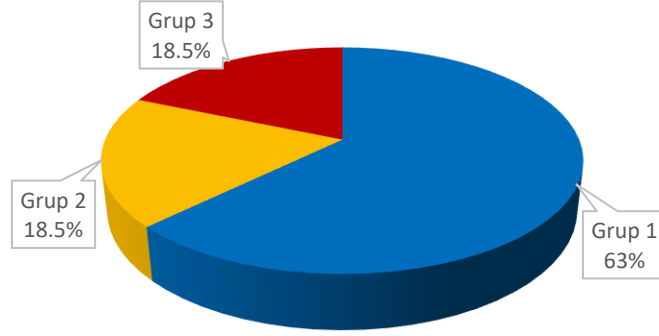
Antibiyotikler	Duyarlı (n)	Orta duyarlı (n)	Dirençli (n)
Amoksisilin+Sulbaktam	3	3	2
Piperasilin+Tazobaktam	0	0	8
Seftazidim	0	0	8
Sefepim	0	0	8
İmipenem	0	1	7
Meropenem	0	0	8
Gentamisin	1	0	7
Amikasin	2	0	6
Tobramisin	1	0	7
Trimetoprim/Sulfametoksazol	1	0	7
Siprofloksasin	0	0	8

Tablo 4- 5. *P. aeruginosa* izolatlarının disk difüzyon yöntemine göre antibiyotik duyarlılıkları.

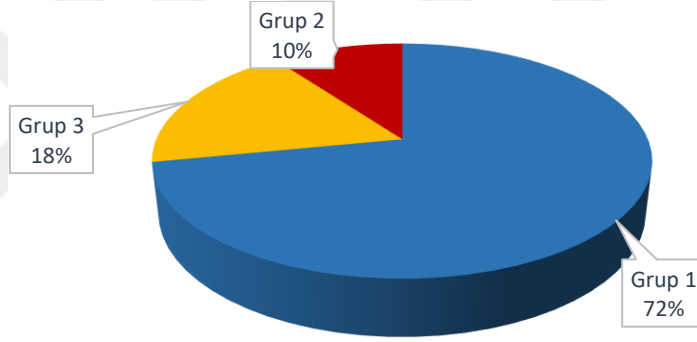
Antibiyotikler	Duyarlı (n)	Orta duyarlı (n)	Dirençli (n)
Piperasilin+Tazobaktam	0	2	3
Seftazidim	5	0	0
Sefepim	3	1	1
İmipenem	1	2	2
Meropenem	0	1	4
Gentamisin	5	0	0
Amikasin	5	0	0
Siprofloksasin	4	1	0

**Şekil 4- 4.** Çalışılan disk difüzyon deneyi sonuçlarına ait örnek plak

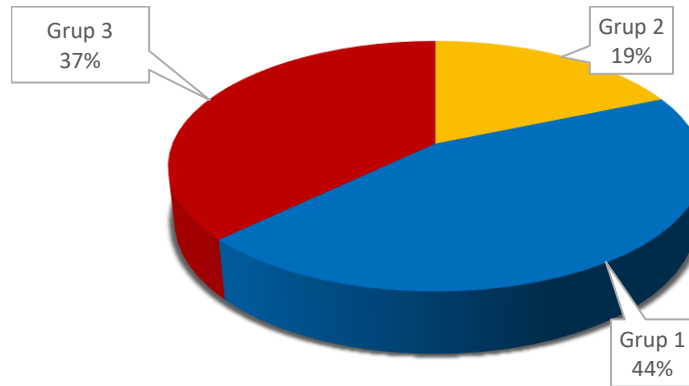
Antibiyotik duyarlılıklarına göre üç gruba ayrılan izolatların, gruplara göre dağılım grafiklerde gösterilmiştir (Şekil4-5,6,7).



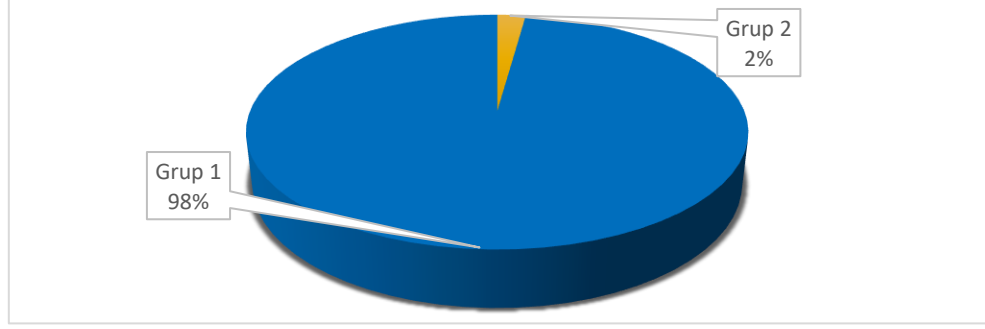
Şekil 4- 5. Tüm izolatların gruplarını gösteren şekil.



Şekil 4- 6. Enterobacteriaceae izolatlarında gruplara göre yüzde oranları

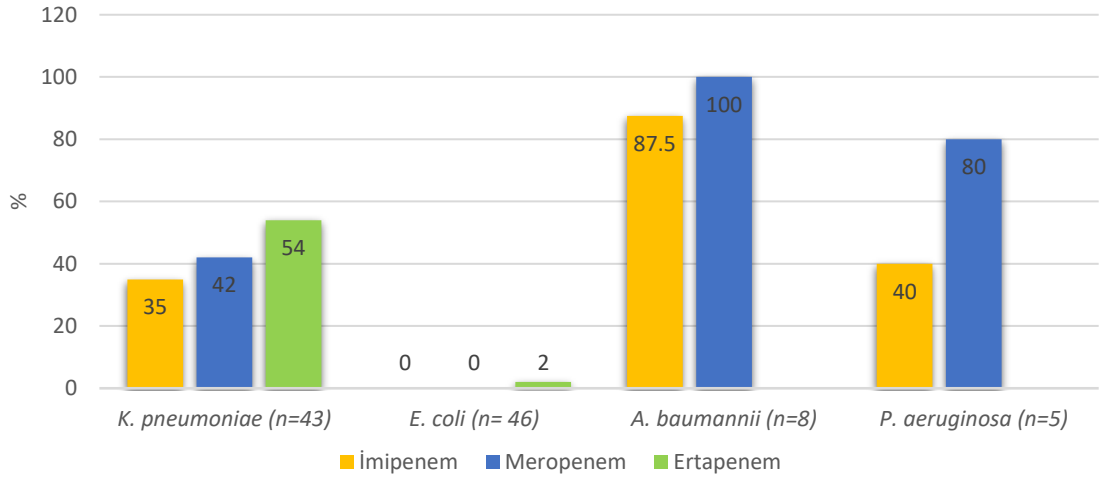


Şekil 4- 7. K. pneumoniae izolatlarında gruplara göre yüzde oranları.



Şekil 4- 8. *E. coli* izolatlarında gruplara göre yüzde oranları.

İzolatların karbapenemlere direnç oranları grafikte gösterilmiştir (Şekil 4-9).



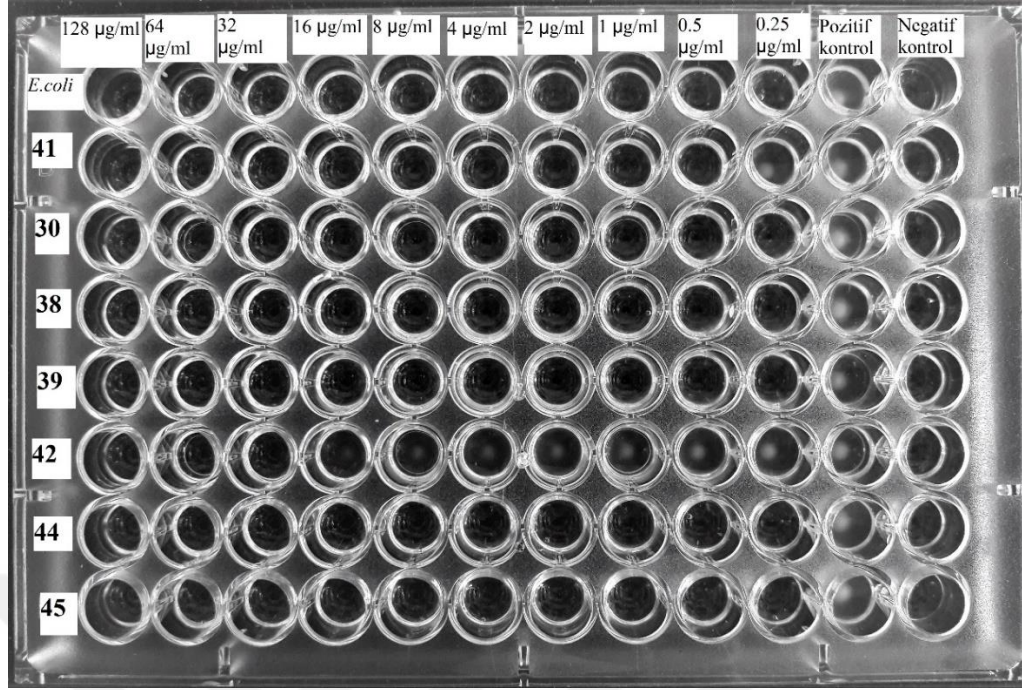
Şekil 4- 9. Tüm izolatların karbapenemlere direnç oranları.

4.3. Minimal İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) deneyleri

Çalışılan dört yönteme göre izolatların %85'inin kolistine duyarlı (MİK: <2 µg/ml) olduğu görülmüştür. İzolatların %15'i kolistine dirençli (MİK: >2 µg/ml) olarak bulunmuştur.

4.3.1. Sıvı Mikrodilüsyon sonuçları

Çalışmada standart BMD yöntemine göre izolatların %15'i kolistine dirençli (MİK: >2 µg/ml), %85'i kolistine duyarlı (MİK: <2 µg/ml) bulunmuştur.



Şekil 4- 10. Çalışılan BMD test sonucu örnek resmi.

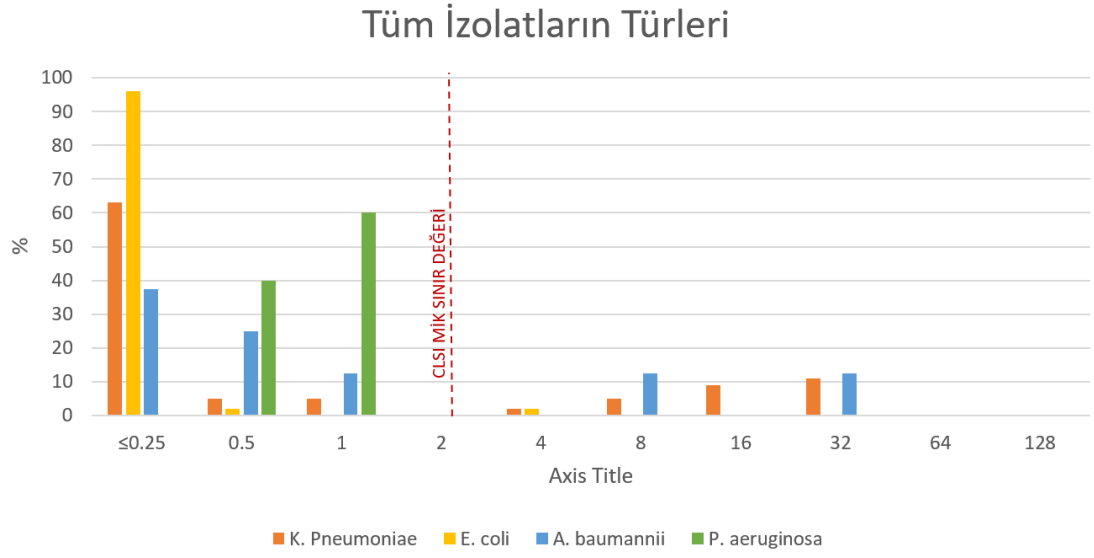
*(30,38,39,44 ve 45 nolu izolatların MİK değeri ≤ 0.25 µg/ml, 41 nolu izolatın MİK değeri: 0.5 µg/ml ve 42 nolu izolatın MİK değeri: 32 µg/ml).

Çalışmaya alınan izolatların kolistin için MİK aralığı BMD yöntemine göre ≤ 0.25 -32 µg/ml arasında bulunmuştur. Tüm suşlar için ikişer defa çalışılmıştır. Negatif kontrol kuyucuklarında üreme gözlemlendiğinde veya pozitif kontrol kuyucuklarında üreme gözlemlenmediğinde test tekrarlanmıştır. Her suş için, yatay sırada üreme olmayan (nokta üreme şeklinde) ilk kuyucuktaki kolistin konsantrasyonu, o izolatın MİK değeri olarak kabul edilmiştir (Şekil 4-10).

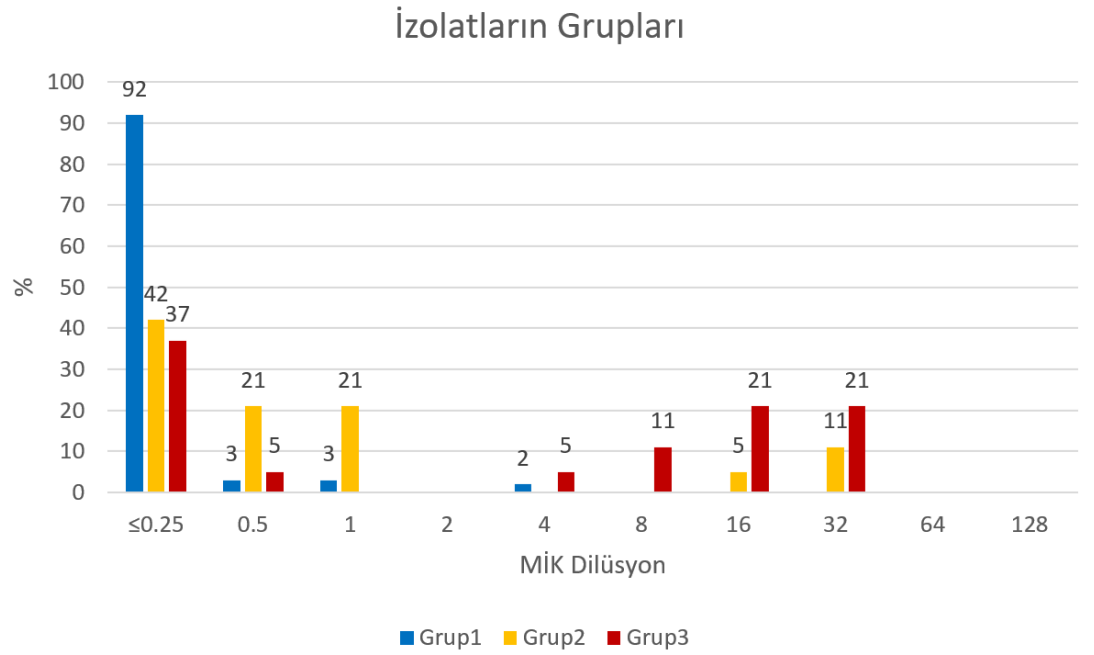
Kolistine dirençli suşların *K. pneumoniae*, *A. baumannii* ve *E. coli* izolatlarına ait olduğu görülmektedir. Kolistine dirençli *P. aeruginosa* suşuna rastlanmamıştır (Tablo 4-8).

Tablo 4- 6. Kolistine dirençli izolatların farklı parametrelere göre dağılımı

Parametre		n	%
Bakteri grupları	Grup 1	2	13.3
	Grup 2	3	20
	Grup 3	10	66.7
Bakteri türü	<i>K. pneumoniae</i>	12	80
	<i>A. baumannii</i>	2	13
	<i>E. coli</i>	1	7
Hasta cinsiyeti	Kadın	6	40
	Erkek	9	60
Hasta yaşı	Yetişkin	13	86.7
	Çocuk	2	13.3
Klinik	İç Hastalıkları	6	40
	Cerrahi Birimi	4	26.6
	Pandemi servisi	2	13.3
	Kadın Hastalıkları	1	6.6
	Çocuk Hastalıkları	1	6.6
	Reanimasyon Anestezi Birimi	1	6.6
Hastalık Tanısı	Kanser	4	40
	Solid organ transplantasyonu	3	20
	COVID-19	2	13.3
	Böbrek yetmezliği	1	6.6
	Peptik ülser	1	6.6
	Yumuşak doku enfeksiyonu	1	6.6
	Tanı belirtilmemiş	1	6.6



Şekil 4- 11. Suşların BMD yöntemine göre dilüsyonlardaki dağılımı



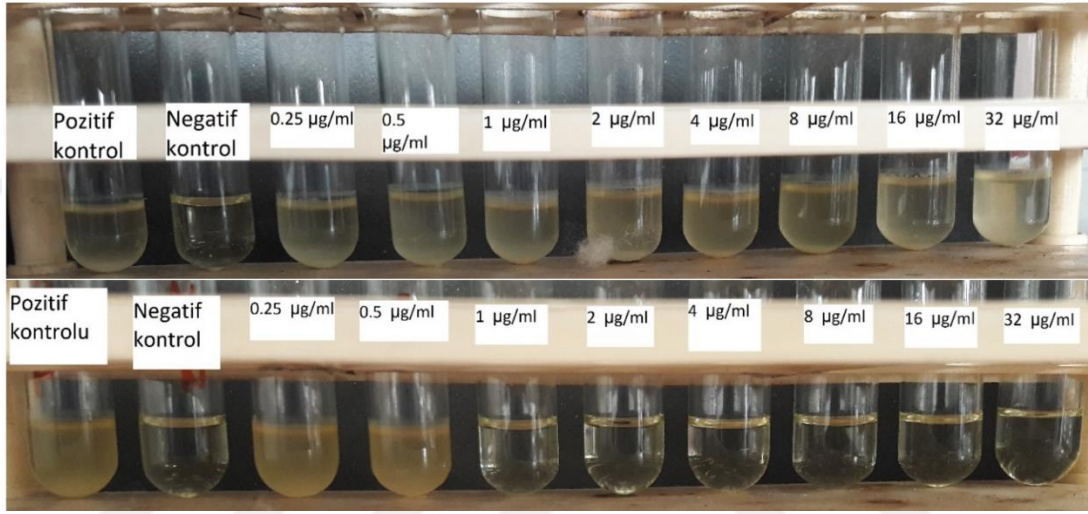
Şekil 4- 12. Suşların BMD yöntemine göre dilüsyonlardaki dağılımı

Tablo 4- 7. Suşların BMD yöntemine göre MİK₅₀ ve MİK₉₀ dilüsyonları

MİK Dilüsyonu	Toplam sayı	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Grup1	Grup 2	Grup 3
Mik₅₀ (µg/ml)	≤0.25	≤0.25	≤0.25	0.5	0.5	≤0.25	0.5	4
Mik₉₀ (µg/ml)	8	16	≤0.25	8	1	≤0.25	16	32

4.3.2. Sıvı Makrodilüsyon sonuçları

Çalışmaya alınan izolatların makrodilüsyon yöntemine göre kolistine duyarlılık aralığı ≤ 0.25 -64 $\mu\text{g/ml}$ arasında bulunmuştur. MİK_{50} , MİK_{90} sırayla ≤ 0.25 , 8 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Makrodilüsyon yöntemi ile izolatların 15'inde kolistin MİK 'i >2 $\mu\text{g/ml}$ olduğu, 4'ünde MİK 'i 2 $\mu\text{g/ml}$ ve 83'sinde kolistin MİK 'i <2 $\mu\text{g/ml}$ olduğu bulunmuştur.



Şekil 4- 13. Çalışılan makrodilüsyon tüplerini gösteren örnek resmi.
[Üstteki resim: 17 nolu izolat (MİK : >32 $\mu\text{g/ml}$), Alttaki resim: 16 nolu izolat (MİK : 1 $\mu\text{g/ml}$)].

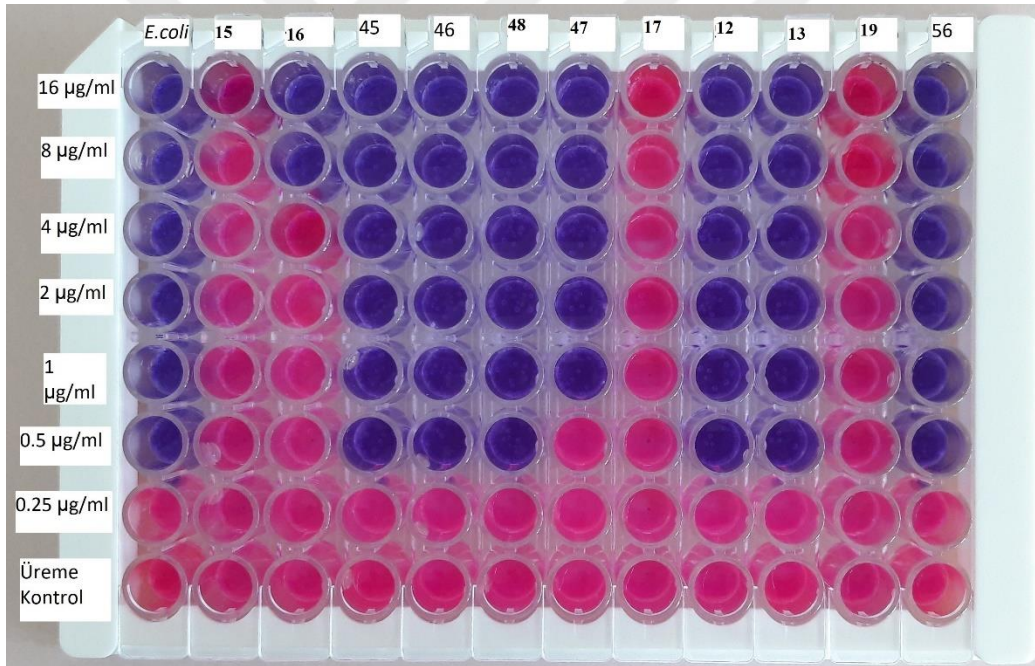
		BMD ($\mu\text{g/ml}$)										
		≤ 0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	
Makrodilüsyon ($\mu\text{g/ml}$)	≤ 0.25	49	4	1								
	0.5	15	3	2								
	1	5		1								
	2	3		2								
	4	2				2		1				
	8						1	3	2			
	16						1	1	3			
	32											
	64									1		
	128											

Şekil 4- 14. Makrodilüsyon yönteminin BMD ile KU ve EU grafiği.

Makrodilüsyon yönteminin sonuçları, standart BMD sonuçlarıyla kıyaslandığında iyi (%98) kategorik uyum (KU) ve nispeten iyi (%86) esansiyel uyum (EU) gösterdiği görülmektedir. Çok büyük hata görülmemesine rağmen, 2 (%2) büyük hata ve 12 (%12) küçük hata görülmüştür (Şekil 4-12).

4.3.3.Ticari Mikrodilüsyon sonuçları

Çalışma kapsamına alınan izolatların ticari mikrodilüsyon yöntemine göre, kolistine duyarlılık aralığı $<0.5\text{-}>16\text{ }\mu\text{g/ml}$ arasında olduğu bulunmuştur. Mik₅₀, Mik₉₀ sırayla 0.5, 8 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur Ticari mikrodilüsyon yöntemi ile izolatların 15'inin kolistin MİK'i $>2\text{ }\mu\text{g/ml}$ ve 87'sinin kolistin MİK'i $<2\text{ }\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 4- 15. Çalışılan ticari mikrodilüsyon mikroploağını gösteren örnek resim

*(15,17,19 nolu izolatların kolistin MİK'i: $>16\text{ }\mu\text{g/ml}$ ve 16 nolu izolatın kolistin MİK'i: $8\text{ }\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur).

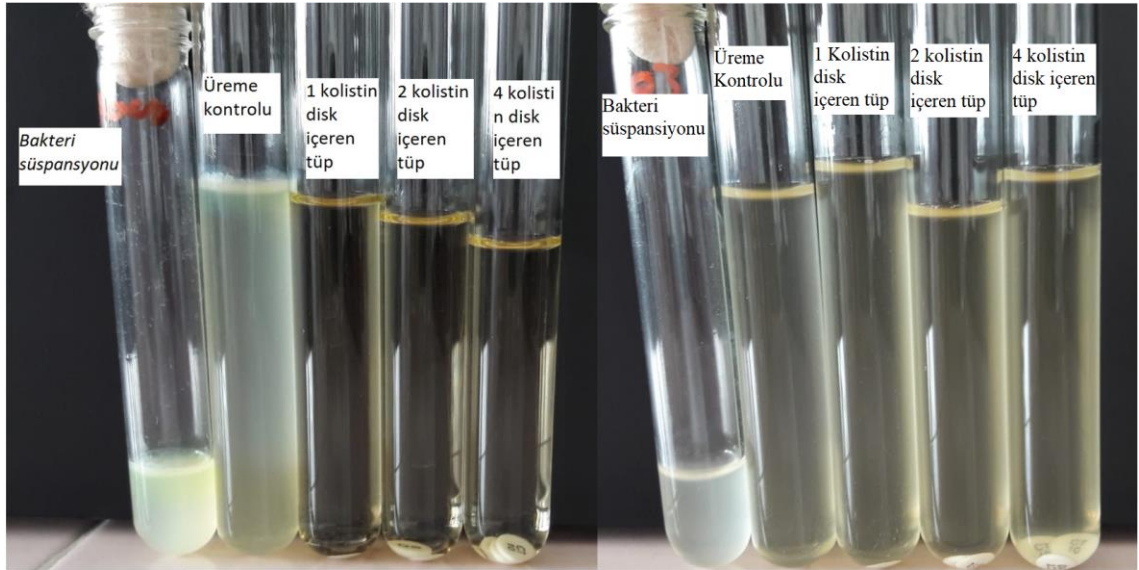
		BMD ($\mu\text{g/ml}$)									
		≤ 0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
Ticari Mikrodilüsyon ($\mu\text{g/ml}$)	≤ 0.25										
	0.5	55	2								
	1	18	3	3							
	2	1	2	3							
	4					1					
	8					1	2		1		
	16							4	2		
	>16							1	3		

Şekil 4- 16. Ticari mikrodilüsyon yöntemin BMD ile KU ve EU grafiği.

Ticari mikrodilüsyon yönteminin sonuçları, BMD yönteminin MİK sonuçlarıyla kıyaslandığında çok iyi (%100) KU ve düşük (%78) EU gösterdiği görülmektedir. ÇBH görülmemesine rağmen 22 (%20) KH görülmektedir (Şekil 4-14).

4.3.4. Disk Elüsyon sonuçları

Disk elüsyon yöntemine göre, izolatların 15'inde kolistin MİK'i $>2 \mu\text{g/ml}$ olduğu ve 87'inin kolistin MİK'i $<2 \mu\text{g/ml}$ olduğu bulunmuştur.



Şekil 4- 17. Çalışılan disk elüsyon yöntemine örnek.

*Solda: Duyarlı suş (MİK: $<1 \mu\text{g/ml}$). Sağda: Dirençli suş (MİK: $>4 \mu\text{g/ml}$)

		Sıvı mikrodilüsyon ($\mu\text{g/ml}$)									
		<0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
Disk Elüsyon ($\mu\text{g/ml}$)	<1	70	7	6							
	2	4									
	4					1	1				
	>4					1	1	5	6		

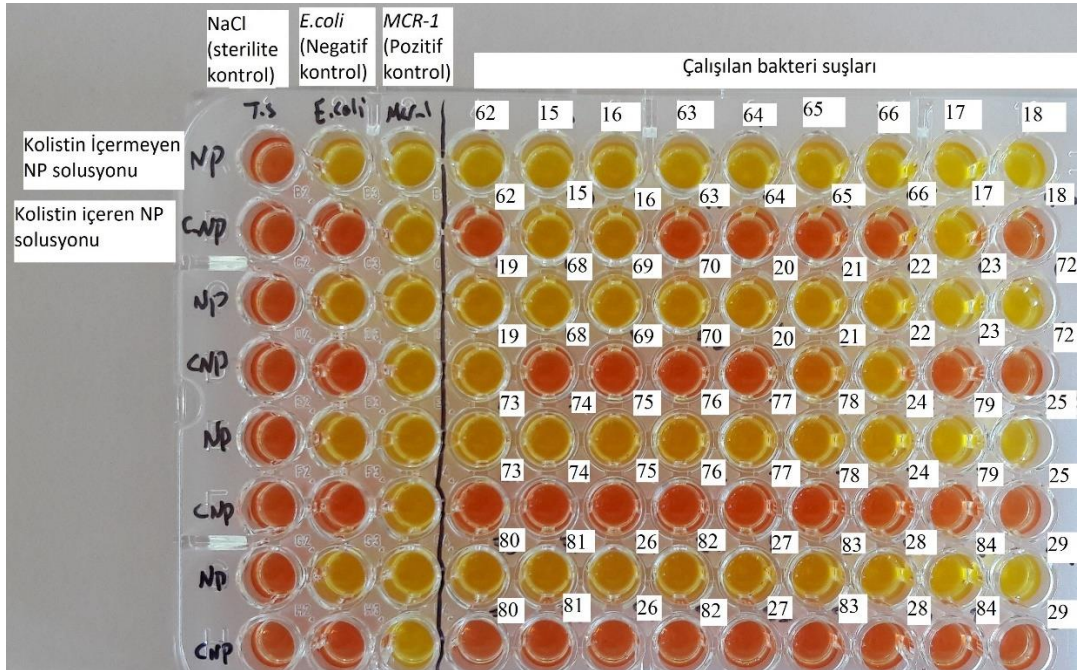
Şekil 4- 18. Disk elüsyon yöntemin BMD ile KU ve EU grafiği.

Disk elüsyon yönteminin sonuçları, standart BMD'nün MİK sonuçlarıyla kıyaslandığında çok iyi (%100) kategorik uyum ve çok iyi (%100) esansiyel uyum gösterdiği görülmektedir. Küçük hata, büyük hata veya çok büyük hata gözlenmemiştir (Şekil 4-15).

4.3.5. Hızlı Testler

4.3.5.1. Hızlı polimiksin Nordman-Poriel (HPNP) testi sonuçları

Bu teste göre 13 (%14.6) *Enterobacteriaceae* izolatının renk değişimi göstermeyerek kolistin duyarlı olduğu ve 76 (%85.4) izolatın renk değişimi göstererek kolistin dirençli olduğu bulunmuştur.



Şekil 4- 19. Çalışılan HPNP testine ait mikropiğin örneği.

*(Kolistin-dirençli izolatlar: 15, 16, 17, 19, 22)

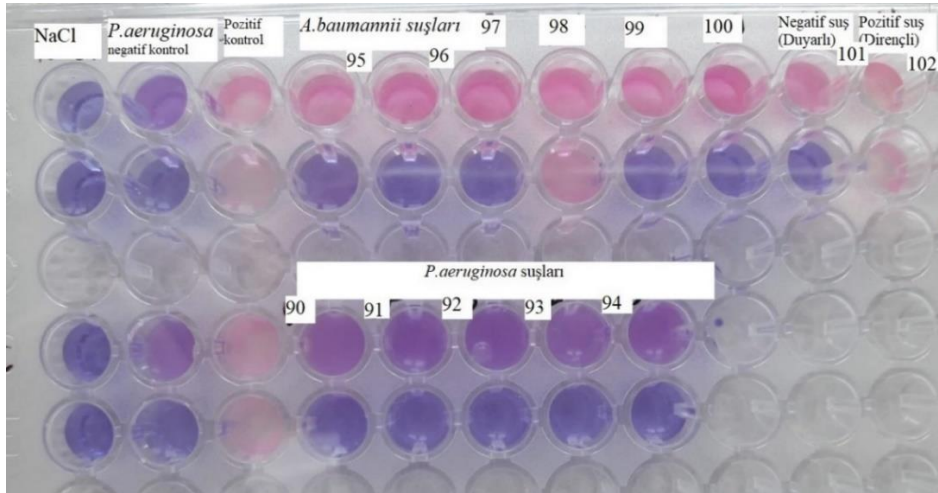
		BMD									
		≤0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
HPNP testi (µg/ml)	≤3.75	71	3	2							
	>3.75					2	2	4	5		

Şekil 4- 20. *Enterobacteriaceae* izolatlarında HPNP testinin altın standart BMD ile KU ve EU grafiği.

HPNP testin sonuçları, BMD yöntemin MİK sonuçlarıyla kıyaslandığında çok iyi (%100) kategorik uyum gösterdiği bulunmuştur. Test, hesaplanan kolistin son konsantrasyonuna göre sadece duyarlı ve dirençli olarak sonuç verebildiğinden esansiyel uyum oranı hesaplanamamıştır. Küçük hata, büyük hata veya çok büyük hata gözlenmemiştir. Ayrıca testin standart BMD testine göre %100 oranında duyarlılık ve özgüllük gösterdiği görülmektedir (Şekil 4-18).

4.3.5.2. Rezaurine bağlı hızlı polimiksin NP testi sonuçları

Bu yöntemle test edilen beş *P. aeruginosa* ve sekiz *A. baumannii* suşlarında sadece iki *A. baumannii* suşunun kolistine dirençli olduğu görülmüştür.



Şekil 4- 21. Çalışılan R-HPNP testine ait mikropak örneği.
(kolistine-dirençli izolatlar: 98,102)

İki *A. baumannii* izolatının olduğu kuyucukta renk değişimi gözlemlenmiş ve bu izolatlar kolistine dirençli olarak kabul edilmiştir. Kalan altı izolatın olduğu kuyucuklarda renk değişimi gözlenmeyerek negatif olarak kabul edilmiştir. Alt sırada *P. aeruginosa*

izolatlarının olduğu kuyucuklarda renk değişimi gözlenmemiş ve tümü duyarlı olarak kabul edilmiştir (Şekil 4-19.).

R- HPNP testi (µg/ml)	BMD										
	Duyarlı					Dirençli					
	≤0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	
≤3.75	3	4	4								
>3.75						1		1			

Şekil 4- 22. *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* için R- HPNP testinin BMD ile KU ve EU grafiği

R-HPNP testin sonuçları, BMD MİK sonuçlarıyla kıyaslandığında çok iyi (%100) kategorik uyum gösterdiği bulunmuştur. Test, hesaplanan kolistin son konsantrasyonuna (3.75 µg/ml) göre sadece duyarlı ve dirençli olarak sonuç verebildiğinden esansiyel uyum oranı hesaplanamamıştır. Küçük hata, büyük hata veya çok büyük hata gözlenmemiştir. (Şekil 4-20.)

Kolistin MİK sınır değerinin (2 ug/ml) üzerinde bir konsantrasyon (3.75 ug/ml) olması nedeniyle, diğer yöntemlerle kıyaslanması doğru yorumlamayı engelleyebilmektedir.

4.4. Tüm Yöntemlerin Karşılaştırılması:

Tablo 4- 8. Tüm izolatların dört yöneme göre kolistin MİK sonuçları

No	Mikroorganizma	BMD (µg/ml)	Makrodilüsyon (µg/ml)	Ticari Mikrodilüsyon (µg/ml)	Disk Elüsyon (µg/ml)	HPNP Testi (µg/ml)
1	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	0.5	0.5	<1	S
2	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	1	0.5	<1	S
3	<i>K. pneumoniae</i>	32	16	16	>4	R
4	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	0.5	0.5	<1	S
5	<i>K. pneumoniae</i>	1	0.5	1	<1	S
6	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	0.5	0.5	<1	S
7	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	1	0.5	2	S
8	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	≤0.25	1	<1	S
9	<i>K. pneumoniae</i>	8	8	8	4	R
10	<i>K. pneumoniae</i>	8	16	16	>4	R
11	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	1	1	<1	S
12	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	0.5	0.5	<1	S
13	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	1	0.5	<1	S
14	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	0.5	0.5	<1	S
15	<i>K. pneumoniae</i>	32	16	16	>4	R
16	<i>K. pneumoniae</i>	4	1	8	4	R
17	<i>K. pneumoniae</i>	32	64	>16	>4	R
18	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
19	<i>K. pneumoniae</i>	16	8	>16	>4	R
20	<i>K. pneumoniae</i>	1	≤0.25	1	<1	S
21	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
22	<i>K. pneumoniae</i>	32	8	8	>4	R
23	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	1	2	<1	S
24	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	4	0.5	<1	S
25	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	≤0.25	1	<1	S
26	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	2	S
27	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	≤0.25	1	2	S

No	Mikroorganizma	BMD (µg/ml)	Makrodilüsyon (µg/ml)	Ticari Mikrodilüsyon (µg/ml)	Disk Elüsyon (µg/ml)	HPNP Testi (µg/ml)
28	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
29	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
30	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
31	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
32	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
33	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	0.5	0.5	<1	S
34	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	2	0.5	<1	S
35	<i>K. pneumoniae</i>	0.5	≤0.25	0.5	<1	S
36	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	4	0.5	<1	S
37	<i>K. pneumoniae</i>	16	8	16	>4	R
38	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	2	0.5	<1	S
39	<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	2	0.5	<1	S
40	<i>K. pneumoniae</i>	16	4	16	>4	R
41	<i>K. pneumoniae</i>	0.5	0.5	1	<1	S
42	<i>K. pneumoniae</i>	32	16	16	>4	R
43	<i>K. pneumoniae</i>	16	8	16	>4	R
44	<i>E. coli</i>	≤0.25	0.5	0.5	<1	S
45	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
46	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
47	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	1	<1	S
48	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
49	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
50	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
51	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	1	<1	S
52	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
53	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
54	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
55	<i>E. coli</i>	≤0.25	0.5	0.5	<1	S

No	Mikroorganizma	BMD (µg/ml)	Makrodilüsyon (µg/ml)	Ticari Mikrodilüsyon (µg/ml)	Disk Elüsyon (µg/ml)	HPNP Testi (µg/ml)
56	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
57	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	1	<1	S
58	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	1	<1	S
59	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
60	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
61	<i>E. coli</i>	≤0.25	0.5	0.5	<1	S
62	<i>E. coli</i>	≤0.25	0.5	1	<1	S
63	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
64	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
65	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
66	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	1	<1	S
67	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
68	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	1	<1	S
69	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
70	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
71	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
72	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	1	<1	S
73	<i>E. coli</i>	≤0.25	0.5	1	<1	S
74	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	2	S
75	<i>E. coli</i>	≤0.25	0.5	0.5	<1	S
76	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	1	<1	S
77	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
78	<i>E. coli</i>	≤0.25	0.5	0.5	<1	S
79	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
80	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
81	<i>E. coli</i>	0.5	≤0.25	0.5	<1	S
82	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
83	<i>E. coli</i>	≤0.25	<0.5	0.5	<1	S

No	Mikroorganizma	BMD (µg/ml)	Makrodilüsyon (µg/ml)	Ticari Mikrodilüsyon (µg/ml)	Disk Elüsyon (µg/ml)	HPNP Testi (µg/ml)
84	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
85	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	1	<1	S
86	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
87	<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	0.5	<1	S
88	<i>E. coli</i>	4	4	4	>4	R
89	<i>E. coli</i>	≤0.25	0.5	0.5	<1	S
90	<i>P. aeruginosa</i>	1	0.5	2	<1	S
91	<i>P. aeruginosa</i>	0.5	0.5	2	<1	S
92	<i>P. aeruginosa</i>	1	2	1	<1	S
93	<i>P. aeruginosa</i>	1	2	2	<1	S
94	<i>P. aeruginosa</i>	0.5	0.5	2	<1	S
95	<i>A. baumannii</i>	≤0.25	≤0.25	1	<1	S
96	<i>A. baumannii</i>	≤0.25	≤0.25	1	<1	S
97	<i>A. baumannii</i>	1	1	2	<1	S
98	<i>A. baumannii</i>	8	16	8	>4	R
99	<i>A. baumannii</i>	0.5	≤0.25	1	<1	S
100	<i>A. baumannii</i>	0.5	≤0.25	1	<1	S
101	<i>A. baumannii</i>	≤0.25	≤0.25	1	<1	S
102	<i>A. baumannii</i>	32	8	>16	>4	R

Tablo 4- 9. Yöntemlere göre suşların MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri.

	BMD (µg/ml)		Makrodilüsyon (µg/ml)		Ticari BMD (µg/ml)		Disk Elüsyonu (µg/ml)	
	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK ₅₀	MİK ₉₀
<i>K. pneumoniae</i>	≤0.25	16	0.5	16	0.5	16	<1	>4
<i>E. coli</i>	≤0.25	≤0.25	≤0.25	0.5	0.5	1	<1	<1
<i>A. baumannii</i>	0.5	8	≤0.25	8	1	8	<1	>4
<i>P. aeruginosa</i>	0.5	1	0.5	2	2	2	<1	<1
Toplam suş	≤0.25	16	≤0.25	8	0.5	8	<1	>4
Grup 1	≤0.25	≤0.25	≤0.25	0.5	0.5	1	<1	<1
Grup 2	0.5	16	0.5	8	1	16	<1	>4
Grup 3	4	32	4	16	8	16	4	>4

Tablo 4- 10. Tüm yöntemlerin karşılaştırmalı sonuçları

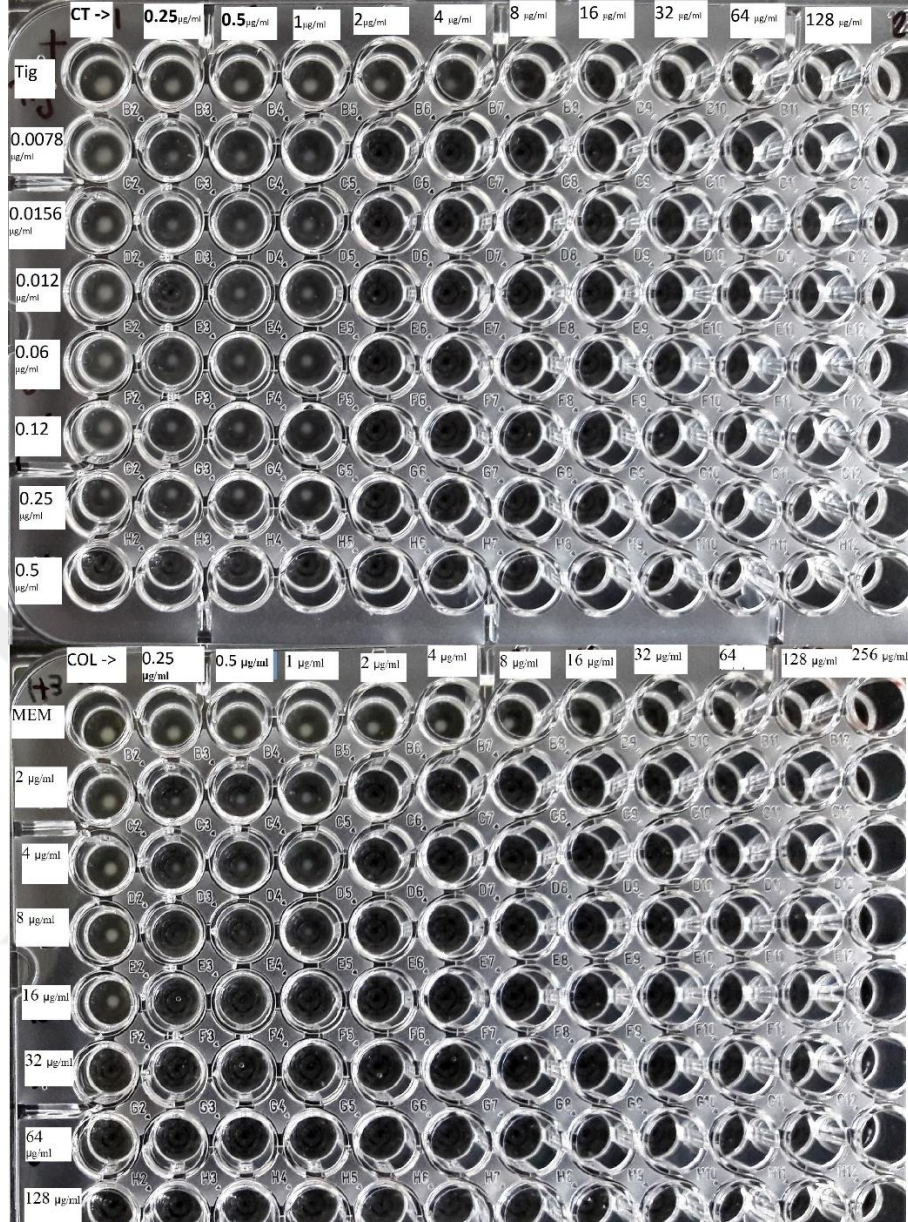
Yöntem	Kategorik uyum (%)	Esansiyel Uyum (%)	Çok Büyük Hata (%)	Büyük Hata (%)	Küçük Hata (%)
Makrodilüsyon	98	86.3	0	2.3	12
Ticari kit	100	78.4	0	0	20.6
Disk Elüsyonu	100	100	0	0	0
HPNP testi	100	-	-	-	-

4.4. Dama Tahtası Yönteminin Sonuçları

Kolistine dirençli izolatların tüm CT-MEM kombinasyonunda sinerjik etki göstermiştir. CT-TİG kombinasyonunda üç izolat (iki *K. pneumoniae*, bir *A. baumannii*) indifferans etki, kalanı sinerjik etki göstermiştir. Antagonistik etki gözlenmemiştir (Tablo 4-11).

Tablo 4- 11. Dama tahtası sonuçlarını gösteren tablo.

Suş No	Türü	CT		MEM		TİG		COL-MEM	COL-TIG
		MİK (µg/ml)	S/R	MİK (µg/ml)	S/R	MİK (µg/ml)	S/R		
3	<i>K. pneumoniae</i>	32	R	32	R	0.25	S	SY	SY
9	<i>K. pneumoniae</i>	8	R	64	R	0.5	S	SY	SY
10	<i>K. pneumoniae</i>	16	R	16	R	0.5	S	SY	İD
15	<i>K. pneumoniae</i>	32	R	16	R	0.5	S	SY	SY
16	<i>K. pneumoniae</i>	4	R	16	R	0.5	S	SY	İD
17	<i>K. pneumoniae</i>	32	R	64	R	0.25	S	SY	SY
19	<i>K. pneumoniae</i>	16	R	16	R	0.25	S	SY	SY
22	<i>K. pneumoniae</i>	32	R	64	R	0.5	SS	SY	SY
93	<i>A. baumannii</i>	8	R	32	R	0.25	S	SY	İD
37	<i>K. pneumoniae</i>	16	R	32	R	0.5	S	SY	SY
88	<i>E. coli</i>	4	R	16	R	0.25	S	SY	SY
40	<i>K. pneumoniae</i>	16	R	64	R	0.5	S	SY	SY
97	<i>A. baumannii</i>	32	R	32	R	0.25	S	SY	SY
42	<i>K. pneumoniae</i>	32	R	1	S	0.5	S	SY	SY
43	<i>K. pneumoniae</i>	16	R	16	R	0.5	S	SY	SY



Şekil 4- 23. Çalışılan dama tahtası mikropalak örneği.

*(Sol: Kolistin-tigesklin sinerjisini gösteren mikropalak örneği. Sağ: Kolistin-meropenem sinerjisini gösteren mikropalak örneği).

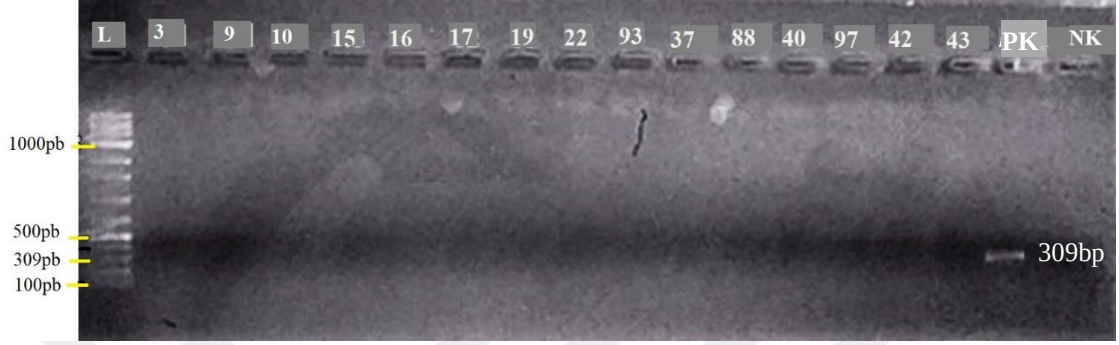
Tablo 4- 12. Dama tahtası yönteminin sonuçları ve yüzde oranları.

	<i>K. pneumoniae</i> (n= 12) n(%)			<i>A. baumannii</i> (n=2) n(%)			<i>E. coli</i> (n=1) n(%)			Toplam (n= 15) n(%)		
	S	İD	A	S	İD	A	S	İD	A	S	İD	A
CT-MEM	12 (100)	—	—	2 (100)	—	—	1 (100)	—	—	15 (100)	—	—
CT-Tig	10 (83)	2 (17)	-	1 (50)	1 (50)	—	1 (100)	—	—	12 (80)	3 (20)	—

*(S: Sinerji, ID: İndiferans, A: Antagonistik).

4.5. Moleküler deneyler

Şekil 4-22’de görüldüğü gibi kolistine dirençli suşların (n=15) hiç birinde plazmit aracılı kolistin-direnç geni *mcr-1* saptanmamıştır.



Şekil 4- 24: Transluminatörde gözlenen agaroz jel elektroforez görüntüsü.

L: DNA Ladder. **PK:** *mcr-1* pozitif *E. coli* (309 bp). **NK:** Negatif kontrol.

5. TARTIŞMA

Bakteriyemide etkenlerin belirlenmesi ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması, sepsisin doğru tedavinin ve mortalitenin azaltılmasında büyük önem taşımaktadır [110]. Türkiye’de ve yurt dışında yapılan çalışmalara göre kan kültürlerinden sefalosporinler, aminoglikozidler ve kinolonlarla birlikte karbapenemlere direnç geliştiren çoğul-dirençli Gram-negatif çomakları (MDR-GNÇ’ları) sıklıkla izole edilmektedir [54]. MDR-GNÇ’lerin etken olduğu enfeksiyonlarda kullanılabilecek antibiyotik seçeneklerinin kısıtlı olması nedeniyle, son tedavi seçeneği kolistin olarak kalmaktadır [77, 85, 155, 157]. Bu nedenle, MDR-GNÇ bakteriler ile enfekte hastaların tedavisinde kolistin duyarlılığı için yol gösterecek güvenilir bir yönteme ihtiyaç duyulmuştur.

Kolistin duyarlılık testlerinde MİK değerlerini belirlemek amacıyla çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Ancak ulusal ve uluslararası rehberler tarafından altın standart olarak tavsiye edilen yöntem, BMD yöntemidir. MDR-GNÇ enfeksiyonlarının tedavisinde kolistin kullanımının öneminden kaynaklanan ulusal ve uluslararası ilgi, bilim insanlarını kolistin direncini saptamak için yeni yöntemler araştırıp bu yöntemleri değerlendirmeye teşvik etmektedir. Simner ve arkadaşları kolistin direncini saptamada disk elüsyon yönteminin kullanılabileceğini bildirmişlerdir [120, 145]. Tez çalışmamızın çıkış noktası bu yöntemin duyarlılığının ve laborauvarda uygulanabilirliğinin araştırılmak istenmesidir. Çeşitli kolistin duyarlılık testleri bulunmasına rağmen hala BMD yerine rutin laboratuvarlarda kullanılabilecek pratik, kolay ve düşük maliyetli bir yöntem bulunmamaktadır [43, 120, 145].

Kolistin minimal inhibitör konsantrasyonunu saptamak için otomatize sistemler kullanıldığında, kolistin hemen hemen testin her aşamasında plastik ile temas etmektedir ve kolistin plastikte yapışmasından dolayı konsantrasyon kayıpları olmakta ve dirençli suşların duyarlı görünmesine neden olmaktadır. Bu nedenle otomatize sistemlerden Phoenix 100, Microscan ve VITEK-2’nin çoğu çalışmalarda güvenilir olmadığı belirtilmiştir [23, 75, 121, 150, 161]. Daha sonra kolistin direncini saptayan çeşitli ticari kitler piyasaya sürülmüştür. Çalışmamızın bu testlerin kolistin duyarlılığının saptamak için test edilmesi ile rutin laboratuvarlarda hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılıp kullanılamayacağı konusunda yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına çeşitli kliniklerden gönderilen kan kültürlerinden izole edilen MDR-GNÇ'lerde makrodilüsyon, ticari mikrodilüsyon, buyyonda disk elüsyon ve HPNP testleriyle kolistin duyarlılıkları saptanarak referans BMD yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Böylece bu yöntemlerin verimliliği karşılaştırılarak en iyi, pratik, güvenilir ve BMD yöntemi yerine kullanılabilecek ve her laboratuvarda uygulanabilecek bir yöntem seçme arayışında bulunulmuştur. İlave olarak kolistine direnç saptanan izolatlarda kolistin-tigesiklin ve kolistin-meropenem kombinasyonları test edilmiş, ayrıca direnç mekanizmasını belirlemek amacıyla PCR ile *mcr-1* genlerinin varlığı araştırılmıştır.

MDR-GNÇ'lere bağlı bakteriyeminin risk faktörlerini araştıran çalışmalar az sayıdadır. Bu çalışmada literatürdekine benzer şekilde, erkek hastalarda kadın hastalardan daha sık olarak (%52 ve %50) bakteriyemi görülmektedir. Bu konu ile ilgili Gudiol ve arkadaşlarının yaptıkları araştırmada, uzun süreli antibiyotik tedavisi, kanser, nötropeni, üriner sistem kateteri ve erkek cinsiyetin MDR-GNÇ'lerle oluşan bakteriyemilerde risk faktörü olduğunu bildirilmiştir [53]. Benzer şekilde Patolia ve arkadaşları risk faktörlerine odaklanan çalışmalarında diyabet, üriner sistem hastalığı, doku ve organ nakli, karaciğer hastalıkları, kemoterapi ve dört haftalık antibiyotik tedavisinin MDR-GNÇ'lerin etken olduğu bakteriyemilerde risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir [117].

Ülkemizde çok merkezli olarak gerçekleştirilen Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS) verilerine göre *E.coli* izolatlarının %45,5'inin GSBL ürettiği, %3.6'sının karbapenemlere, %8.7'sinin amikaseine, %55.5'inin siprofloksasine dirençli olduğu; *K. pneumoniae* izolatlarının %68.5'inin sefotaksime, %70'inin amikaseine, %62.7'sinin siprofloksasine ve %40'ının karbapenemlere dirençli olduğu; *P. aeruginosa* izolatlarının %46.1'sinin karbapenemlere, %23.2'sinin amikaseine, %37.7'inin siprofloksasine dirençli olduğu; *A. baumannii* izolatlarının %72'inin amikaseine, %91'inin siprofloksasine ve %92'inin karbapenemlere dirençli olduğu bildirilmiştir [158]. Ülkemizin de dahil olduğu Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance (CAESAR) verilerine göre ülkemiz *E.coli* izolatlarının %15.1'ini 3.sefalosporinlere, %11.4'ünü aminoglikozidlere, %25.7'sinin florokinolonlara ve %17.2'sinin karbapenemler dirençli olduğu, *K. pneumoniae* izolatların %31.2'si 3.kuşak sefalosporinlere, %24.1'i aminoglikozidlere, %31.5'i florokinolonlara ve %97.2'si karbapenemlere dirençli olduğu bildirilmiştir [158].

Çalışmanın yapıldığı dönemde İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına çeşitli kliniklerden gönderilen kan kültürlerinde pozitiflik oranının %14.2 olduğu gözlenmiştir ve *E. coli* izolatlarında %46.5 CTX, %17 AK, %30.1 CİP ve %5.6 İMP direnci gözlenirken *K. pneumoniae* izolatlarında %63.6 CTX, %31.8 AK, %45.1 CİP ve %34.8 İMP direnci gözlenmiştir [109]. Bu çalışmadaki *Enterobacteriaceae* izolatlarının tümü sefotaksime dirençlidir. *E.coli* izolatlarının %4'ü amikaside, %2'si ertapeneme ve %69.5'i siprofloksasine dirençli olup, *K. pneumoniae* izolatlarının %42'si amikaside, %35 imipeneme ve %51'i siprofloksasine dirençlidir. *A. baumannii* izolatların %75'i amikaside, %87.5'i imipeneme ve %100'si siprofloksasine dirençlidir. *P. aeruginosa* izolatların tümü amikaside ve siprofloksasine duyarlı ve tümü karbapenemlere dirençlidir. Çalışmaya alınan tüm *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarının en az bir karbapenem ajana dirençli olduğu saptanmıştır. Çalışmamızdaki veriler UAMDSS ve CAESAR verileriyle kıyaslandığında *E.coli* izolatlarında karbapenem ve amikasin direncin daha düşük, siprofloksasin direncin daha yüksek olduğu; *K. pneumoniae* izolatlarında karbapenem, amikasin ve siprofloksasin direncin daha düşük olduğu; *A. baumannii* izolatlarında karbapenem direncin daha düşük olduğu, siprofloksasin direncin daha yüksek olduğu görülmüştür.

Kolistin, 1947 yılında keşedilmiş, 1950'li yıllarda üriner ve sindirim sistemi enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Yirmi yıl boyunca kulak, göz enfeksiyonlarında ve sindirim sistemi enfeksiyonlarında seçici bakterisidal ajan olarak kullanıldıktan sonra 1970'li yıllarda nefrotoksik ve nörotoksik etkileri tespit edilince kullanımdan kaldırılmıştır. Ardından 1990'lı yıllarda MDR-GNÇ ve özellikle karbapeneme dirençli bakterilerin ortaya çıkması ve diğer seçeneklerin kısıtlanması nedeniyle kolistin tekrar kullanılmaya başlanmıştır [41].

Kolistin direncinin, kemoterapi ajanları, tarımda ve hayvancılıkta aşırı kolistin kullanımı, bakteri mutasyonları ve ampirik tedavideki hatalara (antibiyotik duyarlılık testlerindeki uygulamalar) bağlı olarak geliştiği bildirilmektedir [45, 170]. MDR-GNÇ bakteriler, önceleri kolistine duyarlı olmasına rağmen 1990'lı yıllarda LPS'lerin kaybına ya da yapısının değişimine neden olan mutasyonlar, atım pompaları, porin kaybı, kolistini inaktive eden enzimler veya polisakkarid kapsülün daha yoğun üretimi gibi yollarla direnç mekanizmaları geliştirmeye başlamıştır [41, 44, 88, 121, 167]. Türkiyede 2009 yılında Eser ve arkadaşları 124 *A. baumannii* izolatında BMD ile %27.5 kolistin-direncini

saptamışlardır [42]. Aygar ve arkadaşları 2015, 2016 ve 2017 yıllarına ait izolatları kullanarak *Enterobacteriaceae* suşlarında kolistin-direnci araştırmışlar sırasıyla %37, %35 ve %41.7 direnç bulmuşlardır [8]. Yunanistan’da, Dafopoulou ve arkadaşları, 2008-2013 yılları arasında farklı klinik örneklerden izole edilen 61 MDR-GNÇ izolatında bizimkinden çok yüksek olmak üzere, BMD ile %95.1 kolistin-direnci saptamışlardır [23]. Lellouche ve arkadaşları, 2013-2017 yılları arasında İtalya, Filistin ve Yunanistan’da izole edilen 364 Gram-negatif bakteri (*Enterobacteriaceae*, *P.aeruginosa* ve *A. baumannii*) izolatında BMD ile kolistin direncini araştırdıklarında bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak %13.5 (n=49) kolistin-direnci saptamışlardır [82]. Bardet ve arkadaşları, 2019 yılında 235 bakteri izolatında BMD ile %63.4 kolistin direnci saptamışlardır [10]. Hindistan’da, Wattal ve arkadaşları, 2019 yılında bir yıl boyunca izole edilen 225 Gram-negatif bakteride BMD ile %32.4 (n= 73) kolistin-direnci saptamışlardır [163]. Mısırda, Zafer ve arkadaşlarının yaptıkları araştırmada, 2016-2017 yıllarında izole edilen 450 *Enterobacteriaceae* izolatında bizim sonuçlarımızdan daha düşük olarak, BMD ile %8.8 (n=40) kolistin-direnci saptamışlardır [174]. Almanya’da Germ ve arkadaşları 2019 yılında 82 *A. baumannii* izolatında BMD ile kolistin direncini araştırmışlar ve %45.1 (n=37) kolistin-direnci raporlamışlardır [47]. Polonya’da 2019 Sekowska *K. pneumoniae* izolatlarında BMD ile %17 oranda kolistin-direnci bulmuşlardır [140]. Averbuch ve arkadaşları Avrupa, Asya ve Avustralya olmak üzere dünyanın farklı bölgelerinden kan kültür izolatlarında BMD ile kolistin direnci araştırmış ve %6.1 oranda direnç saptamışlardır [6]. Türkiye’de 2019 yılında Koyuncu Özyurt ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada 2016-2018 yıllarında izole edilen 419 Gram-negatif bakteri izolatında BMD ile %42.5 (n=178) kolistin-direnci saptanmıştır [75]. Türkiye’den başka bir araştırmada Koçak ve arkadaşları 2018 yılında izole edilen 81 karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* suşunda BMD ile %56 kolistin-direnci saptamışlardır [113]. Yine 2019 yılında Cezeroğlu ve arkadaşları 217 Gram-negatif çomak bakteride BMD ile kolistin direncini araştırdıklarında 50 (%23) izolatın kolistine dirençli olduğunu bulmuşlardır [22]. Arabacı ve arkadaşları 2019 yılında %59.65 oranda kolistin-direnci Phoenix (BD) ile saptamışlardır. Çaycı ve arkadaşları 2020 yılında 126 Gram-negatif bakteri izolatında BMD ile 34 (%27) kolistine dirençli izolat bulmuştur [151]. Çalışmamızda, 2019 -2020 yıllarında farklı kliniklerden gelen kan kültürlerinden izole edilen 102 MDR-GNÇ bakteri izolatında BMD ile %15 oranında kolistine-dirençli bakteri olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda saptanan kolistin-direnci diğer çalışmalara

göre daha düşük olmasına rağmen literatürde son on yıl içinde kolistin-direncinin artmaya devam ettiği gözlenmektedir. Direncin düşük olmasının, hastanemizde tüm ilaçlara dirençli bakteriler dışında kolistin yoğun olarak kullanılmamasına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Kolistin direncine DD veya otomatik sistemler ile bakılmaması gerektiği 2018’de bildirilmiş bu nedenle bu çalışma yapıldığı dönemde bu yöntemler kullanılmamıştır [25].

Son yıllarda MDR-GNÇ’lerin yaygınlığı tüm dünyada değişik oranlarda görülmektedir, ancak insidansi istikrarlı bir şekilde artmaya devam etmektedir. Buna bağlı olarak MDR-GNÇ’ler ile enfekte bakteriyemi hastalarında mortalite, hastanede yatış süresi ve maliyet oranları artmaktadır. GSBL üreten bakterilere bağlı kan dolaşımı enfeksiyonlarında mortalite oranlarının %57 artış gösterdiği raporlanmıştır. Bu durumda, GSBL üreten bakteriler karbapenemler ve kolistin gibi antibiyotiklere de direnç geliştirip plazmit aracılığıyla direnç mekanizmalarını diğer bakterilere aktarma eğilimi göstermektedir [117]. Bu bilgiyle uyumlu olarak çalışmamızda 1.grup (GSBL pozitif) izolatların (n=64) %13’ü (n=2), 2.grup (karbapenemlere dirençli bakteriler) izolatların (n=19) %16’sı (n=3) ve 3.grup (kolistin ve tigesiklin hariç tüm antibiyotiklere dirençli bakteriler) izolatların (n=19) %53’ü (n=10) kolistine dirençli olduğu görülmüştür.

Escherichia coli uzun yıllardır antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde direnç geliştiren bir bakteri olarak dikkati çekmektedir. Direncin sürekli artışı nedeniyle halk sağlığı açısından büyük sorun oluşturmakta ve insan hayatını tehdit eden bakteriler arasında yer almaktadır. Bu nedenle *E. coli* dünya çapında endişe kaynağı olarak dikkat çekmiştir [45, 74]. Janssen ve arkadaşları 2019 yılında kan-kültürlerinden izole edilen 1140 *E. coli* suşlarında 12 (%0.88) kolistine dirençli suş bulmuşlardır [66]. Matuschek ve arkadaşları 2018 yılında 14 *E. coli*’de bizim çalışmamızda saptanan orana göre çok yüksek %64.3 kolistin-direnci bildirmişlerdir [97]. Koyuncu ve arkadaşları *E. coli* izolatlarında %20.6 kolistin-direnci bildirmişlerdir [75]. Çalışmamızda 46 *E. coli* izolatında bir suşun (%2) kolistine dirençli olduğu görülmektedir. Bu suş Acil Cerrahi kliniğinden gelen ve peptik ülseri olan 70 yaşında bir erkek hastaya ait kan-kültüründen izole edilmiş olup 1.grubu oluşturan GSBL pozitif izolatlar arasında yer almaktadır.

Karbapenemlere dirençli *K. pneumoniae* (KRKP) izolatları, dünyanın her yerinde, özellikle hastanede yatan hastalarda ve yoğun bakım hastalarında giderek artmakta, tedavide ciddi sorunlara yol açmakta, hastanede yatış sürelerini uzatmaktadır. Bu

mikroorganizmalar kolistine de direnç kazandığında immün sistemi baskılanmış hastalarda ciddi invazif enfeksiyonlara yol açmaktadır [50, 79, 123]. Koçak ve arkadaşları 2019 yılında yaptıkları araştırmada BMD ile 81 karbapenem-dirençli *K. pneumoniae* izolatının %39.5’inde kolistin-direnci saptamışlardır [113]. Matuschek ve arkadaşları *K. pneumoniae* izolatlarında %55.5, Dafopoulou ve arkadaşları %97.6, Lalloche ve arkadaşlarının %38.6, Koyuncu ve arkadaşları %55.3, Haeili ve arkadaşları %41.2 ve Zafer ve arkadaşları %9.5 oranlarda kolistin-direnci bildirmişlerdir [29, 57, 75, 82, 97, 174]. Çalışmamızda 43 *K. pneumoniae* izolatının 12’sinin (%28) kolistine dirençli olduğu görülmektedir. Bu suşlar farklı kliniklerden gelen farklı yaşta ve farklı hastalığa sahip olan kadın ve erkek hastaların kan-kültürlerinden izole edilmiş olup biri 1.grup, biri 2.grup ve kalanları (n=10) 3.grup içinde yer almaktadır. Çalışmamızda en yüksek kolistin direnci gösteren bakteri türü *K. pneumoniae* olması yanına en yüksek kolistin direnci gösteren bakteri grubu 3.grup olduğu görülmüştür. Kolistine dirençli *K. pneumoniae* izolatları arasında COVID-19 tanısı olan hastadan sadece bir adet izolat izole edilmiş olduğu farkedilmiştir.

P. aeruginosa kolonizasyon yapabilen bir bakteridir. *P. aeruginosa* bakteriyemilerinin tedavisi komplikedir ve genellikle ağır tablolardan kaynaklanmaktadır [30, 52]. Goli ve arkadaşları 2016 yılında *P. aeruginosa* izolatlarında kolistin-direncini DD ile araştırdıklarında %2 direnç bulmuşlardır [52]. Matuschek ve arkadaşları 2018’da %42.8, Lalloche ve arkadaşları 2019’da %8.6, Haeili ve arkadaşları 2019’da %13.1 ve Hameed ve arkadaşları 2019’da %11.9 oranlarda kolistin-direnci bildirmişlerdir [57, 59, 82, 97]. Çalışmamızda beş MDR *P. aeruginosa* izolatları arasında kolistin direncine rastlanmamıştır. Çalışmamızda sadece beş *P. aeruginosa* izolatının çalışmaya alınması kolistine dirençli izolata rastlama olasılığını azaltmıştır. Ayrıca çalışmanın hedefi daha çok kolistin duyarlılığı saptanma yöntemlerini araştırmak olduğundan, çalışmaya alınan bakteri türlerinin sayısı belli sınırlarda olmuştur.

Son 20 yılda MDR *A. baumannii* enfeksiyonları artmaya başlamış, ardından da *A. baumannii* izolatları kolistin-direnci kazanmaya başlamıştır. İntravenöz kateter veya solunum sistem enfeksiyonları mevcudiyetinde bu bakteriyle enfeksiyon olasılığı artmaktadır [31, 125]. Doğan ve arkadaşları kolistin-direncini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada, çalışmaya alınan *A. baumannii* suşlarında %1.5 oranında kolistin-direnç saptamışlardır [36]. Çetin ve arkadaşları %3, Matuschek ve arkadaşları %36.4,

Dafopoulou ve arkadaşları %90, Lalloche ve arkadaşlarının %13.6, Koyuncu ve arkadaşları %31.9, Haeili ve arkadaşları %11.8 ve Hameed ve arkadaşları %9.6 kolistin-direnci saptamışlardır [21, 29, 57, 59, 75, 82, 97]. Çalışmamızda, sekiz *A. baumannii* izolatlarının ikisi (%25) kolistine dirençli bulunmuştur. Bu suşlardan birinin 2.gruba ait olduğu ve 61 yaşındaki COVID19 enfeksiyonu olan bir hastadan izole edildiği belirlenmiştir. Çalışmamızda kolistine en yüksek direnç oranı gösteren iki bakteriden biri *A. baumannii* (diğeri *K. pneumoniae*) olmuştur.

Bizim çalışmamızda 81 yetişkin hastalardan soyutlanan izolatların 13'ünün (%16) ve 21 çocuk hastadan soyutlanan izolatların ikisinin (%9.5) kolistine dirençli olduğu ve dolayısıyla yetişkinlerde rastlanan kolistin-direncinin daha fazla olduğu görülmektedir. Ayrıca kadın hastalardan (n=50) soyutlanan izolatlarının altısının (%12) ve erkek hastalardan (n=52) soyutlanan izolatların dokuzunun (%17) kolistine dirençli olduğu; dolayısıyla erkek hastalarda kolistine-direnç oranının daha fazla olduğu görülmüştür. Çalışmamızda organ nakilli hastalardan soyutlanan izolatlarının üçünün (%50), kanserli hastalardan soyutlanan izolatlarının beşinin (%36), böbrek yetmezliği olan hastalardan soyutlanan izolatlarının birinin (%16) ve COVID-19 ile enfekte hastalardan soyutlanan izolatlarının ikisinin (%22) kolistine dirençli olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla bu hastalıklarının kolistin direnci için risk faktörü olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda kolistin-direnci saptanan hastaların yaş ortalaması 55 ± 21 ve yaş aralığının 0-80 olduğu bulunmuştur. Bu bilgilere göre, kolistin direncine her yaş grubunda rastlanabilmekte, dirençli suş sayısının az olması nedeniyle risk faktörü olarak yaş hakkında bilgi verebilmek mümkün görünmemektedir. Kanserli ve transplante hastalarda kolistin direnç oranının yüksekliği dikkat çekici bulunmuştur. Pandemi servisi izolatlarındaki kolistin-direnç oranının nispeten yüksek olmasının önemli olduğu düşünülmektedir.

Kolistin direnci için uygun yöntem arayışı kapsamında BMD yöntemi kadar güvenilir bir yöntem bulmak için dilüsyon yöntemlerinden başlanmasının uygun olacağı düşünülmüştür. Dilüsyon yöntemleri arasında bulunan sıvı makrodilüsyon yönteminin hazırlanışı ve aşamaları, standart yöntem olan BMD ile aynı olup tek farkı polistiren mikropalak yerine cam tüplerin kullanılmasıdır [121]. Bu yöntem uygulandığında kolistin plastik malzemeler ile teması azalmakta ve kolistin plastiğe bağlanmasından kaynaklanan sorunlar göz önüne alındığında daha güvenilir olmaktadır [57]. Esau ve arkadaşları 2019 yılında 536 *Enterobacteriaceae* izolatlarında sıvı makrodilüsyon ile

kolistin direncini araştırmışlar ve kolistine dirençli 41 izolatta makrodilüsyon yönteminin BMD ile aynı sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir [72, 90]. Bu sonuca göre makrodilüsyon yöntemin uyumluluğunu düşük olduğu söylenebilir. Haeili ve arkadaşları 2019 yılında 109 Gram-negatif bakteri suşunda farklı yöntemlerle kolistin-direnci araştırarak BMD ile karşılaştırıp disk diffüzyon, agar difüzyon ve makrodilüsyon yöntemlerinin verimliliğini incelemişler ve makrodilüsyon yönteminin referans yöntemle hem kategorik uyum (KU) hem de esansiyel uyum (EU) için %100 uyumlu ve güvenilir bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir [57]. Hindler ve ark., 2010-2011 yıllarında izole edilen, MDR-GNÇ izolatında (107 *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*); sıvı makrodilüsyon, agar dilüsyon, TREK GNXF Sensititre ve polisorbata 80 ilaveli BMD yöntemlerinin güvenilirliğini araştırmışlar ve makrodilüsyon ile yüksek KU (%98), nispeten düşük EU (%83) elde etmişlerdir [62]. Çalışmamızda, makrodilüsyon yöntemi ile elde edilen veriler, referans yöntem BMD'nin verileri ile karşılaştırıldığında daha yüksek uyum beklenirken düşük uyumlu olduğu; 12 (%12) küçük hata ve 2 (%2) büyük hata gösterdiği, çok büyük hata (ÇBH) saptanmadığı ve %100 KU ve %86.3 EU gösterdiği bulunmuştur. Ancak çalışma esnasında bazı sonuçların doğruluğunu tespit etmek amacıyla makrodilüsyon testi birkaç kez tekrarlanmış ve testin tekrarlanabilirliğinin düşük olduğu görülmüştür. Buna ek olarak bu maliyet açısından uygun (bir izolat başına yaklaşık 12 TL'ye denk gelmektedir) olan yöntemin çok zahmetli, emek yoğun ve zaman alıcı olduğu, buna bağlı olarak da küçük ve büyük hatalara neden olabildiği farkedilmiştir. Bu bağlamda rutin laboratuvar kullanımına uygun olmadığı düşünülmektedir.

Rutin laboratuvarlarda EUCAST ve CLSI rehberleri tarafından güvenilir altın standart olarak tavsiye edilen BMD yönteminin uygulanması çok zahmetli ve zaman alıcı olmasından dolayı, son yıllarda birkaç firma BMD prensibine dayalı daha kolay ve hızlı uygulanabilen ticari Mikrodilüsyon kitleri hazırlamıştır [97, 120]. Yusuf ve arkadaşları 2020 yılında yaptıkları araştırmada, 2009-2017 yılları arasında farklı örneklerden izole edilen *Enterobacteriaceae*, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* suşlarında kolistin direncini dört farklı yöntemle (UMIC Colistin, Sensititre™, Colistin Micronaut MIC strip ve SensiTest™) çalışıp BMD verileri ile karşılaştırdıklarında, UMIC Colistin, Sensititre™, Colistin Micronaut MIC strip ve SensiTest™ yöntemlerinin KU ve EU oranları sırasıyla %94, %87; %93, %87; %96, %83 ve %96, %93 olarak bulmuşlardır [173]. Pfennigwerth ve arkadaşlarının, 2019 yılında yaptıkları çalışmada 325 *Enterobacteriaceae* izolatında, yarı otomatize sistem (Microscan, BD Phoenix, Vitek2), gradient test (E test) ve iki ticari

test (Mikronaut-S ve TREK Sensititer) ile kolistin direncini araştırmışlardır. Mikronaut-S ve TREK Sensititer kitleri ile sırasıyla %98.5 KU, %90.6 EU, ve %93 KU, %82 EU elde edildiğini bildirmişlerdir [120]. Bardet ve arkadaşlarının, 2019 yılında yaptıkları araştırmada, 235 Gram-negatif bakteri izolatında ticari BMD kitinin (UMIC Colistin) verimliliğini değerlendirmişler ve küçük, büyük veya çok büyük hata göstermediğini ve %100 KA, %94 EU gösterdiğini bulmuşlardır [10]. Jayol ve arkadaşları, 2018 yılında, 185 Gram-negatif bakteri izolatını kolistin direnci açısından değerlendirmek için UMIC sistemi, Sensititre ve Microscan kitlerinin performansını BMD yöntemi ile karşılaştırdıklarında UMIC sisteminin %11.3, Sensititre'in %3 ve Microscan'ın %0.8 oranlarında BH verdiğini bildirmişlerdir [69]. Javed ve arkadaşlarının, 2018 yılında Micronaut-S ve SensiTest olmak üzere iki ticari kitin verimliliğini değerlendirmek için yaptıkları çalışmada Micronaut-S ile %94.7 ve SensiTest ile %93.9 oranında KU elde etmişlerdir [67]. Carretto ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları araştırmada 353 Gram-negatif izolatında SensiTest'in %98.9 KU, %96 EU, iki ÇBH ve iki BH gösterdiğini bildirmişlerdir [20]. Matuschek ve arkadaşları 2018 yılında, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* ve *Enterobacteriaceae* olmak üzere toplamda 75 Gram-negatif bakteri kullanarak Sensititre, Micronaut MIC-Strip, Micronaut -S, UMIC ve SensiTest olmak üzere beş farklı ticari BMD ürünlerinin ve iki gradient testin kolistin duyarlılığındaki verimliliğini araştırmışlar; Sensititre ile %95 KU, %96 EU, dört BH, MICRONAUT MIC-Strip ile %91 KU, ,%99 EU, iki ÇBH, beş BH, MICRONAUT-S ile %89 KU, %96 EU, iki ÇBH, altı BH, UMIC ile %92 KU, ,%82 EU, üç ÇBH, üç BH, ve SensiTest ile %89 KU, %88 EU, bir ÇBH, yedi BH, bildirmişlerdir [97]. Türkiye'de Kansak ve arkadaşları 2017-2018 yılları arasındaki izole edilen 38 *K. pneumoniae* suşlarında BMD yöntemi ile iki ticari yöntemi karşılaştırarak kolistin duyarlılığını araştırdıklarında, kullandıkları Sensititre kit ile %97 KU, %74 EU ve %2.8 ÇHB oranları saptarken Micronaut kitleri ile %100 KU, %76 EU ve %0 ÇBH rastlamışlardır [71]. Çalışmamızda kullanılan Diagnostic testini kullanıldığı yurt dışı çalışmaya rastlanmamıştır. Ülkemizde Altınkanat ve arkadaşları ticari mikrodilüsyon (Diagnostic colistin MIC-strip) testinin verimliliğini değerlendiren bir çalışmada %98 KU, %84 EU ve %3.8 BH rastlamışlardır [46]. Bu çalışmada ticari BMD (Diagonistics 8011) yöntemi ile elde edilen veriler, referans yöntem BMD'nin verileri ile karşılaştırıldığında çok iyi (%100) kategorik uyum ve düşük (%78) esansiyel uyum saptanmış, 22 (%22) suşta KH gösterdiği ve hiç ÇBH saptanmadığı görülmüştür. Bu ticari yöntemin nispeten pahalı (izolat başına maliyeti 40 TL'ye denk gelmektedir)

kolay ve hızlı uygulanabildiği ve sonuçların çıplak gözle rahatlıkla okunabildiği görülmüştür. Kesin MİK değerleri vermemesine rağmen duyarlılık ve direnç hakkında doğru sonuç verdiği görülmüştür.

Çeşitli kolistin duyarlılık testleri bulunmasına rağmen hala BMD yerine rutin laboratuvarlarda kullanabilecek pratik, kolay ve az masraflı bir yöntem bulunmaması nedeniyle Simner ve arkadaşları kolay uygulanabilen disk elüsyon yöntemini geliştirmişlerdir. Disk elüsyon yönteminin verimliliğini BMD ile karşılaştırdıklarında %98 KU ve %99 EU ile büyük ölçüde uyumlu olduğunu bulmuşlar [145]. Koyuncu Özyurt ve arkadaşları 2019 yılında, bu yöntemi 419 Gram-negatif bakteri izolatu ile denediklerinde, %99.3 KU, % 0.2 ÇBH ve %0.5 BH bulduklarını belirtmişlerdir [75]. Esau ve arkadaşları 2019 yılında 536 *Enterobacteriaceae* izolatu BMD yöntemi ile karşılaştırarak, disk elüsyon ile kolistin direncini saptamak için bir araştırma yapmışlar; çalışmanın sonucunda 41 (%7.6) izolatta kolistin-direnci saptayarak disk elüsyon yönteminin BMD ile aynı sonuçları verdiğini bildirmişlerdir [90]. Dalmolin ve arkadaşlarının, 2019 yılında yaptıkları çalışmada 2013-2017 yılları arasında izole edilen 85 Gram-negatif bakteri suşunda disk elüsyon yöntemini değerlendirmişler, non-fermentatif izolatlarda %76.5 KU ve %82.4 EU ve *Enterobacteriaceae* izolatlarında %91.2 KU ve %95.6 EU saptamışlardır [34]. Cielo ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları çalışmada 196 *Enterobacteriaceae* suşunda disk elüsyon yöntemiyle elde edilen kolistin MİK değerlerini BMD verileri ile karşılaştırarak bu yöntemin doğruluğunu araştırmışlar, disk elüsyon ile bir ÇBH ve %99.5 KU gösterdiğini bulmuşlardır [24]. Barış ve arkadaşları 56 *Enterobacteriaceae* izolatu BMD yönteminin verimliliğini değerlendirdiklerinde KU, özgüllük ve duyarlılığı %100 olarak bildirmişlerdir [9]. Çalışmamızda disk elüsyon yöntemi ile elde edilen veriler, referans yöntem BMD'nin verileri ile kıyaslandığında, küçük hata, büyük hata veya çok büyük hata göstermeyerek çok iyi (%100) kategorik uyum ve çok iyi (%100) esansiyel uyum gösterdiği görülmüştür. Bu yöntemin kolay, nispeten uygun maliyetli (izolat başına 20 TL), her laboratuvarında uygulanabilen ve doğru, güvenilir sonuçlar verebilen bir yöntem olduğu ve çıplak gözle rahatlıkla okunabildiği görülmüştür (Tablo 5.1). Yöntemin dezavantajı, araştırmacılar tarafından MİK $\geq$ 2, MİK'lerde BMD ile doğrulanması gerekliliği şeklinde belirtilmiştir [145].

Tablo 5-1. Kolistin-duyarlılık testleriyle ilgili literatür verilerinin karşılaştırması.

Yıl ve araştırmacı	İzolatlar	İzolat sayısı (n)	Yöntem	KU (%)	EU (%)	ÇBH (%)	BH (%)	Kolistin dirençlilik (%)
Haeili et al. 2019	Gram-negatif	109	Makrodilüsyon	100	100	-	-	19.3
Hindler et al. 2012	<i>K. pneumoniae</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i>	107	Makrodilüsyon	>90	83	0	-	18
Carretto et al. 2018	Gram-negatif	353	SensiTest	98.9	96	0.56	0.56	39
Bardet et al. 2019	Gram-negatif	235	UMIC Colistin	100	94	-	-	63.4
Javed et al. 2018	<i>P. aeruginosa</i>	131	Micronaut-S	94.9	86.7	6.5	-	23.5
			SensiTest	93.9	88	6.5	-	
			Sensititre	96.9	90.7	6.5	-	
Jayol et al. 2018	Gram-negatif	185	UMIC	91.9	-	11.3	0	71
			Sensititre	97.8	-	3	0	
			Microscan	91.9	-	0.8	26.9	
Kansak et al. 2020	<i>K. pneumoniae</i>	38	Sensititre	97	74	2.8	-	92
			Micronaut	100	76	0	-	
Matuschek et al. 2018	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	75	Sensititre	95	96	0	5.3	50.5
			Micronaut-MIC	91	99	2.6	6.6	
			Micronaut-S	89	96	2.6	8	
			UMIC	92	82	4	4	
			Sensititre	89	88	1.3	9.3	

Yıl ve araştırmacı	İzolatlar	İzolat sayısı (n)	Yöntem	KU (%)	EU (%)	ÇBH (%)	BH (%)	Kolistin dirençlilik (%)
Pfennigwerth et al. 2019	Enterobacteriaceae	325	Micronaut-S	98.5	90.2	1.2	0.3	32.5
			Trek Sensititre	93	82	2.1	5	
Yüsun et al. 2020	Enterobacteriaceae, A. baumannii, P. aeruginosa	70	UMIC Colistin	94	87	5.9	0	48.5
			Sensititre	93	87	14.7	0	
			Micronaut-MİK	96	83	8.8	0	
			SensiTest	96	93	8.8	0	
Cielo et al. 2020	Enterobacteriaceae	196	Disk elüsyon	99.5		1.11	0	46
Dalmolin et al. 2020	Gram-negatif	68	Disk elüsyon	91.2	95.6	2.3	5.8	60
	Non-fermentatif	17		76.5	82.4	5.8	17.6	
Esau et al. 2019	Enterobacteriaceae	536	Disk elüsyon	100	100	-	-	7.5
Koyuncu-Özyurt et al. 2019	Gram-negatif	419	Disk elüsyon	99.3	-	0.2	0.5	42.5
Barış A et al. 2019	Enterobacteriaceae	56	Disk elüsyon	100	-	-	-	78.5
Bu Çalışmada	K. pneumoniae, E.coli A. baumannii, P. aeruginosa	102	Makrodilüsyon	98	86.3	0	2.3	15
			Ticari Mikrodilüsyon	100	78.4	0	0	
			Disk elüsyon	100	96	0	0	

Bakteriyemide etken bakteri tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması acil bir durum olduğundan, yeni hızlı test geliştirme çabaları mevcuttur. Bu testler arasında, son yıllarda geliştirilen ve sadece *Enterobacteriaceae* ailesinden bakterilerde kolistin direnci belirleyebilen hızlı polimiksin NP testi (HPNP) karşımıza çıkmaktadır. Bu test Jayol ve arkadaşları tarafından değerlendirildiğinde büyük oranda dirençli izolatın saptanmasını sağladığı belirtilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre HPNP testinin rutin laboratuvarlarda kan kültürlerinden izole edilen *Enterobacteriaceae* suşlarında kolistin direncinin saptanması için hızlı ve güvenilir bir seçenek olabileceği bildirilmiştir [69]. HPNP testinin, agara difüzyon ilkesine dayalı olmamasından dolayı, BMD yöntemi kadar güvenilebilir bir yöntem olduğu belirtilmiştir [38, 107]. Conceição-Neto ve arkadaşları farklı klinik örneklerden izole edilen 170 *K. pneumoniae* suşunda kolistin MİK değerlerini BMD yöntemi ile karşılaştırarak HPNP test, Colispor test ve Superpolymyxin medium testlerini değerlendirmişler, HPNP testinin %91 KU, %6.4 büyük hata (BH) ve %9.7 çok büyük hata (ÇBH) gösterdiğini bildirmişlerdir [27]. Shoaib ve arkadaşlarının, 2018-2019 yıllarında izole edilen 121 *Enterobacteriaceae* suşunda, BMD referans yöntem kullanılarak Nordman ve arkadaşlarının önerdiği yöntem olan HPNP testini değerlendirdiklerinde %97 oranda duyarlılık ve %100 oranda özgüllük gösterdiğini bulmuşlardır [144]. Mitton ve arkadaşları 2019 yılında 215 *Enterobacteriaceae* izolatında HPNP testini değerlendirmek için BMD ile karşılaştırmışlar ve %1.8 oranında BH ve %1.9 oranda ÇBH ve %98 KU gösterdiğini bildirmişlerdir [100]. Dalmolin ve arkadaşları 2019 yılında *Enterobacteriaceae* izolatında HPNP testinin %98 oranında duyarlılık ve özgüllük gösterdiğini bildirmişlerdir [33]. Belda-Orlowski ve arkadaşları, 2019 yılında yaptıkları bir çalışmada 120 *Enterobacteriaceae* izolatında bu testi değerlendirerek %91 duyarlılık ve %70 özgüllük raporlamışlardır [15]. Yainoy ve arkadaşları 2019 yılında 339 *Enterobacteriaceae* izolatında %100 duyarlılık ve %95.9 özgüllük oranları raporlamışlardır [169]. Malli ve arkadaşları ise %99 duyarlılık ve %82 özgüllük oranı bildirmişlerdir [94]. Barış ve arkadaşları 56 *Enterobacteriaceae* izolatlarında HPNP testi denediklerinde %96.4 KU, %95.4 duyarlılık ve %100 özgüllük elde ettiklerini bildirmişlerdir [9]. Bu çalışmada HPNP ile elde edilen veriler, referans yöntemi BMD'nin verileri ile kıyaslandığında hiç hata bulunmamış, çok iyi (%100) kategorik uyum gösterdiği bulunmuştur. Bu testin kolay uygulanabilir, düşük maliyetli (izolat başına 22 TL), her laboratuvarında uygulanabilen,

dört saatte hızlı sonuç verebilen, renk değişimine bağlı olarak çok rahat okunabilen bir test olduğu sonucuna varılmıştır.

HPNP mantığına dayalı olarak nonfermentatif bakteriler olan *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* suşlarında kolistin direnci saptayabilen rezasurine bağlı hızlı polimiksin NP (R-HPNP) testi de geliştirilmiştir [83]. Jia ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları araştırmada *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* izolatlarında R-HPNP testini BMD yöntemi ile karşılaştırarak doğrululuğunu araştırmışlardır. Testin *A. baumannii* suşlarında sadece 2 BH, %100 duyarlılık ve %96 özgüllük ve *P. aeruginosa* suşlarında %100 duyarlılık ve özgüllük gösterdiğini bildirmişler [70]. Germ ve arkadaşları 2019 yılında, 82 *A. baumannii* suşunda R-HPNP testinin doğrululuğunu araştırmak için yaptıkları araştırmada %95 KU, %1.2 ÇBH ve %3.7 BU'ı bildirmişlerdir [47]. Bu çalışmada R-HPNP ile elde edilen veriler, referans yöntem BMD'nin verileri ile kıyaslandığında küçük veya büyük hata gözlenmediği, çok iyi (%100) kategorik uyum gösterdiği ancak *P. aeruginosa* izolatlarında *A. baumannii* suşlarına göre daha yavaş renk değişimi olduğu görülmüştür. Bu testin kolay uygulanabilir, düşük maliyetli (izolat başına 22 TL), her laboratuvarında uygulanabilen, dört saatte hızlı sonuç verebilen, renk değişimine bağlı olarak çok rahat okunabilen bir test olduğu düşünülmektedir (Tablo 5.2). HPNP ve R-HPNP testlerinde kolistin konsantrasyonlarının 3.75 µg/ml olması breakpoint'ın >2 µg/ml olması nedeniyle KU yüksek olarak bulunmuştur.

Tablo 5-2. R-HPNP ve HPNP ile ilgili literatür karşılaştırması.

Çalışma	İzolatlar	no	KU (%)	ÇBH (%)	BH (%)	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Kolistine dirençlilik (%)
Coceiãa-Neto et al. 2020	<i>K. Pneumoniae</i>	170	91	9.7	6.4	-	-	72
Shoaib et al. 2020	<i>Enterobacteriaceae</i>	121	-	-	-	97	100	58.5
Mitton et al. 2019	<i>Enterobacteriaceae</i>	215	98	1.9	1.8	-	-	74
Dalmoli et al. 2020	<i>Enterobacteriaceae</i>	68	-	-	-	98	98	50
Belda-Orlowski et al. 2019	<i>Enterobacteriaceae</i>	120	-	-	-	91	70	33
Yainoy et al. 2019	<i>Enterobacteriaceae</i>	339	-	-	-	100	95.9	69
Barış A et al. 2019	<i>Enterobacteriaceae</i>	56	96.4	-	-	95.4	100	78.5
Malli et al. 2019	<i>K. Pneumoniae</i>	131	-	-	-	99	82	75
Jia et al. 2020	<i>Enterobacteriaceae,</i>	192	-	-	1	100	96	27.5
	<i>A. baumannii</i>							
	<i>P. aeruginosa</i>	61	-	-	-	100	100	
Germ et al. 2019	<i>A. baumannii</i>	82	95	1.2	3.7	-	-	45
Bu çalışmada	<i>Enterobacteriaceae,</i>	89	100	0	0	100	100	15
	<i>A. baumannii</i> <i>P. aeruginosa</i>	13	100	0	0	100	100	

Kolistine-dirençli Gram-negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde, kolistin kombinasyonları kullanılmakta ve en sık karbapenemlerin ve protein sentezini inhibe eden ajanların kombinasyonda kullanılması tercih edilmektedir. Kolistin kombinasyonu uygulaması, daha etkili bir tedaviyi sağlayabilmenin yanı sıra toksik yan etkilerin ve direnç gelişiminin engellemesine yardımcı olabilmektedir [114, 126, 152]. Ayrıca tek başına kullanıldığında yan etkileri riskli olabilen ve kolistin-direncine karşı son seçenek tedavi olan tigesiklinin de kolistinle kombinasyon şeklinde kullanılması tavsiye edilmektedir [19]. Bu konu ile ilgili olarak Ran Pek ve arkadaşları, altı karbapenem-dirençli *A. baumannii* suşu ile yaptıkları çalışmada kolistin-dirençli iki suşa kolistin-imipenem ve kolistin-tigesiklin kombinasyonlarını dama tahtası yöntemiyle denediklerinde ikisinin de sinerjik etki gösterdiğini bildirmişlerdir [118]. Ramesh ve arkadaşları, 2017 yılında on kolistin-dirençli *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşu ile yaptıkları araştırmada, kolistin-meropenem kombinasyonunu dama tahtası yöntemiyle araştırmışlar ve bu kombinasyonun tüm izolatlar üzerinde sinerjik etki gösterdiğini bildirmişlerdir [126]. Dündar ve arkadaşları, 2019 yılında 25 karbapenem-dirençli *Enterobacteriaceae* izolatı arasında bulunan beş kolistine dirençli izolata kolistin-tigesiklin ve kolistin-imipenem kombinasyonlarını denemişler, kolistin-tigesiklin kombinasyonunun iki izolatta sinerji, iki izolatta indifferans ve bir izolatta antagonistik etki gösterdiğini, kolistin-imipenem kombinasyonunun da bir izolatta sinerjistik ve dört izolatta indifferans etki gösterdiğini bildirmişlerdir [40]. Tascini ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapılan bir araştırmada 13 kolistin-dirençli izolatta çeşitli antibiyotik kombinasyonları araştırılmış; kolistin-tigesiklin ve kolistin-meropenem kombinasyonlarının %38.5 oranda sinerjik etki gösterdiğini raporlamışlardır [152]. Liu ve arkadaşları 2016 yılında %1 *E.coli* izolatlarında *mcr-1* genine rastlamışlardır [88]. Brennan-Krohn ve arkadaşları, 2018 yılında 20 kolistin-dirençli *Enterobacteriaceae* izolatında kolistin-tigesiklin ve kolistin-meropenem kombinasyonlarının düşük sinerjik etki ve %5.1 oranda antagonistik etki gösterdiğini bildirmişlerdir [17]. Çalışmamızda kolistin-meropenem ve kolistin-tigesiklin kombinasyonları denen 15 kolistine dirençli izolatta [*K. pneumoniae* (n=12), *A. baumannii* (n=2) ve *E. coli* (n=1)] kolistin-meropenem kombinasyonu %100 sinerjik etki gösterirken, kolistin-tigesiklin kombinasyonu %80 sinerjik, %20 indifferans etki göstermiştir.

Kolistinin yoğun kullanımına bağlı olarak bakterilerin geliştirdiği direnç mekanizmaları arasında son dört yılda plazmit aracılı kolistin direnç geni önem

kazanmaya başlamıştır. İlk defa Çin’de, 2015 yılında *mcr-1* geni taşıyan *E. coli* izole edildikten sonra *mcr-2* geni Belçika’da 2016 yılında yine *E. coli* izolatından izole edilmiştir ve dünyanın her yerine yayılmaya başlamıştır [88, 167]. Şimdiye kadar bu gen ailesine ait dokuz (*mcr-1*’den *mcr-9*’a kadar) plazmit aracılı kolistin direnç geni bulunmuştur [87]. Zafer ve arkadaşları 2019 yılında Mısır’da yaptıkları araştırmada 40 izolat arasında biri *E. coli* ve biri *K. pneumoniae* olmak üzere sadece iki izolatta *mcr-1* geni saptanmış ve *mcr-2* genine rastlanmamıştır [174]. Yine Mısır’da, Ahmet ve arkadaşlarının 2019 yılında *P. aeruginosa* ve *Enterobacteriaceae* olmak üzere toplam 50 izolatta *mcr-1* ve *mcr-2* araştırdığı bir çalışmada bir *mcr-1* pozitif ve bir *mcr-2* pozitif *E. coli*; bir *mcr-1* ve iki *mcr-2* pozitif *K. pneumoniae* olduğu görülmüştür [2]. Başka bir çalışmada Zhang ve arkadaşları, 2019 yılında kan kültürlerinden izole edilen 144 *E. coli* suşunda kolistin-direncini araştırdıklarında üç izolatta (%2.1) kolistin-direncinin *mcr-1* geni varlığına bağlı olduğunu bulmuşlardır [175]. Umman’da Mohsin ve arkadaşlarının, 2017 yılında yaptıkları çalışmada 2014-2016 yılları arasında kan kültürlerinden izole edilen 25 kolistin-dirençli *Enterobacteriaceae* izolatında sadece bir *E. coli* izolatında *mcr-1* geni saptamışlar ve *mcr-2* geni saptamamışlardır [101]. Luis ve arkadaşlarının kolistin-direncini araştıran çalışmasında *mcr-1* genine bağlı kolistin-dirençli izolatı rastlanmamıştır [90]. Luis ve arkadaşlarının kolistin-direncini araştıran çalışmasında *mcr-1* genine bağlı kolistin-dirençli izolata rastlanmamıştır [59]. Zhang ve arkadaşları *Enterobacteriaceae* izolatlarında %0.7 *mcr-1* ve %1.5 *mcr-2* genlerine bağlı kolistin-direncine rastlamışlardır [175]. Türkiye’de Sarı ve arkadaşlarının, 2015-2016 yılları arasında izole edilen 329 *Enterobacteriaceae* izolatında *mcr-1* genine bağlı kolistin-direnci araştıran bir çalışmada plazmit aracılı kolistin direnç genine rastlanmamıştır [137]. Güzel ve arkadaşları 2011-2015 yıllarında toplanan 48 *E. coli* izolatlarında plazmit aracılı kolistin direnç genine rastlanmamıştır [56]. Türkiye’de *mcr-1* geni ilk defa Kurekci ve arkadaşları tarafından 2018 yılında tavuk etlerinden izole edilen *E. coli* izolatlarında rastlanmıştır [76]. Adigüzel ve arkadaşları 2020 yılında hayvan izolatında %2.2 *mcr-1* geni saptamışlardır [4]. Arabacı ve arkadaşları 2019 yılında yaptıkları araştırmada 56 hastadan izole edilen 57 KRKP izolatlarında %5.25 (n=3) *mcr-1* geni saptamışlardır [5]. Özkaya ve arkadaşları 14657 *Enterobacteraceae* izolatında %0.13 (n=2) *mcr-1* geni bulmuşlardır [112]. Çalışmamızda *mcr-1* pozitifliğine rastlanmamasına rağmen *mcr-1* geni gittikçe dünyanın her tarafında yayıldığı gibi Türkiye’de yayılmaya devam etmektedir. Ülkemizde hayvanlardaki karbapenem dirençli enfeksiyonlarda kolistin

sık kullanımı, kolistin direncindeki artışta büyük rol oynamaktadır [5]. Çalışmamızda kolistin dirençli izolatlarda direnç mekanizmasının kaynağının, *mcr-1*'den başka bir plazmit aracılı direnç geninin varlığı, hücre duvar LPS'lerinin yokluğu ya da yapısında değişiklikler, atım pompalarının varlığı, porin sayısındaki artış veya kolistini inaktive eden enzimlerin varlığı gibi farklı direnç mekanizmalarından biri olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu çalışmanın ana hedefi diğer kolistin direnç mekanizmaları araştırmak olmadığından bu izolatlarda temel direnç mekanizması araştırılmamıştır. Bu direnç mekanizmalarını saptamak için ileri düzey araştırmalara ihtiyaç vardır. İzolat sayısı artırılarak *mcr-1* geni araştırılmasına devam edilmesi planlanmıştır.



SONUÇLAR:

1. Transplantasyon hastaları, kanser hastaları, böbrek yetmezliği olan hastalar ve COVID-19 ile enfekte hastalarda kolistin-dirençli bakterilerin bakteriyemi açısından risk faktörü olduğu söylenebilmektedir.
2. Disk elüsyon yöntemi, BMD yöntemi ile çok iyi uyum göstermiştir Kolistin konsantrasyonlarının kaybına yol açmayan cam tüplerde uygulanması nedeniyle kolay, pratik, düşük maliyetli ve rutin laboratuvarlarda kullanıma uygun bir test olduğu düşünülmektedir.
3. Makrodilüsyon yöntemi, altın standard yöntem olan BMD yöntemine çok benzemesine rağmen daha zahmetli, zaman alıcı, tekrarlanabilirliği düşük bir yöntem olmasından dolayı rutin laboratuvarlarda kullanım için uygun bir yöntem olmadığı düşünülmektedir.
4. Ticari test, BMD yöntemi ile (disk elüsyon kadar olmasa da) kabul edilebilir oranda uyum göstermiştir, Kolay, pratik, rutin laboratuvarlarda kullanım için uygun olmasına rağmen diğer yöntemlere göre biraz daha maliyetli olduğu düşünülmektedir.
5. HPNP testi BMD yöntemi ile çok iyi uyum göstermiştir. Testin kolay, pratik, düşük maliyetli, rutin laboratuvarlarda kullanıma uygun ve en önlisi dört saatte hızlı sonuç verebilen, renk değişimi nedeniyle kolay okunabilen bir test olduğu düşünülmektedir.
6. Maliyet açısından en uygun yöntemlerin sıvı dilüsyon yöntemleri olduğu, ikinci sırada hızlı testlerin geldiği belirlenmiştir.
7. Çalışmamızda kolistin-meropenem kombinasyonunun sinerjik etkili olduğu bulunmuştur. Kolistin kombinasyon şeklinde kullanılmasının hem direnç artış oranını düşürebildiği, hem de kolistin toksik yan etkilerini sınırlayabildiği düşünülmektedir.
8. Çalışmamızda kolistine direnç gösteren izolatlarda plazmit aracılı kolistin direnç genine (*mcr-1*) rastlanmaması, hastanemizde henüz bu geni taşıyan bakteri yayılımının olmadığını düşündürmektedir. Ancak literatürdeki birçok ulusal merkezli araştırmada bu genin bulunmuş olması ülkemizde mevcut olduğunu ve her an yayılabileceğini düşündürmektedir. Plazmit aracılı direnç kolaylıkla

taşılabildiğinden kolistin-direncinin sürekli takip edilmesi gerekmektedir. Hayvancılıkta ve tarımda kolistinin yoğun kullanılması bu direncin geninin insana taşınmasını kolaylaştırmaktadır. Direnç takibi için farklı direnç mekanizmalarının da araştırılacağı başka çalışmalara ihtiyaç vardır.



KAYNAKLAR

1. Adeolu M., et al., Genome-Based Phylogeny and Taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: Proposal for Enterobacterales Ord. Nov. Divided into the Families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae Fam. Nov., Pectobacteriaceae Fam. Nov., Yersiniaceae Fam. Nov., Hafniaceae Fam. Nov., Morganellaceae Fam. Nov., and Budviciaceae Fam. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016. 66(12): p. 5575-5599
2. Ahmed Z.S., et al., Evidence of Colistin Resistance Genes (Mcr-1 and Mcr-2) in Wild Birds and Its Public Health Implication in Egypt. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 2019. 8(1)
3. Al-Hassan L., El Mehallawy H., and Amyes S., Diversity in *Acinetobacter Baumannii* Isolates from Paediatric Cancer Patients in Egypt. *Clinical Microbiology and Infection*, 2013. 19(11): p. 1082-1088
4. Andrews J.M., Determination of Minimum Inhibitory Concentrations. *J Antimicrob Chemother*, 2001. 48 Suppl 1: p. 5-16
5. Arabacı Ç., et al., Investigation of Carbapenemase and Mcr-1 Genes in Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Isolates. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 2019. 13(06): p. 504-509
6. Averbuch D., et al., Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Rods Causing Bacteremia in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: Intercontinental Prospective Study of the Infectious Diseases Working Party of the European Bone Marrow Transplantation Group. *Clinical Infectious Diseases*, 2017. 65(11): p. 1819-1828. <https://doi.org/10.1093/cid/cix646>
7. Aydoğan H., Nozokomiyal Patojen Olarak *Klebsiella* Türlerinin Mikrobiyolojik, Klinik Ve Epidemiyolojik Özellikleri. *Hastane İnfeksiyonlar Dergisi*, 2000. 4(3): p. 135-143
8. Aygar İ.S., In Vitro Evaluation of the Increase in Mic Value of Colistin in the Carbapenem Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Strains over the Years. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2020. 50(3): p. 164-171. <https://dx.doi.org/10.5222/TMCD.2020.164>
9. Ayşe Barış F.M.A., Banu Bayraktar, Enterobacteraceae İzolatlarında Kolistin Direncinin Belirlenmesinde Kolistin Broth Disk Elusyon Ve Hızlı Polimiksin Np Testinin Değerlendirilmesi. 5. *Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi* 20195. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi p. 251-252
10. Bardet L., et al., Comparative Evaluation of the Umic Colistine Kit to Assess Mic of Colistin of Gram-Negative Rods. *BMC Microbiology*, 2019. 19(1)
11. Baron E.J., et al., A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (Idsa) and the American Society for Microbiology (Asm) A. *Clinical Infectious Diseases*, 2013. 57(4): p. e22-e121
12. Bassetti M., et al., How to Manage *Pseudomonas Aeruginosa* Infections. *Drugs in Context*, 2018. 7: p. 1-18
13. Baumann P., Doudoroff M., and Stanier R., A Study of the *Moraxella* Group Ii. Oxidative-Negative Species (Genus *Acinetobacter*). *Journal of bacteriology*, 1968. 95(5): p. 1520-1541
14. Baykara N., et al., Epidemiology of Sepsis in Intensive Care Units in Turkey: A Multicenter, Point-Prevalence Study. *Critical Care*, 2018. 22(1)

15. Belda-Orlowski A., et al., Evaluation and Readout Optimization of the Rapid Polymyxin Np Test for the Detection of Colistin-Resistant Enterobacteriaceae. *Journal of Medical Microbiology*, 2019. 68(8): p. 1189-1193
16. Bennet J.E., Blaser M.J., and Dolin R., Principles and Practice of Infectious Diseases. 2015: *Elsevier Saunders*.
17. Brennan-Krohn T., Pironti A., and Kirby J.E., Synergistic Activity of Colistin-Containing Combinations against Colistin-Resistant enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2018. 62(10)
18. Bush K. and Bradford P.A., Epidemiology of B-Lactamase-Producing Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 2020. 33(2): p. e00047-00019. <https://cmr.asm.org/content/cmr/33/2/e00047-19.full.pdf>
19. Cai Y., et al., Activity of Colistin Alone or in Combination with Rifampicin or Meropenem in a Carbapenem-Resistant Bioluminescent *Pseudomonas Aeruginosa* Intraperitoneal Murine Infection Model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2018. 73(2): p. 456-461
20. Carretto E., et al., Clinical Validation of Sensitest Colistin, a Broth Microdilution-Based Method to Evaluate Colistin Mics. *Journal of Clinical Microbiology*, 2018. 56(4)
21. ÇetİN E.S., et al., Polİmİksİn B'nİn İmİpeneme Dİrençlİ Acinetobacter Baumannii Suşlarına Karşı İn-Vİtro Aktİvİtesİ. *ANKEM Derg*, 2011. 25(2): p. 94-98
22. Cezaroğlu Y., et al., Çoklu İlaç Direnci Gösteren Gram Negatif Bakterilerin Kolistin Duyarlılık Durumları, in *Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi 2019: İzmir, Türkiye*
23. Chew K.L., et al., Colistin and Polymyxin B Susceptibility Testing for Carbapenem-Resistant and *Mcr*-Positive Enterobacteriaceae: Comparison of Sensititre, Microscan, Vitek 2, and Etest with Broth Microdilution. *Journal of Clinical Microbiology*, 2017. 55(9): p. 2609-2616
24. Cielo N.C., et al., Polymyxin B Broth Disk Elution: A Feasible and Accurate Methodology to Determine Polymyxin B Susceptibility in Enterobacterales. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2020. 98(2)
25. *Clinical and Laboratory Standards Institute (Clsi). Clsi Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Clsi Ast News Update. 2016:1(2):1-9., in Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 2018, Wayne: PA. https://clsi.org/media/1700/clsi-news-winter-2016.*
26. Coburn B., Sekirov I., and Finlay B.B., Type Iii Secretion Systems and Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007. 20(4): p. 535-549
27. Conceição-Neto O.C., et al., Difficulty in Detecting Low Levels of Polymyxin Resistance in Clinical *Klebsiella Pneumoniae* Isolates: Evaluation of Rapid Polymyxin Np Test, Colispot Test and Superpolymyxin Medium. *New Microbes and New Infections*, 2020. 36
28. Cui N., et al., Tigecycline-Induced Coagulopathy: A Literature Review. *International journal of clinical pharmacy*, 2019International journal of clinical pharmacy: p. 1-6
29. Dafopoulou K., et al., Comparative Evaluation of Colistin Susceptibility Testing Methods among Carbapenem-Nonsusceptible *Klebsiella Pneumoniae* and *Acinetobacter Baumannii* Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015. 59(8): p. 4625-4630

30. Dağı H.T., et al., Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Pseudomonas Aeruginosa* Suşlarının Antibiyotiklere Direnç Oranları. *ANKEM Derg*, 2011. 25(2): p. 107-110
31. Dağı H.T., Arslan U., and Tuncer İ., Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Acinetobacter Baumannii* Suşlarında Antibiyotik Direnci. *ANKEM Derg*, 2011. 25(1): p. 22-26
32. Dailey P., et al., Defining System Requirements for Simplified Blood Culture to Enable Widespread Use in Resource-Limited Settings. *Diagnostics*, 2019. 9(1)
33. Dalmolin T.V., et al., Detection of Enterobacterales Resistant to Polymyxins Using Rapid Polymyxins Np Test. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2019. 50(2): p. 425-428
34. Dalmolin T.V., et al., Elution Methods to Evaluate Colistin Susceptibility of Gram-Negative Rods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2020. 96(1)
35. Doern G.V., et al., Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: A Comprehensive Update on the Problem of Blood Culture Contamination and a Discussion of Methods for Addressing the Problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 2019. 33(1)
36. Doğan M., Feyzioğlu B., and Baykan M., Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter* Türlerinin Kolistin, Tigesiklin Ve Diğer Antibiyotiklere Karşı Direnç Profillerinin Araştırılması. *Ankem Dergisi*, 2014. 28(4): p. 138-143
37. Doğanay M., Enfeksiyon Hastalıkları. Sepsis., ed. S.G. Wilke Topçu A, Doğanaya M eds. Sepsis., 1996, istanbul: *Nobel tıp kitabevleri*. 30.
38. Dortet L., et al., Rapid Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae from Blood Cultures. *Clinical Microbiology and Infection*, 2014. 20(4): p. 340-344
39. Dreyer A., Blood Culture Systems: From Patient to Result. *Intechopen*, (2012)Intechopen, <https://www.intechopen.com/books/sepsis-an-ongoing-and-significant-challenge/blood-culture-systems-from-patient-to-result><https://www.intechopen.com/books/sepsis-an-ongoing-and-significant-challenge/blood-culture-systems-from-patient-to-result>
40. Dundar D., et al., In-Vitro Activities of Imipenem–Colistin, Imipenem–Tigecycline, and Tigecycline–Colistin Combinations against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae*. *Journal of Chemotherapy*, 2019. 30(6-8): p. 342-347
41. El-Sayed Ahmed M.a.E., et al., Colistin and Its Role in the Era of Antibiotic Resistance: An Extended Review (2000-2019). *Emerg Microbes Infect*, 2020. 9(1): p. 868-885
42. Eser O.K., Ergin A., and Hasçelik G., [Antimicrobial Resistance and Existence of Metallo-Beta-Lactamase in *Acinetobacter* Species Isolated from Adult Patients]. *Mikrobiyol Bul*, 2009. 43(3): p. 383-390
43. European Committee Recommendations for Mic Determination of Colistin (Polymyxin E) as Recommended by the Joint Clsi-Eucast Polymyxin Breakpoints Working Group on Antimicrobial Susceptibility Testing., 2016 Available from: URL: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf.

44. Falagas M.E., Rafailidis P.I., and Matthaïou D.K., Resistance to Polymyxins: Mechanisms, Frequency and Treatment Options. *Drug Resistance Updates*, 2010. 13(4-5): p. 132-138
45. Galindo-Méndez M., Antimicrobial Resistance in Escherichia Coli, in *E. Coli Infection*. 2020, IntechOpen
46. Gelmez G.A., *Kolistin Duyarlılığının Belirlenmesinde Diagnostics Colistin Mic-Strip Testinin Performansının Değerlendirilmesi* in 5. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi. 2019: izmir
47. Germ J., et al., Evaluation of Resazurin-Based Rapid Test to Detect Colistin Resistance in Acinetobacter Baumannii Isolates. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2019. 38(11): p. 2159-2162
48. Germovsek E., Barker C.I., and Sharland M., What Do I Need to Know About Aminoglycoside Antibiotics? *Archives of disease in childhood - Education & practice edition*, 2017. 102(2): p. 89-93
49. Gharaibeh M.H. and Shatnawi S.Q., An Overview of Colistin Resistance, Mobilized Colistin Resistance Genes Dissemination, Global Responses, and the Alternatives to Colistin: A Review. *Veterinary World*, 2019. 12(11): p. 1735-1746
50. Girometti N., et al., Klebsiella Pneumoniae Bloodstream Infection: Epidemiology and Impact of Inappropriate Empirical Therapy. *Medicine (Baltimore)*, 2014. 93(17): p. 298-309
51. Giske C.G. and Kahlmeter G., Colistin Antimicrobial Susceptibility Testing—Can the Slow and Challenging Be Replaced by the Rapid and Convenient? *Clinical Microbiology and Infection*, 2018. 24(2): p. 93-94
52. Goli H.R., et al., Emergence of Colistin Resistant Pseudomonas Aeruginosa at Tabriz Hospitals, Iran. *Iran J Microbiol*, 2016. 8(1): p. 62-69
53. Gudiol C., et al., Changing Aetiology, Clinical Features, Antimicrobial Resistance, and Outcomes of Bloodstream Infection in Neutropenic Cancer Patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 2013. 19(5): p. 474-479
54. Gultekin E., et al., Antimicrobial Susceptibility of Nonfermentative Gram Negative Bacteria Isolated from Blood Cultures. *Ankara Dergisi*, 2014. 28(3): p. 79-85
55. Gunnison J.B., et al., The Mode of Action of Antibiotic Synergism and Antagonism: The Effect in Vitro on Bacteria Not Actively Multiplying. *Microbiology*, 1955. 13(3): p. 509-518
56. Guzel M., Avsaroglu M.D., and Soyer Y., Determination of Colistin Resistance in Escherichia Coli Isolates from Foods in Turkey, 2011-2015. *Food and Health*, 2020. 6(3): p. 160-169
57. Haeili M., et al., Comparison of Susceptibility Testing Methods for Determining the Activity of Colistin against Gram-Negative Bacilli of Clinical Origin. *Journal of Medical Microbiology*, 2019. 68(1): p. 60-66
58. Hall G.S., *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 13th Edn.* 2013, American Society for Clinical Pathology
59. Hameed F., et al., Plasmid-Mediated Mcr-1 Gene in Acinetobacter Baumannii and Pseudomonas Aeruginosa: First Report from Pakistan. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2019. 52
60. Haynes W., Pseudomonas Aeruginosa---Its Characterization and Identification. *Microbiology*, 1951. 5(5): p. 939-950
61. Hesse C., et al., Genome-Based Evolutionary History of Pseudomonas Spp. *Environmental microbiology*, 2018. 20(6): p. 2142-2159

62. Hindler J.A. and Humphries R.M., Colistin Mic Variability by Method for Contemporary Clinical Isolates of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013. 51(6): p. 1678-1684
63. Humphries R.M., et al., Clsi Methods Development and Standardization Working Group Best Practices for Evaluation of Antimicrobial Susceptibility Tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 2018. 56(4)
64. Institute. C.a.L.S., *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. 2018, Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA.
65. J Oliveira W.C.R., Gram Negative Bacteria. , in *Statpearls*. 2020, StatPearls Publishing
Treasure Island:
Internet.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538213/>
66. Janssen A.B., et al., Mechanisms of Colistin Resistance in *Escherichia* Strains Isolated from Bloodstream Infections. *bioRxiv*, 2019bioRxiv. 10.1101/864983: p. 864983.<https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2019/12/05/864983.full.pdf>
67. Javed M., et al., Colistin Susceptibility Test Evaluation of Multiple-Resistance-Level *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates Generated in a Morbidostat Device. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2018Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 10.1093/jac/dky337
68. Jayol A., et al., Rapid Detection of Polymyxin-Resistant Enterobacteriaceae from Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 2016. 54(9): p. 2273-2277
69. Jayol A., et al., Evaluation of Three Broth Microdilution Systems to Determine Colistin Susceptibility of Gram-Negative Bacilli. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2018. 73(5): p. 1272-1278
70. Jia H., et al., Evaluation of Resazurin-Based Assay for Rapid Detection of Polymyxin-Resistant Gram-Negative Bacteria. *BMC Microbiology*, 2020. 20(1)
71. Kansak N., *Klebsiella Pneumoniae İzolatlarında Sıvı Mikrodilüsyon Temelli İki Ticari Sistemin Referans Mikrodilüsyon Yöntemine Göre Değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul*, 2020. 54(4): p. 606-612
72. Karvanen M., et al., Colistin Is Extensively Lost During Standard in Vitro Experimental Conditions. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017. 61(11)
73. Karvanen M., et al., Colistin Is Extensively Lost During Standard in Vitro Experimental Conditions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017. 61(11)
74. Kourtis A.P., et al., Antibiotic Multidrug Resistance of *Escherichia Coli* Causing Device- and Procedure-Related Infections in the United States Reported to the National Healthcare Safety Network, 2013–2017. *Clinical Infectious Diseases*, 2020Clinical Infectious Diseases. 10.1093/cid/ciaa1031.<https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1031>
75. Koyuncu Özyurt Ö., et al., Evaluation of the Bd Phoenix100 System and Colistin Broth Disk Elution Method for Antimicrobial Susceptibility Testing of Colistin against Gram-Negative Bacteria. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 2019. 53(3): p. 254-261
76. Kurekci C., et al., First Report of *Escherichia Coli* Carrying the Mobile Colistin Resistance Gene Mcr-1 in Turkey. *J Glob Antimicrob Resist*, 2018. 15: p. 169-170
77. Landman D., et al., Polymyxins Revisited. *Clinical Microbiology Reviews*, 2008. 21(3): p. 449-465

78. Laupland K.B. and Church D.L., Population-Based Epidemiology and Microbiology of Community-Onset Bloodstream Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 2014. 27(4): p. 647-664
79. Leal H.F., et al., Bloodstream Infections Caused by Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria: Epidemiological, Clinical and Microbiological Features. *BMC Infect Dis*, 2019. 19(1): p. 609
80. Leber A.L., Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2020: John Wiley & Sons.
81. Leclercq R., et al., Eucast Expert Rules in Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology and Infection*, 2013. 19(2): p. 141-160
82. Lellouche J., et al., Combining Vitek® 2 with Colistin Agar Dilution Screening Assist Timely Reporting of Colistin Susceptibility. *Clinical Microbiology and Infection*, 2019. 25(6): p. 711-716
83. Lescat M., Poirel L., and Nordmann P., Rapid Multiplex Polymerase Chain Reaction for Detection of Mcr-1 to Mcr-5 Genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2018. 92(4): p. 267-269
84. Lescat M., et al., A Resazurin Reduction-Based Assay for Rapid Detection of Polymyxin Resistance in *Acinetobacter Baumannii* and *Pseudomonas Aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2019. 57(3)
85. Li J., et al., Evaluation of Colistin as an Agent against Multi-Resistant Gram-Negative Bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2005. 25(1): p. 11-25
86. Li J., et al., Colistin: The Re-Emerging Antibiotic for Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 2006. 6(9): p. 589-601
87. Ling Z., et al., Epidemiology of Mobile Colistin Resistance Genes Mcr-1 to Mcr-9. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2020. 75(11): p. 3087-3095
88. Liu Y.-Y., et al., Emergence of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Mechanism Mcr-1 in Animals and Human Beings in China: A Microbiological and Molecular Biological Study. *The Lancet Infectious Diseases*, 2016. 16(2): p. 161-168
89. Loho T. and Dharmayanti A., Colistin: An Antibiotic and Its Role in Multiresistant Gram-Negative Infections. *Acta Medica Indonesiana*, 2015. 47(2)
90. Luis Esaú L.-J., et al., An Alternative Disk Diffusion Test in Broth and Macrodilution Method for Colistin Susceptibility in Enterobacteriales. *Journal of Microbiological Methods*, 2019. 167
91. Madigan M.T., Microbial Cell Structure and Function, in *Brock Biology of Microorganisms*. 2015, Pearson: USA. p. 25-72
92. Magiorakos A.P., et al., Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 2012. 18(3): p. 268-281
93. Mainil J., *Escherichia Coli* Virulence Factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2013. 152(1-2): p. 2-12
94. Malli E., et al., Evaluation of Rapid Polymyxin Np Test to Detect Colistin-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Isolated in a Tertiary Greek Hospital. *Journal of Microbiological Methods*, 2018. 153: p. 35-39
95. Martin G.S., Sepsis, Severe Sepsis and Septic Shock: Changes in Incidence, Pathogens and Outcomes. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 2014. 10(6): p. 701-706

96. Matsen J., Evaluation of the Bauer-Kirby-Sherris-Turck Single-Disc Diffusion Method of Antibiotic Susceptibility Testing, in *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1969. p. 445–453.
97. Matuschek E., et al., 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.* *Clinical Microbiology and Infection*, 2018. 24(8): p. 865-870
98. Miajlovic H. and Smith S.G., Bacterial Self-Defence: How *Escherichia Coli* evades Serum Killing. *FEMS Microbiology Letters*, 2014. 354(1): p. 1-9
99. Minasyan H., Sepsis: Mechanisms of Bacterial Injury to the Patient. *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine*, 2019. 27(1): p. 1-22
100. Mitton B., et al., Evaluation of an in-House Colistin Np Test for Use in Resource-Limited Settings. *Journal of Clinical Microbiology*, 2019. 57(10)
101. Mohsin J., et al., Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *Mcr-1* in an *Escherichia Coli* St10 Bloodstream Isolate in the Sultanate of Oman. *Microbial Drug Resistance*, 2018. 24(3): p. 278-282
102. Moore D.D., Commonly Used Reagents and Equipment. *Current Protocols in Molecular Biology*, 1996. 35(1): p. A. 2.1-A. 2.8
103. Murray P., *Enterobacteriaceae*, in *Medical Microbiology*. 2013, Elsevier: USA. p. 258-272
104. Murray P., *Pseudomonas* and Related Bacteria, in *Medical Microbiology*. 2013, Elsevier: USA. p. 288-195
105. Murray P.R., Rosenthal K.S., and Pfaller M.A., *Medical Microbiology*. 2015: Elsevier Health Sciences.
106. Nemec A., et al., Taxonomy of Haemolytic and/or Proteolytic Strains of the Genus *Acinetobacter* with the Proposal of *Acinetobacter Courvalinii* Sp. Nov. (Genomic Species 14 *Sensu* Bouvet & Jeanjean), *Acinetobacter Dispersus* Sp. Nov. (Genomic Species 17), *Acinetobacter Modestus* Sp. Nov., *Acinetobacter Proteolyticus* Sp. Nov. And *Acinetobacter Vivianii* Sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016. 66(4): p. 1673-1685
107. Nordmann P., Jayol A., and Poirel L., Rapid Detection of Polymyxin Resistance in *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases*, 2016. 22(6): p. 1038-1043
108. Ntusi N., et al., Guideline for the Optimal Use of Blood Cultures. *S Afr Med J*, 2010. 100(12): p. 839-843
109. Öksüz L. and Aktaş Z., Bir Üniversite Hastanesinde Kan Kültürlerinden İzole Edilen Bakterilerin Kümülatif Antibiyogram Sonuçları. *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi*. 3(2): p. 35-44
110. Öksüz Ş., et al., Kan Kültürlerinden İzole Edilen Mikroorganizmalar Ve Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg*, 2008. 38(3-4): p. 117-121
111. Osei Sekyere J., *Mcr Colistin Resistance Gene: A Systematic Review of Current Diagnostics and Detection Methods*. *MicrobiologyOpen*, 2018. 8(4)
112. Özkaya E., et al., Investigation of Plasmid Mediated *Mcr Colistin Resistance Gene* in Clinical *Enterobacteriales* Isolates. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 2020. 54(2): p. 191-202
113. Özkul Koçak C. and Çetin Hazırolan G., Colistin Resistance in Carbapenem Resistant *K. Pneumoniae* Clinical Isolates. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 2019 *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 10.5222/tmcd.2019.017

114. Pachon-Ibanez M.E., Prevention of Rifampicin Resistance in *Acinetobacter Baumannii* in an Experimental Pneumonia Murine Model, Using Rifampicin Associated with Imipenem or Sulbactam. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006. 58(3): p. 689-692
115. Pandey N. and Cascella M., Beta Lactam Antibiotics, in *Statpearls*. 2021, StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL)
116. Panelİ K.R.V.U., Sepsiste Sağkalım Kampanyası: Uluslararası Sepsis Ve Septik Şokun Yönetimi Kılavuzu: 2016.
117. Patolia S., et al., Risk Factors and Outcomes for Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli Bacteremia. *Ther Adv Infect Dis*, 2018. 5(1): p. 11-18
118. Peck K.R., et al., In Vitro Time-Kill Studies of Antimicrobial Agents against Blood Isolates of Imipenem-Resistant *Acinetobacter Baumannii*, Including Colistin- or Tigecycline-Resistant Isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 2012. 61(3): p. 353-360
119. Peleg A.Y., Seifert H., and Paterson D.L., *Acinetobacter Baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 2008. 21(3): p. 538-582
120. Pfennigwerth N., et al., Evaluation of Six Commercial Products for Colistin Susceptibility Testing in Enterobacterales. *Clinical Microbiology and Infection*, 2019. 25(11): p. 1385-1389
121. Poirel L., Jayol A., and Nordmann P., Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews*, 2017. 30(2): p. 557-596
122. Polat G., et al., Sepsis and Septic Shock: Current Treatment Strategies and New Approaches. *The Eurasian Journal of Medicine*, 2017. 49(1): p. 53-58
123. Pragasam A.K., et al., Molecular Mechanisms of Colistin Resistance in *Klebsiella Pneumoniae* Causing Bacteremia from India-a First Report. *Front Microbiol*, 2016. 7: p. 2135
124. Procop G.W., et al., Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 2020: Jones & Bartlett Publishers.
125. Qureshi Z.A., et al., Colistin-Resistant *Acinetobacter Baumannii*: Beyond Carbapenem Resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 2015. 60(9): p. 1295-1303. <https://doi.org/10.1093/cid/civ048>
126. Ramesh N., et al., Colistin Susceptibility of Gram-Negative Clinical Isolates from Tamil Nadu, India. *Asian Biomedicine*, 2017. 10(1): p. 35-39
127. Ray C.G. and Ryan K.J., Sherris Medical Microbiology. Vol. 6. 2010: McGraw-Hill.
128. Rhodes A., et al., Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med*, 2017. 43(3): p. 304-377
129. Rodrigues C., et al., The Effect of a Rapid Molecular Blood Test on the Use of Antibiotics for Nosocomial Sepsis: A Randomized Clinical Trial. *Journal of Intensive Care*, 2019. 7(1)
130. Rodríguez-Baño J., et al., Treatment of Infections Caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-, Ampc-, and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology Reviews*, 2018. 31(2): p. e00079-00017. <https://cmr.asm.org/content/cmr/31/2/e00079-17.full.pdf>

131. Roh K.H., et al., Evaluation of Bactec Plus Aerobic and Anaerobic Blood Culture Bottles and Bact/Alert Fan Aerobic and Anaerobic Blood Culture Bottles for the Detection of Bacteremia in Icu Patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2012. 73(3): p. 239-242
132. Rudd K.E., et al., Global, Regional, and National Sepsis Incidence and Mortality, 1990–2017: Analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet*, 2020. 395(10219): p. 200-211
133. Ruppé É., Woerther P.-L., and Barbier F., Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacilli. *Annals of Intensive Care*, 2015. 5(1)
134. Ryan M.R., Historical Evolution of Automated Blood Culture Systems. *Clinical Microbiology Newsletter*, 1993. Volume 15(Issue 14): p. Pages 105-108
135. Sadek M., et al., Rapid Polymyxin/Pseudomonas Np Test for Rapid Detection of Polymyxin Susceptibility/Resistance in Pseudomonas Aeruginosa. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2020. 39(9): p. 1657-1662
136. Saeki M., et al., Inoculum Effect of High Concentrations of Methicillin-Susceptible Staphylococcus Aureus on the Efficacy of Cefazolin and Other Beta-Lactams. *Journal of infection and chemotherapy*, 2018. 24(3): p. 212-215
137. Sari A.N., et al., Ülkemizde Klinik Enterobacteriaceae İzolatlarında Plazmit Aracılı Kolistin Direnç Genlerini (Mcr-1 Ve Mcr-2) Araştıran Çok Merkezli Çalışmaya Ait Sonuçlar. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 2017. 51(3): p. 299-303
138. Schimpff S.C., Gram-Negative Bacteremia. *Support Care Cancer*, 1993. 1(1): p. 5-18
139. Schoch C.L., et al., Ncbi Taxonomy: A Comprehensive Update on Curation, Resources and Tools. *Database (Oxford)*, 2020. 2020
140. Sękowska A., Chudy M., and Gospodarek-Komkowska E., Emergence of Colistin-Resistant Klebsiella Pneumoniae in Poland. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 2019. 67(1): p. 18-22
141. Serap Sevim E., Bactec Kan Kültür Sistemi İle İzole Edilen Mikro-Organizmaların Değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi*, 2007. 21(3): p. 135-149
142. Sharma A., Gupta V.K., and Pathania R., Efflux Pump Inhibitors for Bacterial Pathogens: From Bench to Bedside. *Indian J Med Res*, 2019. 149(2): p. 129-145
143. Shatri G. and Tadi P., Polymyxin, in *Statpearls [Internet]*. 2020, StatPearls Publishing
144. Shoaib M., et al., Evaluation of Rapid Polymyxin Nordmann Poirel Test for Detection of Polymyxin Resistance in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2020. 39(11): p. 2195-2198
145. Simner P.J., et al., Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test to Determine Colistin in Vitro Activity against Gram-Negative Bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, 2019. 57(2)
146. Singer M., et al., The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama*, 2016. 315(8)
147. Soo Y.T., et al., Evaluation of Eucast Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing (Rast) Directly from Blood Culture Bottles. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2020European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: p. 1-6
148. Struthers K., Infections of Blood, in *Clinical Microbiology*. 2017, CRC Press: USA. p. 125-139

149. Sykes J.E., Canine and Feline Infectious Diseases-E-Book. 2013: *Elsevier Health Sciences*.
150. Tan T.Y. and Ng S.Y., Comparison of Etest, Vitek and Agar Dilution for Susceptibility Testing of Colistin. *Clinical Microbiology and Infection*, 2007. 13(5): p. 541-544
151. Tanriverdi Y., et al., Kolistin Direncinin Saptanmasında Sıvı Mikrodilüsyon Ve Otomatize Sistem Sonuçlarının Karşılaştırılması. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 10(3): p. 297-301
152. Tascini C., et al., Synergistic Activity of Colistin Plus Rifampin against Colistin-Resistant Kpc-Producing *Klebsiella Pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013. 57(8): p. 3990-3993
153. Temiz H., et al., Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria Isolated from Blood Cultures. *Klinik Dergisi/Klinik Journal*, 2015. 27(2): p. 62-68
154. Totoro, Microbiology an Introduction. Thirteen edition ed. Microbial Diseases of the Cardiovascular and Lymphatic Systems. Microbial Diseases of the Cardiovascular and Lymphatic Systems, 2019, (USA) *Pearson Education, Inc.*
155. Tumbarello M., et al., Predictors of Mortality in Bloodstream Infections Caused by *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase-Producing K. *Pneumoniae*: Importance of Combination Therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 2012. 55(7): p. 943-950
156. Turlej-Rogacka A., et al., Evaluation of Colistin Stability in Agar and Comparison of Four Methods for Mic Testing of Colistin. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2017. 37(2): p. 345-353
157. Tzouveleakis L.S., et al., Carbapenemases in *Klebsiella Pneumoniae* and Other Enterobacteriaceae: An Evolving Crisis of Global Dimensions. *Clinical Microbiology Reviews*, 2012. 25(4): p. 682-707
158. Ulusal Antibiyotik Direnç Sürveyans Sistemi (Uamdss) 2016 Yıllık Raporu., 2016 Available from: URL: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji_Referans_Laboratuvarlari_ve_Biyolojik_Urunler_DB/uamdss/yillik_raporlar/UAMDSS_2016_Rapor.pdf
159. Van Der Woude M.W. and BäUmler A.J., Phase and Antigenic Variation in Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004. 17(3): p. 581-611
160. Vincent J.-L., International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *Jama*, 2009. 302
161. Vourli S., et al., Evaluation of Two Automated Systems for Colistin Susceptibility Testing of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter Baumannii* Clinical Isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2017. 72(9): p. 2528-2530
162. Wang Q., et al., Emergence of Tigecycline Resistance in *Escherichia Coli* Co-Producing Mcr-1 and Ndm-5 During Tigecycline Salvage Treatment. *Infection and Drug Resistance*, 2018. 11: p. 2241
163. Wattal C., et al., Performance of Three Commercial Assays for Colistin Susceptibility in Clinical Isolates and Mcr-1 Carrying Reference Strain. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2019. 37(4): p. 488
164. Wilson M.G. and Pandey S., *Pseudomonas Aeruginosa*, in *Statpearls [Internet]*. 2020, StatPearls Publishing
165. Wilson M.L., Weinstein M.P., and Reller L.B., Automated Blood Culture Systems. *Clinics in Laboratory Medicine*, 1994. 14(1): p. 149-169

166. Wright W.F., Central Venous Access Device-Related *Bacillus Cereus* Endocarditis: A Case Report and Review of the Literature. *Clin Med Res*, 2016. 14(2): p. 109-115
167. Xavier B.B., et al., Identification of a Novel Plasmid-Mediated Colistin-Resistance Gene, *Mcr-2*, in *Escherichia Coli*, Belgium, June 2016. *Eurosurveillance*, 2016. 21(27)
168. Yahav D., et al., Efficacy and Safety of Tigecycline: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2011. 66(9): p. 1963-1971
169. Yainoy S., et al., Evaluation of the Rapid Polymyxin Np Test for Detection of Colistin Susceptibility in Enterobacteriaceae Isolated from Thai Patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2018. 92(2): p. 102-106
170. Yamaguchi T., et al., High Prevalence of Colistin-Resistant *Escherichia Coli* with Chromosomally Carried *Mcr-1* in Healthy Residents in Vietnam. *mSphere*, 2020. 5(2): p. e00117-00120. <https://msphere.asm.org/content/msph/5/2/e00117-20.full.pdf>
171. Yan A. and Bryant E.E., Quinolones, in *Statpearls [Internet]*. 2020, StatPearls Publishing
172. Yazıcı A., Prof. Dr. Ünal; Türkiye’de Her Yıl 150-200 Bin Kişi Sepsisten Ölüyor., in *Hürriyet*. 2016.07.Eylül
173. Yusuf E., et al., The Accuracy of Four Commercial Broth Microdilution Tests in the Determination of the Minimum Inhibitory Concentration of Colistin. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2020. 19(1)
174. Zafer M.M., et al., Emergence of Colistin Resistance in Multidrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* and *Escherichia Coli* Strains Isolated from Cancer Patients. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2019. 18(1)
175. Zhang J., et al., Molecular Detection of Colistin Resistance Genes (*Mcr-1*, *Mcr-2* and *Mcr-3*) in Nasal/Oropharyngeal and Anal/Cloacal Swabs from Pigs and Poultry. *Scientific Reports*, 2018. 8(1)

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN ÇOĞUL DİRENÇLİ GRAM NEGATİF ÇOMAKLARDA FARKLI YÖNTEMLERLE KOLİSTİN DİRENCİNİN SAPTANMASI

Yazar Rama Al Hamwi

Gönderim Tarihi: 18-Nis-2021 10:03PM (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 1562588083

Dosya adı: ARDA_FARKLI_YO_NTEMLERLE_KOLI_STI_N_DI_RENCI_NI_N_SAPTANMASI.pdf (3.39M)

Kelime sayısı: 26665

Karakter sayısı: 175872

KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN ÇOĞUL DİRENÇLİ GRAM NEGATİF ÇOMAKLARDA FARKLI YÖNTEMLERLE KOLİSTİN DİRENCİNİN SAPTANMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% **7**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **5**

İNTERNET KAYNAKLARI

% **3**

YAYINLAR

% **2**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

nek.istanbul.edu.tr:4444

İnternet Kaynağı

% **1**

2

Submitted to Istanbul University

Öğrenci Ödevi

<% **1**

3

acikarsiv.ankara.edu.tr

İnternet Kaynağı

<% **1**

4

Submitted to Ajou University Graduate School

Öğrenci Ödevi

<% **1**

5

www.ankemdernegi.org.tr

İnternet Kaynağı

<% **1**

6

klinikmikrobiyoloji2013.org

İnternet Kaynağı

<% **1**

7

Submitted to The University of Manchester

Öğrenci Ödevi

<% **1**

8

Submitted to TechKnowledge Turkey

Öğrenci Ödevi

<% **1**

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080