

**KARBAPENEM DİRENÇLİ GRAM NEGATİF BAKTERİLERDE
KOLİSTİN DUYARLILIĞININ SAPTANMASINDA SIVI
MİKRODİLÜSYON VE TİCARİ YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CEREN HEKİMOĞLU

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
AĞUSTOS - 2019**

**KARBAPENEM DİRENÇLİ GRAM NEGATİF BAKTERİLERDE
KOLİSTİN DUYARLILIĞININ SAPTANMASINDA SIVI
MİKRODİLÜSYON VE TİCARİ YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CEREN HEKİMOĞLU

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

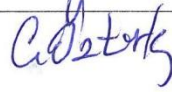

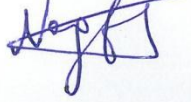
**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**Danışman
Prof. Dr. Nuran DELİALİOĞLU**

**MERSİN
AĞUSTOS - 2019**

ONAY

Ceren HEKİMOĞLU tarafından Prof.Dr. Nuran DELİALİOĞLU danışmanlığında hazırlanan "Karbapenem Dirençli Gram Negatif Bakterilerde Kolistin Duyarlılığının Saptanmasında Sıvı Mikrodilüsyon ve Ticari Yöntemlerin Karşılaştırılması" başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 27.08.2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği ile Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

| Görevi | Ünvanı, Adı ve Soyadı | İmza |
|----------|-------------------------------|---|
| Başkan | Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK |  |
| Danışman | Prof.Dr. Nuran DELİALİOĞLU |  |
| Üye | Dr. Öğr. Üyesi Toğrul NAĞİYEV |  |

Yukarıdaki Jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 1.08.19 tarih ve 2019-366 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Bahar TAŞDELEN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
 - Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
 - Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
 - Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi
- beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

27 Ağustos 2019/ 27 August 2019

İmza / Signature

CEREN HEKİMOĞLU

ÖZET

KARBAPENEM DİRENÇLİ GRAM NEGATİF BAKTERİLERDE KOLİSTİN DUYARLILIĞININ SAPTANMASINDA SIVI MİKRODİLÜSYON VE TİCARİ YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

Karbapenamaz dirençli nozokomiyal ve toplum kökenli Gram negatif bakteri enfeksiyonları dünya çapında giderek artmaktadır. Karbapenem dirençli suşların hastanede yatan hastalar arasında artan yayılımı endişe kaynağı haline gelmiştir. Karbapenemler (imipenem, meropenem, ertapenem), çoklu ilaca dirençli non-fermantatif ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) pozitif *Enterobacteriaceae*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde son terapötik seçenek olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarında artış sebebiyle kolistin kullanımı da artmaktadır. Kolistin duyarlılığını saptayabilmek için farklı test yöntemleri bulunmaktadır. EUCAST ve CLSI ortak önerisi referans yöntem sıvı mikrodilüsyon yöntemidir.

Bu çalışmada, karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* izolatlarında kolistin duyarlılığının saptanmasında sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile ticari sıvı mikrodilüsyon testi, VITEK 2 [BioMerieux, Fransa] ve MicroScan [Beckman Coulter, CA, USA] sistemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya karbapenemlere dirençli 25 adet *A. baumannii*, 25 adet *K. pneumoniae* ve 25 adet *P. aeruginosa* izolatı dahil edilmiştir. Tüm izolatların CLSI ve EUCAST'ın ortak önerisi olan ISO-20776 standart sıvı mikrodilüsyon metodu ve VITEK 2 [BioMerieux, Fransa] ve MicroScan [Beckman Coulter, CA, USA] sistemleri ile kolistin duyarlılıkları tespit edilmiştir.

Referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon ile karbapenem dirençli 75 izolatın 47'si (%63) kolistine duyarlı, 28'i (%37) dirençli bulunmuştur. VITEK 2 ile 61'i (%81) kolistine duyarlı, 14'ü (%19) dirençli, MicroScan ile 55'i (%73) kolistine duyarlı, 20'si (%27) dirençli olarak bulunmuştur. Kolistin duyarlılığını belirlemede MicroScan %86.38 duyarlı, %53.57 özgül, VITEK 2 %97.87 duyarlılık, %50 özgüllükte bulunmuştur. İki ticari sistem için kolistin duyarlılık ve özgüllükleri referans yöntemle karşılaştırıldığında birbirine yakın değerler verdiği gözlenmiştir. Her iki sistemde duyarlılıkları çok iyi ancak özgüllüklerinin düşük olduğu görülmektedir. MicroScan çok büyük hata oranı %16, VITEK 2 ile %18 olarak bulunmuştur. MicroScan için büyük hata oranı %6 iken, VITEK 2 için büyük hata oranı %1.3 olduğu belirlenmiştir. Kategorik uyum; MicroScan %83, VITEK 2 %85 bulunmuştur.

Hastalara uygun antibiyoterapinin yapılabilmesi için, hata oranlarının en az seviyede olduğu, özgüllük ve duyarlılığı yüksek ve tekrarlanabilir bir duyarlılık test yöntemi tercih edilmelidir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi zahmetli ve pahalı bir yöntem olduğundan rutinde kullanımı zordur. Bunun için sıvı mikrodilüsyonla kategorik uyumu, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, ticari sistemlerin kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kolistin duyarlılığı, Sıvı mikrodilüsyon, MicroScan, VITEK 2, Gram negatif basiller

Danışman: Prof. Dr. Nuran DELİALİOĞLU, Mersin Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin

ABSTRACT

COMPARISON OF BROTH MICRODILUTION AND COMMERCIAL METHODS FOR THE DETECTION OF COLISTIN SUSCEPTIBILITY IN CARBAPENEM RESISTANT GRAM NEGATIVE BACTERIA

Carbapenamase-resistant nosocomial and community-acquired Gram-negative bacterial infections are increasing worldwide. Increased dissemination of carbapenem resistant strains among hospitalized patients has become a source of concern. Carbapenems (imipenem, meropenem, ertapenem) are frequently used as the last therapeutic option in the treatment of infections caused by multi-drug resistant non-fermentative and extended spectrum beta-lactamase (ESBL) positive *Enterobacteriaceae*. In recent years, however, the use of colistin is also increasing due to an increase in carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* infections. Different test methods are available to determine the sensitivity of colistin. EUCAST and CLSI joint recommendation reference method is broth microdilution method.

In this study, it was aimed to compare colistin susceptibility and commercial broth microdilution test, VITEK 2 [BioMerieux, France] and MicroScan [Beckman Coulter, CA, USA] systems in the determination of colistin sensitivity in carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates. 25 *A. baumannii*, 25 *K. pneumoniae* and 25 *P. aeruginosa* isolates resistant to carbapenems were included in the study. Colistin susceptibility of all isolates was determined by using ISO-20776 standard broth microdilution method and VITEK 2 [BioMerieux, France] and MicroScan [Beckman Coulter, CA, USA] systems which are common recommendations of CLSI and EUCAST.

Of the 75 isolates resistant to carbapenem, 47 (63%) were susceptible to colistin and 28 (37%) were resistant to broth microdilution. VITEK 2 61 (%81) were susceptible to colistin and 14 (19%) were resistant, MicroScan 55 (%73) were susceptible to colistin and 20 (%27) were resistant. In determining the sensitivity of colistin, MicroScan was found to be %86.38 sensitive, %53.57 specific, VITEK 2 %97.87 sensitivity and %50 specificity. Colistin sensitivity and specificity were similar for the two commercial systems when compared with the reference method. Sensitivity in both systems is very good but low specificity. MicroScan has a very major error rate of %16 and VITEK 2 with %18. The major error rate for MicroScan was %6, while the major error rate for VITEK 2 was %1.3. Categorical agreement; MicroScan was found to be %83 and VITEK 2 was %85.

In order to provide appropriate antibiotherapy to patients, a reproducible sensitivity test method with a high specificity and sensitivity and minimum error rate should be preferred for appropriate antibiotherapy. Broth microdilution method is difficult use because it is expensive and laborious. It was concluded that commercial systems with high categorical compatibility, sensitivity and specificity can be used with broth microdilution.

Keywords: Colistin susceptibility, Broth microdilution, MicroScan, VITEK 2, Gram-negative bacilli.

Advisor: Prof. Nuran DELIALIOĞLU, Department of Medical Microbiology, University of Mersin, Mersin

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, her türlü bilgi ve desteklerini benden esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Nuran DELİALİOğLU'na, yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan Prof. Dr. Gönül ASLAN'a, Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK'e, Doç. Dr. Seda TEZCAN ÜLGER'e, Eczacılık Fakültesi Dr. Öğr. Üyesi Mahmut ÜLGER'e, Dr. Müjgan BAYER'e, tez çalışmam boyunca bana her zaman yardımcı olan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında görev yapan tüm çalışanlara, beni her zaman destekleyen ve yanımda olan aileme sonsuz teşekkür ederim. 2018-1 TP2-2905 no'lu proje ile desteklerini sunan Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne katkılarından dolayı teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|---|--------------|
| İÇ KAPAK | İi |
| ONAY | İii |
| ETİK BEYAN | İv |
| ÖZET | V |
| ABSTRACT | Vi |
| TEŞEKKÜR | Vii |
| İÇİNDEKİLER | Viii |
| TABLolar DİZİNİ | X |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | Xi |
| KISALTMALAR ve SİMGELER | Xii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI | 3 |
| 2.1. <i>Acinetobacter</i> spp. | 3 |
| 2.1.1. Tarihçe ve Taksonomi | 3 |
| 2.1.2. Mikrobiyolojik, Metabolik ve Kültür Özellikleri | 3 |
| 2.1.3. Epidemiyoloji | 3 |
| 2.1.4. Patogenez ve Virülans Faktörleri | 3 |
| 2.1.5. Klinik | 4 |
| 2.1.6. <i>Acinetobacter</i> Enfeksiyonlarında Tedavi | 4 |
| 2.1.2. <i>Enterobacteriaceae</i> Ailesi ve <i>Klebsiella</i> Cinsi Bakteriler | 4 |
| 2.1.2.1. Tarihçe ve Taksonomi | 4 |
| 2.1.2.2. Mikrobiyolojik, Metabolik ve Kültür Özellikleri | 5 |
| 2.1.2.3. Epidemiyoloji | 5 |
| 2.1.2.4. Antijen Yapıları | 5 |
| 2.1.2.5. Virülans Faktörleri | 5 |
| 2.1.2.6. Klinik | 5 |
| 2.1.2.7. <i>Klebsiella</i> Enfeksiyonlarında Tedavi | 6 |
| 2.1.3. <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> | 6 |
| 2.1.3.1. Tarihçe ve Taksonomi | 6 |
| 2.1.3.2. Mikrobiyolojik, Metabolik ve Kültür Özellikleri | 6 |
| 2.1.3.3. Epidemiyoloji | 6 |
| 2.1.3.4. Antijen Yapıları | 6 |
| 2.1.3.5. Patogenez ve Virülans Faktörleri | 7 |
| 2.1.3.6. Klinik | 7 |
| 2.1.3.7. <i>Pseudomonas</i> Enfeksiyonlarında Tedavi | 7 |
| 2.1.4. Bakterilerde Antibiyotik Direnci | 7 |
| 2.1.4.1. Doğal Direnç | 7 |
| 2.1.4.2. Çevre ve Şartlara Bağlı Direnç | 7 |
| 2.1.4.3. Kazanılmış Direnç | 8 |
| 2.1.4.3.1. Biyokimyasal Mekanizmalar | 8 |
| 2.1.4.3.2. Genetik Mekanizmalar | 8 |
| 2.2. Beta Laktam Grubu Antibiyotikler | 8 |
| 2.2.1. Karbapenemler | 9 |
| 2.2.1.1. Karbapenemlerin Sınır Değerleri | 9 |
| 2.2.1.2. İmipenem | 9 |
| 2.2.1.3. Meropenem | 9 |
| 2.2.1.4. Ertapenem | 10 |
| 2.3. Beta Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizması | 10 |
| 2.3.1. Hücreye Giren İlaç Miktarının Azalması | 10 |
| 2.3.2. Beta-laktamaz Enzimleri ile İlacın İnaktivasyonu | 10 |

| | |
|---|----|
| 2.3.3. Efluks Pompası | 10 |
| 2.4. Beta-Laktamazlar | 10 |
| 2.5. Kolistin | 12 |
| 2.5.1. Etki Mekanizması | 13 |
| 2.5.2. Antimikrobiyal Aktivite | 13 |
| 2.5.3. İlacın Atılımı | 14 |
| 2.5.4. Klinik Kullanımı | 14 |
| 2.5.5. Yan Etkileri | 14 |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM | 15 |
| 3.1. Çalışma Grubu | 15 |
| 3.2. Araç ve Gereçler | 17 |
| 3.2.1. Kullanılan Kitler ve Kimyasallar | 18 |
| 3.2.2. Kullanılan Besiyerleri | 19 |
| 3.2.3. Çözeltiler | 19 |
| 3.2.3.1. Stok Kolistin Sülfat Hazırlanması | 19 |
| 3.2.3.2. Resazurin Hazırlanması | 20 |
| 3.2.3.3. Katyon Ayarlı Mueller Hinton Hazırlanması | 20 |
| 3.2.4. Dilüsyon Testi için İnokulumun Hazırlanması | 20 |
| 3.2.4.1. Bakteri Süspansiyonun Hazırlanması | 20 |
| 3.3. Yöntem | 21 |
| 3.3.1. Mikrobiyolojik Özelliklerinin Değerlendirilmesi | 21 |
| 3.3.1.1. İzolatların İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri | 21 |
| 3.3.2. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi | 24 |
| 3.4. İstatistik Analiz | 26 |
| 4. BULGULAR | 27 |
| 4.1. İzolatların Kliniklere Göre Dağılımı | 27 |
| 4.2. İzolatların Materyallere Göre Dağılımı | 27 |
| 4.3. İzolatların Sıvı mikrodilüsyon, MicroScan ve VITEK 2 ile kolistin MİK değerlerinin belirlenmesi | 28 |
| 4.4. Karbapenem Dirençli İzolatların Kolistin MİK Sonuçları Sıvı Mikrodilüsyon ve Ticari Yöntemlerle Karşılaştırılması | 31 |
| 4.5. Karbapenem Dirençli İzolatlarında Test Edilen Kolistinin Sıvı Mikrodilüsyon ile Karşılaştırıldığında MicroScan ve VITEK 2 için Hata Oranları | 33 |
| 5. TARTIŞMA | 36 |
| 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER | 44 |
| KAYNAKLAR | 45 |
| ÖZGEÇMİŞ | 49 |

TABLolar DİZİNİ

| | Sayfa |
|--|--------------|
| Tablo 2.1. Karbapenemaz üreten <i>Enterobacteriaceae</i> için klinik sınır değerleri | 9 |
| Tablo 2.2. Beta-laktamazların sınıflandırılma şeması | 11 |
| Tablo 2.3. Kolistin etki spektrumu | 13 |
| Tablo 3.1. Çalışmaya alınan izolatların özellikleri | 15 |
| Tablo 3.2. Sıvı dilüsyon yöntemi için kullanılan antimikrobiyal sulandırım şeması | 24 |
| Tablo 3.3. Kappa değerlerine göre uyum düzeylerinin yorumlanması | 26 |
| Tablo 4.1. İzolatların kliniklere göre dağılımı | 27 |
| Tablo 4.2. İzolatların materyallere göre dağılımı | 27 |
| Tablo 4.3. Sıvı mikrodilüsyon ve otomatize iki sistemle elde edilen MİK değeri ve duyarlılık sonuçları | 29 |
| Tablo 4.4. İzolatların kolistin MİK değerlerinin MicroScan, VITEK 2 ve sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırılması | 32 |
| Tablo 4.5. İzolatlarının MicroScan ve VITEK 2 duyarlılık ve özgüllük sonuçları | 32 |
| Tablo 4.6. İzolatların sıvı mikrodilüsyon ve MicroScan kolistin MİK sonuçlarının Kappa testi ile analizi | 33 |
| Tablo 4.7. İzolatların sıvı mikrodilüsyon ve Vitek 2 kolistin MİK sonuçlarının Kappa testi ile analizi | 33 |
| Tablo 4.8. MicroScan hata oranları | 34 |
| Tablo 4.9. VITEK 2 hata oranları | 34 |
| Tablo 4.10. MicroScan ve VITEK 2 sistemlerinin sıvı mikrodilüsyon ile kategorik uyumları | 35 |
| Tablo 5.1. Literatürlerde yayınlanan çalışmalarda kolistin duyarlılığını saptamak için farklı test yöntemlerinin karşılaştırmalı analizi | 40 |
| Tablo 5.2. Türkiye’de yayınlanan çalışmalarda kolistin duyarlılığını saptamak için farklı test yöntemlerinin karşılaştırmalı analizi | 42 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | Sayfa |
|---|--------------|
| Şekil 2.1. Beta-laktam antibiyotikler | 8 |
| Şekil 2.2. Polimiksin B ve kolistinin kimyasal yapısı | 12 |
| Şekil 3.1. VITEK 2 (BioMerieux, Fransa) cihazı | 22 |
| Şekil 3.2. VITEK 2 antibiyotik duyarlılık kartı (BioMerieux, Fransa) | 22 |
| Şekil 3.3. MicroScan (Beckman Coulter, CA, USA) cihazı | 23 |
| Şekil 3.4. MicroScan bakteri tanımlama paneli (Beckman Coulter, CA, USA) | 23 |
| Şekil 3.5. MicroScan antibiyotik duyarlılık paneli (Beckman Coulter, CA, USA) | 23 |
| Şekil 4.1. Sıvı mikrodilüsyon kolistin MİK sonuçlarının değerlendirilmesi | 28 |



KISALTMALAR ve SİMGELER

| Kısaltma/Simge | Tanım |
|----------------|--|
| AB | <i>Acinetobacter baumannii</i> |
| AD | Agar dilüsyon |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BMD | Broth Microdilution |
| BH | Büyük Hata |
| CA | Categorical Agreement |
| CLSI | Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü |
| CI | Kolistin |
| ÇBH | Çok Büyük Hata |
| EUCAST | Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi |
| Da | Dekagram |
| DD | Disk Difüzyon |
| DNA | Deoksiribo Nükleik Asit |
| ECDC | The European Centre for Disease Prevention and Control |
| GSBL | Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz |
| g | gram |
| GN | Gram negatif |
| GP | Gram pozitif |
| KAMHB | Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth |
| KH | Küçük Hata |
| KP | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| Log | Logaritma |
| LPS | Lipopolisakkarit |
| MİK | Minimal İnhibitör Konsantrasyon |
| mm | milimetre |
| ml | mililitre |
| mg | miligram |
| NaCl | Sodyum klorür |
| PA | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| PBP | Penisilin Bağlayan Proteinler |
| P-80 BMD | Polisorbat 80 ekli Broth Microdilution |
| PFGE | Pulse-Field Jel Elektroforezi |
| Resistance | Dirençli |
| RADP | Rastgele Amplifiye Polimorfik DNA Analizi |
| Susceptible | Duyarlı |
| TSB | Triptik Soy Broth |
| TM | Tüp Makrodilüsyon |
| µm | Mikron |
| µg | mikrogram |
| µl | mikrolitre |

1. GİRİŞ

Karbapenamaz dirençli nozokomiyal ve toplum kökenli Gram negatif (GN) bakteri enfeksiyonları dünya çapında giderek artmaktadır. Karbapenem dirençli suşların hastanede yatan hastalar arasında artan yayılımı endişe kaynağı haline gelmiştir [1]. Karbapenemler (imipenem, meropenem, ertapenem), çoklu ilaca dirençli nonfermantatif ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) pozitif *Enterobacteriaceae*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde son terapötik seçenek olarak sıklıkla kullanılmaktadır [2]. Karbapenemlere karşı direnç; bakteri hücrelerine giren ilaç miktarında azalma, efluks pompası, enzimlerin hidrolizi, hücre duvarında yer alan porların yapısındaki değişimler gibi mekanizmalarla ortaya çıkmaktadır [3].

Kolistin, karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarının tedavisi için kullanılan antibiyotiktir. Başlangıçta kolistinin yüksek oranda nefrotoksisite ve nörotoksisite etkisi nedeniyle kullanılması çok tercih edilmemiştir. Ancak son yıllarda karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarında artış sebebiyle kolistin kullanımı artmaktadır [4]. Kolistin kullanımının artması, dünya çapında kolistin direncinin ortaya çıkmasına yol açmıştır [5]. Kolistin direnci, mutasyon veya adaptasyon mekanizmaları ile ortaya çıkmaktadır [6].

Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI), *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* için kolistin MİK değeri yayınlamıştır. Kılavuzun önerileri doğrultusunda, duyarlı, orta duyarlı ya da dirençli olarak yorum yapılmasına rağmen test edilen izolatlar doğal tür ya da doğal olmayan tür olarak tanımlanabilmektedir [7]. Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi (EUCAST) *Enterobacteriaceae* türleri, *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter* türlerinde kolistin için Minimal İnhibitor Konsantrasyon (MİK) belirlenmesinde referans yöntem sıvı mikrodilüsyon yöntemini önermektedir. EUCAST'a göre *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* ve *Enterobacteriaceae* türleri için kolistin MİK değerini ≤ 2 mg/L ise duyarlı, MİK > 2 mg/L ise bakterileri dirençli olarak değerlendirilmektedir. 2016 yılında yayımlanan CLSI ve EUCAST'ın ortak önerisi, kolistin MİK testi için ISO-20776 standart sıvı mikrodilüsyon metodunun yapılmasıdır [8].

Disk difüzyon metodu, kolistinin agara zayıf şekilde dağılmasından dolayı yanlış sonuçlar vermekte ve bu nedenle kullanılması önerilmemektedir [9]. Gradyent difüzyon yöntemi, sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırıldığında yanlış duyarlı sonuçlar vermesinden dolayı dikkatli yorumlanmalıdır [10].

Bu çalışmada, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde izole edilen karbapenem dirençli *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* izolatlarında kolistin duyarlılığının sıvı mikrodilüsyon yöntemi ve otomatize sistemler VITEK 2 (BioMerieux, Fransa) ve MicroScan (Beckman Coulter, CA, USA) cihazları kullanılarak

belirlenmesi ve bulunan sonuçların referans yöntem sıvı mikrodilüsyon metoduyla karşılaştırılması amaçlanmıştır.



2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. *Acinetobacterspp.*

2.1.1. Tarihçe ve Taksonomi

Acinetobacter 1900'lü yılların başlarında "Morax-Axenfeld basilleri" olarak isimlendirilmiştir [11]. *Acinetobacter* cinsleri *Moraxellaceae* ailesinde ve Gammaproteobacteria sınıfında yer almaktadırlar [12]. Deoksi Ribonükleik Asit (DNA)-DNA hibridizasyon çalışmaları ile *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter radiorezistens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter ursingii*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter schindleri*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter baumannii* ile birlikte 25 adet genom tür belirlenmiştir [11].

2.1.2. Mikrobiyolojik, Metabolik ve Kültür Özellikleri

Acinetobacter baumannii, laktoz negatif, katalaz pozitif, oksidaz negatif, koyun kanlı agarda kolonileri düzgün, bazen mukoid ve renksiz koloniler oluşturan, morfolojik görünümü basil şeklinde olan, fermentasyon yapmayan Gram negatif (GN) bir bakteridir [13]. *Acinetobacter baumannii* genotipik yöntemler ile tanımlanabilen ticari otomatize sistemlerden Rastgele Amplifiye Polimorfik DNA Analizi (RADP), Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), Pulse-Field Jel Elektroforezi (PFGE) yöntemleri ile tanımlanabilmektedir [14].

2.1.3. Epidemiyoloji

Acinetobacter spp. normalde toprakta ve suda serbest yaşayan bakterilerdir. Normal kişilerin %25'inde deri ve mukoz membranlarında kolonize olabilirler. Kuru yüzeylerde çok uzun süre yaşayabilir, toz ve çöplerle yayılabilir. Klinik izolatların çoğu kolonizasyondur. İmmün yetmezliği olan hastalarda ciddi ve mortalitesi yüksek enfeksiyonların gelişimine neden olur [15].

2.1.4. Patogenez ve Virülans Faktörleri

Acinetobacter cinsi bakteriler fırsatçı bir patojendirler ve genellikle nazokomiyal enfeksiyonlarına neden olurlar. Bu cins bakterilerin virülans yetenekleri düşük olmasına rağmen polisakkarid kapsül, lipid A, biyofilm oluşumu gibi virülans faktörlerine sahiptir.

Polisakkarit kapsül, bakteriyi fagositozdan korurken, lipid A bakteriyi konağa karşı savunmada toksik etki oluşturur, biyofilm oluşumu ise bakteriyi kuruluğa karşı korur. [16].

2.1.5. Klinik

Acinetobacter türleri özellikle ağır hastalığı olanlarda yaşamı tehdit eden, artmış morbidite ve uzamış hastane yatışına yol açabilen dünya çapında yaygın problem oluşturan enfeksiyonlara neden olmaktadır [17]. En sık pnömoni, bakteriyemi, endokardit, menenjit, üriner sistem ve deri enfeksiyonlarına neden olmaktadır [18].

2.1.6. *Acinetobacter* Enfeksiyonlarında Tedavi

A. baumannii türlerinde çoklu ilaca karşı artan direnç, tedavide kullanılan antibiyotik seçeneklerini sınırlandırmaktadır [19]. Tigesiklin, kolistin, sulbaktam ve amikasin, kolistin ve karbapenem kombinasyonu *Acinetobacter* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılacak antibiyotiklerdir [3].

2.1.2. *Enterobacteriaceae* Ailesi ve *Klebsiella* Cinsi Bakteriler

Enterobacteriaceae ailesindeki bakteriler doğada sıklıkla bulunmaktadır. Morfolojik olarak Gram negatif basil şeklinde görülen, 0,5-3 µm boyutlarında, oksidaz negatif, katalaz pozitif, sporsuz bakterilerdir. *Enterobacteriaceae* familyasındaki bakteriler, fakültatif anaeropturlar. En iyi üreme sıcaklığı 35-37°C ve karbondioksitsiz ortamda ürerler [20].

Enterobacteriaceae toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonların sıklıkla kaynağıdır. Üriner sistem enfeksiyonları, septisemi, peritonit, pnömoni, menenjit ve cihazla ilişkili enfeksiyonlar gibi enfeksiyonlara neden olurlar. Plazmidler ve transpozonlar aracılığıyla gen transferi yaparak genetik materyal elde etme eğilimindedirler [21]. *Enterobacteriaceae* üyesi mikroorganizmalar arasında antimikrobiyal direncin giderek artması dünya çapında önemli bir sorun haline gelmiştir. Özellikle tıbbi bakım ilişkili enfeksiyonlarda dirençli *Klebsiella spp.*, *Esherichia coli* ve *Enterobacter* türlerinin artış göstermesi, morbidite ve mortalite artışına sebep olmaktadır [22].

Tez çalışmasında değerlendirilen bakterilerin bir kısmı *Klebsiella* cinsinin *Klebsiella pneumoniae* türüne ait oldukları için burada sadece bu cins ve türün özelliklerinden bahsedilecektir.

2.1.2.1. Tarihçe ve Taksonomi

Klebsiella pneumoniae ciddi seyirli ve yaşamı tehdit eden pnömoni hastalığına sebep olması nedeniyle "Friedlander basili" olarak isimlendirilmiştir. *Klebsiella* cinsi; *K. ornithinolytica*, *K. rhinoscleromatis*, *K. pneumoniae*, *K. planticola*, *K. terrigena*, *K. ozaenae* olmak üzere yedi türü bulunmaktadır [23].

2.1.2.2. Mikrobiyolojik, Metabolik ve Kültür Özellikleri

Klebsiella cinsi hareketsiz türleri içerir. *Klebsiella* cinsi bakteriler, Gram boyama ile katı besiyerlerinde büyük, mukoid yapıda geniş koloniler yapması polisakkarit kapsül yapısına bağlıdır. *Klebsiella* cinsi bakterilerde, laktoz pozitif, H₂S ve indol negatif, sitratı kullanma, Voges Proskauer testleri pozitifdir [23]. *Klebsiella* türleri aerob veya fakültatif anaerob bakterilerdir. Optimal 37°C'de ve pH 7'de ürerler. Ancak *K. pneumoniae* dışındaki türler 4-44°C arasında da üreyebilmektedirler. Genel kullanım besiyerlerinde rahatlıkla ürerler. Yapılarında bulunan kapsül nedeniyle kuruluğa oldukça dirençlidir [24].

2.1.2.3. Epidemiyoloji

Klebsiella'lar hastane enfeksiyonlarının %8'inden sorumlu tutulmaktadır. Yapılan bir araştırmada, hastanede yatan kişilerdeki enfeksiyonların %9'undan ve bütün primer bakteriyemilerin %14'ünden *Klebsiella* türleri izole edilmiştir [23].

2.1.2.4. Antijen Yapıları

K antijeni serotiplendirmeyi sağlar. Yetmişden fazla K antijeni tipi tanımlanmıştır, bu antijen tiplerinden bazıları pnömokok ve *Haemophilus influenza* kapsülleri ile çapraz reaksiyon vermektedir. *Klebsiella*'nın K antijenleri, O antiserumlarıyla aglütinasyonu önler. *Klebsiella*'nın beş farklı O antijen tipi vardır. O antijen tipleri serotiplendirmede kullanılmaz [23].

2.1.2.5. Virülans Faktörleri

Klebsiella cinsi bakterilerin polisakkarit kapsülü, bakteriyi fagositozdan korurken, biyofilm oluşumu ise bakteriyi çevresel koşullardaki değişikliklerden (nem, ph değişimi) korur [23].

2.1.2.6. Klinik

K. pneumoniae fırsatçı nazokomiyal patojendir ve pnömoni, bakteriyemi, üriner sistem enfeksiyonları ve yara enfeksiyonları gibi pek çok hastalığa neden olur. Yeni doğan ünitelerinde plazmidle yönetilen çok ilaca dirençli *Klebsiella* suşlarına bağlı hastane enfeksiyonları görülür [23].

2.1.2.7. Klebsiella Enfeksiyonlarında Tedavi

Klebsiella cinsi bakterilerde plazmid aracılı direncin yayılımı ile çok ilaca dirençli bakterilerin tedavisinde kullanılan antibiyotikleri sınırlı hale gelmektedir. Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* tedavisinde kolistin kullanımı halen devam etmektedir. Kolistinin kullanımının artmasıyla birlikte kolistin direnci de artmaktadır [25].

2.1.3. Pseudomonas Aeruginosa

2.1.3.1. Tarihçe ve Taksonomi

Pseudomonas aeruginosa, Gessard tarafından tanımlanmış olup *Pseudomonadaceae* ailesinin, *Pseudomonas* cinsine ait bir türü olarak kabul edilmiştir [26-27].

2.1.3.2. Mikrobiyolojik, Metabolik ve Kültür Özellikleri

P. aeruginosa 0,5-0,8 µm eninde, 1,5-3 µm boyunda olup, laktoz negatif, katalaz negatif, oksidaz pozitif, non-fermentatif Gram negatif basil görünümünde, hareketli bakterilerdir. *P. aeruginosa* zorunlu aéroptur. En iyi 37°C'de ürerler diğer bazı türler 42°C'de ürerler, fakat 4°C'de üremezler. İki adet pigmenti bulunur; piyoverdin (yeşil-sarı) ve piyosiyenin (mavi) pigmentleridir [28].

2.1.3.3. Epidemiyoloji

P. aeruginosa canlı ve cansız çevreden izole edilir. Nozokomiyal fırsatçı bir patojendir ve insanlarda nemli bölgelere yerleşir. Sağlıklı kişilerde nadiren hastalık yapmasına rağmen antibiyotik alan hastalarda %50 oranında taşıyıcı olabilmektedir [28].

2.1.3.4. Antijen Yapıları

P. aeruginosa'nın O antijenleri aşı geliştirme çalışmaları için kullanılmaktadır [28].

2.1.3.5. Patogenez ve Virülans Faktörleri

Bakteride bulunan protein yapısındaki piluslar epitel hücrelerine tutunmayı sağlarken, pilus dışı adezin yapıları ise musin tabakaya ve epitel hücrelerine tutunur. *P. aeruginosa*'da bulunan slaym yapısı, bakterinin etrafında bir matriks olarak şekillenir, bakteriyi konak savunmasından korur. *Pseudomonas* endotoksini lipit A olup, organizmanın biyolojik etkisini düzenler. Ekzotoksin lipit A hücre dışı bir enzim olup, lokal doku hasarında ve bakteriyal invazyonda rolü vardır. Hücre dışı enzim olan Ekzoenzim S, doku kültüründeki hücrelere sitopatik etki gösterir [28].

2.1.3.6. Klinik

Fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa*'nın, yol açtığı enfeksiyonlar, üriner sistem enfeksiyonları, merkezi sinir sistem enfeksiyonları, bakteriyemi ve gastrointestinal enfeksiyonlar gibi pek çok hastalığa sebep olurlar [28].

2.1.3.7. *Pseudomonas* Enfeksiyonlarında Tedavi

P. aeruginosa enfeksiyonlarında karbapenemler, penisilin ve aminoglikozit kombinasyonu, kinolonlar tedavide tercih edilen antibiyotik seçenekleri arasındadır [28].

2.1.4. Bakterilerde Antibiyotik Direnci

Enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı bakterilerde gelişen direnç yayılımı artmakta ve günümüzde kullanılan tedavi seçeneklerini sınırlandırmaktadır [29].

2.1.4.1. Doğal Direnç

Bakterinin genetik özelliğinde var olan, kendiliğinden oluşturduğu dirençtir [29].

2.1.4.2. Çevre ve Şartlara Bağlı Direnç

Laboratuvar ortamında etkili olan bir antibiyotik, çevre şartları değiştiğinde antibiyotiğin hedef bölgeye ulaşamaması durumunda, canlı dokular üzerinde aynı etkiyi gösteremeyebilir [29].

2.1.4.3. Kazanılmış Direnç

Bakterinin biyokimyasal veya genetik mekanizmalar ile sonradan kazandığı dirençtir [29].

2.1.4.3.1. Biyokimyasal Mekanizmalar

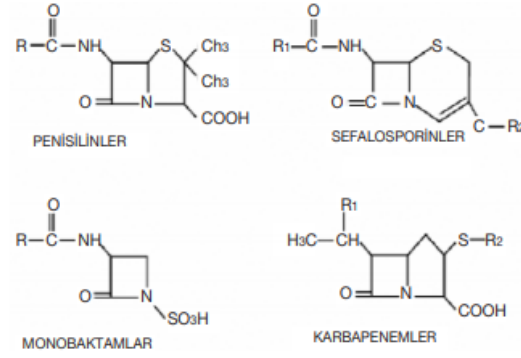
Efluks pompası gibi ilacın dışa atılması, ilacın hedef bölgesindeki değişiklik, bakterinin sentezlediği enzimlerle ilacın inaktive edilmesi, permeabilitenin azalması gibi biyokimyasal mekanizmaları kullanan bakteriler antibiyotiklere direnç geliştirmektedir [29].

2.1.4.3.2. Genetik Mekanizmalar

DNA'daki mutasyonlar ya da yeni bir DNA dizini edinilmesi antibiyotik direncine neden olur. Genetik mekanizmalarla direnç kazanılması; kromozomal genlerde mutasyon oluşması, direnç genlerinin dışarıdan alınması, dışarıdan alınan genlerde mutasyon oluşması gibi mekanizmalarla olmaktadır [29].

2.2. Beta Laktam Grubu Antibiyotikler

Sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar, penisilinler ve beta-laktamaz inhibitörleri'nin (klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam) bulunduğu gruptur. Bu gruptaki antibiyotiklerde beta-laktam halkası bulunmaktadır. Bu gruptaki antibiyotikler, bakterilerde peptidoglikan sentezinden sorumlu penisilin bağlayan proteinler'in (PBP) hedef bölgelerine bağlanarak bakterilerde hücre duvar yapısını bozmakta bozmaktadır [30].



Şekil 2.1. Beta-laktam antibiyotikler.

2.2.1. Karbapenemler

Karbapenemler çok geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteye sahiptir. Gram negatif, Gram pozitif, aerop ve anaerop bakterilere karşı etkili olup PBP'lere bağlanarak bakterinin ölümüne neden olur [31].

2.2.1.1. Karbapenemlerin Sınır Değerleri

Tez çalışmasında, çalışmaya dahil edilen bakteriler 2019 yılı EUCAST metodolojisi MİK değerleri ve zon çaplarına göre değerlendirilmiştir.

Tablo 2.1. Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* için klinik sınır değerleri (2019 yılı EUCAST dökümanı)(S: Duyarlı, R: Dirençli)[32].

| Karbapenem | MİK (mg/L) değerleri | | Disk difüzyon zon çapı (mm) (10 µg disk) | |
|------------------|----------------------|-----|---|-----|
| | S ≤ | R > | S ≥ | R < |
| Meropenem | 2 | 8 | 22 | 16 |
| İmipenem | 2 | 4 | 22 | 17 |
| Ertapenem | 0.5 | 0.5 | 25 | 25 |

2.2.1.2. İmipenem

İmipenem; Gram negatif, Gram pozitif, anaerop ve aerop bakterilere etkilidir [33]. İmipenem'in molekül ağırlığı düşük olduğundan bakteri membranından kolaylıkla geçer ve beta-laktam halkasında bulunan trans konfigürasyonu Gram negatif bakterilerde beta-laktamaz

üreten enzimlere karşı direnç gösterir [34]. Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde PBP'lere bağlanarak, bakterinin hücre duvar sentezini inhibe eder [35].

2.2.1.3. Meropenem

Meropenem, PBP2'ye bağlanarak bakterinin hücre duvar sentezini inhibe eder ve özellikle Gram negatif bakterilerde *P. aeruginosa* 'ya karşı oldukça etkilidir [36].

2.2.1.4. Ertapenem

Ertapenem, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin tedavisinde etkilidir. Ertapenemin dış membranında meta grubunun bulunması, plazma proteinlerine bağlanma kapasitesini artırmaktadır. Plazma proteinlerine bağlanma oranı ertapenemde % 95 iken imipenemde bu oran %20' dir [37-38].

2.3. Beta Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

2.3.1. Hücreye Giren ilaç Miktarının Azalması

Beta-laktam antibiyotikler Gram negatif bakterilerde, dış membranda yer alan porin F ve porin C adı verilen porlardan hücreye girebilmektedir. Gram negatif bakteriler, porin F ve porin C proteinlerini mutasyona uğratarak beta-laktam antibiyotiklerine direnç gösterirken, imipenem Gram negatif bakterilerde D2 proteini adı verilen porlardan geçerek, Gram negatif bakterilere etki gösterir [39].

2.3.2. Beta-laktamaz Enzimleri ile İlacın İnaktivasyonu

Bakteriler yapılarında bulunan beta-laktamaz enzimlerini sentezlenmesiyle, beta-laktam halkasındaki siklik amid bağlarını parçalar ve beta laktam antibiyotiklerine karşı direnç geliştirirler [40]. *Enterobacteriaceae* familyasındaki Gram negatif bakteriler, Gram pozitif bakterilerden stafilokoklar, anaerob bakterilerden *Fusobacterium* ve *Clostridium* beta-laktamaz sentezleyen bakterilerdir [41-42].

2.3.3.Efluks Pompası

Transport proteinlerinden oluşan efluks pompası da diğer bir direnç mekanizmasıdır. Pompalar oldukça seçici olabilir veya geniş bir substrat özgüllüğü gösterebilir. Bu pompaların çoğunluğu sitoplazmik zarında bulunmaktadır [43].

2.4. Beta-Laktamazlar

Bakteriler yapılarında bulunan beta-laktamaz enzimlerini sentezlenmesiyle, beta-laktam halkasındaki siklik amid bağlarını parçalar ve beta laktam antibiyotiklerine karşı direnç geliştirirler. Beta-laktamazlar, molekül özellikleri ve fonksiyonlarına göre sınıf A, sınıf B, sınıf C ve sınıf D olmak üzere 4 sınıf altında toplanmıştır. Sınıf A beta laktamazlar, serin-ester aracılıklı fonksiyon gösteren, penisilinleri hidrolize eden beta-laktamazlardır. Sınıf B beta-laktamazlar, çinko iyonu kullanan metalloenzimlerdir. Sınıf C beta-laktamazlar, diğer adıyla AmpC enzimler serin-ester aracılıklı fonksiyon gösteren sefalosporinazlardan oluşan enzimlerdir. Sınıf D beta-laktamazlar, serin-ester aracılıklı fonksiyon gösteren ve oksasilini hidrolize eden beta laktamazlardır [29].

Tablo 2.2.Beta-laktamazların sınıflandırılma şeması [29].

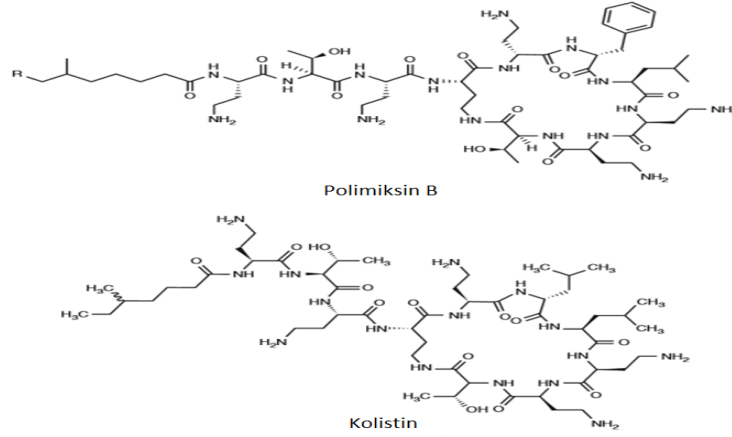
| Grup | Moleküler sınıf | Tercih ettiği substrat | Klavulanat ile inhibisyon | Enzimler |
|------|-----------------|---|---------------------------|---|
| 1 | C | Sefalosporinler | - | CMY-2-13, LAT-1, MOX-1-2, ACC-1, FOX-1-6, MIR-1, CFE-1, BIL-1 |
| 2a | A | Penisilinler | + | Stafilokok penisilinazı |
| 2b | A | Sefalosporin, Penisilin | + | TEM-1, TEM-2, SHV-1 |
| 2be | A | Penisilinler, Geniş spektrumlu Sefalosporinler, Monobaktamlar | + | TEM-3, TEM-26, SHV-2-6, PER, CTX-M, VEB, GES, IBC-1e (GSBL) |

| | | | | |
|-----|---|--|-----|--|
| 2br | A | Penisilinler | +/- | İnhibitör dirençli TEM enzimleri TEM-30, TEM-36, TCR-1 |
| 2c | A | Penisilinler, Karbanisilin | + | Karbanisilini hidrolize eden enzimler, PSE-1-3-4, BRO-1, AER-1, SAR-1 |
| 2d | D | Penisilinler, Kloksasilin | +/- | Oksasilin ve Karbapenem hidrolize eden enzimler OXA-48, OXA-51 |
| 2e | A | Sefalosporinler | + | <i>P. vulgaris</i> 'in indüklenebilir sefalosporinazları, CepA, FEC-1, L2 |
| 2f | A | Sefalosporinler, Penisilinler, Karbapenemler | + | NMC, SME, IMI, KPC, GES |
| 3 | B | Karbapenemler, Birçok beta-laktam | - | Çinko bağımlı karbapenemazlar; IMP, VIM, GIM. 3a, 3b, 3c alt gruplarına ayrılır. |
| 4 | - | Penisilinler | - | Dizileri bilinmeyen çeşitli enzimler |

2.5. Kolistin

Kolistin polimiksin ailesinin bir üyesi olup, polipeptid yapıda ilaçlardır. Kolistin, *Bacillus polymyxa subspecies colistinus*'tan üretilen, 10 aminoasitten oluşan hidrofilik polikasyonik peptit zinciri ve bir hidrofobik yağ asit kuyruğundan oluşan, 1200 Da ağırlığında bir moleküldür.

Kolistin ve Polimiksin B benzer kimyasal yapıya sahiptir. Şekil 2.2’de kolistin ve Polimiksin B’nin kimyasal yapısı gösterilmiştir [44-45].



Şekil 2.2. Polimiksin B ve kolistinin kimyasal yapısı [45].

Kolistimetat sodyum inaktif bir ön ilaç olup, aktif kolistine dönmesi için in vivo ortamda hidrolize olması gerekmektedir [45].

2.5.1. Etki Mekanizması

Kolistinin antimikrobiyal etkisinin hedefi hücre membranıdır. Bakteri membranı ile başlangıçtaki etkileşim; anyonik bakteri membran lipopolisakkaridleri (LPS) ile katyonik polipeptid kolistin arasında olur. Kolistin, normalde negatif yüklü membran LPS’leri stabilize eden kalsiyum (Ca^{+2}) ve magnezyumu (Mg^{+2}) uzaklaştırır ve dış membran yapısını bozar. Bu sürecin sonucu ise, hücre zarının geçirgenliğinin artması, hücre komponentlerinin dışarı sızması, nihayet hücrenin ölümü olmaktadır. Doza bağımlı olarak bakterisidal etkileri ve post antibiyotik etkileri vardır. Direkt antibakteriyel etkinliğinin yanısıra, kolistin aynı zamanda potent bir anti-endotoksin aktivitesine sahiptir. Gram negatif bakterilerin endotoksini, LPS moleküllerinin Lipid A kısmıdır. Kolistin LPS’lere bağlanarak nötralize eder. Ancak bu etkinin septik şok oluşumunu önlemede in-vivo yansıması net değildir. Çünkü LPS’ler hızlıca LPS-bağlayıcı proteinlere bağlanır, oluşan bu kompleks hızlıca CD14 yüzey reseptörüne bağlanır ve etkisi sonlanır [46].

2.5.2. Antimikrobiyal Aktivite

Kolistin dar bir antibakteriyel spektruma sahiptir. *Enterobacteriaceae* ailesinin büyük bir kısmına, *Acinetobacter spp.* ve *P. aeruginosa*’ya karşı etkilidir. Mantar ve parazitlere, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere, bazı anaerobik bakterilere karşı etkisizdir [44].

Tablo 2.3.Kolistin etki spektrumu [44].

| | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Pseudomonas</i> | Gram-negatif basiller | Anaerobik Bakteriler |
|----------------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Duyarlı Bakteriler | <i>E.coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>Acinetobacter</i> | <i>B. melaninogenicus</i> |
| | <i>Citrobacter</i> | <i>P. fluorescens</i> | <i>S. maltophilia</i> | <i>B. oralis</i> |
| | <i>Klebsiella</i> | <i>P. putida</i> | <i>Moraxella</i> | |
| | <i>Enterobacter</i> | <i>P. maltophilia</i> | <i>H. influenza</i> | |
| | <i>Salmonella</i> | | <i>Bordetella</i> | |
| | <i>Shigella</i> | | <i>Posteurella</i> | |
| | | | <i>L. pneumophila</i> | |
| Dirençli Bakteriler | <i>Proteus</i> | <i>P. pseudomallei</i> | <i>V. cholerae</i> | <i>B. fragilis</i> |
| | <i>Campylobacter</i> | <i>P. cepacia</i> | <i>V. eltor</i> | |
| | <i>Providencia</i> | <i>P. picketti</i> | | |
| | <i>Morganella</i> | | | |
| | <i>Serratia</i> | | | |
| | <i>Brucella</i> | | | |

2.5.3. İlacın Atılımı

İlacın atılımı, filtrasyon ile böbreklerden atılır [47].

2.5.4. Klinik Kullanımı

Kolistin birçok enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır [48]. Kolistinin karbapenemlerle birlikte kullanıldığında bakterinin hücre membranına hasar vermekte, aynı zamanda yapılan çalışmalarda karbapenem ve kolistim kullanımının sinerji etki oluşturduğu gözlenmiştir [49-50].

2.5.5. Yan Etkileri

Hipersensivite reaksiyonu çok nadir görülür. Hastalarda en sık görülen yan etki, nefrotoksisitedir. %14-19'dan %48-49 oranlarına kadar görülebilmektedir. Doz bağımlıdır ve genelde antibiyotiği kestikten sonra geri dönüşümlüdür. Ortalama 5-7. günler arasında

gelişmektedir. Risk faktörleri olarak; yüksek doz kolistin kullanımı, uzun tedavi süresi, septik şok, hipoalbuminemi, hiperbilirubinemi, obesite, nefrotoksik başka ajanların kullanımı (aminoglikozid, vankomisin) saptanmıştır [51].

Kolistin kullanımına bağlı diğer bir yan etki ise nörotoksisite gelişimidir, %7 civarında görülmektedir. Nefrotoksisite gibi doz bağımlıdır ve geri dönüşümlüdür. Parestezi, nöbet, görme bozuklukları, ataksi, vertigo, deliryum, nöromüsküler bozukluklar, apne gibi semptomlar gelişebilmektedir [52].



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Çalışmaya, 2018 yılında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'ndeki servis ve polikliniklerden Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerden izole edilen ve antibiyotik duyarlık testi sonucu karbapenem grubu antibiyotiklere dirençli (imipenem, ertapenem, meropenem antibiyotiklerinden en az birine dirençli) saptanan toplam 25 adet *Acinetobacter baumannii*, 25 adet *Klebsiella pneumoniae* ve 25 adet *Pseudomonas aeruginosa* izolatu dahil edilmiştir. Çalışma izolatlarının izole edildiği materyal ve hastanın yattığı servis Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmaya alınan izolatların özellikleri. (AB: *Acinetobacter baumannii*, KP: *Klebsiella pneumoniae*, PA: *Pseudomonas aeruginosa*,).

| İzolat Numarası | Örnek | Klinik |
|-----------------|-----------------|-------------------------------|
| AB1 | Akıntı | KBB Servisi |
| AB2 | Kateter idrarı | Nefroloji Servisi |
| AB3 | Yara | Genel Yoğun Bakım Polikliniği |
| AB4 | Yara | Hematoloji Servisi |
| AB5 | Kateter idrarı | Göğüs Hastalıkları Servisi |
| AB6 | Trakeal aspirat | Onkoloji Servisi |
| AB7 | Yara | Genel Yoğun Bakım Polikliniği |
| AB8 | Trakeal aspirat | Genel Yoğun Bakım Polikliniği |
| AB9 | Trakeal aspirat | Göğüs Cerrahisi |
| AB10 | Trakeal aspirat | Nöroloji Servisi |
| AB11 | Kateter idrarı | Genel Cerrahi |
| AB12 | Trakeal aspirat | Onkoloji Servisi |
| AB13 | İdrar | Onkoloji Servisi |
| AB14 | Yara | Genel Cerrahi |
| AB15 | İdrar | Acil Polikliniği |
| AB16 | Trakeal aspirat | Enfeksiyon Servisi |
| AB17 | İdrar | Genel Cerrahi |
| AB18 | Balgam | Endokrinoloji Servisi |
| AB19 | Trakeal aspirat | Beyin Cerrahi Servisi |
| AB20 | Kateter idrarı | Reanimasyon |

| | | |
|------|-----------------|-------------------------------|
| AB21 | Trakeal aspirat | Genel Yoğun Bakım Polikliniği |
| AB22 | Sürüntü | Yenidoğan Polikliniği |
| AB23 | Kateter | Nefroloji Servisi |
| AB24 | Trakeal aspirat | Genel Yoğun Bakım Polikliniği |
| AB25 | İdrar | Nefroloji Servisi |
| KP1 | İdrar | Üroloji Servisi |
| KP2 | İdrar | Genel Yoğun Bakım Polikliniği |
| KP3 | Kateter idrarı | Genel Yoğun Bakım Polikliniği |
| KP4 | İdrar | Çocuk Hematolojisi |
| KP5 | İdrar | Acil Polikliniği |
| KP6 | İdrar | Çocuk Nefrolojisi |
| KP7 | İdrar | Nefroloji Servisi |
| KP8 | İdrar | Üroloji Servisi |
| KP9 | Periferik kan | Koroner Yoğun Bakım Ünitesi |
| KP10 | İdrar | Acil Polikliniği |
| KP11 | İdrar | Kardiyoloji Servisi |
| KP12 | Periferik kan | Hematoloji Servisi |
| KP13 | İdrar | Nöroloji Servisi |
| KP14 | Trakeal aspirat | Gastroenteroloji Servisi |
| KP15 | Trakeal aspirat | Enfeksiyon Servisi |
| KP16 | Periferik kan | Onkoloji Servisi |
| KP17 | İdrar | Beyin Cerrahi Servisi |
| KP18 | Kateter idrarı | Nöroloji Servisi |
| KP19 | İdrar | Yenidoğan Polikliniği |
| KP20 | İdrar | Nefroloji Servisi |
| KP21 | Periferik kan | Nöroloji Servisi |
| KP22 | İdrar | Nefroloji Servisi |
| KP23 | İdrar | Gastroenteroloji Servisi |
| KP24 | İdrar | Hematoloji Servisi |
| KP25 | Trakeal aspirat | Yenidoğan Polikliniği |
| PA1 | Akıntı | KBB Servisi |
| PA2 | Yara | Onkoloji Servisi |
| PA3 | İdrar | Genel Yoğun Bakım Polikliniği |
| PA4 | Doku | Enfeksiyon Servisi |
| PA5 | Yara | Hematoloji Servisi |

| | | |
|------|-----------------|-------------------------------|
| PA6 | İdrar | Üroloji Servisi |
| PA7 | Yara | Enfeksiyon Servisi |
| PA8 | İdrar | Üroloji Servisi |
| PA9 | Yara | Onkoloji Servisi |
| PA10 | Doku | Ortopedi Servisi |
| PA11 | Akıntı | Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları |
| PA12 | Yara | Enfeksiyon Servisi |
| PA13 | Abse | KBB Servisi |
| PA14 | İdrar | Enfeksiyon Servisi |
| PA15 | Balgam | Göğüs Hastalıkları Servisi |
| PA16 | Balgam | Hematoloji Servisi |
| PA17 | Safra | Genel Cerrahi |
| PA18 | Trakeal aspirat | Genel Yoğun Bakım Polikliniği |
| PA19 | Doku | Ortopedi Servisi |
| PA20 | Doku | Ortopedi Servisi |
| PA21 | Trakeal aspirat | Genel Yoğun Bakım Polikliniği |
| PA22 | Sürüntü | Yenidoğan Polikliniği |
| PA23 | Yara | Genel Cerrahi |
| PA24 | İdrar | Üroloji Servisi |
| PA25 | Trakeal aspirat | Beyin Cerrahi Servisi |

3.2. Araç ve Gereçler

Kullanılan sarf malzemeleri şunlardır:

- Suş saklama kabı (96'lık),
- Ependorf tüp,
- Eküvyon çubuğu,
- Steril öze ucu,
- 10 µL'lik, 100 µL'lik ve 1000 µL'lik otomatik pipet uçları (Grainer Bio-One, Almanya),
- Mikropleyt (96 çukurlu, U tabanlı),

Kullanılan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na ait cihazlar ise şunlardır:

- Etüv (Nüve EN 500, Türkiye)
- Biyogüvenlik kabini (Thermo Scientific)
- Hassas terazi (Sartorius BL310, Almanya)

- Distile su cihazı (Millipore, Fransa)
- Vorteks (Nüve NM-110, Türkiye)
- +4°C'lik soğutucu (Uğur, Türkiye)
- Otoklav (Hirayama- HA-300 M4, Japonya)
- Işık mikroskobu (Olympus, Japonya)
- pH metre (Hanna, İtalya)
- Mikropipet seti
- MicroScan cihazı (Beckman Coulter, CA, USA)
- VITEK 2 cihazı (BioMerieux, Fransa)
- Mc Farland cihazı (BIOSAN, DEN-18)

3.2.1. Kullanılan Kitler ve Kimyasallar

- 10 µg Amikasin içeren disk (Biorad, İngiltere),
- 10 µg Ampisilin içeren disk (Biorad, İngiltere),
- 10 µg Amoksisilin klavulonik asit içeren disk (Biorad, İngiltere),
- 10 µg Ertapenem içeren disk (Biorad, İngiltere),
- 10 µg Gentamisin içeren disk (Biorad, İngiltere),
- 10 µg İmipenem içeren disk (Biorad, İngiltere),
- 10 µg Levofloksasin içeren disk (Biorad, İngiltere),
- 10 µg Meropenem içeren disk (Biorad, İngiltere),
- 10 µg Sefepim içeren disk (Biorad, İngiltere),
- 10 µg Sefoksitin içeren disk (Biorad, İngiltere),
- 10 µg Seftriakson içeren disk (Biorad, İngiltere),
- 10 µg Seftazidim içeren disk (Biorad, İngiltere),
- 10 µg Seftazidim klavulanik asit içeren disk (Biorad, İngiltere),
- 10 µg Siprofloksasin içeren disk (Biorad, İngiltere),
- 10 µg Trimetoprim sülfometaksazon içeren disk (Biorad, İngiltere),
- MicroScan Gram negatif bakteri tanımlama paneli (Beckman Coulter, CA, USA),
- MicroScan Gram negatif/Nonfermentatif antibiyotik duyarlılık kartı (Beckman Coulter, CA, USA),
- VITEK 2 Gram negatif/Nonfermentatif antibiyotik duyarlılık kart (BioMerieux, Fransa),
- Kolistin Sülfat ($\geq 15,000$ U/mg Sigma Aldirch, lot no: SLBV1747),
- Resazurin Sodium Salt (Sigma Aldirch, lot no:MKCG9800,),
- Standart Suş: *Escherichia coli* ATCC 25922

- Standart Suş: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

3.2.2. Kullanılan Besiyerleri

- Blood agar base (Conda, İspanya)
- Eosin Methylene Blue Agar (Conda, İspanya)
- Mueller Hinton Agar (Himedia, Hindistan)
- Mueller Hinton II Broth Katyon Ayarlı (Becton Dickinson lot no:8190586, ABD)

Besiyerleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda tartılarak distile suda eritildikten sonra pH'si 7.4 ayarlandı. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra katı besiyeri disposibl petri kutularına döküldü. Sıvı besiyeri cam balonda sterilize edilerek hazırlandı. İzolatların saklanması için %16 gliserol içeren triptik soy broth (TSB) besiyeri kullanıldı. 1 g TSB (glikoz içermeyen), 10 mL gliserol ve 40 mL distile su manyetik karıştırıcıda karıştırılıp eritildi, pH 7.2' ye ayarlandı. 115°C' de 10 dk otoklavlandı. 55°C'ye kadar soğutulduktan sonra 1.5 mL'lik mikrosantifüj tüplerine 1'er mL hacimlerde dağıtıldı.

3.2.3. Çözeltiler

3.2.3.1. Stok Kolistin Sülfat Hazırlanması

Kolistin sülfat tozunun potensi ≥ 15000 IU/mg olarak belirtilmiştir (Colistin sulfate salt, Sigma C4461). Bu potensi $\mu\text{g}/\text{mg}$ şekline dönüştürmek için, parantez içindeki linkten (<https://mypharmatools.com/othertools/iu>) bu işlem yapılırca bu potensin 731,71 $\mu\text{g}/\text{mg}$ olduğu görülüyor. Daha sonra istenilen konsantrasyonda stok ilaç hazırlamak için aşağıdaki formül kullanıldı:

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

10 miligram Kolistin sülfat maddesi tartıldı ve kaç mililitre suda çözüneceği hesaplandı.

$$\text{Hacim (mL)} = \frac{10 \text{ mg} \times 731,71 \mu\text{g}/\text{mg}}{1280 \mu\text{g}/\text{mL}}$$

Hacim = 5,71 mL steril distile su gerekir.

10 mg ilaç tartılıp 5,71 mL'de çözdürüldü ve 0,5 mL'lik endorf tüplerine 300 µl bölünerek -80°C'de saklanır. Yapılan her çalışma için bir endorf tüp çıkartılarak, oda ısısına gelince 1/10 steril distile su ile dilüe edildi (250 µl stok ilaç + 2250 µl besiyeri). Böylece stok ilaç solusyonun başlangıç konsantrasyonu 128 µg/mL olur.

3.2.3.2. Resazurin Hazırlanması

0,001 gr resazurin tartılıp 10 mL steril distile suda çözüldü ve filtreden geçirildi. Hazırlanan bu resazurin 4°C'de bekletildi.

3.2.3.3. Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth Hazırlanması

Üretici firma önerileri doğrultusunda distile suda eritildikten sonra pH'si 7.4 ayarlanarak otoklavda 121°C'de 10 dakika steril edilerek hazırlandı. Besiyeri 4°C'de kullanılana kadar bekletildi.

3.2.4. Dilüsyon Testi için İnokulumün Hazırlanması

İnokulum hazırlanmasında doğrudan koloni süspansiyon yöntemi kullanıldı. Bu yöntemle, bakteriler kanlı agara tek koloni düşürme yöntemi ile ekildi. 18-24 saat inkübe edilen plaktan tek düşmüş koloniler seçildi. Serum fizyolojik ile McFarland 0.5 bulanıklığı standardına ayarlandı.

3.2.4.1. Bakteri Süspansiyonu Hazırlama

Hazırlanan bu süspansiyon 15 dk içinde plaktaki kuyulara dağıtıldı. 1 mL 0,5 McFarland yoğunluğunda (1×10^8 CFU/mL) bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyon 1/20 dilüe edildi ve böylece 5×10^6 CFU/mL bakteri süspansiyonu elde edildi (125 µl 0,5 McFarland bakteri süspansiyonu + 2,375 mL steril distile su). Bu süspansiyondan ilgili kuyulara 10 µl ilave edildi. Böylece son bakteri yoğunluğu her kuyucukta 5×10^5 CFU/mL olur.

3.3. Yöntem

3.3.1. Mikrobiyolojik Özelliklerinin Değerlendirmesi

3.3.1.1. İzolatların İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Kliniklerden gönderilen örnekler Kanlı agar ve Eosin Methylene Blue (EMB) agar besiyerlerine, kateter ve doku örnekleri tiyoglikolatlı buyyona, kan kültürleri kan kültür şişelerine alınmış (VERSA TREK, Thermo Scientific, Remel Inc) ve otomatik kan kültür cihazında (VERSA TREK, Thermo Scientific, Remel Inc) takip edilmiştir. Kan kültürleri cihazda 5 gün inkübasyona bırakılmış, diğer kültürler 18-24 saatlik inkübasyon sonucu değerlendirilmiştir.

Kültürde üreyen mikroorganizmaların koloni morfolojisi değerlendirilerek Gram boyama yapıldıktan sonra katalaz, oksidaz testleri ve klasik biyokimyasal testler (glukoz, laktoz kullanımı, sitrat kullanımı, indol testi) yapıldı. Koloni morfolojisi düzgün, bazen mukoid, renksiz hemoliz yapmayan, laktoz negatif, katalaz pozitif, oksidaz negatif bakterinin *Acinetobacter*, laktoz pozitif, indol negatif, sitrat pozitif mukoid koloniler *Klebsiella*, laktoz negatif, katalaz negatif, oksidaz pozitif, non-fermentatif Gram negatif basiller *Pseudomonas* olarak değerlendirilmiştir. Bu izolatların tür tanımlaması MicroScan Gram negatif bakteri tanımlama paneli (Beckman Coulter, CA, USA) ile firmanın önerdiği şekilde çalışılarak bakteri identifikasyon cihazında (MicroScan , Beckman Coulter, CA, USA) yapılmıştır.

İzolatların antibiyotik duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon testi ile yapılmıştır. İmipenem, meropenem ve ertapenem herhangi birine dirençli tespit edilen izolatların kolistin MİK değeri MicroScan ve VITEK 2 sistemleri ile tespit edilmiştir. *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* için VITEK 2 AST-N326 Gram negatif/Non-fermentatif antibiyotik duyarlılık kartı (BioMerieux, Fransa), *K. pneumoniae* için VITEK 2 AST-N325 Gram negatif/Non-fermentatif antibiyotik duyarlılık kartı (BioMerieux, Fransa) kullanılarak firmanın önerdiği şekilde çalışılmış ve VITEK 2 cihazında minimal inhibitör konsantrasyonları tespit edilmiştir. VITEK 2 antibiyotik duyarlılık panellerinde kolistin sulandırımı 5 kuyucukta 0.5-2-4-8-16µg/mL şeklindedir. İzolatların diğer sistem MicroScan cihazı (Beckman Coulter, CA, USA) ile kolistin MİK belirlemek için Gram negatif/Non-fermentatif antibiyotik duyarlılık panelleri kullanılmıştır. Firmanın önerdiği prosedüre göre çalışılarak MicroScan cihazında (Beckman Coulter, CA, USA) değerlendirilmiştir. MicroScan antibiyotik duyarlılık panellerinde ise kolistin sulandırımı 2 kuyucukta 2 ve 4 µg/mL şeklindedir.

Duyarlılık testlerinin sonuçları EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) kriterlerine göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak kategorize edilmiştir. Ayrıca direnci doğrulamak ve kolistin MİK değerini belirlemek için referans test olan sıvı mikrodilüsyon testi çalışılmıştır. Standart suş olarak, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanılmıştır. Ayrıca kolistine doğal dirençli olan laboratuvarımızda izole ettiğimiz *Proteus mirabilis* suşu da çalışmanın kontrolü için kullanılmıştır.

A. baumannii, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* olarak tiplendirilen imipenem, meropenem veya ertapenem en az birine dirençli tespit edilen izolatlar, çalışma yapılıncaya kadar %16 gliserol içeren triptik soy buyyon besiyerinde -20°C'de saklanmıştır.



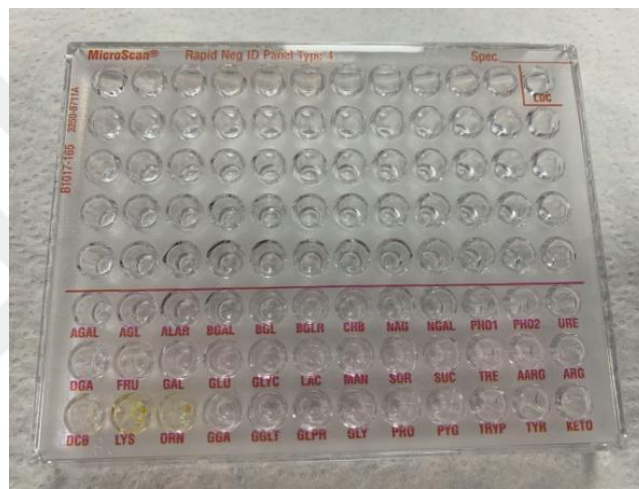
Şekil 3.1.VITEK 2 Cihazı (BioMerieux, Fransa).



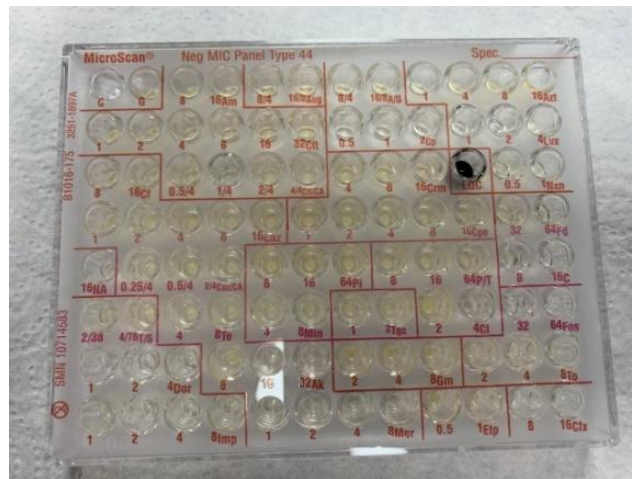
Şekil 3.2.VITEK 2 Antibiyotik duyarlılık kartı (BioMerieux, Fransa)



Şekil 3.3. MicroScan Cihazı (Beckman Coulter, CA, USA).



Şekil 3.4. MicroScan bakteri tanımlama panelleri (Beckman Coulter, CA, USA).



Şekil 3.5. MicroScan antibiyotik duyarlılık panelleri (Beckman Coulter, CA, USA).

3.3.2. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Bu yöntemde Katyon ayarlı Mueller Hinton Broth kullanıldı. Bu test, 96 kuyucuklu U-tabanlı mikropatlarda çalışıldı. Çalışma öncesi hazırlanan antibiyotik stok solüsyonundan CLSI'da verilen tabloya göre seri sulandırım yapıldı (Tablo 3.2) (7).

Tablo 3.2. Sıvı dilüsyon yöntemi için kullanılan antimikrobiyal sulandırım şeması [7]. (KAMBH: Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth)

| Stok Solüsyon | Antibiyotik (sulandırım kısmı/miktarı) | KAMBH (sulandırım kısmı/miktarı) | Test Konsantrasyonu |
|---------------|--|----------------------------------|---------------------|
| 5120 µg/MI | 1 MI | 9 mL | 512 µg/mL |
| 512 µg/MI | 1 mL | 1 mL | 256 µg/mL |
| 512 µg/mL | 1 mL | 3 mL | 128 µg/mL |
| 512 µg/MI | 1 mL | 7 mL | 64 µg/mL |
| 64 µg/MI | 1 mL | 1 mL | 32 µg/mL |
| 64 µg/MI | 1 mL | 3 mL | 16 µg/mL |
| 64 µg/mL | 1 mL | 7 mL | 8 µg/mL |
| 8 µg/mL | 1 mL | 1 mL | 4 µg/mL |
| 8 µg/mL | 1 mL | 3 mL | 2 µg/mL |
| 8 µg/mL | 1 mL | 7 mL | 1 µg/mL |
| 1 µg/mL | 1 mL | 1 mL | 0.5 µg/mL |
| 1 µg/mL | 1 mL | 3 mL | 0.25 µg/mL |
| 1 µg/MI | 1 mL | 7 mL | 0.125 µg/mL |

Ana tüpe 2250 µl katyon ayarlı Mueller Hinton Broth besiyeri ve 250 µl kolistin eklendi. Tüp vortekslendi ve mikropatlaktaki her kuyucuğa 100 µl Mueller Hinton Broth dağıtıldı. Ana tüpten her kuyucuğun ilk sırasına 100 µl besiyeri pipetaj yapılarak eklendi. Kuyucuklarda bulunan 200 µl hacim, seri dilüsyonlar yapılarak pipetajlandı ve kuyucuklardaki son hacim 100 µl oldu. İlk kuyucuktan itibaren seri dilüsyon yapılarak 64 ile 0,03 µg/mL kolistin konsantrasyonu olacak şekilde 12 kuyucukta seri dilüsyon yapıldı. Her bakteri için hazırlanan cam tüplere 2500 mL steril distile su eklendi.

Öze ile saf koloni alınarak tüpün içerisine eklendi ve tüp vortekslendi. 0,5 McFarland yoğunluğunda (1×10^8 CFU/mL) bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyon 1/20 dilüe edildi ve böylece 5×10^6 CFU/mL bakteri süspansiyonu elde edildi. Her bakteri için hazırlanan cam tüplere 2375 mL steril distile su eklendi. 0,5 McFarland yoğunluğunda (1×10^8 CFU/mL) hazırlanmış bakteri süspansiyonu, 125 µl hazırlanan tüplere aktarıldı ve vortekslendi. Bu

süspansiyon 1/20 dilüe edilmiş oldu ve böylece 5×10^6 CFU/mL bakteri süspansiyonu elde edildi (125 µl 0,5 McFarland bakteri süspansiyonu + 2,375 mL steril distile su).

Her kuyucuğa üreme kontrolünü değerlendirmek için resazurin çözeltisinden 10 µl eklendi. Plakların etrafı streç film ile kaplanıp 35°C'de 16-20 saat inkübe edildikten sonra kuyucuklarda renk değişikliğinin olup olmamasına göre, mavi rengin pembeye dönüşmesi üreme olduğunu göstermektedir. Üremenin olmadığı son kuyucuk antibiyotiğin MİK değerini vermektedir.

Kontroller:

Her bakteri için pozitif kontrol çalışıldı.

Besiyeri için negatif kontrol çalışıldı.

Kalite kontrol için standart suşlar;

Escherichia coli ATCC 25922, *Pseudomonas auroginosa* ATCC 27853 çalışıldı.

3.4. İstatistik Analiz

75 adet karbapenem dirençli Gram negatif bakterilerin sıvı mikrodilüsyon, VITEK 2, MicroScan cihazı ile tespit edilen kolistin MİK değerleri Kappa testine göre analiz edilmiştir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi referans yöntem olup, VITEK 2 ve MicroScan kolistin MİK sonuçları bu yöntemle değerlendirilmiştir.

Kappa değerine göre test sonuçları yorumlanmaktadır. Kappa değerini; <0 ise kötü uyum, 0.01-0.20 aralığı önemsiz düzeyde uyum, 0.21-0.40 aralığı zayıf düzeyde uyum, 0.41-0.60 aralığı orta düzeyde uyum, 0.61-0.80 aralığı iyi düzeyde uyum, 0.81-1 aralığı çok iyi düzeyde uyum olarak yorumlanır.

Tablo: 3.3. Kappa değerlerine göre uyum düzeylerinin yorumlanması.

| Kappa değeri | Yorumu |
|---------------------|----------------------|
| <0 | Kötü uyum |
| 0.01-0.20 | Önemsiz düzeyde uyum |
| 0.21-0.40 | Zayıf düzeyde uyum |
| 0.41-0.60 | Orta düzeyde uyum |
| 0.61-0.80 | İyi düzeyde uyum |
| 0.81- 1 | Çok iyi düzeyde uyum |

4. BULGULAR

4.1. İzolatların Kliniklere Göre Dağılımı

Karbapenem dirençli *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* izolatının kliniklere göre dağılımı; 36'sı (%48) dahili kliniklerden, 18'i (%24) genel yoğun bakım, 18'i (%24) cerrahi kliniklerden ve 3'nün (%4) çeşitli poliklinikler olduğu görülmektedir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. İzolatların kliniklere göre dağılımı.

| Klinik | İzolat (Sayı) | Yüzde (%) |
|-----------------------|---------------|------------|
| Dahili Klinikler | 36 | 48 |
| Genel Yoğun Bakım | 18 | 24 |
| Cerrahi Klinikler | 18 | 24 |
| Çeşitli Poliklinikler | 3 | 4 |
| Toplam | 75 | 100 |

4.2. İzolatların Materyallere Göre Dağılımı

İzolatların 25'i (% 33,3) idrar örneklerinden, 15'i (%20) trekeal aspirattan, 10'u (%13,3) yara örneklerinden, 6'sı (%8) kateter idrar örneğinden ve 4'ü (%5,3) doku ve periferik kan örneklerinden, 11'i (%14,5) diğer örneklerden izole edilmiştir (Tablo 4.2).

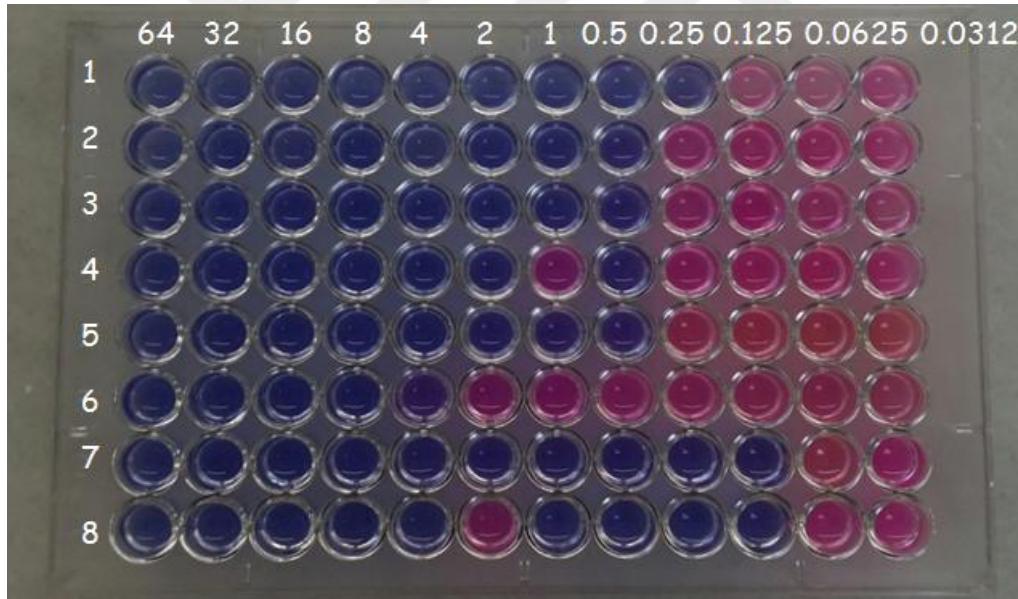
Tablo 4.2. İzolatların materyallere göre dağılımı.

| Materyal | Sayı | Yüzde (%) |
|-----------------|-----------|------------|
| İdrar | 25 | 33,3 |
| Trekeal aspirat | 15 | 20 |
| Yara | 10 | 13,3 |
| Kateter idrarı | 6 | 8 |
| Doku | 4 | 5,3 |
| Periferik kan | 4 | 5,3 |
| Balgam | 3 | 4 |
| Akıntı | 3 | 4 |
| Sürüntü | 2 | 2,6 |
| Safra | 1 | 1,3 |
| Abse | 1 | 1,3 |
| Kateter | 1 | 1,3 |
| Toplam | 75 | 100 |

4.3. Sıvı Mikrodilüsyon, MicroScan ve VITEK 2 ile MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Karbapenem dirençli 25 adet *A. baumannii*, 25 adet *K. pneumoniae*, 25 adet *P. aeruginosa* olmak üzere 75 izolatın kolistine karşı duyarlılıkları sıvı mikrodilüsyon Resazurin mikrotitre plak yöntemi [Resazurin Microtitre Assay (REMA)], otomatize sistem MicroScan [Beckman Coulter, CA, USA] ve VITEK 2 (BioMerieux, Fransa) kullanılarak test edilmiştir.

Sıvı mikrodilüsyon yönteminde plaklar inkübasyon süresi sonunda değerlendirilerek kolistin MİK değerleri tespit edilmiştir. MİK; Mikroorganizmanın üremesini engelleyen minimum antibakteriyal ilaç konsantrasyonudur. Kuyucuklardaki renk değişimini gözlemleyebilmek için bu çalışmada Resazurin çözeltisi kullanılmıştır. Kuyucuklarda pembe renk değişimi üreme olduğunu göstermektedir. Renk değişiminin olmadığı bir önceki kuyu en düşük antimikrobiyal ilaç konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Her bir test yönteminde bulunan kolistin için Minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri EUCAST sınır değerlerine göre MİK: ≤ 2 mg/L ise duyarlı, MİK: >2 mg/L ise dirençli olarak değerlendirilmiştir [8].



Şekil 4.1. İzolatların sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile kolistin MİK sonuçlarının değerlendirilmesi.

Tablo 4.3. Sıvı mikrodilüsyon ve otomatize iki sistemle elde edilen MİK değeri ve duyarlılık sonuçları (AB: *Acinetobacter baumannii*, KP: *Klebsiella pneumoniae*, PA: *Pseudomonas aeruginosa*, CI: Kolistin).

| İZOLAT | KOLİSTİN MİK SONUÇLARI | | | | | |
|--------|------------------------|--------------|-------------|------------|--------------|-------------|
| | MİCROSCAN MİK | MİCROSCAN CI | VITEK 2 MİK | VITEK 2 CI | DİLÜSYON MİK | DİLÜSYON CI |
| AB1 | ≤ 2 | S | 16 | R | 64 | R |
| AB2 | >4 | R | 0.5 | S | 16 | R |
| AB3 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.5 | S |
| AB4 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.25 | S |
| AB5 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.25 | S |
| AB6 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 32 | R |
| AB7 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 8 | R |
| AB8 | >4 | R | 0.5 | S | 8 | R |
| AB9 | ≤ 2 | S | 16 | R | 64 | R |
| AB10 | > 4 | R | 0.5 | S | 0.25 | S |
| AB11 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.25 | S |
| AB12 | > 4 | R | 0.5 | S | 0.0625 | S |
| AB13 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.25 | S |
| AB14 | ≤ 2 | S | 16 | R | 64 | R |
| AB15 | ≤2 | S | 4 | R | 64 | R |
| AB16 | ≤ 2 | S | 8 | R | 64 | R |
| AB17 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 64 | R |
| AB18 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 32 | R |
| AB19 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 64 | R |
| AB20 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.0625 | S |
| AB21 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.0625 | S |
| AB22 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.0625 | S |
| AB23 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.0625 | S |
| AB24 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.125 | S |
| AB25 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.125 | S |
| KP1 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.125 | S |
| KP2 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.125 | S |

| | | | | | | |
|-------------|-----|---|-----|---|--------|---|
| KP3 | > 4 | R | 16 | R | 32 | R |
| KP4 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.125 | S |
| KP5 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.5 | S |
| KP6 | > 4 | R | 2 | S | 4 | R |
| KP7 | > 4 | R | 16 | R | 32 | R |
| KP8 | > 4 | R | 0.5 | S | 0.25 | S |
| KP9 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.25 | S |
| KP10 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.125 | S |
| KP11 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.125 | S |
| KP12 | > 4 | R | 0.5 | S | 0.125 | S |
| KP13 | > 4 | R | 16 | R | 64 | R |
| KP14 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.5 | S |
| KP15 | > 4 | R | 2 | S | 16 | R |
| KP16 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.125 | S |
| KP17 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.25 | S |
| KP18 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.25 | S |
| KP19 | > 4 | R | 8 | R | 32 | R |
| KP20 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.0625 | S |
| KP21 | > 4 | R | 0.5 | S | 64 | R |
| KP22 | > 4 | R | 2 | S | 8 | R |
| KP23 | > 4 | R | 16 | R | 64 | R |
| KP24 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.0625 | S |
| KP25 | > 4 | R | 0.5 | S | 0.5 | S |
| PA1 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.5 | S |
| PA2 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.5 | S |
| PA3 | > 4 | R | 0.5 | S | 4 | R |
| PA4 | > 4 | R | 0.5 | S | 8 | R |
| PA5 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 1 | S |
| PA6 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 1 | S |
| PA7 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.5 | S |
| PA8 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.0625 | S |
| PA9 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.25 | S |
| PA10 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.25 | S |
| PA11 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.5 | S |
| PA12 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.25 | S |

| | | | | | | |
|------|-----|---|-----|---|------|---|
| PA13 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 1 | S |
| PA14 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.25 | S |
| PA15 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.5 | S |
| PA16 | ≤ 2 | S | 16 | R | 0.5 | S |
| PA17 | > 4 | R | 16 | R | 64 | R |
| PA18 | ≤ 2 | S | 16 | R | 16 | R |
| PA19 | ≤ 2 | S | 4 | R | 64 | R |
| PA20 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.25 | S |
| PA21 | > 4 | R | 0.5 | S | 32 | R |
| PA22 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 2 | S |
| PA23 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 1 | S |
| PA24 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 0.5 | S |
| PA25 | ≤ 2 | S | 0.5 | S | 1 | S |

4.4. Karbapenem Dirençli İzolatların Kolistin MİK Sonuçları Sıvı Mikrodilüsyon ve Ticari Yöntemlerle Karşılaştırılması

Karbapenem dirençli 25 *A. baumannii* izolatının, MicroScan ile izolatların 4'ü (%16) kolistine dirençli, 21'i (%84) duyarlı, VITEK 2 ile izolatların 5'i (%20) kolistine dirençli, 20'si (%80) duyarlı bulunmuştur. Referans yöntem sıvı mikrodilüsyon ile bu izolatların 13'ü (%52) kolistine dirençli, 12'si (%48) duyarlı bulunmuştur (Tablo 4.4.).

Karbapenem dirençli 25 *K. pneumoniae* izolatının, MicroScan ile izolatların 12'si (%48) kolistine dirençli, 21'i (%52) duyarlı, VITEK 2 ile izolatların 5'i (%20) kolistine dirençli, 20'si (%80) duyarlı bulunmuştur. Referans yöntem sıvı mikrodilüsyon ile bu izolatların 9'u (%36) kolistine dirençli bulunurken, 16'sı (%64) duyarlı bulunmuştur (Tablo 4.4.).

Karbapenem dirençli 25 *P. aeruginosa* izolatının, MicroScan ile izolatların 4'ü (%16) kolistine dirençli, 21'i (%84) duyarlı, VITEK 2 ile izolatların 4'ü (%16) kolistine dirençli, 21'i (%84) kolistine duyarlı bulunmuştur. Referans yöntem sıvı mikrodilüsyon ile bu izolatların 6'sı (%24) kolistine dirençli, 19'u (%76) duyarlı bulunmuştur (Tablo 4.4.).

Referans yöntem sıvı mikrodilüsyon ile çalışmaya dahil edilen 75 izolatın 47'si (%63) kolistine duyarlı, 28'i (%37) dirençli bulunmuştur. VITEK 2 ile 61'i (%81) kolistine duyarlı ve 14'ü (%19) dirençli, MicroScan ile 55'i (%73) kolistine duyarlı, 20'si (%27) dirençli bulunmuştur (Tablo 4.4.).

Tablo 4.4. İzolatların kolistin MİK değerlerinin MicroScan, VITEK 2 ve sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırılması.

| İzolatlar (n=75) | Microscan Kolistin MİK | | Vitek 2 Kolistin MİK | | Sıvı Mikrodilüsyon Kolistin MİK | |
|-------------------------------------|---------------------------|---------|-------------------------|---------|------------------------------------|---------|
| | R (n/%) | S (n/%) | R (n/%) | S (n/%) | R (n/%) | S (n/%) |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> (25) | 4 (16) | 21 (84) | 5 (20) | 20 (80) | 13 (52) | 12 (48) |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (25) | 12 (48) | 13 (52) | 5 (20) | 20 (80) | 9 (36) | 16 (64) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (25) | 4 (16) | 21 (84) | 4 (16) | 21 (84) | 6 (24) | 19 (76) |
| Toplam (75) | 20 (27) | 55 (73) | 14 (19) | 61 (81) | 28 (37) | 47 (63) |

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi referans alınarak, karbapeneme dirençli izolatların MicroScan ve VITEK 2 sistemlerinin kolistine duyarlılığı ve özgüllüğü Kappa testi ile değerlendirilmiştir. MicroScan sistemi; *A. baumannii* için %84.62 duyarlı, %16.67 özgül, *K. pneumoniae* için %81.25 duyarlı, %100 özgül, *P. aeruginosa* için %100 duyarlı, %57.14 özgül olduğu gözlenmiştir. Microscan sistemi, 75 izolatta %86.38 duyarlı, %53.57 özgüllükte bulunmuştur (Tablo 4.5.).

VITEK 2 sistemi; *A. baumannii* için %65 duyarlı, %100 özgül, *K. pneumoniae* için %80 duyarlı, %100 özgül, *Pseudomonas aeruginosa* için %85 duyarlı, %80 özgül sahip olduğu gözlenmiştir. VITEK 2 sistemi 75 izolatta %97.87 duyarlı, %50 özgüllükte bulunmuştur (Tablo4.5.).

Tablo 4.5. İzolatlarının MicroScan ve VITEK 2 duyarlılık ve özgüllük sonuçları

| | MİCROSCAN CI | | VİTEK 2 CI | |
|---------------------------|---------------|---------------|---------------|------------|
| | Duyarlılık | Özgüllük | Duyarlılık | Özgüllük |
| <i>A.baumannii</i> (25) | %84.62 | %16.67 | %65 | %100 |
| <i>K. pneumoniae</i> (25) | %81.25 | %100 | %80 | %100 |
| <i>P. aeruginosa</i> (25) | %100 | %57.14 | %85 | %80 |
| Toplam (75) | %86.39 | %53.57 | %97.87 | %50 |

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi referans alınarak, MicroScan kolistin duyarlılığının bakteri türlerinde uyumu; *A. baumannii* için önemsiz düzeyde uyum, *K. pneumoniae* için iyi düzeyde uyum, *P. aeruginosa* için iyi düzeyde uyum olduğu bulunmuştur (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. İzolatların sıvı mikrodilüsyon ve MicroScan kolistin MİK sonuçlarının Kappa testi ile analizi.

| Sıvı mikrodilüsyon CI- Microscan CI | | |
|-------------------------------------|-------|------|
| <i>A. baumannii</i> | Kappa | 0,01 |
| | N | 25 |
| <i>K. pneumoniae</i> | Kappa | 0,76 |
| | N | 25 |
| <i>P. aeruginosa</i> | Kappa | 0,66 |
| | N | 25 |

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi referans alınarak, VITEK 2 kolistin duyarlılığının bakteri türlerinde uyumu; *A. baumannii* için orta düzeyde uyum, *K. pneumoniae* için iyi düzeyde uyum, *P. aeruginosa* için orta düzeyde uyum olduğu bulunmuştur (Tablo 4.7.).

Tablo 4.7. İzolatların sıvı mikrodilüsyon ve Vitek 2 kolistin MİK sonuçlarının Kappa testi ile analizi.

| Sıvı mikrodilüsyon CI- Vitek 2 CI | | |
|-----------------------------------|-------|------|
| <i>A. baumannii</i> | Kappa | 0,43 |
| | N | 25 |
| <i>K. pneumoniae</i> | Kappa | 0,62 |
| | N | 25 |
| <i>P. aeruginosa</i> | Kappa | 0,57 |
| | N | 25 |

4.5. Karbapenem Dirençli İzolatlarında Test Edilen Kolistin Sıvı Mikrodilüsyon ile Karşılaştırıldığında MicroScan ve VITEK 2 için Hata Oranları

Bu çalışmadaki hata oranları, referans yöntem sıvı mikrodilüsyon ile dirençli, diğer test yöntemleri ile duyarlı bulunduğu çok büyük hata olarak değerlendirilmiştir. Referans yöntem ile duyarlı, diğer test yöntemleri ile dirençli bulunduğu büyük hata olarak değerlendirilmiştir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle duyarlı veya dirençli, diğer test yöntemleriyle orta duyarlı bulunması küçük hata olarak değerlendirilmiştir.

Referans yöntem sıvı mikrodilüsyonla MicroScan ve VITEK 2 ile elde edilen kolistin duyarlılık sonuçlarının hata oranları karşılaştırılmıştır. MicroScan ile *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* için küçük hata tespit edilmemiştir. *Acinetobacter baumannii* için büyük hata 2 (%8) izolatta, çok büyük hata 10 (%40) izolatta bulunmuştur. *Klebsiella pneumoniae* için büyük hata 3 (%12) izolatta bulunmuş, çok büyük hata tespit edilmemiştir. *Pseudomonas aeruginosa* için büyük hata bulunmamıştır, çok büyük hata 2

(%8) izolatta bulunmuştur. 75 izolatın kolistin duyarlılıkları sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırıldığında MicroScan için hata oranları; küçük hata oranı %0, büyük hata oranı %6 ve çok büyük hata oranı %16 bulunmuştur (Tablo 4.8.). MicroScan sisteminin sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırıldığında kategorik uyumu %83 bulunmuştur (Tablo 4.10)

Tablo 4.8. MicroScan hata oranları.

| İzolatlar | Küçük Hata (n/%) | Büyük Hata (n/%) | Çok Büyük Hata (n/%) |
|---------------------------|------------------|------------------|----------------------|
| <i>A. baumannii</i> (25) | 0 | 2 (8) | 10 (40) |
| <i>K. pneumoniae</i> (25) | 0 | 3 (12) | 0 |
| <i>P. aeruginosa</i> (25) | 0 | 0 | 2 (8) |
| Toplam (75) | 0 | 5 (6) | 12 (16) |

VITEK 2 ile *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında küçük hata tespit edilmemiştir. *Acinetobacter baumannii* için büyük hata oranı izolatların hiçbirinde bulunmamışken, çok büyük hata oranı 7 (%28) izolatta bulunmuştur. *Klebsiella pneumoniae* için izolatların hiçbirinde büyük hata bulunmamışken, çok büyük hata oranı 4 (%16) izolatta bulunmuştur. *Pseudomonas aeruginosa* için büyük hata 1 (%4) izolatta bulunurken, çok büyük hata 3 (%12) izolatta bulunmuştur. Karbapenem dirençli 75 izolatın kolistin duyarlılığı sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırıldığında VITEK 2 için hata oranları; küçük hata %0, büyük hata %1.3 ve çok büyük hata %18 olarak bulunmuştur (Tablo 4.9.) VITEK 2 sistemi sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırıldığında kategorik uyumu %85 bulunmuştur (Tablo 4.10).

Tablo 4.9. VITEK 2 hata oranları.

| İzolatlar | Küçük Hata (n/%) | Büyük Hata (n/%) | Çok Büyük Hata (n/%) |
|---------------------------|------------------|------------------|----------------------|
| <i>A. baumannii</i> (25) | 0 | 0 | 7 (28) |
| <i>K. pneumoniae</i> (25) | 0 | 0 | 4 (16) |
| <i>P. aeruginosa</i> (25) | 0 | 1 (4) | 3 (12) |
| Toplam (75) | 0 | 1 (1.3) | 14 (18) |

Tablo 4.10. MicroScan ve VITEK 2 sistemlerinin sıvı mikrodilüsyon ile kategorik uyumları. (ÇBH: Çok Büyük Hata, BH: Büyük Hata, KH: Küçük Hata)

| Ticari Sistemler | ÇBH | BH | KH | HATALAR | Kategorik uyum |
|------------------|-----|----|----|---------|----------------|
| MicroScan | 12 | 5 | 0 | %17 | %83 |
| VITEK 2 | 14 | 1 | 0 | %15 | %85 |

5. TARTIŞMA

Karbapenemler, etki spektrumu geniş, beta-laktamaz enzimlerine dirençli olması nedeniyle tedavide sıklıkla kullanılan antibiyotiklerdir [53]. Karbapenamaz dirençli nozokomiyal ve toplum kökenli GN bakteri enfeksiyonları dünya çapında giderek artmaktadır. Karbapenem dirençli suşların hastanede yatan hastalar arasında artan yayılımı endişe kaynağı haline gelmiştir [1].

Kolistin, karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarının tedavisinde günümüzde kullanılmaktadır. Başlangıçta kolistinin yüksek oranda nefrotoksisite ve nörotoksisite etkisi nedeniyle kullanılması çok tercih edilmemiştir. Ancak son yıllarda karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarında artış sebebiyle polimiksin kullanımı artmaktadır [4]. Kolistin kullanımının artması, dünya çapında kolistin direncinin ortaya çıkmasına yol açmıştır [5].

Souli ve ark., 2007-2008 yılları arasında 50 *K. pneumoniae* izolatında %10 kolistin direnci saptamışlardır [54]. İtalya'da 2013-2014 yılları arasında yapılan çalışmada, çeşitli hastanelerden toplanan karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşlarında kolistin direncinin ortaya çıktığı bildirilmiştir [55]. Goel ve ark., 2014 yılında Hindistan'daki onkoloji ünitesinde 24 *K. pneumoniae* izolatının kolistine dirençli olduğunu bildirmişlerdir [56]. Qamar ve ark., 2017 yılında yaptıkları çalışmada, 251 adet karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* izolatında %15.9 kolistin direnci bildirmişlerdir [57]. Koçak ve ark., 2018 yılında yaptıkları çalışmada, 81 adet karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında %39.51'i kolistine dirençli olduğu tespit edilmiştir [58]. Javed ve ark., 2018 yılında yaptıkları çalışmada, 131 adet *P. aeruginosa* izolatının 31'i kolistine dirençli olduğu saptanmıştır [59].

Kolistin duyarlılığının saptanmasında sıvı mikrodilüsyon, disk difüzyon, agar dilüsyon, gradiyent testler ve otomatize sistemlerin karşılaştırıldığı çok sayıda çalışma yapılmıştır. Kolistin duyarlılık testi yıllar içinde değişmiştir ve halen devam eden bir tartışma konusudur. Kolistin duyarlılık test yöntemleri ile ilgili karşılaştırmalı çalışmalarda kullanılan altın standart yöntemleri her zaman aynı değildir, bu durum araştırmacılar için bir sorun oluşturur. Bu nedenle, bildirilen duyarlılık sonuçları çelişkili ve yanıltıcıdır. Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi (EUCAST) *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* türlerinde kolistin için Minimal İnhibitor Konsantrasyon (MİK) belirlenmesinde referans yöntem olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemini önermektedir [8]. Disk difüzyon metodu, kolistinin agara zayıf şekilde dağılmasından dolayı yanlış sonuçlar vermekte ve bu nedenle kullanılması önerilmemektedir [9]. Gradyent difüzyon yöntemi, sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırıldığı çalışmalarda yanlış duyarlı sonuçlar vermesinden dolayı dikkatli yorumlanması gerekmektedir [10].

Arroya ve ark., 2005 yılında yaptıkları çalışmada, 115 adet *A. baumannii* izolatında kolistin duyarlılığını gradiyent test ve sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırmıştır. Bu çalışmada gradiyent testin duyarlılığını %90, özgülüğü %100 olduğu tespit edilmiştir. Gradyent testin *A. baumannii* izolatlarında kolistin direncinin belirlenmesinde güvenilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir [60].

Tan ve ark., 2006 yılında yaptıkları çalışmada, 172 adet *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter spp.*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* izolatlarında kolistin duyarlılığını gradiyent test, VITEK 2 sistemi ve referans aldıkları agar dilüsyon yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Agar dilüsyon gradiyent test yöntemi karşılaştırıldığında kategorik uyumun %82 olduğu ancak hata oranlarının fazla olduğu saptanmıştır. VITEK 2 sisteminin çok büyük hatalara neden olduğu ve kolistin direncinin saptanmasında güvenilir olmadığı bildirilmiştir [61].

Lo Ten Foe ve ark., 2007 yılında yaptıkları çalışmada, 102 adet *A. baumannii* ve *E. cloacae* izolatında kolistin duyarlılığını disk difüzyon, agar dilüsyon ve VITEK 2 sistemi ile referans yöntem sıvı mikrodilüsyon karşılaştırılmıştır. Agar dilüsyon ve VITEK 2 sisteminin sıvı mikrodilüsyon ile yüksek düzeyde kategorik uyum gösterdiği, disk difüzyon yönteminin çok büyük hatalara neden olduğu için güvenilir olmadığı tespit edilmiştir [9].

Somily ve ark., 2010 yılında yaptıkları çalışmada, çok ilaca dirençli 265 adet *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *B. cepacia* izolatlarında kolistin duyarlılığını disk difüzyon, sıvı mikrodilüsyon ve gradiyent test yöntemlerini karşılaştırmıştır. Kolistin agar yüzeyinde yeterince yayılmadığı için disk difüzyon yöntemi güvenilir bir yöntem olmadığı gözlenmiştir. Gradyent testin ise güvenilir ve alternatif bir yöntem olarak önerilmişlerdir [62].

Hindler ve ark., 2010-2011 yılları arasında yaptıkları çalışmada, 107 adet çok ilaca dirençli *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* izolatlarında kolistin duyarlılığını TREK GNXF Sensititre, agar dilüsyon, tüp makrodilüsyon, BMD, polisorbata 80 ekli BMD yöntemlerini referans aldıkları polisorbata-80 ekli BMD ile karşılaştırmışlardır. Polisorbata 80 ekli BMD ile en iyi kategorik uyumu TREK GNXF Sensititre yöntemi vermiştir ve hata oranları gözlenmemiştir. Bu testler, referans alınan yöntemle karşılaştırıldığında TREK GNXF Sensititre yönteminin klinik testler için kullanımı uygun görüldüğü öne sürülmüştür. Bu çalışmada, polisorbata 80 ekli BMD ile karşılaştırıldığında, tüp makrodilüsyon ve agar dilüsyonun kategorik uyumun yüksek olduğu gözlenmiştir. Gradyent testin kategorik uyumunun düşük olduğu ve çok büyük hata oranı vererek yanlış duyarlı sonuçlara neden olduğu belirlenmiştir. BMD ile karşılaştırıldığında ise kategorik uyumun çok düşük olduğu saptanmıştır ve bu çalışmada polisorbata-80 ekli BMD'nin referans yöntem olarak uygulanmasını önermişlerdir [63].

Giani ve ark., 2012 yılında yaptıkları çalışmada, İspanya ve İtalya'dan toplanan 349 adet *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *S. maltophilia*, *S. aureus*, Koagülaz negatif stafilokok, enterokok, *S. pneumoniae* izolatlarının kolistin

duyarlılıklarını Phoenix™ 100 otomatize sistem ve sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırmışlardır. Kategorik uyumun yüksek olduğu (%95.2) ve *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında duyarlılığın %100 olduğu gözlenmiştir [64].

Rojas ve ark., 2011-2014 yılları arasında yapılan çalışmada, 246 hastadan karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında kolistin duyarlılıklarını gradiyent test ve sıvı mikrodilüsyon yöntemini karşılaştırmıştır. Gradyent testin çok büyük hata oranları verdiği ve güvenilir olmadığı gözlenmiştir [65].

Lee ve ark., 2013 yılında yaptıkları çalışmada, 213 adet *A. baumannii* izolatında kolistin duyarlılığını gradiyent test, MicroScan ve VITEK 2 sistemlerini referans aldıkları yöntem agar dilüsyonla karşılaştırmışlardır. Her üç yöntem agar dilüsyonla karşılaştırıldığında kategorik uyumun yüksek olduğu belirlemişlerdir [66].

Dafopoulou ve ark., 2015 yılında yaptıkları çalışmada, 61 adet karbapenem dirençli *A. baumannii*, *K. pneumoniae* izolatlarında kolistin duyarlılığını Broth Microdilution (BMD), polisorb-80 ekli BMD, agar dilüsyon, gradiyent test, MİK test strip ve VITEK 2 yöntemlerini referans yöntem BMD ile karşılaştırmışlardır. BMD ile polisorb-80 ekli BMD kategorik uyumun yüksek olduğu ancak düşük MİK değerleri nedeniyle çok büyük hata oranı vermiştir. BMD panellerine polisorb-80 eklendiğinde kolistin panele yapışması minimum seviyede olduğu için düşün kolistin MİK değerlerine sebep olmaktadır. Bu çalışmada agar dilüsyon ve VITEK 2 yöntemlerinin referans yöntem ile yüksek düzeyde uyumlu olduğu belirlenmiştir. VITEK 2 sistemi kolistine dirençli izolatları hızlı tespit etmesinden dolayı kullanışlı bir yöntemdir ve bu çalışmada VITEK 2 çok büyük hata oranları gözlenmemiştir. Gradyent test ve MİK test strip yöntemi referans yöntemle karşılaştırıldığında düşük düzeyde uyum ve çok büyük hatalara neden olduğundan bu test yöntemleri daha az güvenilir yöntemlerdir [10].

Nhung ve ark., 2015 yılında yaptıkları çalışmada 241 adet çok ilaca dirençli *A. baumannii*, *P. aeruginosa* ve *Enterobacteriaceae* izolatlarında kolistin duyarlılığını gradiyent difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile karşılaştırılmıştır. İki yöntem arasındaki kategorik uyum oranları *A. baumannii* ve *Enterobacteriaceae* izolatları için %100, *P. aeruginosa* izolatları için %98 olarak bildirilmiştir. Gradyent testin kullanımı kolay ve güvenilir bir yöntem olduğunun sonucuna varmışlardır [67].

Chew ve ark., 2017 yılında yaptıkları çalışmada, 76 adet karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* izolatlarında kolistin duyarlılığını Sensititre, MicroScan, VITEK 2 sistemi, BMD, gradiyent test yöntemlerini referans yöntem BMD ile karşılaştırmışlardır. Sensititre ve MicroScan sistemleri ile kolistin duyarlılığının %100 olduğu belirlenmiş ve aynı zamanda mcr-1 genin varlığı test etmek için ideal ticari sistemler olduğu gözlenmiştir. VITEK 2'nin kategorik uyumu yüksek seviyede olduğu belirlenmiş ve bu çalışmada hata oranları gözlenmemiştir.

Gradyent test yönteminin ise BMD ile kategorik uyumun düşük olduğu saptanmıştır ve çok büyük hatalara neden olduğu tespit edilmiştir [4].

Simar ve ark., 2017 yılında yaptıkları çalışmada, 143 adet *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*) familyasından izole edilen izolatlar kolistin duyarlılığı sıvı mikrodilüsyon ve gradyent test yöntemiyle karşılaştırılmıştır. Kategorik uyumun düşük olduğunu ve çok büyük hatalara neden olmasından dolayı bu çalışmada gradyent test yöntemi önerilmemiştir [68].

Matuschek ve ark., 2017 yılında yaptıkları çalışmada, 75 adet *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* izolatlarında kolistin duyarlılığı Sensititre, MICRONAUT-S, MICRONAUT MİK-Strip, SensiTest, UMIC, gradyent test ve MİK test strip sistemlerini sıvı mikrodilüsyon ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada ticari sistemlerden en iyi kategorik uyum gösteren Sensititre, MICRONAUT-S ve MICRONAUT MİK Striplerin olduğu gözlenmiştir. MİK test strip ve gradyent test yöntemlerinin güvenilir sonuçlar vermediği, hata oranlarının yüksek değerlerde olduğu gözlenmiştir [69].

Javed ve ark., 2018 yılında yaptıkları çalışmada, 131 adet *P. aeruginosa* izolatlarında kolistin duyarlılığını MICRONAUT-S, SensiTest, Sensititre, Hızlı Polimiksin *Pseudomonas* ve gradyent test yöntemlerini referans yöntem aldıkları sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırılmıştır. Sıvı mikrodilüsyonla en yüksek düzeyde kategorik uyum gösteren %96 Sensititre sistemi olurken, MICRONAUT-S, SensiTest, Hızlı Polimiksin sistemleri de yüksek düzeyde uyum göstermiştir. Gradyent test yönteminin uyumu ise düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir [59].

Sınırtaş ve ark., 2009 yılında yaptıkları çalışmada, çeşitli klinik örneklerden toplanan 100 adet *A. baumannii* izolatlarında kolistin duyarlılığını disk difüzyon, gradyent difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleriyle karşılaştırmıştır. Bu üç yöntem ile *A. baumannii* izolatlarının kolistine %100 duyarlı olduğu saptanmıştır [70].

Tüzemen ve ark., 2016-2017 yıllarında yaptıkları çalışmada, 50 adet Phoenix™ sistemle kolistine dirençli saptanan *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* izolatları gradyent difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleriyle karşılaştırılmıştır. Phoenix™ sisteminin üç bakteri türü için kategorik uyumu %92 saptanırken, gradyent testte bu kategorik uyum %20'dir. Bu çalışmada Phoenix™ sisteminde 50 adet dirençli bulunan izolatlar, sıvı mikrodilüsyon ile 46'sı dirençli bulunmuştur. Bu sistem kolistin direncini iyi bir şekilde belirlemekte ve sıvı mikrodilüsyon ile kategorik uyumu çok yüksek düzeydedir [71].

Tablo 5.1. Literatürlerde yayınlanan çalışmalarda kolistin duyarlılığını saptamak için farklı test yöntemlerinin karşılaştırmalı analizi. (AD: Agar dilüsyon, DD: Disk Difüzyon, CA: Categorical Agreement, ÇBH: Çok Büyük Hata, TM: Tüp Makrodilüsyon P-80 BMD: Polisorbitat-80 ekli Broth Microdilution)

| Araştırma makaleleri | Yıl | İzolasyonlar | Yöntemler | Referans Yöntem | Yüksek Olan Yöntemler | ÇBH |
|----------------------|-----------|---|---|-----------------|-----------------------------------|---|
| Arroya ve ark. | 2005 | 115 adet <i>A. baumannii</i> | Gradyent test, BMD | BMD | Gradyent test | - |
| Tan ve ark. | 2006 | 172 <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Acinetobacter</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. maltophilia</i> | Gradyent test, Vitek 2, Agar dilüsyon | Agar dilüsyon | Gradyent test | Vitek 2 |
| Lo ten foe ve ark. | 2007 | 102 adet <i>A. baumannii</i> , <i>E. cloacae</i> | DD, AD, Vitek 2, BMD | BMD | Agar dilüsyon ve Vitek 2 | DD |
| Somily ve ark. | 2010 | 265 adet <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. maltophilia</i> , <i>B. cepacia</i> | DD, BMD, Gradyent test | BMD | Gradyent test | DD |
| Hindler ve ark. | 2010-2011 | 107 adet <i>A. baumannii</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> | AD, TM, BMD, P-80 BMD, TREK GNXF Sensititre | P-80 BMD | TREK GNXF Sensititre, BMD, TM, AD | Gradyent test |
| Giani ve ark. | 2012 | 349 adet <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>S. maltophilia</i> , <i>S. aureus</i> , Koagülaz negatif stafilokok, Enterokok, <i>S. pneumoniae</i> | Phoenix™ 100, BMD | BMD | Phoenix™ 100 | - |
| Rojas ve ark. | 2011-2014 | 246 adet <i>K. pneumoniae</i> | Gradyent test, BMD | BMD | - | Gradyent test |
| Lee ve ark. | 2013 | 213 adet <i>A. baumannii</i> | VITEK 2, MicroScan, AD | AD | VITEK 2, MicroScan | - |
| Dafopoulou ve ark., | 2015 | 61 adet <i>A. baumannii</i> , <i>K. pneumoniae</i> | BMD, P-80 BMD, AD, MİK test strip, Gradyent test, VITEK 2 | BMD | AD, VITEK 2 | Gradyent test, MİK test strip, BMD P-80 |

| | | | | | | |
|-------------------|------|--|---|-----|--|-------------------------------|
| Nhung ve ark. | 2015 | 241 adet <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> | Gradyent test, BMD | BMD | Gradyent test | - |
| Chew ve ark. | 2017 | 76 adet <i>Enterobacteriaceae</i> | Sensititre, Microscan, VITEK 2, BMD, Gradyent test | BMD | Sensititre, Microscan, VITEK 2 | Gradyent test |
| Simar ve ark. | 2017 | 143 adet <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> | Gradyent test, BMD | BMD | | Gradyent test |
| Matuschek ve ark. | 2017 | 75 adet <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> spp. | Sensititre, MICRONAUT-S, MICRONAUT MİK-Strip, SensiTest, UMIC, Gradyent test, MİK test strip, BMD | BMD | Sensititre, MICRONAUT-S, SensiTest, MICRONAUT MİK-Strip | Gradyent test, MİK test strip |
| Javed ve ark. | 2018 | 131 adet <i>P. aeruginosa</i> | MICRONAUT-S, SensiTest, Sensititre, Hızlı Polimiksin testi, BMD | BMD | Sensititre, MICRONAUT-S, SensiTest, Hızlı Polimiksin testi | Gradyent test |

Tablo 5.2. Türkiye’de yayınlanan çalışmalarda kolistin duyarlılığını saptamak için farklı test yöntemlerinin karşılaştırmalı analizi.

| Araştırmacılar | Yıl | İzolatlar | Yöntemler | Referans Yöntem | CA Yüksek Olan Yöntemler | ÇBH |
|------------------|------|---|------------------------------|-----------------|--------------------------|---------------|
| Sınırtaş ve ark. | 2009 | 100 adet <i>A. baumannii</i> | Gradyent difüzyon, DD, BMD | BMD | Gradyent difüzyon, DD | - |
| Tüzemen ve ark. | 2017 | 50 adet <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> | Phoenix™, Gradyent test, BMD | BMD | Phoenix™ | Gradyent test |

Bu tez çalışmasında, sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle 75 adet karbapenem dirençli Gram negatif bakteri izolatının 28'i (%37) sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle kolistine dirençli bulunmuştur. Kolistine dirençli bulunan bu izolatların 20'si MicroScan ve 14'ü VITEK 2 sistemi ile kolistine dirençli bulunmuştur. MicroScan 8 izolatı, VITEK 2 ise 14 dirençli izolatı tespit edememiştir. MicroScan çok büyük hata oranı %16, VITEK 2 ile %18 olarak bulunmuştur. Bir testte çok büyük hatanın meydana gelmesi, yanlış duyarlı sonuçlara neden olmaktadır. Bu çalışmada kullanılan MicroScan ve VITEK 2 sistemlerinin çok büyük hata oranların birbirine yakın sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Sıvı mikrodilüsyon ile 47 izolat duyarlı bulunmuş, bunların 55'i MicroScan ile 61'i VITEK 2 ile dirençli bulunmuştur. MicroScan için büyük hata oranı %6 iken, VITEK 2 için büyük hata oranı %1.3 olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada MicroScan ve VITEK 2 sonuçlarının kategorik uyumu sıvı mikrodilüsyonla sırasıyla %83 ve %85 bulunmuştur. Hastalara uygun kolistin tedavisinin yapılabilmesi için, hata oranlarının en az seviyede olduğu, özgüllük ve duyarlılığı yüksek ve tekrarlanabilir bir duyarlılık test yöntemi tercih edilmelidir.

Bu tez çalışmasında, referans yöntem sıvı mikrodilüsyon ile MicroScan ve VITEK 2 kolistin duyarlılıkları karşılaştırıldığında, her iki yöntem için yüksek düzeyde duyarlılık tespit edilmiştir. Bu çalışmada, MicroScan ve VITEK 2 sistemlerinin özgüllüğü düşük ve birbirine yakın değerler elde edilmiştir. İki ticari sistem için kolistin duyarlılık ve özgüllükleri referans yöntemle karşılaştırıldığında birbirine yakın değerler verdiği gözlenmiştir. Her iki sistemde duyarlılıkları çok iyi ancak özgüllükleri düşüktür. Ticari yöntemlerin sıvı mikrodilüsyon ile uyumunu karşılaştırmak için istatistik analizi kappa testi ile yapılmıştır. Bunun sonucu MicroScan ile *A. baumannii* önemsiz düzeyde uyum, *K. pneumoniae* için iyi düzeyde uyum, *P. aeruginosa* için iyi düzeyde uyum olduğu bulunmuştur. Vitek 2 ile *A. baumannii* orta düzeyde uyum, *K. pneumoniae* için iyi düzeyde uyum, *P. aeruginosa* için orta düzeyde uyum olduğu bulunmuştur.

Kolistin duyarlılığını saptayabilmek için farklı test yöntemleri vardır. EUCAST ve CLSI ortak önerisi referans yöntem sıvı mikrodilüsyon yöntemidir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi genellikle zahmetli ve pahalı bir yöntem olduğundan rutinde kullanımı zordur. Bunun için sıvı mikrodilüsyonla eş sonuç verebilecek, kategorik uyumu yüksek, doğru direnç tespiti yapabilecek, hızlı, güvenilir, tekrarlanabilen, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hata oranları düşük ticari sistemlere ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Özellikle hastanede oluşan karbapenem dirençli Gram negatif bakteri enfeksiyonlarında kolistin tedavide tercih edilmektedir. Bu nedenle kolistin duyarlılığının doğru tespit edilmesi önemlidir. Bu amaçla EUCAST ve CLSI'nın ortak önerileri sıvı mikrodilüsyon yöntemidir. Disk difüzyon, agar dilüsyon ve gradiyent test kullanılması önerilmemektedir. Sıvı mikrodilüsyon testi rutin laboratuvarlarda kullanımı zahmetli ve maliyeti yüksek olduğundan laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan otomatize bakteri tanımlama sistemleri bu amaçla kullanılabilir. Ancak bu sistemlerden kategorik uyumu, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek sistemler tercih edilebilir. Bu sistemlerin kalite kontrol suşları ile mutlaka test edilerek kullanılması önerilebilir.



KAYNAKLAR

- [1]. Ionescu MI, Neagoe DS, Chiorean C, Dumitras L, Rus A.(2014).Carbapenem Resistance in Non-Fermentative Bacterial Species and in *Enterobacteriaceae* Isolates from Hospitalized Patients in Different Health-Care Settings. *Clujul Med* 87(4): 235–41.
- [2]. Kanj SS, Kanafani ZA. (2011). Current concepts in antimicrobial therapy against resistant Gram-negative organisms: extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*, carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Mayo Clin Proc*86(3):250-259.
- [3]. Peleg AY, Seifert H, Peterson DL.(2008).Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21:538-82.
- [4]. Chew KL, La MV, Lin RTP, Teo JWP. (2017). Colistin and Polymyxin B Susceptibility Testing for Carbapenem-Resistant and *mcr*-Positive *Enterobacteriaceae*: Comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with Broth Microdilution. *J Clin Microbiol* 55(9):2609-2616.
- [5]. Osei Sekyere J, Govinden U, Bester LA, Essack SY. (2016). Colistin and tigecycline resistance in carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: emerging resistance mechanisms and detection methods. *J Appl Microbiol* 121(3):601-17.
- [6]. Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. (2005). Evolution of colistin as an agent againsts multi-resistant gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents*25:11-25.
- [7].Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 28th Edition. *M100* CLSI document M100-S27.
- [8]. Recommendations for MICdetermination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. *EUCAST* 2016; 22.
- [9]. Lo-Ten-Foe JR, de Smet AM, Diederens BM, Kluytmans JA, van Keulen PH. (2007). Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, Etest, broth microdilution and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 51(10):3726-30.
- [10]. Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, et al. (2015). Comparative evaluation of colistin susceptibility testing methods among carbapenem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 59(8):4625-30.
- [11]. Bergogne-Berezin E. Importance of *Acinetobacter* spp. Ed: Bergogne-Berezin E. *Acinetobacter Biology and Pathogenesis*; 1-85, Springer, Paris, France 2008.
- [12]. Başustaoğlu A, Özyurt M. (1998). Nozokomiyal patojen olarak *Acinetobacter*’lerin mikrobiyolojik, klinik ve epidemiyolojik özellikleri. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*2:88-93.
- [13]. Winn J, Stephen A, William J, Elmer K, Gary P, Schreckenberger P. Gail Woods Koneman’s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6 ed., Lippincott;Washington, Williams & Wilkins 2006: 353-355.
- [14]. Seifert H, Baginski R, Schulze A, Pulverer G. (1993). The distribution of *Acinetobacter* species in clinical culture materials. *Zentralbl Bakteriologie* 279:544-552.
- [15]. French GL, Philips I. Antimicrobial resistance in hospital and nosocomial infections. In: Mayhall CG (ed). *Hospital Epidemiology and Infection Control*. 2nd ed. Lippincott; Philadelphia, Williams & Wilkins, 1999: 1243-64.
- [16]. Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover J.C., Tenover F.C. 9. E.d. Atlas Yayıncılık; Ankara, 2008;770-802.
- [17].Park SY, Choo JW, Kwon SH, Yu SN, Lee EJ, Kim TH, et al. (2013). Risk Factors for mortality in Patients with *Acinetobacter baumannii* Bacteremia. *Infect Chemother* 45(3);325-30.
- [18]. Bahar İH, Esen N. *Acinetobacter* Türleri ve Diğer Gram Negatif Nonfermantatif Basiller. In: Topçu WA, Söyletir G, Doğanay M, eds. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 3 ed. Nobel Tıp Kitabevleri; İstanbul, 2008:2195-201.
- [19]. Akalın H. Çoğul Dirençli Gram Negatif Bakteriler, Ed: Doğanay M, Ünal S. *Hastane İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi; Ankara, 2003:269-287.*
- [20]. Ustaçelebi Ş. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş Kitabevi; Ankara,1999; 472-74.

- [21]. Paterson DL. (2006). Resistance in gram-negative bacteria Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control* 34:20-8.
- [22]. Sligl W, Taylor G, Brindley PG. (2005). Five years of nosocomial Gram-negative bacteremia in a general intensive care unit: epidemiology, antimicrobial susceptibility, and outcomes. *Int J Infect Dis* 10: 320-325.
- [23]. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitapevi; Ankara, 1999; 509-511.
- [24]. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, 9 ed. İzmir: Fakülteler Kitapevi; 1996; 56-64.
- [25]. Aydoğan H, Basustaoğlu A. (2000). Nozokomiyal patojen olarak *Klebsiella* türlerinin mikrobiyolojik, klinik ve epidemiyolojik özellikleri. *Hastan Enfeksi Derg* 4: 135-43.
- [26]. Hill EB, Henry DA, Speert DP. *Pseudomonas*. Murray PR, Boran EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. 9 ed. Atlas kitapçılık; Ankara, 2009; 734-743
- [27]. Vahaboğlu H, Akhan S. *P. aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri. in: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitapevi; İstanbul, 2008; 2175-2186.
- [28]. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitapevi; Ankara, 1999; 551-56.
- [29]. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitapevi; Ankara, 1999; 91-94.
- [30]. Gür D. (1997). Hastane enfeksiyonlarında önem kazanan gram-negatif bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları. *Hastane Enfeksiyonları Dergisi* 1:38-45.
- [31]. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitapevi; Ankara, 1999; 84.
- [32]. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. 2019 EUCAST.
- [33]. Basoli A, Az M, Mazzocchi P, Speranza V, and study group. (1997). Imipenem/silastatin (1,5 g daily) versus Meropenem (3,0 g daily) in patients with intraabdominal infections: Result of prospective, randomized, multicentre trial. *Scand J Infect Dis* 29:503-8.
- [34]. Bimbaum J, Kahan FM, Kroop H. (1985). Carbapenems a new class of beta-lactam antibiotics: Discovery and development of imipenem-cilastatin. *Am J Med* 78 (Suppl 6A):3-21.
- [35]. Yang Y, Bhached N, Bush K. (1995). Biochemical comparison of imipenem, meropenem and biapenem : Permeability, binding to penicillin proteins, and stability to hydrolysis by beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 35:75-84.
- [36]. Edwards JR. (1995). Meropenem: a microbiological overview. *J Antimicrob Chemother* 36 (Suppl A):1-17.
- [37]. Keating GM, Perry CM. (2005). Ertapenem: a review of its use in the treatment of bacterial infections. *Drugs* 65:2151-2178.
- [38]. El-Gamal MI, Oh CH. (2010). Current status of carbapenem antibiotics. *Curr Top Med Chem* 10:1882-1897.
- [39]. Sanders, C.C. (1992). Beta-Lactamases of gram-negative bacteria: new challenges for new drugs. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 14 (5), 1089-1099.
- [40]. Bradford PA. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21 st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbial Rev* 14:933-51.
- [41]. Cornaglia G, Mazzariol A, Fontana R. (2000) The astonishing complexity of antibiotics resistance. *Clin Microbial Infect* 6(Suppl 3):93-4.
- [42]. Pool K. (2004). Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci* 61:2200-23.
- [43]. Murray PR Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Mikhael AP. Antibakteriyel İlaçlara Direnç Mekanizmaları. In: Murray PR Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC eds. *Klinik Mikrobiyoloji*. 9 ed. Washington DC: ASM. 2009; 1114-1145.
- [44]. Boisson, M, Gregoire, N., Couet, W., & Mimoz, O. (2013). Colistin in critically ill patients. *Minerva Anestesiologica* 79:200-208.
- [45]. Nation RL, Li J, Cars O, Couet W, Dudley MN, Kaye KS, et al. (2015). Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. *Lancet Infectious Diseases* 15:225-34.

- [46]. Falagas ME, Kasiakou SK. (2005). Colistin: the revival of polymyxins for the management of the multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*40(9):1333-1341.
- [47]. Sümer Ş, Dikici N. (2010). Kolistin. *Yoğun Bakım Dergisi* 9(4):182-187.
- [48]. Falagas ME, Rafailidis PI, Ioannidou E et al. (2010). Colistin therapy for microbiologically documented multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: a retrospective cohort study of 258 patients. *Int J Antimicrob Agents* 35(2):194-9.
- [49]. Tripodi MF, Durante-Mangoni E, Fortunato R, Utili R, Zarrilli R. (2007). Comparative activities of colistin, rifampicin, imipenem and sulbactam/ampicillin alone or in combination against epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 carbapenemases. *Int J Antimicrob Agents* 30(6):537-40.
- [50]. Zavascki AP, Goldani LZ, Li J. (2007). Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother* 60:1206-1215.
- [51]. Tran TB. (2016). Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of colistin and polymyxin B: are we there yet? *Int J Antimicrob Agents*48(6):592-597.
- [52]. Bergen PJ, Li J, Nation RL. (2011). Dosing of colistin-back to basic PK/PD. *Current Opinion in Pharmacology* 11:464-469.
- [53]. European Centre for Disease Prevention and Control. Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union. 2016 Stockholm: ECDC.
- [54]. Souli M, Galani I, Antoniadou A, et al. (2010). An outbreak of infection due to beta-lactamase *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Clin Infect Dis*50(3):364-73.
- [55]. Monaco M, Giani T, Raffone M, et al. (2014). Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. *Euro Surveill* 19(42):pii20939.
- [56]. Goel G, Hmar L, De MS, Bhattacharya S, Chandy M. (2014). Colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*: report of a cluster of 24 cases from a new oncology center in eastern India. *Infect Control Hosp Epidemiol* 35(08):1076-1077.
- [57]. Qamar S, Shaheen N, Shakoor S, Farooqi J, Jabeen K, Hasan R. (2017). Frequency of colistin and fosfomycin resistance in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from a tertiary care hospital in Karachi. *Infect Drug Resist* 31;10:231-236.
- [58]. Ceren Özkul Koçak, Gülşen Hazırolan. (2019). Karbapeneme Dirençli *Klebsiella pneumoniae* Klinik İzolatlarında Kolistin Direnci. *Türk Mikrobiyoloji Cem Derg* 49(1):17-23.
- [59]. Javed M, Ueltzhoeffer V, Heinrich M, Siegrist HJ, Wildermuth R, Lorenz FR, Neher RA, Willmann M. (2018). Colistin susceptibility test evaluation of multiple-resistance-level *Pseudomonas aeruginosa* isolates generated in a morbidostat device. *J Antimicrob Chemother* 1;73(12):3368-3374.
- [60]. Arroyo LA, García-Curiel A, Pachón-Ibañez ME, et al. (2005). Reliability of the E-test method for detection of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*43(2): 903-5.
- [61]. Tan TY, Ng SY. (2007). Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. *Clin Microbiol Infect* 13(5): 541-4.
- [62]. Somily AM. (2010). Comparison of E-test and disc diffusion methods for the in vitro evaluation of the antimicrobial activity of colistin in multi-drug resistant Gram-negative bacilli. *Saudi Med J* 31(5): 507-11.
- [63]. Hindler JA, Humphries RM. (2013). Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram negative bacilli. *J Clin Microbiol* 51(6): 1678-84.
- [64]. Giani T, Morosini MI, D'Andrea MM, García-Castillo M, Rossolini GM, Cantón R. (2012). Assessment of the Phoenix™ automated system and EUCAST breakpoints for antimicrobial susceptibility testing against isolates expressing clinically relevant resistance mechanisms. *Clin Microbiol Infect*18(11): E452-8.
- [65]. Rojas LJ, Salim M, Cober E, et al. (2017). Colistin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Laboratory detection and impact on mortality. *Clin Infect Dis* 64(6):711-8.

- [66]. Lee SY, Shin JH, Lee K, et al. (2013). Comparison of the Vitek 2, MicroScan, and Etest methods with the agar dilution method in assessing colistin susceptibility of blood stream isolates of *Acinetobacter* species from a Korean university hospital. *J Clin Microbiol* 51(6): 1924-6.
- [67]. Nhung PH, Miyoshi-Akiyama T, Phuong DM, et al. (2015). Evaluation of the Etest method for detecting colistin susceptibility of multidrug-resistant Gram-negative isolates in Vietnam. *J Infect Chemother* 21(8): 617-9.
- [68]. Shelby Simar, BS, Diane Sibley, BS, Deborah Ashcraft, BS, George Pankey, MD. (2017). Colistin and Polymyxin B Minimal Inhibitory Concentrations Determined by Etest Found Unreliable for Gram-Negative Bacilli. *Ochsner Journal* 17:239-242.
- [69]. E. Matuschek, J. Åhman, C. Webster, G. Kahlmeter. (2018). Antimicrobial susceptibility testing of colistin-evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect* Aug; 24(8):865-870.
- [70]. Sınırtaş M, Akalın H, Gedikoğlu S. (2009). Investigation of colistin sensitivity via three different methods in *Acinetobacter baumannii* isolates with multiple antibiotic resistance. *Int J Infect Dis* 13(5): e217-20.
- [71]. Nazmiye Ülkü Tüzemen, Kadir Efe, Halis Akalın, Cüneyt Özakin. (2019). Otomatize Sistemde Kolistin Direnci Saptanan İzolatların Gradyan Difüzyon Yöntemi ve Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemiyle Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi. *Klinik Dergisi* 32(1): 57-61.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Ceren Hekimoğlu

Doğum Tarihi :19.08.1992

E-mail : cerenhkmglu@mersin.edu.tr

Öğrenim Durumu :

| Derece | Bölüm/Program | Üniversite | Yıl |
|---------------|---|-------------------------------|-----------|
| Lisans | Biyoloji / Fen | Karadeniz Teknik Üniversitesi | 2010-2014 |
| Yüksek Lisans | Mikrobiyoloji/ Sağlık Bilimleri Enstitüsü | Mersin Üniversitesi | 2017-2019 |
| Doktora | | | |

Görevler :

| Görev Ünvanı | Görev Yeri | Yıl |
|--------------|------------|-----|
| | | |

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

- 1.
- 2.
- 3.