



T.C. SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

ANKARA BİL KENT ŞEHİR SUAM

TİBBİ MİKROBİYOLOJİ KLİNİğİ

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN ‘*KLEBSIELLA PNEUMONIAE*’ İZOLATLARINDA KOLİSTİN DUYARLILIğININ DEğERLENDİRİLMESİNDE ALTIN STANDART MİKRODİLÜSYON VE GÜNCEL OTOMATİZE TİCARİ SİSTEMİN PERFORMANS KİYASLAMASI VE *mcr* GEN VARLIğININ ARAŞTIRILMASI

Dr. Irmak ÖZKUBAT KORKMAZ

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

ANKARA/ 2024



T.C. SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

ANKARA BİL KENT ŞEHİR SUAM

TİBBİ MİKROBİYOLOJİ KLİNİĞİ

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN ‘*KLEBSIELLA*
PNEUMONIAE’ İZOLATLARINDA KOLİSTİN
DUYARLILIĞININ DEğERLENDİRİLMESİNDE ALTIN
STANDART MİKRODİLÜSYON VE GÜNCEL OTOMATİZE
TİCARİ SİSTEMİN PERFORMANS KİYASLAMASI VE *mcr*
GEN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Dr. Irmak ÖZKUBAT KORKMAZ

Danışman: Prof. Dr. Bedia DİNÇ

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

ANKARA/ 2024

TEŞEKKÜR

Öncelikle akademik alanda ilerlememi teşvik eden ve destekleyen değerli tez danışman hocam Prof. Dr. Bedia DİNÇ'e yoğun programına rağmen her zaman yanımda olduğunu hissettirdiği ve bu süreçte gösterdiği rehberlik için içtenlikle teşekkür ederim.

Tez konumu belirlemeye başladığım günden beri, Prof. Nilay ÇÖPLÜ'nün engin bilgi ve deneyimlerinden faydalanarak tezimi planladım. Özellikle antibiyotik duyarlılık testleri konusundaki uzmanlığı, tezime olan katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Bölümdeki diğer hocalarıma, uzman hekimlerimize katkılarından dolayı teşekkür ederim. Her birinizin emeği ve desteği, mesleki gelişimimde büyük bir rol oynadı.

Laboratuvarda birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım bütün teknisyen ablalarım ve arkadaşlarıma bana destekleri için çok teşekkür ederim.

Asistanlık sürecimde kıdemliden çok kız kardeşim gibi hissettiğim asistan arkadaşlarıma özel bir teşekkür etmek istiyorum. Tez döneminin zorlu ve “tuhaf” problemleriyle uğraşırken arkamda olduğunuzu ve birlikte başardığımızı hissetmek benim için çok kıymetliydi.

Uzaktan bakıldığında belki de yetiştirirken kolay baş edilebilen bir evlat gibi gözükssem de Tıp fakültesi ve asistanlık sürecinde yaşadığım pek çok problemde beni asla yalnız hissettirmeyen, merhametli, iyi kalpli ve haksızlıklara boyun eğmeyen biri olmamı sağlayan canım aileme; annem Yeşim ÖZKUBAT, babam Naki ÖZKUBAT, kardeşim Yankı ÖZKUBAT'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu süreçte beni motive eden, destekleyen ve bana güvende olduğumu hissettiren hayat arkadaşım Deniz Serim KORKMAZ'a, zor günlerimde bana önce yürümeyi sonra koşmayı öğrettiği için minnettarım.

Hepinize içtenlikle teşekkür ederim.

Saygılarımla,

Dr. Irmak ÖZKUBAT KORKMAZ

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	vii
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	3
2.1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> Genel Özellikler	3
2.1.1.1. <i>K. pneumoniae</i> virülans faktörleri	3
2.1.1.2. <i>K. pneumoniae</i> 'nin Patogenezi	5
2.1.1.3. <i>K. pneumoniae</i> İlişkili Enfeksiyonlar	6
2.1.2. <i>K. pneumoniae</i> 'nin Laboratuvar Tanısı	7
2.1.3. <i>K. pneumoniae</i> 'da Tedavi ve Gelişen Antibiyotik Direnci	8
2.2. KOLİSTİN	11
2.2.1. Kolistinin Genel Özellikleri	11
2.2.1.1. Kolistinin etki mekanizması	12
2.2.1.2. Kolistinin etki spektrumu	13
2.2.1.3. Kolistinin klinik kullanımı	13
2.2.1.4. Kolistinin Yan Etkileri	14
2.2.2. Kolistin Direnci	14
2.2.3. Antibiyotik Direncinin Genetik Temeli	15
2.2.3.1. Kolistin direnç mekanizmaları	15
2.2.3.1.1. PmrA/PmrB ve PhoP/PhoQ gibi çift bileşenli sistemler ve <i>mgrB</i> :	16
2.2.3.1.2. Lipid A biyosentezini yapan genlerin (<i>lpxA/C/D</i>) inaktivasyonu ile LPS kaybı:	17
2.2.3.1.3. CrrAB:	17
2.2.3.1.4. Dışa Atım Pompaları:	17

2.2.3.1.5. <i>mcr</i> Genleri:	17
2.3. KOLİSTİN DUYARLILIK TESTLERİ.....	22
2.3.1. Kolistin Antibiyotik Duyarlılık Testleri	22
2.3.1.1. Kolistin standart sıvı mikrodilüsyon yöntemi	22
2.3.1.2. Antibiyotik duyarlılık testleri için kullanılan otomatize sistemler.....	23
2.3.1.3. <i>mcr</i> gen tespit yöntemleri.....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	26
3.1. KLEBSIELLA PNEUMONIAE İZOLATLARININ TOPLANMASI VE SAKLANMASI.....	26
3.1.1. İzolatların İdentifikasyonu	26
3.1.1.1. MALDI-TOF MS	27
3.1.2. Kolistin Antibiyotik Duyarlılık Tespiti.....	28
3.1.2.1. Kolistin standart sıvı mikrodilüsyon yöntemi	28
3.1.2.1.1. Kolistin stok hazırlanması:.....	28
3.1.2.1.2. Mueller-Hinton sıvı besiyeri hazırlanması:.....	29
3.1.2.1.3. Mikrodilüsyon mikropak hazırlanması:	29
3.1.2.1.4. İnokulum hazırlanması:.....	29
3.1.2.1.5. Mikroplaga inokulum eklenmesi:	29
3.1.2.2. Otomatize ticari sistem VITEK-2	30
3.2. MOBİL KOLİSTİN DİRENÇ (MCR 1-10) GENİ VARLIĞININ qPCR İLE ARAŞTIRILMASI	32
3.2.1. Kültürden DNA İzolasyonu	32
3.2.1.1. Hızlı Nükleik asit Ekstraksiyon Kit Bileşenleri	32
3.2.1.2. Sarf Malzemeler	32
3.2.1.3. DNA izolasyon aşamaları	32
3.2.2. <i>mcr</i> 1-10 Kolistin Direnç Geni Analizi.....	33
3.2.2.1. Kit İçeriği	33
3.2.2.2. Sarf Malzemeler ve Kullanılan Ekipmanlar.....	33
3.2.2.3. qPCR aşamaları	35
3.2.2.4. Sonuçların Yorumlanması.....	37
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	38
3.3.1. Duyarlılık Analizlerinde Kullanılan Tanımlar ve Formüller	38

3.3.2. Açıklamalar.....	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. İZOLATLARIN DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİ.....	40
4.2. STANDART SIVI MİKRODİLÜSYON İLE TİCARİ OTOMATİZE	
SİSTEM DUYARLILIK SONUÇLARI	41
4.2.1. SMD ile VITEK 2 Kolistin Duyarlılık Sonuçları	41
4.2.2. Otomatize Sistem ile ÇİD Bakterilerin Tedavisinde Kullanılan Antibiyotik	
Duyarlılık Sonuçları.....	42
4.2.3. Otomatize Sistemin Kolistin Duyarlılık Performansının Değerlendirilmesi	
.....	44
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ.....	68
7. KAYNAKLAR	69

KISALTMALAR

AST: Antimicrobial susceptibility testing/Antibiyotik duyarlılık testleri

BH: Büyük Hata

CAT: Colistin Agar Test/Kolistin agar test

CBDE: Colistin broth disc elution/Kolistin sıvı disk elüsyon

ÇBH: Çok büyük hata

ÇİD: Çoklu ilaç direnci

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute/Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü

CPKP: Carbapenemase-producing *K. pneumoniae*/Karbapenem dirençli *K. pneumoniae*

CPS: Capsular polysaccharide/Polisakkarit kapsül

CHINET: China Antimicrobial Surveillance Network/Çin Antimikrobiyal Gözetim Ağı

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EARS-Net: European Antimicrobial Resistance Surveillance Network/Avrupa Antimikrobiyal Direnç Gözetim Ağı

EU: Esansiyel Uyum

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing/Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi

GSBL: Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz

IDSa: Infectious Diseases Society of America/Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği

IC: Internal Control/İnternal kontrol

ISO: International Organization for Standardization/Uluslararası Standartlar Organizasyonu

KU: Kategorik uyum

L-Ara4N: 4-amino-4-deoksi-l-arabinoz

LC-MS: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/ Sıvı kromatografi kütle spektrometrisi

LPS: Lipopolisakkarit

MALDI-TOF MS: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight/Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi

mcr: Mobilized colistin resistance/Mobil kolistin direnci

MH: Mueller-Hinton

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu

NPD: Negatif prediktif değer

PCR: Polymerase Chain Reaction/Polimeraz zincir reaksiyonu

PEtN: Phosphoethanolamine/fosfoetenolamin

PPD: Pozitif prediktif değer

RBAST: RNA-based AST/RNA bazlı antibiyogram duyarlılık testi

SMD: Sıvı mikrodilüsyon

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: <i>K. pneumoniae</i> Tanısında Kullanılan Biyokimyasal Testler	7
Tablo 2: <i>mcr</i> 1-10 Gen Varyantları Hakkında Bilgiler	20
Tablo 3: Kolistin Duyarlılık Tespitinde Fenotipik ve Moleküler Yöntemler	24
Tablo 4: Üretici Firmanın Forward ve Reverse Primer Tasarımı	34
Tablo 5: PCR ile Araştırılan Gen Bölgeleri Ve Boyalar	35
Tablo 6: Reaksiyon İçeriği ve Miktarlar	36
Tablo 7: qPCR Termal Döngü Basamakları:	36
Tablo 8: Araştırmaya Alınan Hastaların Temel Özellikleri	40
Tablo 9: Araştırmaya Dahil Edilen İzolatların Kolistin Duyarlılık Profili	42
Tablo 10: İzolatların VITEK 2 ile Diğer Antibiyotik Duyarlılık Analiz Sonuçları	43
Tablo 11: SMD ve VITEK 2 Yöntemlerinin Kolistin MİK Sonuçları	44
Tablo 12: SMD ve VITEK 2 Sonuçlarının Uyumlulukları	44
Tablo 13: VITEK 2 Yönteminin SMD'a Göre Duyarlılık Analizleri	45
Tablo 14: SMD ve VITEK 2 Testlerinin Uyum Değerlendirmesi	45
Tablo 15: Kolistin Duyarlılığı ile Hastaların Temel Özellikleri Arasındaki İlişki	46
Tablo 16: İzolat Tipine Göre Kolistin Duyarlılıkları	46
Tablo 17: Kolistin Duyarlılığı ile Diğer Antibiyotik Duyarlılıkları Arasındaki İlişki	47

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: <i>K. pneumoniae</i> kolonilerinin %5 koyun kanlı agar besiyerindeki görünümü	3
Şekil 2: Kolistinin etki mekanizması.....	13
Şekil 3: Kolistine karşı gelişen direnç mekanizmaları	16
Şekil 4: Otomatize örnek işleme ve inkübasyon cihazı.....	27
Şekil 5: MALDI-TOF MS metal kart	28
Şekil 6: PCR çalışmasında pozitif kontrol ve izolat sonuçlarının yorumlanması.....	38



ÖZET

Klinik Örneklerden İzole Edilen '*Klebsiella pneumoniae*' İzolatlarında Kolistin Duyarlılığının Değerlendirilmesinde Altın Standart Mikrodilüsyon ve Güncel Otomatize Ticari Sistemin Performans Kıyaslaması ve *mcr* Gen Varlığının Araştırılması

Amaç: Kolistin özellikle çoklu ilaca dirençli Gram negatif bakterilerin tedavisinde son çare olarak kullanılmaktadır. Standart sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemi, kolistin duyarlılık testlerinde EUCAST tarafından referans olarak kabul edilir. Ticari otomatize sistemler ise hızlı sonuçlar, tekrarlanabilirlik ve iş yükünün azalması gibi avantajlar sunar. Ancak daha önceki çalışmalar, çok büyük hata oranlarının yüksek olması sebebiyle ticari otomatize sistemleri kolistin duyarlılık tespiti için önermemiştir.

Günümüzde hayvancılık sektöründe yoğun kullanımı sonucu bakteriler kolistine karşı da direnç geliştirmeye başlamıştır. Direnç mekanizmaları arasında PmrAB ve PhoPQ gibi çift bileşenli sistemlerin aktivasyonu, lipid A biyosentezini etkileyen mutasyonlar, dışa atım pompaları ve plazmid aracılığıyla mobil kolistin direnç genleri (*mcr*) bulunmaktadır. *mcr* genleri, kolistine direnç gelişiminde önemli bir tehdit oluşturmakta ve türler arası kolistin direncinin yayılımına neden olup, endişe yaratmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, *K. pneumoniae* izolatlarında kolistin duyarlılık testi için kullanılan ticari otomatize sistemin referans yöntemle performansının karşılaştırılması ve izolatlarda *mcr* gen varlığını PCR ile saptayarak, hastane enfeksiyonlarındaki kolistin direncinin ve etkili tanı yöntemlerinin belirlenmesine katkı sağlamaktır.

Gereç ve Yöntem: Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Temmuz 2023 ile Aralık 2023 tarihleri arasında ulaşan klinik örneklerden (apse, kan, idrar, vs.) elde edilen ve MALDI- TOF MS ile tanımlanan 284 *Klebsiella pneumoniae* izolatında, kolistin standart sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemi ve VITEK 2 otomatize sistemi kullanılarak kolistin duyarlılık testi gerçekleştirildi. Kolistin dirençli izolatlar, multipleks qPCR kullanılarak *mcr* (1-10) gen varlığı açısından incelendi.

Bulgular: Hastaların yaş ortalaması 61,5±24,1 idi ve %58,1 erkekti. Kolistin duyarlılığı açısından, izolatların %52,1'i SMD'a göre duyarlı bulunurken, VITEK 2 ile bu oran %49,3 olarak belirlendi. Karşılaştırma sonuçlarına göre, VITEK 2 ile SMD yöntemi arasında KU

oranı %96,6 ve EU oranı %93,0, BH oranı %3,3 ÇBH oranı %0,1 olarak belirlendi. Kolistin direnci olan izolatlarda eravasiklin ve seftazidim avibaktam haricinde diğer antibiyotiklere karşı da %90'ın üzerinde direnç saptandı. Çalışılan 136 kolistin dirençli izolatın hiçbirinde *mcr* 1-10 geni saptanmadı.

Sonuç: Yoğun bakımda yatan hastalarda elde edilen *K. pneumoniae* izolatlarının %75,73'ü SMD'a göre kolistin dirençlidir. Bu durum, hastane enfeksiyonlarının yönetiminde endişe vermektedir. Çalışmamızda diğer çalışmalardan farklı olarak, ticari otomatize sistemin dirençli sonuç vermeye yani büyük hata yapmaya daha yatkın olduğu bulunmuştur. VITEK2 KU, EU ve ÇBH açısından kabul edilebilir oranlara sahipken BH oranları kabul edilebilir sınırların dışında bulunmuştur. Diğer klinik çalışmalarla benzer olarak kolistin dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında *mcr* geni tespit edilmemiştir.

Anahtar Kelimeler: *Klebsiella pneumoniae*, kolistin, *mcr*, ticari otomatize sistem, qPCR

ABSTRACT

Performance Comparison of Gold Standard Microdilution and Current Automated Commercial System in the Evaluation of Colistin Susceptibility in '*Klebsiella Pneumoniae*' Isolates from Clinical Samples and Investigation of *mcr* Gene Presence

Objective: Colistin is increasingly used as a last choice treatment for multidrug-resistant Gram-negative bacteria. However, its efficacy is threatened by the emergence of resistance mechanisms, including the spread of mobile colistin resistance (*mcr*) genes. This study aims to compare the performance of a commercial automated system with the reference method for colistin susceptibility testing and to determine the presence of *mcr* genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates.

Materials and Methods: A total of 284 *Klebsiella pneumoniae* isolates obtained between July 2023 and December 2023 were subjected to colistin susceptibility testing using both the standard broth microdilution method and the VITEK 2 automated system. Isolates were collected from various clinical specimens. Phenotypically colistin resistant isolates were screened for the presence of *mcr* (1-10) genes using multiplex qPCR.

Results: The average age of patients was 61.5±24.1 years, with 58.1% being male. While 52.1% of isolates were susceptible to colistin according to SMD, this rate was 49.3% with VITEK 2. The comparison revealed an acceptable very major error (VME) rate of 0.1%, essential agreement (EA) of 93.0%, and categorical agreement (CA) of 96.6% between VITEK 2 and SMD. But an unacceptable major error (ME) rate of 3.3% was also observed in the comparison between VITEK 2 and SMD. Isolates resistant to colistin showed resistance rates of over 90% against other antibiotics except eravacycline and ceftazidime-avibactam. Of the 136 studied colistin resistant isolates, none harboured *mcr*1-10 gene.

Conclusion: A concerning prevalence of colistin resistance was observed among *K. pneumoniae* isolates from ICU patients. In contrast to previous studies, our research indicates a higher likelihood of colistin-resistant outcomes with the automated system, suggesting an increased propensity for ME. Although VITEK 2 demonstrated acceptable VME, EA and CA, the elevated ME rates underscore the need for caution. Similarly to other studies, *mcr* gene was not detected in colistin resistant *K. pneumoniae* isolates.

Key Words: *Klebsiella pneumoniae*, colistin, commercial automated system, antimicrobial resistance, *mcr* 1-10.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Penisilinin 1940 yılında kullanılmaya başlanması, mikroorganizmaların tedavisinde büyük umutlar yaratmıştır. Ancak mikroorganizmaların adaptasyon kabiliyetleri, yeni antibiyotiklerin piyasaya sürülmesini takiben kısa sürede direnç geliştirmesiyle dikkat çekici boyutlara ulaşmıştır. Son zamanlarda, çoklu ilaç dirençli (ÇİD) Gram-negatif bakterilere karşı gelişen enfeksiyonların artmasıyla birlikte, kolistin nefrotoksik ve nörotoksik olmasına rağmen tedavi seçenekleri arasında yeniden önemli bir yer edinmiş ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır.

Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (IDSA) tarafından potansiyel çoklu ilaca direnç mekanizmaları ve virülansları nedeniyle özellikle tehlikeli olarak tanımlanan ve dikkatle takip edilmesi gereken altı tür ‘ESKAPE’ olarak belirtilmiş olup, *Klebsiella pneumoniae* bunlardan biridir. *K. pneumoniae*’da artan karbapenem direnci kaygı uyandırmaktadır ve tedavide kolistin son seçenek olarak tercih edilmektedir. Ancak tarım ve hayvancılık sektörlerindeki kontrolsüz antibiyotik kullanımı ile COVID-19 pandemisi sırasında artan yoğun bakım hasta sayısı gibi faktörler, antibiyotiklere ve özellikle kolistine karşı direncin gelişimine dikkat çekmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), kolistini kritik öneme sahip antimikrobiyallerden biri olarak tanımlamıştır.

Ülkemizin Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi 2016 Yıllık Raporu’na göre *K. pneumoniae* izolatlarında kolistin direnci %17 olarak saptanmıştır. Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı 2022 raporuna göre ise Türkiye genelinde, sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlarda saptanan *K. pneumoniae* izolatlarında kolistin direnci %31,21 olarak tespit edilmiştir.

Günümüzde oldukça önemli bir problem olan antibiyotiklere karşı gelişen direnç, antibiyotik duyarlılık testlerinin hızlı ve doğru şekilde sonuçlanmasını gerektirmektedir. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) daha hızlı olan ticari otomatize yöntemlerle kolistin duyarlılığının saptanmasını önermemektedir. Standart mikrodilüsyon yöntemi (SMD) kolistin

antibiyotik duyarlılık testlerinde altın standarttır ve laboratuvarımızda rutin olarak uygulanmaktadır. Ancak altın standart yöntemin uygulaması zaman alıcıdır ve zahmetlidir. Türkiye'nin en büyük hastanesi olan Ankara Bilkent Şehir Hastanesi'nde yoğun bakım ve serviste yatan hasta sayısının yoğunluğu, bu zaman alıcı sıvı mikrodilüsyon testinin uygulanabilirliğini sorgulamamıza neden olmaktadır. Çalışmamız; kolistin duyarlılık tayininde piyasada nispeten daha yeni olan otomatize ticari sistem ile çalışıldığında, sonuç verme süresini 1 gün kadar kısaltarak daha hızlı tanı ve klinikte hastanın doğru antibiyotik tedavisine ulaşımını hızlandırmayı hedeflemektedir.

Kolistine karşı gelişen dirençte kromozomal genler tarafından oluşan pek çok mekanizma tanımlanmıştır. Kolistin direncine neden olan ve 2016 yılında gündeme gelen *mcr-1* (mobil kolistin direnci-1) geni, transfer edilebilir bir plazmid üzerinde konumlanmıştır. Plazmid aracılı gen transferi, antibiyotik direnç genlerinin diğer tür bakterilere aktarılmasına yol açmaktadır. Hastanemiz gibi büyük hastanelerde kolistin direncinin artışı ve yayılımında *mcr* geni oldukça önemlidir.

Bu çalışmanın amacı, mevcutta kullandığımız altın standart sıvı mikrodilüsyon yöntemi ve güncel otomatize ticari sistem yöntemin kolistin duyarlılık sonuçlarını kıyaslayarak, sonuçlar doğrultusunda hastanemiz laboratuvarında, hızlı ve doğru tanı yöntemini belirlemektir. Ek olarak hastanemiz klinik örneklerinden izole edilen *K. pneumoniae* izolatlarında “*mcr* (1-10)” gen varlığı PCR ile araştırılarak, *mcr* geni için rutin tanımlamaya gidilmesinin faydalı olup olmayacağı ve hasta izolasyonu gerektirip gerektirmeyeceği konusunun netleştirilmesi planlanmaktadır.

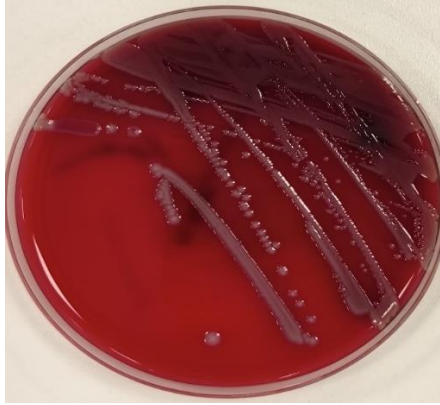
2. GENEL BİLGİLER

2.1. KLEBSIELLA PNEUMONIAE

2.1.1. *Klebsiella pneumoniae* Genel Özellikler

Geçmişte Friedlander basili olarak bilinen *Klebsiella* cinsi, Carl Friedlander tarafından 1882 yılında ilk kez tanımlandığı için uzun süre bu şekilde anıldı. 19. yüzyılda ise, Alman mikrobiyolog Edwin Klebs'in adını aldı (1).

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*), *Enterobacteriaceae* ailesine ait olup, çevrede (su, toprak vb.) yaygın olarak bulunur. Belirgin bir polisakkarit kapsülle çevrili ve hareketsiz, oksidaz-negatif olan bakteri, Gram-negatif basil morfolojisindedir. İnsanda orofarengeal ve gastrointestinal mukozalarda kolonize olan bu bakteri, standart laboratuvar ortamında iyi ürer. Büyüme sıcaklığı 35 ila 37 °C arasında olup, optimal pH 7.2'dir. Kültürde mukoid formda koloniler göze çarpar. Fakültatif anaerobik özellik gösterir ve çoğu izolat, tek karbon kaynağı olarak sitrat ve glukozu, tek azot kaynağı olarak ise amonyağı kullanır (1,2).



Şekil 1: *K. pneumoniae* kolonilerinin %5 koyun kanlı agar besiyerindeki görünümü

2.1.1.1. *K. pneumoniae* virülans faktörleri

K. pneumoniae'nin virülansını esas olarak konak ve bakteri arasındaki etkileşimler belirler. Temel olarak dört virülans faktörü tanımlanmıştır. Bunlar; fimbria, siderefor, lipopolisakkarit yapı ve kapsüldür. Başrolü oynayan yapılar; lipopolisakkarit (LPS) ve polisakkarit kapsüldür (CPS). LPS, lipid A, core ve O-polisakkarit antijeninden oluşur;

bu bileşenler *K. pneumoniae*'nin kompleman aracılı fagositozdan kaçması için esastır. LPS, komplemanı aktive edebildiğinden, C3b LPS molekülleri üzerinde biriktirilir. Bununla birlikte, C3b, en uzun O-polisakkarit yan zincirlerine sabitlendiğinden bakteri hücre zarından uzak tutulmuş olur ve böylece, litik membran atak kompleksi (C5b-C9) oluşumu engellenir ve membran hasarı ve hücre ölümü gerçekleşmez (2).

Asidik polisakkarit kapsül geniş çubuklar halinde fibriler yapıları ile bakteri yüzeyini büyük bir tabaka şeklinde kaplar ve bu yapı hücreye fiziksel bir bariyer sağlayarak bakterinin fagositozdan korunmasını sağlar (2).

Klebsiella spp. kapsül polisakkaritlerinin, fagositleri engelleme yeteneği dışında, makrofajların in vitro diferansiyasyonunu ve fonksiyonel kapasitesini engellediği gösterilmiştir (2,3). Bu bağlamda, CPS'nin büyük ölçüde bakterinin hayatta kalma ve konakta hastalık oluşturma kapasitesinden sorumlu olduğu söylenebilir.

LPS ve CPS'nin yanı sıra, fimbrial ve non-fimbrial adezinlerin ve demir yakalama sistemlerinin varlığı da virülans için diğer önemli faktörlerdir. Fimbrialar hücre yüzeyinden uzanan saç benzeri protein uzantılarıdır ve *K. pneumoniae*'nin biyolojik olmayan yüzeylere yapışmasını kolaylaştırarak kateterle ilişkili enfeksiyonlara neden olurlar (4). Fimbriaların temel özelliği, farklı hayvan türlerinin eritrositlerini aglütine etme yetenekleridir. Tip 1 fimbria, bakterilerin konak organizmanın mukozal yüzeylerine bağlanmasına aracılık eden bir adezin türüdür ve pek çok *Enterobacteriaceae*'da bulunur (5). Mannoza duyarlı bir hemaglütinindir. Tip 1 fimbria seçici olmadan mukozal yüzeylere bağlanır ve bakteriyel kolonizasyonu başlatır. Ancak, bu yapı bir kez konakçı dokuya girdikten sonra, lektinofagositozdan bağımsız bir lökosit aktivitesini tetikler ve bakteri ile lökosit arasındaki etkileşimi zayıflatır. Bu sayede, adezinler, spesifik mannoz içeren lökosit reseptörlerine bağlanarak lökosit aktivasyonunu tetikler. Tip 3 fimbria ise daha spesifik bir şekilde endotel hücrelerine, solunum yolu epiteline ve üroepitelyal hücrelere yapışır. Ek olarak *K. pneumoniae*'da biyofilm oluşumuna temel olarak tip 3 fimbria aracılık eder (5-7).

Bakterilerin çoğalması ve büyümesi için demir elde etme yeteneği hayati öneme sahiptir. *K. pneumoniae*'da 4 tip konak hücre proteininden demir taşıyıcıları bulunur. Bu sideroforlar: enterobaktin, yersiniabaktin, salmokein ve aerobaktindir. Enterobaktin, virülansı yüksek izolatlarda bulunur ve demire en yüksek afiniteye

sahiptir. Salmokelin, invaziv hastalıklarla ilişkilidir ve yüksek virülansa sahip olan *K. pneumoniae* izolatlarının sebep olduğu ciddi toplum kaynaklı enfeksiyonlara, örneğin karaciğer apsesi ve pnömoniye yol açar (8).

Yukarıda bahsi geçen yapılar dışında *K. pneumoniae* virülansı ile ilgili gen kümeleri de tanımlanmış olup, bu gen kümelerinden Pks (Poliketid Sentaz) gen kümelerinin, kan dolaşımı enfeksiyonları ile ilişkisi tespit edilmiştir. Bu gen kümeleri tarafından üretilen kolibaktin de konakçı DNA hasarı süreçlerine müdahale eden ve virülansı arttıran bir toksindir (2,9).

2.1.1.2. *K. pneumoniae*'nin Patogenezi

K. pneumoniae patojenitesini oluşturan birçok yeteneğe sahiptir ve bunlar; hücrel bağışıklığı doğrudan ve dolaylı olarak değiştirme, bakteriyi fagositozdan koruma, CPS aracılığıyla bağışıklık tepkisini değiştirme ve hücrelere reseptörler aracılığıyla bağlanma özellikleridir (10).

K. pneumoniae, patogenezinde önemli olan bir belirteç de mikroorganizmanın patotipidir. *K. pneumoniae* fenotipik görünüm ve genetik belirteçlere dayalı olarak klasik ve hipervirülan patotiplere ayrılır. Klasik tip *K. pneumoniae* genellikle kültürde hiperviskozite göstermez. Ayrıca nozokomiyal enfeksiyonu olan ya da bağışıklığı baskılanmış, yaşlı hastalarda idrar yolu enfeksiyonu, sepsis, karın içi enfeksiyon ve yara enfeksiyonu ile ilişkilendirilmiştir. Hipervirülan tip genellikle sağlıklı kişilerde ciddi enfeksiyon oluşturur (11). Hipervirülan *K. pneumoniae* (hvKP) ilk olarak 1980'lerde ve 1990'larda sırasıyla Tayvan'da ve diğer Asya ülkelerinde rapor edilmiştir, ancak son zamanlarda daha geniş bir yayılım görülmektedir (12). Bu bakteriye özel bir sendrom belirlenmiştir. Bu sendrom piyojenik karaciğer apseleri ve vücutta başka organlara da yayılabilen toplum kaynaklı *K. pneumoniae* enfeksiyonu şeklindedir. HvKP izolatları besiyerinde hiperviskoz koloniler oluştururlar (1). Günümüze kadar *Klebsiella spp.* için 78 kapsül serotip belirlenmiştir. HvKp suşları, K1, K2, K16, K28, K57 ve K63 kapsül tiplerini içerir. En sık görülen K1 ve K2 tiplerine ip testi yapıldığında besiyerinde 5 mm'den daha uzun bir viskoz ip oluştururlar (13). HvKp'nın çok mukus üreten fenotipinin plazmid üzerinde bulunan kapsül regülasyon geni olarak bilinen RmpA'yı taşıdığı ve bu sayede karaciğer apsesi gibi pürülan doku enfeksiyonu ile bağlantılı olduğu bulunmuştur (14).

2.1.1.3. *K. pneumoniae* İlişkili Enfeksiyonlar

K. pneumoniae idrar yolu enfeksiyonu, pnömoni, yara yeri enfeksiyonu piyojenik karaciğer apsesi, enterit, menenjit, erişkin ve yenidoğanda sepsis gibi pek çok hastalığın etkenidir (2,15). *K. pneumoniae* toplumda bireylerin nazofarenkslerinde (%1-6 aralığında) kolonize olabilirken, yatan hastalarda bu oranlar %20'lere kadar çıkabilir. Bu kolonizasyon, özellikle hastanede yatan ve alkolizm, diabetes mellitus ve KOAH gibi altta yatan hastalıklara sahip bireyler için solunum yolu enfeksiyonu kaynağı olabilir (1).

Bugün, *K. pneumoniae* pnömonisi Amerika Birleşik Devletleri'nde hastane kaynaklı pnömoninin en yaygın nedeni olarak kabul edilmekte olup, bu organizma tüm nozokomiyal bakteriyel enfeksiyonların %3 ile %8'inden sorumludur. *K. pneumoniae* kaynaklı pnömonide, akciğerde hemoraji ve geniş nekroz alanı nedeniyle balgam kiremit kırmızısı ya da kuş üzümü jölesi gibi mukoid ve yoğun olur. Bu hastalarda sıklıkla plörit de gelişir (1). Klinik bir çalışmada, *K. pneumoniae* 'ye bağlı pnömoni vakalarında hayatta kalma oranının yaklaşık %50 olduğu gösterilmiştir (16). Geçmişte komorbiditesi olan kişilerde toplum kökenli pnömoninin önemli bir etkeni olan bu bakteri, günümüzde kontrolsüz antibiyotik kullanımı sonucu gelişen antibiyotik direncinde artış ile hastane ilişkili enfeksiyonların önemli bir sebebi haline gelmiştir. Ayrıca günümüzde antibiyotiğe dirençli toplum kökenli *K. pneumoniae* enfeksiyonlarında da artış gözlemlenmektedir (14,15). Aynı şekilde, hastane personelinin elleri ve yatan hastalarda değişen oranlarda görülen rektal kolonizasyon, hastane enfeksiyonları için ciddi bir kaynak oluşturur (17,18). Özellikle çoklu ilaç dirençli *K. pneumoniae*'nin neden olduğu hastane enfeksiyonları endişe verici bir boyuta ulaşmıştır. Bunun yanı sıra *K. pneumoniae* Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (IDSA) tarafından potansiyel çoklu ilaca direnç (ÇİD) mekanizmaları ve virülansları nedeniyle özellikle tehlikeli olarak tanımlanan altı türden biridir. Bu altı tür, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* türlerinin kısaltması olan 'ESKAPE' patojenleri olarak adlandırılmaktadır. ESKAPE patojenleri, antibiyotiklerin bakterisidal etkisinden kaçıp kurtulabilen türleri içerir. Bu patojenik bakteri grubu, çoğunlukla çocuklar, bağışıklık sistemi baskılanmış bireyler

ve kritik hastalar gibi özellikli gruplarda ölümcül veya yaşamı tehdit eden enfeksiyonlara neden olmaktadır (19,20).

2.1.2. *K. pneumoniae*'nin Laboratuvar Tanısı

Enterobacteriaceae ailesinden, *Klebsiella*. cinsi, Gram-negatif, kapsüllü, 0,5 ila 1,5 µm genişliğinde ve 1 ila 6 µm uzunluğunda bir basildir. Standart mikrobiyoloji laboratuvar koşullarında kolayca üreyen *K. pneumoniae* MacConkey besiyerinde büyük mukoid, laktoz fermentasyonu ve asit üretimi sebebiyle mor-pembe renkli koloniler oluşturur (1). Biyokimyasal testlerinde ornitin dekarboksilaz negatif ancak lizin dekarboksilaz pozitifdir. Sitrat testi *Klebsiella* türlerinde pozitifdir. Bu bakterilerde genellikle Voges-Proskauer testi de pozitifdir. Üreyi yavaş da olsa hidrolize ederler (2). Triptofandan indol üretimi *K. pneumoniae*'da negatif iken *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*)'da pozitifdir (1). *K. pneumoniae* biyokimyasal özellikleri Tablo 1'de belirtilmiştir.

Tablo 1: *K. pneumoniae* Tanısında Kullanılan Biyokimyasal Testler

Biyokimyasal Testler	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>
Hareket	Negatif	Negatif
İndol	Negatif	Pozitif
Lizin	Pozitif	Negatif
Voges-Proskauer	Pozitif	Pozitif
Metil red	Negatif	Negatif
Arjinin	Negatif	Negatif
Üreaz	Pozitif	Pozitif
Ornitin	Negatif	Negatif
Sükroz	Pozitif	Pozitif
Laktoz	Pozitif	Pozitif
Sorbitol	Pozitif	Pozitif
Adonilol	Pozitif	Pozitif
Arabinoz	Pozitif	Pozitif
Jelatinaz	Negatif	Negatif
DNAaz	Negatif	Negatif

Günümüzde mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakteri tanımlama yöntemlerinde konvansiyonel yöntemlerin dışında, VITEK 2 ve Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) vb. ticari

otomatize sistemlerin kullanım sıklığı artmıştır (21). Bu sistemler konvansiyonel yöntemlere göre çok daha hızlı ve kullanıcı dostudur.

2.1.3. *K. pneumoniae*'da Tedavi ve Gelişen Antibiyotik Direnci

Ampisiline interensek dirençli olan *K. pneumoniae* enfeksiyonlarını tedavi etmek için sefalosporin ve aminoglikozid grubu antibiyotikler kullanılır, ancak florokinolon grubu antibiyotikler de tercih edilebilir. *K. pneumoniae*, antimikrobiyal ajanlara karşı direnç geliştirmek için birden fazla mekanizmayı kullanabilir. İlk olarak, belirli enzimlerin (örneğin, β -laktamazlar veya aminoglikozid modifiye edici enzimler) üretilmesi direncin bir nedenidir. İkinci olarak, hücre geçirgenliğinin azalması, özellikle dış membran porinlerinin (Omps) kaybı yoluyla direnç gelişir. Transmembran proteinler olan efüzyon pompalarının aşırı ekspresyonu antimikrobiyal ajanın bakteri hücresinden atılması sağlanarak direnç gelişimidir. Son olarak, antimikrobiyal ajanın, hedefinde gerçekleşen modifikasyon da direnç mekanizmalarından biridir. Bu mekanizmaların kombinasyonu, *K. pneumoniae*'nin antimikrobiyal ajanlara karşı etkili bir direnç geliştirmesine yol açar (22).

β -laktam antimikrobiyaller genellikle tedavide ilk seçenek olarak kabul edilse de β -laktamaz ve özellikle karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* suşları yayılmaktadır. 1960'lı yıllarda *K. pneumoniae*'da penisilin direncinin keşfi, blaSHV-1 ve blaTEM-1 gibi ilk beta-laktamaz genlerinin bulunmasına yol açmıştır. Yaklaşık 20 yıl sonra, Almanya'da yoğun bakım hastalarından elde edilen *K. pneumoniae*'nin ilk GSBL geni blaSHV-2 tanımlanmıştır. Bu gen, keşfedilen ilk GSBL geni olarak kabul edilir çünkü çeşitli β -laktamlara dirençlidir. Kısa bir süre sonra, Fransa'da *K. pneumoniae*'nin blaTEM-3 olarak bilinen başka bir plazmid aracılı GSBL varyantı bulunmuştur (14). İspanya ve Irak'ta *K. pneumoniae* klinik izolatlarının %40'ı GSBL pozitifdir (23).

K. pneumoniae'da karbapenem direnci ilk olarak 1983'te gösterilmiştir (24). Türkiye'de 2001 yılında izole edilen bir *K. pneumoniae* izolatının, karbapenem dahil tüm β -laktamlara karşı direnç gösterdiği belirlenmiştir (25). Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* (CPKP) izolatları blaIMP, blaKPC ve blaNDM gibi farklı genlere sahip olabilir. Ancak dünya genelindeki klinik örneklerden elde edilen izolatların büyük bir kısmını blaKPC taşıyan CPKP olduğu bildirilmiştir (22).

Avrupa Birliği 2021 yılında EARS-Net'e bildirilen 43,617 adet *K. pneumoniae* izolatının yaklaşık üçte biri (%38,4), kontrol altında tutulan antimikrobiyal ajanlardan (fluorokinolonlar, üçüncü nesil sefalosporinler, aminoglikozidler ve karbapenemler) en az birine dirençli bulunmuştur (26). Avrupa Birliği ortalama direnç yüzdesi en sık üçüncü nesil sefalosporinler için (%34,3) bildirilmiş olup, bunu sırasıyla fluorokinolonlar (%33,6), aminoglikozitler (%23,7) ve karbapenemler (%11,7) izlemiştir (26).

Çin Antimikrobiyal Gözetim Ağı (CHINET) verilerine göre, *K. pneumoniae*'nin imipenem ve meropenem gibi karbapenem grubu antimikrobiyal ajanlara direnç oranı, 2005 ile 2021 arasında sekiz kat artarak %3,0'dan %23,8'e yükselmiştir (27). Giderek yayılan ÇİD *K. pneumoniae* için zaman kaybetmeden çözüm yollarının araştırılması gereklidir. Antibiyotiklerin uygunsuz kullanımına bağlı olarak plazmid ve transfer edilebilir genetik elemanlar kullanan *K. pneumoniae*, antibiyotik direnç genlerini biriktirmeye devam eder ve bu durum, "süper resistom" ile sonuçlanan, aşırı ilaca dirençli suşların ortaya çıkmasına sebep olur. Bu nedenle, *K. pneumoniae*'daki virülans ve ilaç direnci mekanizmalarının daha derinlemesine anlaşılması önemli bir konudur (14,28).

Ülkemizde 2012 yılında, 80 yaşında, öncesinde Türkiye'de hastane yatış öyküsü bulunan bir kadın hastanın Romanya'da hastaneye yatışının 21. gününde alınan trakeal aspirat kültüründe, ilk kez kolistin direnci gösteren *K. pneumoniae* izole edilmiş ve izolatın Türkiye kökenli olduğu belirtilmiştir (29). Son yıllarda, hastane enfeksiyonlarına neden olan ÇİD *K. pneumoniae* kökenlerinde gelişen kolistin direnç gelişiminin mekanizmaları araştırılmıştır. Kolistin dirençli suşlarda lipid A yapısında 5 kat daha fazla 4-amino-4-deoksi-l-arabinoz (L-Ara4N) bulunduğu gösterilmiştir. Daha sonraki araştırmalar, bu kökenlerde meydana gelen phoP/phoQ ve pmrA/pmrB regülatuar sistemlerindeki mutasyonların, pmrC ve arnBCADTEF operonlarının ekspresyonun arttırılmasıyla lipid A'nın fosfat gruplarına fosfoetenolamin (PEtN) ve L-Ara4N bölgenin modifikasyonlarına yol açtığını ortaya koymuştur (30). Böylece *K. pneumoniae*'nin modifikasyona uğramış dış zar komponentinin, dış zarda negatif yükü azalttığı ve bu durumun bakterinin kolistinle etkileşiminin azalmasına yol açtığı bilinmektedir (31). LPS modifikasyonuna yol açan iki bileşenli regülatuar sistemler, PmrAB ve PhoPQ, *mgrB* geni ile inhibe edilir ve bu mekanizma şimdiye kadar *K.*

pneumoniae'da görülen en sık kolistine direnç mekanizmasıdır (32–34). Ayrıca bakteriyi klorheksidine maruz bırakmak, *pmrB*'de nokta mutasyona yol açarak *K. pneumoniae*'da kolistin direncinin gelişimi ile ilişkili bulunmuştur (35).

K. pneumoniae'da *ramR* varyantları üzerinde yapılan çalışmalarda *ramR* geninin, *ramA*'nın ekspresyonunu baskılayabildiği ve bunun diğer akış pompalarını ve LPS modifikasyonunu etkileyebildiği ve sonucunda *K. pneumoniae*'da kolistine karşı direnç gelişimine neden olduğu tespit edilmiştir (36).

Yukarıda bahsedilen direnç mekanizmaları kromozomal direnç genleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu tezde araştırılacak olan mobil kolistin direnç geni (*mcr*) plazmidler üzerinde taşınmaktadır. Başlangıçta *mcr-1* geni, çiftlik domuzlarından elde edilen *E. coli* izolatlarında keşfedilmiştir. Ek olarak 2011 ile 2014 yılları arasında toplanan hem hayvan hem de insan kaynaklı örneklerde diğer *E. coli* izolatlarında ve *K. pneumoniae* izolatlarında *mcr* aracılı kolistin direnci gösterilmiştir (37,38).

Günümüze kadar dokuz *mcr* geni daha (*mcr-2*'den *mcr-10*'a kadar) keşfedilmiş ve dünya geneline yayılmıştır. Şu ana kadar *K. pneumoniae*'da *mcr-1*, *mcr-3*, *mcr-7*, *mcr-8*, *mcr-9* ve *mcr-10* rapor edilmiştir (39). *mcr-1* geni *K. pneumoniae*'da IncX4 plazmidi üzerinde taşınmaktadır (40).

2.2. KOLİSTİN

2.2.1. Kolistinin Genel Özellikleri

Yoshiaki Koyama tarafından 1947 yılında keşfedilen kolistin; fakültatif anaerobik endospor oluşturan bir basil olan *Paenibacillus polymyxa*’ (önceki adı *Bacillus polymyxa*)’dan izole edilmiştir. Kolistin, bir hidrofobik yağ asidi kuyruğundan ve hidrofilik polikasyonik peptit halkasından oluşan, 1200 Da ağırlığında, polipeptit yapılı, polimiksin molekül ailesinin üyesi bir antibiyotiktir (41). Peptitteki amino asit dizisi değişikliğine bağlı olarak beş farklı varyantı bulunur (Polimiksin A-E) (42).

Günümüzde klinik kullanımı olan polimiksinler; polimiksin E (kolistin) ve polimiksin B’dir. Bunlardan polimiksin B *Bacillus polymyxa* türünden izole edilmiş, polimiksin E ise *Bacillus colistinus* türünden izole edilmiştir (42). Bu iki ilacın moleküler farkı; polimiksin B’nin altıncı konumundaki D-fenilalanin amino asiti, -lösin ile değiştirilmiştir (43).

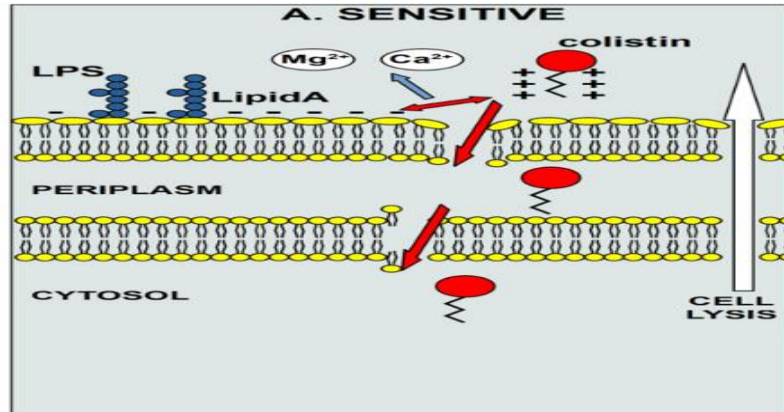
Kolistinin 1947’de keşfinden sonra klinik kullanımı 1950’lerde Japonya ve Avrupa’da başlamıştır. 1970’lerde, ciddi nefrotoksisite ve nörotoksisite yan etkilerinin ortaya çıkmasıyla kullanımına son verilmiş, yerini toksik etkileri daha az olan ve yeni kullanıma giren başka antibiyotiklere bırakmıştır. Kolistin günümüzde, önce kistik fibrozis hastalarının tedavisi için, daha sonra da ÇİD Gram negatif bakterilerin özellikle yoğun bakımlarda giderek yayılması ve tedavide kullanılacak başka seçenek antibiyotik eksikliği nedeniyle tekrar gündeme gelmiştir (44).

Kolistin, iki farklı ticari formda (kolistimetat sodyum ve kolistin sülfat) satılmaktadır. Kolistimetat sodyum parenteral olarak, kolistin sülfat oral veya topikal olarak uygulanır (43). Her iki form da inhale edilebilir (43). Kolistin sülfat katyonik ve stabildir, oysa inaktif bir ön ilaç olan kolistimetat sodyum anyoniktir ve stabil değildir (45). 2010 yılında ülkemizde ruhsat alan kolistimetat sodyum, daha düşük toksisite oranlarına sahip olması sebebiyle uygulanması daha güvenli olan formdur (46). Kolistin sülfat, oral yolla alındığında emilime uğramadığından selektif bağırsak dekontaminasyonunda kullanılmaktadır (45).

2.2.1.1. Kolistinin etki mekanizması

Kolistin, bir deterjan gibi bakterilerin hücre membranını etkileyerek, membran geçirgenliğini artırarak ve hücre içindeki elektrostatik dengeyi bozarak bakterisidal aktivitesini gösterir. Katyonik yapıdaki kolistin, Gram-negatif basillerin dış zarında bulunan LPS bileşeni lipit A'nın negatif yüklü fosfat grupları ile elektrostatik olarak etkileşime girer (47). Kolistin gibi pozitif yüklü moleküller, LPS'leri stabilize eden divalent katyon iyonları olan Ca^{+2} ve Mg^{+2} ile yarışma yoluyla yer değiştirerek dış membrandaki bütünlüğü bozar ve LPS salınımına neden olur. Daha sonra, kolistin lipofilik asit-yag zinciri aracılığıyla dış membrana taşınır. Kolistin, dış membranın geçirgenliğini değiştirerek iç membrana ulaşır. Ardından, bakteri iç membranındaki fosfolipit tabakasının bütünlüğü dağılır. Nihayetinde kolistin, sitoplazmik içeriğin membran dışına sızması ile bakterisidal etkisini gösterir (48,49).

Kolistin için başka potansiyel etki mekanizmaları da tanımlanmıştır bunlardan biri vezikül-vezikül temasıdır. Kolistin dış membranı geçtikten sonra, iç ve dış membran arasında lipid değişimleri gerçekleşir, bu da membranlarda yapısal değişikliklere ve fosfolipit kaybına neden olarak bakterilerin parçalanmasına yol açan osmotik dengenin bozulmasına neden olur (41). Çalışmalarda ek olarak bakteriyel iç membranda bulunan solunum enzimlerinin kolistin aracılığı ile baskılandığı ifade edilmiştir (50). Kolistin tarafından tetiklenen oksidatif stresle ilişkilendirilen serbest radikallerin birikimi, DNA, protein ve lipid hasarına neden olarak bakteri ölümüne yol açan bir mekanizma daha oluşturur. Gram negatif bakteri hücre zarındaki LPS, bilindiği üzere endotoksik aktivite ile ilişkilidir ve kolistin bu bölgede bulunan lipid A' ya bağlanarak, burayı nötralize eder ve güçlü bir anti-endotoksik etki gösterir (51).



Şekil 2: Kolistinin etki mekanizması

Kaynak: (52)

2.2.1.2. Kolistinin etki spektrumu

Son yıllarda kliniklerde, çoklu ilaç direnci gösteren *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve karbapenem dirençli *Klebsiella spp.* gibi etkenlerin neden olduğu enfeksiyonlar, kolistinin bilinen yan etkilerine rağmen klinik kullanımda tercih edilen bir antimikrobiyal olmasını zorunlu kılmıştır. Bunun yanında kolistin *Enterobacter spp.*, *E.coli*, *Shigella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertussis* ve *Yersinia pseudotuberculosis*’e karşı bakterisidal etkinlik gösteren antimikrobiyal bir ajandır. *Stenotrophomonas maltophilia* enfeksiyonlarında da etkin olmasına rağmen, değişken antibiyotik duyarlılıkları görülebilmektedir. Bununla birlikte *Mycobacterium*’lardan *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium smegmatis*’e de etki gösterdiği bildirilmiştir. Özetle Gram negatif basillerde bakterisidal etki eden kolistin, Gram pozitif kok, anaeroblar ve *Mycoplasma* türlerine etkisizdir (41).

Ancak kolistine karşı *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Proteus mirabilis*, *Providencia spp.*, *Morganella morgani*, *Moraxella catarrhalis*, *Serratia marcescens*, *Brucella spp.*, gibi bakterilerde doğal direnç görülmektedir (53).

2.2.1.3. Kolistinin klinik kullanımı

Kolistin ciddi yan etkilerinden dolayı, genellikle karbapenemaz üreten ve çoklu ilaca dirençli olan *Enterobacterales* türlerinin yol açtığı enfeksiyonlarda son çare olarak kullanılmaktadır. Yoğun bakım ünitelerinde, mekanik ventilasyona bağlı pnömoni, bakteriyemi, sepsis gibi ciddi durumlarda tercih edilmektedir. Diğer antibiyotiklere direnç geliştirmiş gram negatif bakteri kaynaklı idrar yolu enfeksiyonları, menenjit, osteomyelit, gastrointestinal sistem enfeksiyonları, yumuşak doku enfeksiyonları, göz ve kulak enfeksiyonları gibi çeşitli klinik durumlarda bir tedavi seçeneği olarak görülmektedir. Hasta kliniği menenjiti düşündürüyorsa intratekal kolistin uygulaması önerilmektedir. Ancak nefrotoksisite nedeniyle böbrek yetmezliği olan hastalarda, doz ayarlamalarının dikkatle yapılması gerektiği unutulmamalıdır. Ayrıca Myastenia

gravis hastalarında, kolistine karşı alerjisi olanlarda ve gebelerde kullanılmamalıdır (54).

2.2.1.4. Kolistinin Yan Etkileri

Kolistin tedavisinin en sık görülen yan etkileri nefrotoksisite ve nörotoksisitedir ve bunlar doz bağımlı ve ilacın erken kesilmesiyle geri dönüşümlüdür. Özellikle böbrek dokularında daha şiddetli yan etki gelişmektedir. Bunun nedeni, kolistinin zar bütünlüğünü bozup bakterilerin ölümüne neden olmasının yanı sıra insan hücre zarları ile etkileşime girmesi neticesinde, onları parçalayarak toksisite geliştirmesidir (32,55). Akut tübüler nekroz gelişimi, serum üre ve kreatinin düzeylerinde artışla kendini göstermektedir. Kolistinin neden olduğu nefrotoksisite insidansı, Spapen ve arkadaşlarının yayınladığı bir derlemede %0 ile %53,5 arasında değişen oranlar sergilemiştir (56).

İlaça bağlı nörotoksisite nöromusküler blokajla bağlantılı bulunmuş olup, baş dönmesi, konfüzyon, yüz ve periferik parestezi, görme bozuklukları, ataksi ve apne ile kendini gösterir. Kolistinin özellikle yüksek dozlarda intraventriküler uygulanması konvülsiyonlara yol açabilir (57). Kolistin kullanımına bağlı alerjik reaksiyonların görülme sıklığı yaklaşık %2 olarak rapor edilmiştir. Ayrıca diğer antibiyotiklerde de görülebilen psödomembranöz kolit gelişimi, kolistin tedavisinin nadir yan etkilerindendir (58).

2.2.2. Kolistin Direnci

DSÖ'ne göre kolistin kritik öneme sahip antimikrobiyallerden biri olarak kabul edilmiştir. Tarım ve hayvancılık sektöründe kontrolsüz antibiyotik kullanımı, COVID-19 pandemisi ile artan yoğun bakım hasta sayısı gibi faktörler, antibiyotiklere ve özellikle kolistine karşı direnç gelişiminde oldukça dikkat çekmektedir. Bu durum dirençli Gram-negatif bakteri popülasyonunun seçilimine ve yayılımına yol açmaktadır (59).

Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı 2022 raporuna göre Türkiye genelinde sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlarda saptanan kolistin direnç

oranları *A. baumannii* için %12,52 ve *K. pneumoniae* için %31,21 olarak rapor edilmiştir (60).

2.2.3. Antibiyotik Direncinin Genetik Temeli

Antibiyotiklere karşı direncin 3 genetik temeli vardır. Bunlar; kromozom aracılı (kromozomal) direnç, plazmid aracılı direnç ve transpozon aracılı dirençtir. Kromozomal direnç, genellikle, ilacın hedef aldığı hücrenin yüzeyine etki eden membran transport sistemini düzenleyen genlerde meydana gelen bir mutasyondan kaynaklanır. Kromozomal direnç, plazmid aracılı dirençle kıyaslandığında klinik açıdan daha az sorun yaratır. Bunun sebebi, spontan mutasyon sıklığının daha düşük oranlarda gerçekleşmesidir. Plazmidler, genellikle bakteri ve diğer mikroorganizmalarda bulunan, halka şeklinde çift iplikli DNA molekülleri olarak tanımlanan küçük genetik yapılardır. Bu DNA parçacıkları, antibiyotiklere direnç kazandıran veya hücre membran transport sistemini etkileyen çeşitli enzimleri kodlayabilirler. Plazmidin önemli bir özelliği de farklı türler ve cinsler arası genetik bilgiyi aktarabilmesidir. Bu da direnç gelişiminin türler arası yayılımında oldukça önemlidir. Plazmidler birden fazla direnç genini bir arada taşıyabilmeleri açısından da önem taşır. Bu tez çalışmasında *K. pneumoniae* izolatlarında varlığı araştırılacak olan *mcr* geni, plazmid üzerinde taşındığı için kolistin direncinin türler arasında hızlı yayılımına neden olacağı düşünülmektedir.

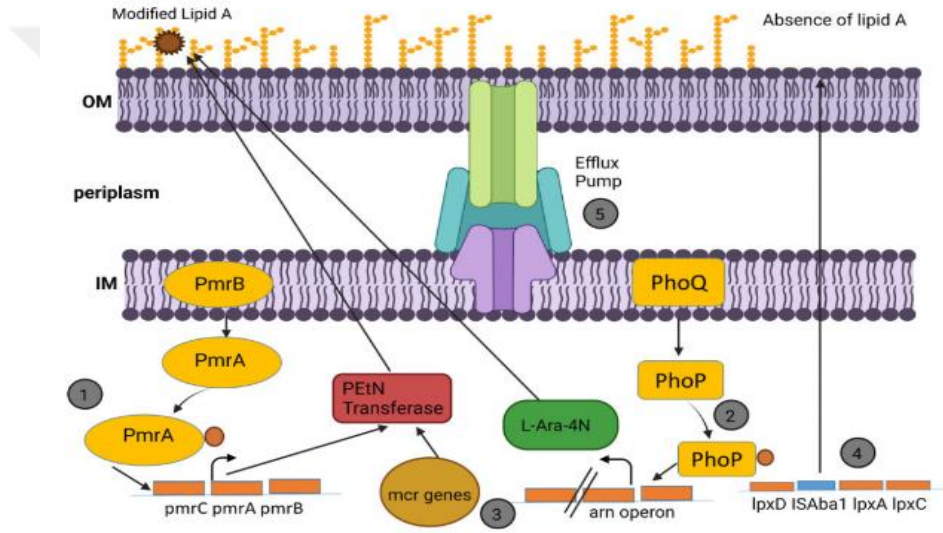
Transpozon aracılı direnç ise, genetik materyaldeki bir transpozonun, özellikle direnç genlerini taşıyarak mikroorganizmalarda direnç gelişimine katkıda bulunmasını ifade eder (61).

2.2.3.1. Kolistin direnç mekanizmaları

Kolistin direnç mekanizmalarına ilişkin araştırmalar, bakterilerin kolistin aktivitesine karşı kendilerini savunduğu farklı yolların olduğunu ortaya çıkarmıştır (62). Kolistin direnci kromozomal ya da plazmid aracılı gerçekleşebilir. Geçmişte, kolistine karşı direnç, başlıca LPS'lerin senteziyle ilgili kromozomal genlerdeki mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir. Bu direnç mekanizması genellikle PhoPQ ve PmrAB gibi iki bileşenli sistemlerin yanı sıra arnBCADTEF (ayrıca pmrHFIJKLM olarak da bilinir), *crrAB*, *mgrB* ve *pmrE* gibi düzenleyici gen kümeleriyle bağlantılı bulunmuştur (63).

Günümüzde kolistine karşı bakterilerde gelişen direnç mekanizmaları:

1. Lipopolisakkarit modifikasyonuna yol açan PmrAB ve PhoPQ iki bileşenli düzenleyici sistemler ve *mcrB* geni
2. Lipid A biyosentezini yapan genlerin (*lpxA/C/D*) inaktivasyonu ile LPS kaybı
3. CrrAB iki bileşenli düzenleyici sistemler
4. Dışa atım pompaları
5. Mobil kolistin direnç genleri (*mcr*) olarak sıralanabilir.



Şekil 3: Kolistine karşı gelişen direnç mekanizmaları

Kaynak: (64)

2.2.3.1.1. PmrA/PmrB ve PhoP/PhoQ gibi çift bileşenli sistemler ve *mcrB*:

LPS modifikasyon yolundaki genlerin çoğu, PmrA/PmrB ve PhoP/PhoQ gibi çift bileşenli sistemler tarafından kontrol edilir. Bu sistemler, bakterinin dış ortama uyum sağlamasına yardımcı olan genleri aktive eder ve lipid A sentezinde yer alan enzimleri kodlayan genleri (*pmrE* ve *arnBCADTEF* operonlarını) düzenler (64). Bu kaskad, özellikle dış zarın yapısını değiştirerek veya modifiye ederek anyonik özelliğini azaltır ve bakteriyi katyonik antibiyotiklere karşı daha dayanıklı hale getirme görevine

katkıda bulunur. Stres, yüksek demir konsantrasyonu ve asidik pH, PhoPQ ve PmrAB çift bileşenli sistemleri ile *arnBCADTEF* kaskadını aktive edebilir (33).

mgrB bir PhoQ kinaz inhibitörüdür. *mgrB* inaktivasyonu PhoQ, PhoP ve PmrK (*pmrHFIJKLM* operonunun bir parçası) genlerinin transkripsiyonunda artışa neden olarak kolistin direncine yol açar (65). *mgrB*'nin inaktivasyonunun aynı zamanda kapsül yapısını da etkilediği gösterilmiştir (66).

2.2.3.1.2. Lipid A biyosentezini yapan genlerin (*lpxA/C/D*) inaktivasyonu ile LPS kaybı:

Lipid A biyosentezini yapan genler olan *lpxA*, *lpxC* ve *lpxD*'de gelişen mutasyonlar, bakterilerin LPS üretimini etkiler ve böylece kolistin etki ettiği hücre zarındaki hedef kısımların eksik oluşumuna yol açar (67).

2.2.3.1.3. CrrAB:

CrrA/CrrB, işlevi PmrA/PmrB düzenleyici sistemi ile ilişkilendirilmiş diğer iki bileşenli sistemdir. CrrB de gelişen bir mutasyon PmrA/PmrB düzenlenmesini etkiler ve *pmrHFIJKLM* ve *pmrCAB* operonlarının aşırı ifadesi yoluyla yine lipid A modifikasyonu üzerinden kolistine karşı direnç gelişmesine yol açar. Ek olarak CrrA/CrrB ile ilişkili genlerdeki mutasyonların, olası bir akış pompası aracılığıyla kolistine karşı dirence etki ettiği ileri sürülmüştür (67,69).

2.2.3.1.4. Dışa Atım Pompaları:

Dışa atım pompaları kolistin direnç gelişimini etkileyen önemli bir mekanizmadır (41). Çalışmalar *KpnEF* ve *acrAB*' de oluşacak mutasyonların, dışa atım pompasının aşırı çalışmasına neden olarak kolistin direncine yol açtığını göstermiştir (69,70).

2.2.3.1.5. *mcr* Genleri:

Kolistin direncinin 2015 yılına kadar sadece kromozomal mutasyonlar tarafından gerçekleştiği biliniyor iken, bu tarihten sonra plazmidler üzerinden horizontal gen transferi yoluyla da direnç geliştiği keşfedilmiştir (37). Çin'de gıda hayvanlarından elde edilen *E.coli* izolatlarında antimikrobiyal dirence ilişkin rutin bir araştırma projesi sırasında, kolistin direncinde büyük bir artış gözlemlenmiş ve bu çalışmada, *Enterobacteriaceae*'de ilk plazmid aracılı polimiksin direnç mekanizması, "Mobil

Colistin Resistance” yani *mcr* -1 geni rapor edilmiştir (37). Tüm genom sekanslama ve homoloji modelleme teknikleri kullanılarak *mcr*-1 geni, plazmidin (pHNSHP45) belirli bir genetik yapısı üzerinden tanımlanmıştır (37). Ayrıca *mcr*-1’in fosfoetanolamin transferazı kodladığı tespit edilmiştir (37). Bu transferazlar, LPS tabakasındaki lipid A'ya fosfoetenolamin eklenmesini katalizleyerek bakterinin dış zarındaki lipid A'nın modifikasyonuna neden olur ve sonucunda LPS tabakanın negatif yükü azalır, bu da kolistin direncine yol açar (72).

ÇİD Gram negatif bakterilerin tedavisinde tercih edilen kolistin, plazmid aracılığıyla bakteriler arası yayılabilen bu *mcr* genleri ile kolistine direnç gelişiminde önemli tehdit oluşturmaktadır ve tedavide yetersiz yanıt elde etme endişesi yaratmaktadır (73).

mcr'nin 2015 yılındaki keşfinden bugüne kadar 10 adet *mcr* varyantı keşfedilmiştir (64). Bu 10 varyant günümüzde yaklaşık 5 farklı kıtada ve yaklaşık 70 ülke veya bölgede 11 *Enterobacteriaceae* türünde bildirilmiştir (74). Farklı kaynaklardan (insanlar, hayvanlar, sebzeler, su vb.) izole edilen bakterilerden çeşitli *mcr* varyantları rapor edilmiş olup, en sık *mcr*-1 ve *mcr*-9 varyantları gösterilmiştir (75).

Hayvanlar ve çevreden toplanan örnek izolatlarında bulunan *mcr*-1 geni geniş bir dağılım gösterir. Bununla birlikte *mcr*-1 pozitif izolatların genel yaygınlığı çoğu ülkede düşük seviyelerdedir (<%5). Ancak, Asya'da ve Avrupa'da (örneğin Hollanda, Fransa, İtalya ve Almanya gibi birkaç ülkede) nispeten yüksek bir prevalans (%10-40). gözlemlenmiştir. Bu durum, *mcr*-1 yayılımının bölgesel olarak farklı olduğunu göstermektedir (53,75).

mcr-1 geni çeşitli plazmid tipleriyle (IncX4, IncI2, IncHI2, IncF, IncY ve IncP) taşınır (49). *mcr*-1 geni başlangıçta Phnshp45 adlı bir IncI2 plazmidinde keşfedilmiş ve daha sonra benzer genetik varyantları *Enterobacteriales*'in çeşitli türlerinden tespit edilmiştir (77). Klinik örneklerde *mcr*-1 pozitif *K. pneumoniae* ülkemizde ilk defa 2019 yılında yapılan bir çalışmada bildirilmiştir. Bu çalışmada karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında *mcr*-1 geninin varlığı araştırılmış ve üç izolatta *mcr*-1 pozitifliği saptanmıştır (78).

Belçika'da *mcr-2*, domuzlardan ve sığırlardan elde edilen bir *E. coli* izolatında keşfedilmiştir. IncX4 tip plazmid tarafından taşınan *mcr-2* genini kodlayan genin atası *Moraxella pluranimalium*'dur (79).

mcr-3, bir IncHI2 tipi plazmid tarafından taşınır. *mcr-3*'ün kökeninin, *Aeromonas* cinsine ait bir bakteri türü olduğu düşünülmektedir (80).

ColE10 plazmidi tarafından taşınan *mcr-4*, İtalya'da domuzlardan izole edilen *S. enterica* serovar *Typhimurium*' dan tespit edilmiştir. Aynı gen, İspanya ve Belçika'daki domuzlardan izole edilen *E. coli*'lerde bulunmuş olup, Kendler ve ark. yaptığı çalışmada büyük olasılıkla *Shewanella frigidimarina* türünden geldiği belirtilmiştir (41,81–83).

ColE plazmidi tarafından taşınan *mcr-5* geni ise bir *S. enterica* serovar *Paratyphi B*'de tespit edilmiştir. *mcr-5* ayrıca *Cupriavidus gilardii* türünde de tespit edilmiştir (49).

Moraxella spp.'de keşfedilen *mcr-2.2* varyantı ise *mcr-6* olarak isimlendirilmiştir (41).

mcr-7 geni, *K. pneumoniae*'nin taşıdığı bir IncI2 tipi konjugatif plazmidte tespit edilmiştir. *mcr-3* gibi, *mcr-7.1*'in de *Aeromonas* türünden köken aldığı düşünülmektedir (84).

Çin' de 2018 de yapılan bir çalışmada rapor edilen *mcr-8*, *K. pneumoniae*'da bir IncFII tipi konjugatif plazmidle taşınmaktadır. Ek olarak *mcr-8*'in *mcr-8.1*'den *mcr-8.4*'e kadar dört varyantı tanımlanmıştır (41).

mcr-9 varyantının, *S. typhimurium*'un IncHI2 plazmidinde yerleştiği bulunmuştur (41,84).

mcr-10, bir IncFIA plazmidi tarafından taşınan *Enterobacter roggenkampii* suşunda yapılan inceleme sonucu tespit edilmiştir. *mcr-9* ve *mcr-10* genlerinin atasının *Buttiauxella spp.* 'e dayandığı düşünülmektedir (41).

Tablo 2: *mcr* 1-10 Gen Varyantları Hakkında Bilgiler

<i>mcr</i> varyantları	Genel bilgiler
<i>mcr-1</i>	İlk olarak Phnshp45 adlı bir IncI2 plazmidinde keşfedilmiş ve daha sonra benzer genetik varyantları <i>Enterobacterales</i> 'in çeşitli türlerinden tespit edilmiştir.
<i>mcr-2</i>	IncX4 tip plazmid tarafından taşınan <i>mcr-2</i> genini kodlayan genin atası <i>Moraxella pluranimalium</i> 'dır.
<i>mcr-3</i>	IncHI2 tipi plazmid tarafından taşınır. Kökeninin, <i>Aeromonas</i> cinsine ait bir bakteri türü olduğu düşünülmektedir.
<i>mcr-4</i>	ColE10 plazmidi tarafından taşınır, <i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> 'dan tespit edilmiştir. <i>Shewanella frigidimarina</i> türünden geldiği belirtilmiştir.
<i>mcr-5</i>	ColE plazmidi tarafından taşınır ve bir <i>S. enterica</i> serovar <i>Paratyphi B</i> 'de tespit edilmiştir.
<i>mcr-6</i>	<i>Moraxella spp.</i> 'de keşfedilen <i>mcr-2.2</i> varyantı ise <i>mcr-6</i> olarak isimlendirilmiştir.
<i>mcr-7</i>	<i>K. pneumoniae</i> 'nin taşıdığı bir IncI2 tipi konjugatif plazmidte tespit edilmiştir. <i>Aeromonas</i> türünden köken aldığı düşünülmektedir.
<i>mcr-8</i>	<i>K. pneumoniae</i> 'da bir IncFII tipi konjugatif plazmidle taşınmaktadır. Ek olarak <i>mcr-8</i> 'in <i>mcr-8.1</i> 'den <i>mcr-8.4</i> 'e kadar dört varyantı tanımlanmıştır.
<i>mcr-9</i>	<i>S. typhimurium</i> 'un IncHI2 plazmidinde yerleştiği bulunmuştur.
<i>mcr-10</i>	IncFIA plazmidi tarafından taşınan <i>Enterobacter roggenkampii</i> suşunda yapılan inceleme sonucu tespit edilmiştir. <i>mcr-10</i> ve <i>mcr-9</i> genlerinin atasının <i>Buttiauxella spp.</i> 'e dayandığı düşünülmektedir

Günümüzde *mcr*-pozitif plazmidlerin transferini engellemeye yönelik stratejiler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Örneğin, dihidroartemisin ve chelerythrine enerji harcamada limit yaratarak, *mcr*-1 pozitif plazmidlerin konjugasyonunu etkili bir şekilde engeller. Bu yaklaşım, transfer edilebilir kolistin direnciyle mücadelede etkili olabilir (52,86).



2.3. KOLİSTİN DUYARLILIK TESTLERİ

2.3.1. Kolistin Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Mikroorganizmaların kolistine duyarlılığı fenotipik ve moleküler yöntemler ile belirlenebilir. Fenotipik yöntemler sıvı besiyeri bazlı, agar bazlı ve şelatör temelli yöntemler olarak üç gruba ayrılır. Sıvı besiyeri bazlı yöntemler kendi içinde otomatize ve manuel olarak ikiye ayrılmaktadır. Manuel yöntemlere; altın standart yöntem olan sıvı mikrodilüsyon, kolistin disk elüsyon ve hazır sıvı mikrodilüsyon yöntemlerinden UMIC test kit (Biocentric, Fransa), MICRONAUT MIC Strip S (Merlin Diagnostica, Almanya) ve Com ASP Colistin (Liofilchem®, İtalya) testleri örnek olarak verilebilir.

2.3.1.1. Kolistin standart sıvı mikrodilüsyon yöntemi

Fenotipik antibiyotik duyarlılık belirleme testlerinden SMD yöntemi, plastik mikropaklarda mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılıklarının seri dilüsyonla belirlenmesi prensibine dayanır (1).

EUCAST ve Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) tarafından kolistin duyarlılık testi için Uluslararası Standartlar Organizasyonu (ISO) 20776-1:2019 (87) kolistin sıvı mikrodilüsyonunun referans yöntem olarak kullanılmasını önerir (88).

EUCAST, sıvı mikrodilüsyon testi için tercihen katyon ayarlı Mueller-Hinton (MH) sıvı besiyeri kullanımı, test sürecinin herhangi bir evresine katkı maddesi eklenmemesi, yüzeylerin düz polistirenden yapılmış ve herhangi bir işleme tabi tutulmamış olması, polimiksinlerin sülfat tuzlarının kullanılması, metansülfonat kolistin türevinden kaçınılması gibi önerilere uyulmasını önermektedir (89).

Bu yöntemin dezavantajlarından bazıları şunlardır; SMD tüm laboratuvarlar tarafından rutin olarak uygulanmamaktadır ve kolistin mikrotitre kuyularının plastik yüzeylerine bağlanma sorunu bulunmaktadır (64).

Otomatize sistemlerden ise Microscan (Becman Coulter, ABD), BD Phoenix (Becton Dickinson, ABD) ve VITEK 2 (Biomerioux, ABD) vb. cihazlarla antibiyotik duyarlılık testleri sayılabilir (64).

2.3.1.2. Antibiyotik duyarlılık testleri için kullanılan otomatize sistemler

Otomatize yöntemler, standart sıvı mikrodilüsyona dayanan ticari minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) tespit sistemlerini içerir ve aynı anda bakteri türlerinin tanımlanmasını sağlar (64).

Antibiyotik duyarlılık testlerinde otomatize sistemler, konvansiyonel yöntemlere kıyasla çok sayıda testi aynı anda çalışma imkanı, hızlı sonuç verme, tekrarlanabilirlik, kabul edilebilir bir maliyete sahip olması, CLSI, EUCAST standartlarına göre yazılım güncellemeleri, laboratuvarda iş yükünün azaltılması, sonuç yorumlamasında objektif oluşları, veri tabanı ile direnç mekanizmaları için uyarı oluşturmaları ve bilgisayar / LIS ile bağlantısı ile dünya genelinde mikrobiyoloji tanı laboratuvarlarının temelini oluşturmaktadır (21).

Otomatize sistem VITEK-2, Gram pozitif ve negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılık testinin sonuçlarını aynı anda ve kısa sürede verebilmektedir. VITEK 2 cihazı, bakteri tür tanımlaması için fotoelektrik kolorimetrik yöntemi, antibiyotik duyarlılık testleri için ise türbidimetrik yöntemi kullanmaktadır. Antibiyotik duyarlılığı belirlemekte kullanılan VITEK 2 AST kartları ise, antibiyotik MİK'lerini mikrodilüsyon ile belirleyebilen çift dilüsyon tekniğinin kısaltılmış ve minyatürleştirilmiş bir çeşididir (90). Her AST kartı, mikro kuyucuklarda, kültür besiyeri ile önceden belirlenmiş miktarda spesifik antimikrobiyal ajanlar bulundurur (89).

Agar temelli yöntemlere SuperPolymyxin, CHROMagar COL-APSE (CHROMagar, Fransa), LBMJR, E test, agar dilüsyon testi örnek verilebilir (64,92). Bununla birlikte EUCAST kolistin duyarlılık tespitinde sadece SMD yöntemini kabul eder, ancak agar dilüsyon testi ve kolistin disk elüsyon testi 2020'de CLSI tarafından kolistin duyarlılık ölçümü için onaylanmıştır (93). Ancak çeşitli agar plakları hazırlanması ve farklı konsantrasyonlar için tekrarlanması gerekir, bu nedenle agar dilüsyon yöntemi uğraş gerektirir. Antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesi için disk difüzyon testi kolay ve ucuz bir yöntemdir (81). Ancak kolistin agar içine zayıf ve yavaş difüze olduğundan küçük inhibisyon zon çapları oluşur. Bu nedenle, kolistin duyarlı ve dirençli izolatları ayırmak zordur. Sonuç olarak, bu yöntem kolistin duyarlılık testleri için EUCAST ve CLSI tarafından önerilmemektedir (86,91). Şelatör temelli testlerin belki de biraz daha

öne çıkma nedeni *mcr* gen tespiti yapılabilir olmasıdır. Bu yöntem *mcr* geni tarafından kodlanan fosfoetanolamin transferazın çinko bağımlı olması ve bu çinkonun şelatlanması üzerine *mcr* gen taşıyan kolistin dirençli suşların kolistin içeren plaklarda üremesi temeline dayanmaktadır. Modifiye edilmiş Rapid Polymyxin NP (ELITech Microbio, Fransa) testi şelatör tabanlı yöntemlerden biridir (63,92).

Tablo 3: Kolistin Duyarlılık Tespitinde Fenotipik ve Moleküler Yöntemler

Kolistin Duyarlılık Tespitinde ve <i>mcr</i> Gen Varlığı Araştırılmasında Kullanılan Yöntemler	
Fenotipik Yöntemler	Moleküler Yöntemler
Sıvı besiyeri temelli yöntemler: - Manuel - Otomatize ticari sistemler	- Multipleks PCR - RNA bazlı AST (RBAST) - Tüm Genom Dizileme - MALDI-TOF-MS, LC-MS/MS - LAMP ile kombine edilmiş çipler - Yüzey genişletilmiş Raman spektroskopisi
Agar bazlı yöntemler: - Super Polymyxin - CHROMagar COL-APSE - LBMJR - MIC Test Strip, E- test	
Şelatör temelli yöntemler: Modifiye edilmiş Rapid Polymyxin NP	

Özetleyecek olursak, fenotipik testlerle kolistin antibiyotik duyarlılık testleri, çeşitli teknik zorluklar nedeniyle sorunlara yol açmaktadır. Bu zorlukların başlıca nedeni, kolistinin büyük molekül ağırlığına sahip olması ve bu nedenle agara difüzyonunun zor olmasıdır. Ayrıca kolistinin bazı laboratuvar malzemelerine adsorpsiyonu ve ortamdaki katyonlarla etkileşimi de fenotipik testlerin dezavantajları olarak sıralanabilir (38). Disk difüzyon, agar dilüsyon ve gradiyent test yöntemleri kolistin

duyarlılık testi performansını olumsuz etkileyerek, tekrarlanan testler arasında ve laboratuvarlar arasında uyumsuz sonuçların ortaya çıkmasına neden olur .

Yapılan çalışmalarda, yarı-otomatize sistemlerin de kolistin direncini doğru bir şekilde tespit etmede yetersiz olduğu ortaya konmuştur (93). Sonuç olarak; EUCAST ve CLSI kolistin antibiyotik duyarlılık testlerinde disk difüzyon testini önermemektedir. CLSI, kolistin duyarlılık testi için kolistin sıvı disk elüsyon (CBDE) ve kolistin agar test (CAT) yöntemlerini onaylamıştır, ancak sıvı mikrodilüsyon hala referans yöntem olarak kabul edilmektedir (63).

2.3.1.3. *mcr* gen tespit yöntemleri

mcr gen varlığının tespiti için moleküler yöntemlerden polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), klinik laboratuvarlar tarafından gözlemlenen fenotipik kolistin direncinin altında yatan direnç mekanizmalarını anlamak için kullanılan en yaygın yöntemdir. *mcr* tanısında geleneksel PCR veya gerçek zamanlı qRT-PCR kullanılabilir (65). Bakteride bilinen kolistin direnci ile ilişkilendirilen *mcrB*, *phoPQ*, *pmrAB*, *pmrHFIJKLM/arnBCADT* ve *mcr* genlerin amplifikasyonu gerçekleştirilir. Amplikonların dizilenmesi ve analizi, amplifiye edilen genin mutasyon olasılığı için vahşi suş dizileriyle karşılaştırılır. Bu genlerin ifade düzeyleri hem duyarlı hem de dirençli fenotipteki suşlarda qRT-PCR ile ölçülebilir (41). Tek gen bölgesi yerine birden fazla gen araştırılabilen multipleks PCR ile *mcr* varyantları araştırılabilmektedir. Bizim çalışmamızda *mcr* (1-10) varyantlarını araştıran multipleks qPCR kullanıldı.

mcr varlığını araştırmak için tüm genom dizileme, yüksek rezolüsyonlu erime eğri analizi, MALDI-TOF MS LC-MS (sıvı kromatografi kütle spektrometrisi, RNA bazlı Antimikrobiyal Duyarlılık Testi (RBAST), Yüzey Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi gibi yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (82,96–98). Bu yöntemler oldukça hızlı sonuç verir. Hasta izolasyonunda plazmidle aktarılan *mcr* gen varlığının bilinmesi, bu direncin yayılmasının önüne geçmek için önemli bir adım olacaktır (64). Ancak moleküler yöntemlerin dezavantajı kolistin MİK değeri belirleyemiyor olmalarıdır ve ayrıca direnç gen tespiti yapılmış olan izolatlara standart mikrodilüsyon yapıldığında, bazı izolatlarda fenotipik yöntemlerle kolistin direnci tespit edilmemiştir (63).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Temmuz 2023-Aralık 2023 tarihleri arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden elde edilen 284 *K. pneumoniae* izolatına kolistin için altın standart sıvı mikrodilüsyon yöntemi ve VITEK 2 otomatize sistemi ile antibiyotik duyarlılık testi çalışıldı. Kolistin dirençli olan izolatlarda multipleks qPCR (Bioksen, Türkiye) ile *mcr* (1-10) gen varlığı araştırıldı. Prospektif olan tez çalışması için Ankara Bilkent Şehir Hastanesi 2 Nolu Etik Kurulundan onay alındı (06.12.2023 tarih ve E2-23-5872 sayı). Yapılan güç analizinde %90 güç ve 0,05 hata payıyla literatürdeki örnek çalışma sonuçları değerlendirilerek minimum örneklem sayısı 87 olarak hesaplandı (99).

3.1. KLEBSIELLA PNEUMONIAE İZOLATLARININ TOPLANMASI VE SAKLANMASI

- Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Temmuz 2023-Aralık 2023 tarihleri arasında poliklinik, servis ve yoğun bakım hastalarından gelen çeşitli klinik örneklerden (apse, kan, idrar, idrar sonda, balgam, derin trakeal aspirat, yara vs.) yapılan kültürlerden MALDI-TOF MS (VITEK® MS, BioMérieux, Fransa) ile tanımlanan ve kolistin sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile direnç profili belirlenmiş olan 284 *K. pneumoniae* izolatı çalışmaya dahil edildi.
- Kolistin dirençli 136, kolistin duyarlı 148 izolat boncuklu suş saklama besiyerinde (Alkim Sağlık Hizmetleri, Türkiye) -80 °C'de VITEK-2 ve *mcr* qPCR çalışılana kadar saklandı.
- Aynı hastadan gelen tek bir örnekten izole edilen *K. pneumoniae* izolatı kullanıldı. Tekrarlayan izolatlar çalışmadan dışlandı.
- İzolatlar yaş cinsiyet, bulunduğu klinik, numune tipi gözetilmeden toplandı ve demografik bilgilere daha sonra laboratuvar kayıtları ve hastane bilgi işletim sisteminden elde edilen veriler kullanılarak ulaşıldı.

3.1.1. İzolatların İdentifikasyonu

- WASPLab® (Walkaway Specimen Processor, Copan, İtalya) cihazına yüklenen besiyeri plakları 37 °C’de 18-24 saat inkübasyon sonrasında Tıbbi Mikrobiyoloji uzman doktorları tarafından değerlendirildi. Gelen örneklerden (idrar ve gaita örnekleri dışında) rutin olarak yapılan yaymaların, Gram boyama ile incelenmesi sonucu gram negatif basil morfolojisine sahip olduğu görüldü.



Şekil 4: Otomatize örnek işleme ve inkübasyon cihazı

3.1.1.1. MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS teknolojisi, matriks olarak bilinen bir madde kullanılarak molekülleri analiz eder. Molekülleri lazer tarafından parçalanmaktan bu matriks korur. Lazer ışını matriks ve mikrobiyal molekülleri serbest bırakır. Bu süreçte, matriks lazer enerjisinin çoğunu emer ve iyonize eder. Bu nedenle, gaz fazında rastgele çarpışmalar nedeniyle oluşan yük matriksten mikrobiyal moleküllere aktarılır (100).

Çalışmamızda, üreme tespit edilen kültürlerden ön tanıda gram negatif patojen olduğunu düşündüğümüz saf bakteri kolonileri %5 koyun kanlı agardan steril öze ile alındı ve Şekil 5’te gösterildiği üzere MALDI-TOF MS metal kartındaki kuyucuğa sürüldü.

Daha sonra kuyucuk üzerine 1 ml a-siyano-4 hidrokisisinamik asit matriks solüsyonu pipet yardımıyla damlatıldı ve 15 dakika boyunca kuruması beklendi.

Üretici firma önerisi ile, tanımlamada kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 8739 suşu kullanıldı. Hazırlanan plaka VITEK MS (BioMerioux, Fransa) cihazına yerleştirildi, iki saat sonunda sonuçlar değerlendirildi.

Tanımlama MALDI-TOF MS teknolojisi ile tür, cins ve familya düzeyinde yapıldı.



Şekil 5: MALDI-TOF MS metal kart

3.1.2. Kolistin Antibiyotik Duyarlılık Tespiti

- Boncuklu suş saklama besiyerinde -80 °C’de saklanmış olan izolatlar %5 koyun kanlı agar besiyerine tek koloni düşürme ekimi yapılarak pasajlandı.
- 37 °C etüv ısısında ve 24 saat aerobik koşullarda inkübe edildi.
- Saf olduğundan emin olunan kolonilerden duyarlılık testleri için 0,5 McFarland bulanıklığında inokulum hazırlandı.
- Eş zamanlı olarak bu inokulumlar hem SMD hem de VITEK 2 işlemleri için kullanıldı.

3.1.2.1. Kolistin standart sıvı mikrodilüsyon yöntemi

3.1.2.1.1. Kolistin stok hazırlanması:

Bu tezde SMD ile kolistin duyarlılık tayini için 1128,78 µg/mg potense sahip olduğu üretici tarafından bildirilen kolistin sülfat (Biosynth Carbosynth, İngiltere) tozu kullanıldı. Kullanılacak kolistin miktarı şu formülle hesaplandı.

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

$$1128,78 \text{ µg/mg} \times 15 \text{ mg}$$

$$16,5 \text{ ml} = \frac{\quad}{\quad}$$

$$1024 \text{ µg/ml}$$

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda, 15mg kolistin sülfat, 16,5 ml steril distile su ile çözelti hazırlanıp, stok solüsyon oluşturmak için steril ependorflara 2ml'lik alikotlandı. Alikotlar kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

3.1.2.1.2. Mueller-Hinton sıvı besiyeri hazırlanması:

- Kolistin SMD çalışmamız için ISO 16782 önerileri doğrultusunda katyon ayarı yapılmış Mueller-Hinton sıvı besiyeri (Condalab, İspanya) kullanıldı.
- Üretici firma 21g besiyerinin 1 litre steril distile suda çözünmesini önerir.
- Çalışmamız için gerekli olan 300ml Mueller-Hinton sıvı besiyeri için 6,3g toz besiyeri hassas terazide ölçüldü ve 300ml steril distile su ile 500ml balon joje içinde karıştırılarak çözdürüldü.
- Balon joje ağız kısmı alüminyum folyo ile kapatıldı.
- 121°C'de 15 dakika otoklavlandı ve soğuması beklendi.

3.1.2.1.3. Mikrodilüsyon mikroplak hazırlanması:

- Çalışmada kullandığımız steril mikroplakta (Microcult, Çin) 96 kuyucuk bulunmaktadır. Kolistin sıvı mikrodilüsyon çalışılacak bir mikroplak 12 izolat için kolistin duyarlılık tespit edecek ve 7 kolistin konsantrasyonu (0,5-32 µg/ml) içerecek şekilde dikey olarak kullanıldı ve aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı.
- Mikrodilüsyonu hazırlarken 14 ml steril distile su ve 2 ml stok kolistin solüsyon karıştırıldı. Böylece kolistin stoğu 1/7 oranında dilüe edilmiş oldu ve kolistin konsantrasyonu 128 µg/ml oldu.
- Biyogüvenlik kabininde, mikroplağın her bir kuyucuğuna 50 µl hazırlanmış katyon ayarı yapılmış Mueller-Hinton Broth, çok kanallı pipet ve steril pipet ucu kullanılarak dağıtıldı.
- İlk sıraya 50 µl 1/7 oranında dilüe edilmiş (128 µg/ml konsantrasyonda) kolistin stoğundan koyuldu.
- Son kuyucuğa kadar dilüsyon yapılarak devam edildi.
- Böylece mikroplakta en yüksek kolistin konsantrasyonu 64 µg/ml oldu. Son kuyucuğa kolistin konulmadı.
- Mikroplak hazırlandıktan sonra inokulum hazırlama aşamasına geçildi.

3.1.2.1.4. İnokulum hazırlanması:

- Boncuk pasajı yapılmış taze kültüründen izole edilen *K. pneumoniae* kolonisi steril öze ile alınarak steril salin ile steril şeffaf plastik tüp içinde vortekslelendikten sonra dansitometri (BioMérieux, Fransa) yardımı ile 0,5 McFarland'a ayarlandı.
- 0,5 McFarland bakteri yoğunluğuna ayarlanan tüplerden 5 µl inokulum, daha önce hazırlanmış olan 500 µl Muller-Hinton Broth içeren ependorf tüpüne pipetlendi ve vortekslelendi.
- Bakteri konsantrasyonu 1/100 dilüsyona uğramış oldu.

3.1.2.1.5. Mikroplağa inokulum eklenmesi:

- Bakteri inoküle edilmiş besiyeri içeren ependorf tüpünden 8 kuyucuğa 50 µl eşit olarak dağıtıldı. Bu işlem sonucunda, bakteri konsantrasyonunun son hali 5×10^5 CFU/ml oldu. Ayrıca kolistin konsantrasyonu da iki kat dilüe edilmiş oldu ve en yüksek 32 µg/ml en düşük ise 0,5 µg/ml kolistin konsantrasyonu olacak şekilde ayarlanmış oldu.
- Son iki satır kolistin dirençli ve duyarlı kontrol suşları için kullanıldı. EUCAST önerileri doğrultusunda kalite kontrol amacıyla, kolistine duyarlı ATCC 25922 *E. coli* suşu ve kolistin dirençli *mcr-1* pozitif NCTC 13846 *E. coli* suşu kullanıldı.
- Kapağı kapatılan mikropaklar 18 ila 20 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildi.

3.1.2.1.6. Kolistin Mikrodilüsyon Sonuçların Değerlendirilmesi:

- Üremenin olmadığı ilk kuyucuktaki konsantrasyon değeri, MİK olarak belirlendi.
- Elde edilen bu MİK değerleri, EUCAST kriterlerine göre yorumlandı.
- *K. pneumoniae* için kolistin duyarlılık kategorileri belirlenirken EUCAST sınır değerler tablosu versiyon V14.0 baz alındı MİK ≤ 2 µg/ml kolistin duyarlı, MİK ≥ 4 µg/ml kolistin dirençli kabul edildi.
- Uyum ve hata oranları hesaplanırken ISO tarafından önerilen 20776-2 numaralı standart baz alındı (89,101).

Testi okuma sırasında yanlış inokülasyon, kontaminasyon ve heterojen direnç gibi çeşitli olası nedenlere bağlı 'atlayan kuyucuk' adı verilen bir teknik sorun ortaya çıkabilir. Birden fazla atlayan kuyucuk durumu söz konusu olduğunda, ilgili izolat çalışmaya dahil edilmedi. Bu durumda tekrar edilmesi gerekmektedir. Tek bir atlayan kuyucuk tespit edildiğinde, tekrar test edildi. Bu durumda en düşük konsantrasyon MİK kabul edilir.

3.1.2.2. Otomatize ticari sistem VITEK-2

- VITEK-2 çalışılacak izolatlardan öncelikle inokulum hazırlandı.
- İnokulum hazırlanırken %5 koyun kanlı agara pasaj yapılmış, saf üreyen kültürden alınan koloni, şeffaf plastik bir test tüpünde steril salin ile karıştırılarak ve vorteksenerek 0,5 Mc Farland ($1-2 \times 10^8$ cfu/mL) olacak şekilde dansitometri yardımı ile ölçülüp, ayarlandı.
- Bulanıklığı ayarlanan inokulum süspansiyonu 15 dk içerisinde kullanıldı.

- Başka bir 3,0 ml %0,45 salin içeren steril plastik şeffaf tüpe, üretici firma önerileri doğrultusunda 0,5 Mc Farland ayarlanmış inokulumden 145 µl eklendi ve vortekslendi.
- Ambalajları içinde açılmamış olarak 2 °C ila 8 °C sıcaklıkta saklanmış olan VITEK®2 AST XN21 kartlar, kullanılmadan önce ambalajı içinde oda ısısına gelmesi için bekletildi.
- Kartlar hazırlanan tüplere yerleştirildi ve VITEK® 2 Compact (BioMérieux, Marcy l'Étoile, Fransa) cihazın inkübatörüne ve okuyucusuna elle yerleştirildi.
- Cihaz, Gram negatif organizmalar için 18 saate kadar süren bir süre boyunca her kuyucukta üremeyi izledi.
- Bu işlemde, her kart optik bir birimde her 15 dakikada bir taranır ve bu tarama sırasında algılanan ışık miktarı, ulaşılan üreme miktarıyla ters orantılıdır (1).
- Karttaki her antimikrobiyal ajan için MİK değerleri inkübasyon döngüsü tamamlandığında belirlendi.
- VITEK-2 AST XN21 kartı kolistin için MİK $\leq 0,25$ µg/ml ve MİK ≥ 8 µg/ml aralığında sonuç vermektedir. EUCAST rehberinde *K. pneumoniae* için MİK >2 µg/ml ise dirençli kabul edilmektedir.
- Kalite kontrol suşu olarak laboratuvarımızın suş arşivinden, duyarlı *E. coli* ATCC 25922 ve dirençli *E. coli* NCTC 13846 suşu kullanıldı. Dirençli kalite kontrol suşu için kolistin MİK hedef değeri 4 µg/ml 'dir (102).
- Bu çalışmada kullanılan AST XN21 kartı, *K. pneumoniae* izolatlarında şu antibiyotikler için EUCAST 2022 rehberine göre MİK belirleyerek duyarlılık profili sonucu vermektedir: sefoperazon/sulbaktam, seftolozan/tazobaktam, seftazidim /avibaktam, kolistin, eravasiklin, gentamisin, levofloksasin, meropenem/ vaborbaktam, moksifloksasin, temosilin, tikarsilin/ klavulanik asit, tobramisin.
- Bizim çalışmamızda kolistin dışında çalışılmış olan antibiyogram sonuçları duyarlı/dirençli sonuçlarına göre değerlendirildi.

3.2. MOBİL KOLİSTİN DİRENÇ (*mcr* 1-10) GENİ VARLIĞININ qPCR İLE ARAŞTIRILMASI

- Boncuklu suş saklama besiyerinden %5 koyun kanlı agar besiyerine tek koloni düşürme pasajı yapıldı ve 24 saat, 37 °C etüvde inkübasyona bırakıldı.
- Saf kültürden 1-2 koloni önce Tıbbi Mikrobiyoloji, Bakteriyoloji Laboratuvarında vNAT (Bioeksen, Türkiye) tüpüne alındı ve karıştırıldı. Daha sonra vortekslendi ve 45 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- İzolasyon öncesinde yapılan bu işlemin bakteri DNA ekstraksiyonuna katkı sağlayacağı ve plakların moleküler laboratuvara direkt transferinde oluşabilecek olası bir kontaminasyonu önleyeceği düşünüldü.
- Hazırlanan vNAT tüpleri Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarına gerekli önlemler dahilinde taşındı.
- Daha sonra qPCR yöntemi ile *mcr* 1-10 taranması için DNA izolasyon aşamasına geçildi.

3.2.1. Kültürden DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, Hızlı Nükleik asit Ekstraksiyon Kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılarak Zymio EXM3000 (Çin) cihazında gerçekleştirildi.

3.2.1.1. Hızlı Nükleik asit Ekstraksiyon Kit Bileşenleri

1. Ekstraksiyon Kartuşu
2. Manyetik Çubuk Kılıfı
3. Proteinaz K
4. STL-B
5. Wash Buffer
6. Elution Buffer

3.2.1.2. Sarf Malzemeler

1. Filtreli uç, 200 µl ve 1500 µl
2. 8'li Rod Kılıfları
3. 8 kuyulu örnek hazırlık kartuşu

3.2.1.3. DNA izolasyon aşamaları

- Kartuşlar, her biri sekiz kartuş taşıyabilme kapasitesine sahip bloklara yerleştirildi.
- Kartuşların kapağı açıldı.
- Kartuşların bir numaralı kuyularına 15 µl Proteinaz K pipetlendi.
- Hazırlanmış vNAT tüpünden bir numaralı kuyucuğa steril pipet yardımı ile 200 µl pipetlendi.
- Ekstraksiyon kartuşları Zybiox EXM3000(Çin) cihazında kartuş standına yerleştirildi.
- Manyetik çubuk kılıfları cihazda ilgili bölüme yerleştirildi.
- Cihaz çalıştırıldı ve izolasyon başlatıldı.
- İzolasyon işleminin gerektirdiği 16 dakikalık süre sonunda kartuşun son kuyusunda DNA izolatu elde edildi.

3.2.2. *mcr* 1-10 Kolistin Direnç Geni Analizi

Kolistin direnç geni *mcr* 1-10 araştırılması qPCR yöntemiyle gerçekleştirildi.

Kolistin direnci qPCR Panel (Bioeksen, Türkiye) kullanılarak CFX96 Touch Real-Time PCR (BIO-RAD-USA) cihazında gerçekleştirildi. PCR test kitinin içeriği aşağıda gösterilmiştir.

3.2.2.1. Kit İçeriği

- qPCR Mix
- Oligo Mix 1 (*mcr* 1,2, İnternal kontrol (İC) ,3)
- Oligo Mix 2 (*mcr* 4,5,6)
- Oligo Mix 3 (*mcr* 7,8,9,10)
- Pozitif kontrol
- Soğuk blok üzerine beyaz 0,2 ml'lik sekiz şeritli PCR reaksiyon tüpleri yerleştirildi. Çalışılacak örnek sayısına göre uygun hacimde master karışımı (7,5X=5X buffer +2,5X *mcr* oligo mix) steril ependorflar içerisinde pipetlenerek hazırlandı ve 5 saniye vortekslendi. Reaksiyon içeriği Tablo 4'te belirtildi.
- Negatif Kontrol

3.2.2.2. Sarf Malzemeler ve Kullanılan Ekipmanlar

- Magnetic Induction Cycler (Mic) (Bio Molecular System- BMS) ve/veya
- CFX96 Touch™/CFX96™ Dx/CFX Opus 96™/CFX Opus 96™ Dx (Bio-Rad) Real-Time PCR sistemleri
- 1-10, 10-100, 100-1000 µL sıvı aktarmaya uygun mikropipetler ve uyumlu filtreli pipet uçları (nükleaz içermeyen)
- Spin Santrifüj
- Vorteks

- qPCR cihazlarına özgü ve reaksiyon hacmi ile uyumlu reaksiyon tüpleri ve kapakları/filmleri

Tablo 4: Üretici Firmanın Forward ve Reverse Primer Tasarımı

mcr (1-10)	Primer Dizilimi
<i>mcr_1_177_F</i>	ATGCTCCAAAATGCCCTACAGA
<i>mcr_1_177_R</i>	TGCCACGATCAAGCCCAAT
<i>mcr_1_177_P_FAM</i>	CGACCAAGCCGAGACCAAGGAT
<i>mcr_2_287_F</i>	CTGATGGGTTTGGTGGCGT
<i>mcr_2_287_R</i>	TGGTCGGTTTGCATGGCAT
<i>mcr_2_287_P_ROX</i>	GCGATGGCGGTCTATCCTGTATCG
<i>mcr_3_150_F</i>	ACACATGCTATGACGAGGTTGT
<i>mcr_3_150_R</i>	CAGGGGTGAACTGACGATGA
<i>mcr_3_150_P_CY5</i>	TGCTCAAATGAAAGGGGATAAGCTGGT
<i>mcr_4_208_F</i>	CAATCTACTGCTGACTGGGCTAT
<i>mcr_4_208_R</i>	GGTAGGGACAATGTAACGCCT
<i>mcr_4_208_P_FAM</i>	GTTCGTTGGCATTGGGATAGTCGC
<i>mcr_5_93_F</i>	GTTCATCAGCCTTGTGTTACC
<i>mcr_5_93_R</i>	AGCCATGTTCCAGAAGTTAGGG
<i>mcr_5_93_P_HEX</i>	GGAATGCCCTTCTTGCTGGACGC
<i>mcr_6_211_F</i>	CACCGTTTATGACACCACCATG
<i>mcr_6_211_R</i>	TGCCATCACCCTGCCAC
<i>mcr_6_211_P_ROX</i>	GTGGCGTGGGTCAAGGTGGATTATC
<i>mcr_7_158_F</i>	GAAGTTCTCGATGAACGGCTAC
<i>mcr_7_158_R</i>	TGTCATCAAACCTCCTTGCGC
<i>mcr_7_158_P_FAM</i>	GTCGGTGCCCTGCATGTTCTCCA
<i>mcr_8_117_F</i>	TCCGTTCTTTTCTTTCCACTCT
<i>mcr_8_117_R</i>	CGCCAACCACCACAATTCAATT
<i>mcr_8_117_P_HEX</i>	GCCTTCAACAGACAATAAGCGGGGA
<i>mcr_9_129_F</i>	GTGATGCTGGAAAACCTTGATGAT
<i>mcr_9_129_R</i>	CATGAAGTGGCGATGCTCA
<i>mcr_9_129_P_ROX</i>	GACCGACTTATTACCTGCGTTATCCG

<i>mcr_10_185_F</i>	ATGGGCATTCTTCCGGCTAT
<i>mcr_10_185_R</i>	TCTTTGTTTCAGCGTCGGGT
<i>mcr_10_185_P_CY5</i>	CACCGGCTGCTTTCCATGCT

Tablo 5: PCR ile Araştırılan Gen Bölgeleri Ve Boyalar

Araştırılan Gen Bölgesi	Boyalar	PCR Kuyuları
<i>mcr-1</i>	FAM	1. Kuyucuk
IC	HEX	
<i>mcr-2</i>	ROX	
<i>mcr-3</i>	Cy5	
<i>mcr-4</i>	FAM	2. Kuyucuk
<i>mcr-5</i>	HEX	
<i>mcr-6</i>	ROX	
<i>mcr-7</i>	FAM	3. Kuyucuk
<i>mcr-8</i>	HEX	
<i>mcr-9</i>	ROX	
<i>mcr-10</i>	Cy5	

3.2.2.3. qPCR aşamaları

Reaksiyon karışımının hazırlanma aşamasında, çalışmaya başlamadan önce temiz odada 4°C dolaptan çıkarılan tüm test bileşenleri oda sıcaklığına getirildi. Daha sonra, bileşenler vortekslenerek karıştırıldı ve en az üç saniye boyunca 6800 x g hızında santrifüj edildi. Test için şu adımlar izlendi:

- Her bir 8 şeritli PCR tüpüne çalışılacak olan *mcr* master karışımı 7,5 µl pipetlendi. DNA izolasyonu bitmiş olan kartuşun son kuyucuğundan 2,5 µl alınarak üç *mcr* kuyucuğu için de eklendi.
- Kartuş içinde kalan DNA izolatları steril ependorflarda saklandı.
- İşlem sonunda her bir PCR tüpü, PCR karışımından 7,5 µl, örnek DNA'sından 2,5 µl olacak şekilde toplam 10 µl hacime ulaştı (Tablo 6).
- PCR tüplerinin kapakları kapatıldı ve ardından spin cihazına (Frontier, Ohaus, ABD) yerleştirildi. Bir dakika boyunca hızlı bir şekilde santrifüj işlemine tabi tutuldu.
- Şerit PCR tüpleri CFX96 Touch Real-Time PCR (BIO-RAD-Amerika Birleşik Devletleri) cihazındaki bloklara yerleştirildi.
- qPCR çalışması için üreticinin önerileri doğrultusunda, uygun ısı-döngü profili ile çalışma başlatıldı (Tablo 7).

Tablo 6: Reaksiyon İçeriği ve Miktarlar

Reaktif	Miktar
5X qPCR Mix	5 µl
2,5 X Oligo Mix	2,5 µl
2,5 X Nükleik Asit/ Negatif kontrol/ Pozitif Kontrol	2,5 µl

PCR testi 45 dakikada sonuçlandı ve *mcr* 1-10 olmak üzere toplam on adet direnç geni tarandı. Prob olarak floresan boyalar (FAM, HEX, ROX, Cy5) ampikonların analizinde kullanıldı.

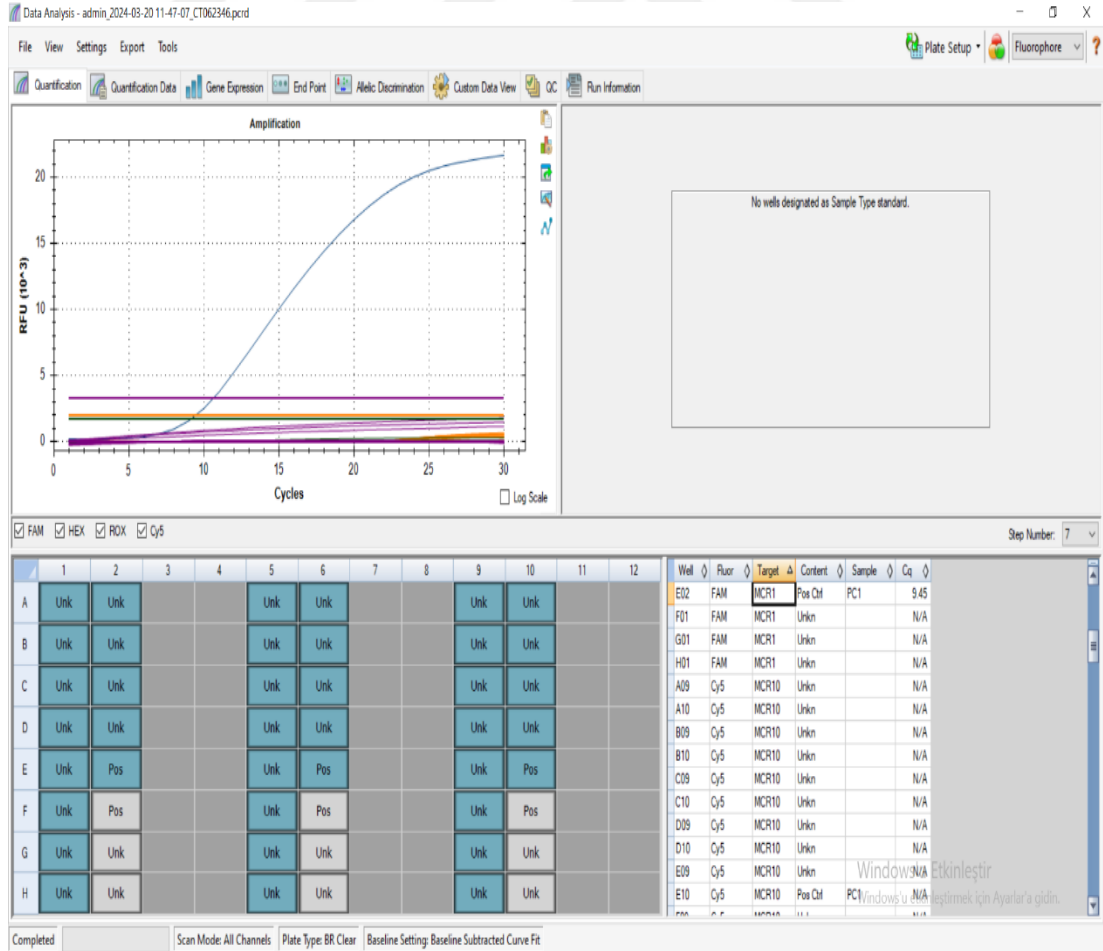
Tablo 7: qPCR Termal Döngü Basamakları:

qPCR Programı			
Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Enzim Aktivasyonu	1 Döngü	52 °C	3 dk
Bekleme	1 Döngü	95 °C	10 sn
Denatürasyon	12	95 °C	1 sn
Bağlanma/Uzama	Touchdown Döngüsü: Döngü başına	67 °C- 56 °C	15 sn

	bağlanma sıcaklığında 1 °C azalma		
Denatürasyon	35 Döngü	95 °C	1 sn
Bağlanma/Uzama		55 °C	15 sn
Tespit (Okuma)		(FAM-Green) /(HEX-Yellow)	

3.2.2.4. Sonuçların Yorumlanması

İlk olarak negatif kontroller değerlendirildi ve kontaminasyon olmadığı gözlemlendi. Daha sonra pozitif kontrol eğrileri değerlendirildi. Örneklerin değerlendirilmesine geçildi. Elde edilen tüm amplifikasyon eğrilerinin şekli, Cq değerleri olan tüm reaksiyon kuyucukları için incelendi. Eşik değerinin üzerindeki tüm sigmoidal eğriler “pozitif” olarak, sigmoidal olmayan eğriler “negatif” olarak kaydedildi.



Şekil 6: PCR çalışmasında pozitif kontrol ve izolat sonuçlarının yorumlanması

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler için SPSS Statistics ver. 29.0 (IBM, ABD) paket programı kullanıldı ve p değerinin 0,05'ten küçük olması anlamlı olarak kabul edildi. Değişkenlerin tanımlayıcı analizleri yapıldı, kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak, sürekli değişkenler ortalama, standart sapma, ortanca ve 25-75 persentil değerleri ile verildi. Bağımsız kategorik değişkenlerin analizinde Pearson ki-kare ve eğitimde ki kare testleri kullanıldı. Sürekli değişkenlerin analizinde normal dağılım Kolmogorov-Smirnov testleri ile değerlendirildi ve kategorik değişkenlerle karşılaştırılmasında normal dağılım olmadığı için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Referans test ile VITEK 2 arasındaki uyum Cohen's Kappa analizi ile değerlendirildi (103).

Kappa değeri şu şekilde yorumlanır:

- <0 uyum yok
- 0,01-0,20 önemsiz düzeyde uyum
- 0,21-0,40 zayıf düzeyde uyum
- 0,41-0,60 orta düzeyde uyum
- 0,61-0,89 iyi düzeyde uyum
- 0,81-1,00 çok iyi düzeyde uyum

3.3.1. Duyarlılık Analizlerinde Kullanılan Tanımlar ve Formüller

Gerçek pozitif (GP): Standart mikrodilüsyon ve VITEK 2 yönteminin dirençli saptadığı hastalar

Gerçek negatif (GN): Standart mikrodilüsyon ve VITEK 2 yönteminin duyarlı saptadığı hastalar

Yalancı pozitif (YP): VITEK 2 yönteminin dirençli, standart mikrodilüsyonun duyarlı saptadığı hastalar

Yalancı negatif (YN): VITEK 2 yönteminin duyarlı, standart mikrodilüsyonun dirençli saptadığı hastalar

- Duyarlılık (Sensitivite)= $(GP/(GP+YN)) * 100$
- Özgüllük (spesifite)= $(GN/(YP+GN)) * 100$
- Pozitif prediktif değer= $(GP/(GP+YP)) * 100$
- Negatif prediktif değer= $(GN/(YN+GN)) * 100$
- Test geçerliliği= $((GP+GN)/(GP+GN+YP+YN))*100$

3.3.2. Açıklamalar

- **Esansiyel uyum (EU):** Test sonucunun referans MİK ile ± 1 dilüsyon farkı olmasıdır.
- **Kategorik uyum (KU):** Test sonucunun duyarlı, orta duyarlı veya dirençli kategorilerle uyumlu olmasıdır.
- **Büyük hata (BH):** Referans yöntemle duyarlı bulunup test edilen yöntemle dirençli bulunmasıdır.
- **Çok büyük hata (ÇBH):** Referans metoda dirençli bulunup test edilen metodla duyarlı bulunmasıdır.

4. BULGULAR

4.1. İZOLATLARIN DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİ

Temmuz 2023-Aralık 2023 tarihleri arasında Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen örneklerden elde edilen 284 *K. pneumoniae* izolatı çalışmaya dahil edildi. Araştırmaya katılan hastaların temel özellikleri Tablo 8’de verilmiştir. Hastaların yaş ortalaması $61,5 \pm 24,1$ ’tir ve %58,1’i (n=165) erkektir. Çalışılan örneklerin %43,0’ı (n=122) anesteziyoloji, %15,1’i (n=43) dahiliye ve %7,0’si (n=20) pediatri kliniklerinden gelmiştir. Örneklerin alındığı hastaların %70,1’i (n=199) yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olup, %9,9’u (n=28) ise ayaktan poliklinik başvurusu yapmıştır. Poliklinik hastaları incelendiğinde, bu hastaların acil servise başvuran ya da daha önce hastanede yatış öyküsü olan hastaları içerdiği anlaşılmaktadır. Çalışılan izolatların %28,5’i (n=81) derin trakeal aspirat, %26,1’i (n=74) idrar ve %22,2’si (n=63) kan örneklerinden elde edilmiştir (Tablo 8).

Tablo 8: Araştırmaya Alınan Hastaların Temel Özellikleri

Hastaların Temel Özellikleri		N	%
Yaş (ay)	Ortalama $\pm$ SS	61,5 $\pm$ 24,1	
	Ortanca (25p-75p)	68,0 (52,0-80,0)	
Cinsiyet	Kadın	119	41,9
	Erkek	165	58,1
Klinik	Anesteziyoloji	122	43,0
	Dahiliye	43	15,1
	Pediatri	20	7,0
	Nöroloji	18	6,3
	Acil	16	5,6

	Genel cerrahi	12	4,2
	Diğer cerrahi	11	3,9
	Göğüs hastalıkları	11	3,9
	Kardiyoloji	7	2,5
	Üroloji	7	2,5
	Enfeksiyon	7	2,5
	COVID-19	6	2,1
	Fizik tedavi	3	1,1
	Psikiyatri	1	0,4
Başvuru tipi	Poliklinik	28	9,9
	Servis	57	20,1
	Yoğun bakım	199	70,1
İzolat tipi	Derin trakeal aspirat	81	28,5
	İdrar	74	26,1
	Kan	63	22,2
	Yara	22	7,7
	İdrar sonda	14	4,9
	Doku	8	2,8
	Bal	6	2,1
	Balgam	6	2,1
	Kateter	5	1,8
	Apse	3	1,1
	Plevra	2	0,7

4.2. STANDART SIVI MİKRODİLÜSYON İLE TİCARİ OTOMATİZE SİSTEM DUYARLILIK SONUÇLARI

4.2.1. SMD ile VITEK 2 Kolistin Duyarlılık Sonuçları

Bu çalışmada, altın standart yöntem olarak kolistin SMD yöntemi kullanılmıştır ve izolatların 129 (%45,4)'unun MİK $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ dilüsyonda olduğu gözlenmiştir. Diğer

test yöntemi olan VITEK 2’de ise örneklerin %46,8’i MİK ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$, %45,1’i ise MİK=0,5 $\mu\text{g/ml}$ dilüsyonda görülmüştür. Altın standart yöntemle göre alınan izolatların %52,1’i, VITEK 2’ye göre ise %49,3’ü kolistin duyarlıdır. Dağılımların ayrıntıları Tablo 9’ de gösterilmiştir.

Tablo 9: Araştırmaya Dahil Edilen İzolatların Kolistin Duyarlılık Profili

Yöntem		N	%
SMD Kolistin Dilüsyon ($\mu\text{g/ml}$)	$\leq 0,5$	129	45,4
	1	15	5,3
	2	4	1,4
	4	19	6,7
	8	53	18,7
	16	36	12,7
	32	13	4,6
	>32	15	5,3
SMD Kolistin Duyarlılık	Duyarlı	148	52,1
	Dirençli	136	47,9
VITEK 2 Kolistin Dilüsyon ($\mu\text{g/ml}$)	$\leq 0,25$	2	0,7
	0,5	128	45,1
	1	4	1,4
	2	6	2,1
	4	11	3,9
	≥ 8	133	46,8
VITEK 2 Kolistin Duyarlılık	Duyarlı	140	49,3
	Dirençli	144	50,7

4.2.2. Otomatize Sistem ile ÇİD Bakterilerin Tedavisinde Kullanılan Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

K. pneumoniae izolatlarının antibiyotiklere ait duyarlılık analizleri Tablo 10’da gösterilmiştir. En sık direnç tıkarşılın klavulanik asit’e karşı gözlenmiş olup izolatların %94,7 (n=269)’si dirençli bulunmuştur. Bunu takiben moksifloksasin direnci %89,8 (n=255), seftolozan tazobaktam direnci %82,0 (n=233) ve sefoperazon sulbaktam

direnci ise %80,3 (n=228) sıklıkta tespit edilmiştir. En az direnç %22,5 (n=64) sıklıkla eravasikline karşı saptanmıştır. Çalışmamıza dahil edilen 284 izolatın 20 (%7,04)'si otomatize sistem sonuçlarına göre tüm antibiyotiklere dirençli bulunmuştur.

Tablo 10: İzolatların VITEK 2 ile Diğer Antibiyotik Duyarlılık Analiz Sonuçları

Antibiyotik		N	%
Temosilin	Duyarlı	66	23,2
	Dirençli	218	76,8
Tikarsilin Klavulanik Asit	Duyarlı	15	5,3
	Dirençli	269	94,7
Sefoperazon Sulbaktam	Duyarlı	50	17,6
	Orta duyarlı	6	2,1
	Dirençli	228	80,3
Seftazidim Avibaktam	Duyarlı	130	45,8
	Dirençli	154	54,2
Seftolozan Tazobaktam	Duyarlı	51	18,0
	Dirençli	233	82,0
Meropenem Vaborbaktam	Duyarlı	139	48,9
	Dirençli	145	51,1
Gentamisin	Duyarlı	149	52,5
	Dirençli	135	47,5
Tobramisin	Duyarlı	57	20,1
	Orta duyarlı	1	0,4
	Dirençli	226	79,6
Levofloksasin	Duyarlı	26	9,2
	Orta duyarlı	32	11,3
	Dirençli	226	79,6
Moksifloksasin	Duyarlı	28	9,9
	Orta duyarlı	1	0,4
	Dirençli	255	89,8
Eravasiklin	Duyarlı	220	77,5
	Dirençli	64	22,5

4.2.3. Otomatize Sistemin Kolistin Duyarlılık Performansının Değerlendirilmesi

SMD ile otomatize sistem yönteminin dilüsyonları karşılaştırıldığında 264 (%93,0) izolatta EU, 274 (%96,6) izolatta KU, bir (%0,1) izolatta ÇBH ve 9 (%3,3) izolatta BH saptanmıştır. Uyum detaylarına Tablo 11 ve Tablo 12’de yer verilmiştir.

Tablo 11: SMD ve VITEK 2 Yöntemlerinin Kolistin MİK Sonuçları

		VITEK 2					
		≤0,25	0,5	1	2	4	≥8
SMD	≤0,5	2	114	3	4	3	3
	1	0	11	0	2	0	2
	2	0	3	0	0	1	0
	4	0	0	0	0	4	15
	8	0	0	1	0	0	52
	16	0	0	0	0	1	35
	32	0	0	0	0	1	12
	>32	0	0	0	0	1	14

	Esansiyel uyum (EU)
	Büyük Hata (BH)
	Çok büyük hata (ÇBH)

Tablo 12: SMD ve VITEK 2 Sonuçlarının Uyumlulukları

Test dilüsyon uyumlulukları	N	%
Esansiyel Uyum	264	93,0
Kategorik Uyum (KU)	274	96,6
Büyük Hata	9	3,3
Çok Büyük Hata	1	0,1

VITEK 2 testinin duyarlılık analizlerine ise Tablo 13'te yer verilmiştir. Ticari otomatize sistemin duyarlılığı %99,3, özgüllüğü %93,9, PPD %93,8 ve NPD ise %99,3 olarak saptanmıştır. Testin toplam geçerliliği %96,5'tir.

Tablo 13: VITEK 2 Yönteminin SMD'a Göre Duyarlılık Analizleri

		SMD		Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD	Test geçerliliği
		Dirençli	Duyarlı					
VITEK2	Dirençli	135	9	%99,3	%93,9	%93,8	%99,3	%96,5
	Duyarlı	1	139					

Testlerin uyumunu değerlendirmek için yapılan kappa analizinde dilüsyon sonuçları birleştirilmiştir (Tablo 14) ve uyum analizi sonucu kappa değeri 0,698 bulunmuş olup, uyum düzeyi “iyi” olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 14: SMD ve VITEK 2 Testlerinin Uyum Değerlendirmesi

		VITEK 2				
		≤0,5	1	2	4	≥8
SMD	≤0,5	116	11	3	0	0
	1	3	0	0	0	1
	2	4	2	0	0	0
	4	3	0	1	4	3
	≥8	3	2	0	15	113

Örnekleri çalışmaya alınan hastaların yaş ve cinsiyet ile kolistin duyarlılıkları arasında ilişki saptanmamıştır. *K. pneumoniae* izolatlarının kolistin direnç oranları poliklinik başvurularında düşük (%28,6) iken yoğun bakım hastalarında en yüksek (%75,73) olarak tespit edilmiştir. (Tablo 15).

Tablo 15: Kolistin Duyarlılığı ile Hastaların Temel Özellikleri Arasındaki İlişki

Kolistin duyarlılık		Duyarlı		Dirençli		P
		N	%	N	%	
Yaş (ay)	Ortalama $\pm$ SS	60,75 $\pm$ 25,2		62,3 $\pm$ 22,9		0,904 ¹
	Ortanca (25p-75p)	68,0 (51,75-79,75)		67,5 (52,0-81,0)		
Cinsiyet	Kadın	60	40,5	59	43,4	0,628 ²
	Erkek	88	59,5	77	56,6	
Başvuru tipi	Poliklinik	20	71,4	8	28,6	0,019 ³
	Servis	32	56,1	25	43,9	
	Yoğun bakım	96	48,2	103	51,8	

¹ Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır.² Ki-kare testi kullanılmıştır.³ Eğitimde kıkare testi kullanılmış ve satır yüzdesi verilmiştir.

İzolatların alındığı örnek tipi ile kolistin direnci arasında ilişki saptanmamıştır (Tablo 16).

Tablo 16: İzolat Tipine Göre Kolistin Duyarlılıkları

Kolistin duyarlılık		Duyarlı		Dirençli		P
		N	%	N	%	
Numune	Solunum yolu örneği	44	29,7	49	36,0	0,486 ^{1,3}
	İdrar	43	29,1	31	22,8	
	Kan	30	20,3	33	24,3	
	Yara/doku/apse	21	14,2	12	8,8	
	İdrar sonda	7	4,7	7	5,1	
	Steril (plevra/katater)	3	2,0	4	2,9	
Numune	Solunum yolu örneği	44	47,3	49	52,7	0,258 ¹
	İdrar	43	58,1	31	41,9	0,230 ¹
	Kan	30	47,6	33	52,4	0,418 ¹
	Yara/doku/apse	21	63,6	12	36,4	0,159 ¹
	İdrar sonda	7	50,0	7	50,0	0,871 ¹
	Steril (plevra/katater)	3	42,9	4	57,1	0,713 ²

¹ Pearson ki-kare analizi kullanılmıştır.

² Fisher'in kesinlik testi kullanılmıştır.

³ Sütun yüzdesi verilmiştir.

Kolistin direnci olan izolatlarda eravasiklin, seftazidim avibaktam, gentamisin ve meropenem vaborbaktam haricinde diğer antibiyotiklere karşı da %90'ın üzerinde direnç saptanmıştır.

Kolistin duyarlı olan izolatlarda ise tikarsilin klavulanik asit direnci %90,5 (n=134), moksifloksasin direnci %82,4 (n=122), seftolozan tazobaktam direnci %68,9 (n=102) ve tobramisin direnci %68,2 (n=101) sıklıkta tespit edilmiştir. Tablo 17'de kolistin duyarlılığı ile diğer antibiyotik duyarlılıkları arasındaki ilişki gösterilmiştir.

Tablo 17: Kolistin Duyarlılığı ile Diğer Antibiyotik Duyarlılıkları Arasındaki İlişki

Kolistin duyarlılık		Duyarlı		Dirençli		p
		N	%	N	%	
Temosilin	Duyarlı	60	40,5	6	4,4	<0,001
	Dirençli	88	59,5	130	95,6	
Tikarsilin Klavulanik Asit	Duyarlı	14	9,5	1	0,7	0,001
	Dirençli	134	90,5	135	99,3	
Sefoperazon Sulbaktam	Duyarlı	50	33,8	6	4,4	<0,001
	Dirençli	98	66,2	130	95,6	
Seftazidim Avibaktam	Duyarlı	80	54,1	50	36,8	0,003
	Dirençli	68	45,9	86	63,2	
Seftolozan Tazobaktam	Duyarlı	46	31,1	5	3,7	<0,001
	Dirençli	102	68,9	131	96,3	
Meropenem Vaborbaktam	Duyarlı	86	58,1	53	39,0	0,001
	Dirençli	62	41,9	83	61,0	
Gentamisin	Duyarlı	93	62,8	56	41,2	<0,001
	Dirençli	55	37,2	80	58,8	
Tobramisin	Duyarlı	47	31,8	11	8,1	<0,001
	Dirençli	101	68,2	125	91,9	
Levofloksasin	Duyarlı	23	15,5	3	2,2	<0,001
	Orta duyarlı	28	18,9	4	2,9	

	Dirençli	97	65,5	129	94,9	
Moksifloksasin	Duyarlı	26	17,6	3	2,2	<0,001
	Dirençli	122	82,4	133	97,8	
Eravasiklin	Duyarlı	117	79,1	103	75,7	0,504
	Dirençli	31	20,9	33	24,3	
Tüm analizler ki kare testi ile yapılmıştır.						

Otomatize sistem sonuçlarına göre çalışmamıza dahil edilen 284 *K. pneumoniae* izolatının 20 (%7,04)'si tüm antibiyotiklere dirençli bulunmuştur.

Çalışmamızda SMD yöntemiyle kolistin direnci tespit edilen 136 izolatın hiçbirinde multipleks qPCR yöntemiyle *mcr* 1-10 geni tespit edilmemiştir.

5. TARTIŞMA

Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi'nin verilerine göre, ÇİD bakteriler Avrupa'da yılda 33.000'den fazla ölüme ve 670.000'den fazla enfeksiyona yol açmaktadır. Bu rakamların yanı sıra, ÇİD bakteri enfeksiyonlarının ve komplikasyonlarının sağlık sistemine yıllık maliyetinin 1,1 milyar doları aştığı tahmin edilmektedir (104). Bu çarpıcı veriler, *K. pneumoniae* gibi dirençli patojenlerin ciddi bir halk sağlığı tehdidi oluşturduğunu vurgulamaktadır. *K. pneumoniae*, solunum yolu, idrar yolu ve kan dolaşımı enfeksiyonlarının yanı sıra hastane ortamlarında sıkça görülen bir enfeksiyon nedenidir. Antibiyotik direnci, bu bakterinin tedavisini zorlaştırırken, hastane ortamlarında kolayca yayılmasına ve salgınlara neden olabilir. Dolayısıyla, *K. pneumoniae*'nin kontrol altına alınması ve antibiyotik direncinin önlenmesi hem insan hem de çevre sağlığı için kritik bir öneme sahiptir (105).

DSÖ 2016 yılında, kolistini insan tıbbı için en yüksek öncelikli kritik öneme sahip antimikrobiyaller grubuna dahil etmiştir (106). Yoğun bakım ve servislerde, ÇİD Gram negatif bakterilerin etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde kolistin son çare olarak kullanılmakta iken; hekimlerden ziyade, çiftçilerin bu antibiyotiği hayvancılıkta bilinçsiz şekilde büyüme faktörü olarak kullanması kolistine karşı gelişen direnci oldukça endişe verici bir düzeye getirmiştir (88).

COVID-19 pandemisi, dünya genelinde sağlık sistemlerini zorlayan büyük bir kriz yaratmıştır. Bu pandemi sürecinde, hastaneler önemli bir rol oynamış ve yoğun bakım kapasitelerinin artırılması ve hastalara etkili bir şekilde bakım sağlanması için çaba gösterilmiştir. COVID-19 pandemisinde yoğun bakımda yatan hasta sayısı hastane enfeksiyonlarında artışa ve dirençli patojenlerin yayılımına yol açmıştır (107,108).

CDC tarafından 2022 yılında COVID-19 pandemisi hakkında hazırlanan rapora göre, pandeminin ilk yılında 29.400'den fazla kişi antimikrobiyal dirence sahip etken kaynaklı enfeksiyondan hayatını kaybetmiş ve bu ölümlerin yaklaşık %40'ının nozokomiyal kaynaklı olduğu saptanmıştır (107). Mevcut veriler, nozokomiyal dirençli enfeksiyonlarda belirgin bir artış olduğunu ve 2019'dan 2020'ye kadar en az %15 arttığını göstermektedir (107). Koupaei ve arkadaşlarının 2024 yılında

yayınlanmış olduğu ‘COVID 19 hastalarında sekonder olarak gelişen *K. pneumoniae* enfeksiyonlarını’ araştıran bir sistematik meta analizde, COVID-19 hastalarında yaygınlığı %6,7 ile %26,81 aralığında bulunmuştur. ÇİD patojenler içinde en yaygın görüleni karbapenem dirençli *K. pneumoniae* olarak tespit edilmiştir (109).

ÇİD *Enterobacteriaceae* ailesinde yaygın olarak kullanılan kolistine karşı yıllara göre artan direnç oranları endişe yaratmakla birlikte, kullanımının zorunlu olduğu durumlarda uygun tedaviyi sağlamak adına klinik laboratuvarlarda hızlı ve güvenilir antimikrobiyal duyarlılık testlerinin uygulanması önemli hale gelmiştir. Binsker ve arkadaşlarının 2022’de İtalya’da yapmış olduğu bir araştırmada, *Enterobacteriaceae*’da kolistin direnci yıllara göre 2017’de %20,1, 2018’de %31,2 ve 2019’da %26,9 oranlarında tespit edilmiştir (110). Bir ve arkadaşları 2022 yılında 100 karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* izolatu arasında, %15’ini kolistine dirençli saptamıştır (111).

Balkanlar’da 2013’ten itibaren karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında kolistin direncinin endişe veren düzeylere ulaştığı bildirilmiştir. Bulgaristan %37 (112), Yunanistan %40 (113), Romanya %27,5, Sırbistan %10,6 (114) Türkiye %25,5 (115) oranlarıyla direncin en yüksek olduğu ülkeler arasında gösterilmiştir (116). Uzairue ve arkadaşlarının yaptığı meta analiz sonucunda 2020 yılında *K. pneumoniae* izolatlarında kolistin direnç oranının %12,9 olarak gözlemlendiği belirtilmiştir (117).

Öztaş ve arkadaşlarının 2017-2021 yıllarını kapsayan retrospektif çalışmada karbapenem duyarlı *K. pneumoniae* izolatlarının kolistin direnç oranı %6,15 iken karbapenem dirençli izolatların kolistin direnç oranı %16,74 olarak belirtilmiştir (118). Öngen ve Uçak’ın çalışmasında 85 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatının 68’i (%80) kolistin dirençli saptanmıştır (119).

Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarımıza Temmuz 2023-Aralık 2023 tarihleri arasında altı aylık süreçte ulaşan 3040 hasta örneğinden izole edilen ve kolistin SMD çalışılan Gram negatif bakterilerde kolistin direnç oranı %22,36 olarak tespit edilmiş olup, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* izolatlarının sırasıyla %32,5, %17 ve %14,3’ü kolistine dirençli bulunmuştur. Dirençli izolatların tamamı dikkate alındığında, *K. pneumoniae*’nın dirençli izolatlar arasındaki

oranı %51,9 ile en yüksek bulunmuş ve onu sırasıyla *A. baumannii* (%21,4) ve *P. aeruginosa* (%18,2) takip etmiştir. Ancak bu verilerin değerlendirilmesinde önemli bir husus şudur ki; laboratuvarımızda her Gram negatif basil için kolistin çalışılmamakta olup, sadece onkoloji, bağışıklığı baskılanmış veya kistik fibrozis gibi özel durumlara sahip hastaların servis ya da poliklinikten gelen örneklerinde ve yoğun bakım hastalarında kolistin antibiyotik duyarlılık testlerinin çalışılması bu oranın yüksekliğini açıklamaktadır.

Bu tez çalışmasına dahil edilen 284 *K. pneumoniae* izolatında altın standart yöntem olan SMD ile kolistin duyarlılık değerlendirmesi yapılmıştır ve 148 (%52,1)'i kolistin duyarlı, 136 (%47,9)'sı kolistin dirençli tespit edilmiş olup, ülkemizde yapılmış olan çalışmalarda tespit edilen kolistin direnç aralığındadır. Araştırmamızda sadece antibiyotik duyarlılık test yöntemleri kıyaslanmamış aynı zamanda *mcr* direnç geni de araştırdığından, bu çalışmaya ağırlıklı olarak dirençli izolatlar dahil edilmiştir ve bu nedenle kolistin dirençli *K. pneumoniae* oranının bu şekilde yüksek olması şaşırtıcı değildir. Diğer çalışmalar genellikle seçilen bakteri türü ve bakteri izolatlarının diğer antibiyotiklere karşı direnç durumu (karbapenem direnci vb.) gibi seçim kriterleri açısından çeşitlilik göstermektedir. Ancak, benzer şekilde, çoğu çalışmada *K. pneumoniae*'nin yüksek kolistin direnç oranlarına sahip olduğu gözlenmiştir.

Yoğun bakım yatışı ÇİD enfeksiyonlar için predispozan bir faktördür. Panigrahi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, yoğun bakımda yatan hasta kültüründe üreyen çok ilaca dirençli Gram negatif basillerde kolistin direnç prevalansı %19,6 bulunmuş ve bu dirençli bakteri grupları arasında, kolistin direncinin *K. pneumoniae*'da %9,6 oranı ile en yüksek olduğu belirlenmiştir (120). Suudi Arabistan'da 2023 yılında *K. pneumoniae* izolatlarının %50,7 'si yoğun bakımda yatan hastalardan izole edilmiştir (121). Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların pozitif kültür sonuçlarının incelendiği bir çalışmada 2499 izolat toplanmış, bunun %21,3'ü *Klebsiella spp.* olarak tanımlanmış ve bu izolatların %1,28 'i kolistine dirençli saptanmıştır (122). Kan örneklerinde kolistin dirençli *K. pneumoniae* hakkında araştırma yapan bir meta analizde yoğun bakım ünitelerinde kolistin dirençli *K. pneumoniae* oranı %11,5 iken, servis ve polikliniklerden gelen numunelerde bu oran %3.03 olarak hesaplanmıştır (117). Çeşitli yoğun bakım hastalarından 166 ÇİD *K. pneumoniae* izolatının dahil edildiği ve %19,87'sinin kolistin dirençli saptandığı bir çalışmada, kolistin dirençli *K.*

pneumoniae dağılımı nöroloji yoğun bakım %21,69, dahiliye yoğun bakım %14,81, yenidoğan yoğun bakım %20,83, çocuk yoğun bakım %12,5 olarak rapor edilmiştir (120).

Konya'da gerçekleştirilen bir çalışmada, 657 ÇİD Gram negatif basil incelenmiştir. Bu bakterilerin 538 (%81,88)'i *K. pneumoniae* türüne aittir ve bunların 459 (%69,86)'u yoğun bakım ünitelerinden alınan numunelerden izole edilmiştir (123).

Bizim çalışmamızda kolistin direnci dikkate alındığında izolatlarda direnç oranları en az poliklinik (%28,6) başvurularında iken en fazla yoğun bakım hastalarında (%51,8) tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda diğer çalışmalara kıyasla yoğun bakım hastalarında kolistin direnç oranı daha yüksektir. Bunun nedeni hastanemizin üçüncü basamak hastane olması ve hastanemizdeki tedaviye başlayana dek hastanın farklı merkezlerde tedavi almış olması olabilir. Ayrıca rutin olarak yoğun bakımda yatan hastalarda kolistin SMD çalışılırken servis ve poliklinik hastalarına gerekli hallerde kolistin duyarlılık testi çalışılmaktadır.

K. pneumoniae izolatlarının örnek bazında dağılımı incelendiğinde; İbrahim ve arkadaşlarının Suudi Arabistan'da yapmış olduğu çalışmada klinik örneklerden izole edilen 211 *K. pneumoniae* en çok idrar (n=85) daha sonra sırasıyla, balgam (n=74), yara (n=25), kan (n=20), trakeal aspirat örneklerinden (n=7) izole edilmiştir (122). Hindistan'da yoğun bakım hastalarında yapılan çalışmada alınan kan örneklerinin %8,75'inde idrar örneklerinin %4,26'sında ve balgam ve bronkoalveoler lavaj örneklerinin %4,4'ünde kolistin dirençli *Klebsiella spp.* izole edilmiştir (122). Tripathi ve arkadaşlarının 2023 yılında yapmış olduğu bir prevalans çalışmasında 1985 *K. pneumoniae* izolatının %1,86'nda kolistin dirençli bulunmuş ve idrar örneklerinin %3'ü, kan örneklerini %6'sı, balgam örneklerinin ise %2'si kolistin dirençli *K. pneumoniae* olarak belirlenmiştir (124).

Türkiye'de yapılan 657 ÇİD Gram negatif basilin dahil edildiği bir çalışmada örneklerin 303'ü kandan izole edilmiştir ve bu bakterilerin 118 (%38,9)'i kolistin dirençli bulunmuştur, bronkoalveoler lavaj örneğinden izole edilen 190 bakterinin ise 115 (%60,5)'i kolistine dirençli saptanmıştır (123).

Hastanemizin laboratuvar sisteminden edindiğimiz retrospektif verilere göre Temmuz-2023-Aralık 2023 arasında 1980 *K. pneumoniae* izolatına kolistin SMD çalışılmıştır ve bu bakteriler en çok %31,1 ile kan daha sonra %25,6 idrar, %8,3 yara örneğinden izole edilmiştir. Kolistin direnci gösteren 353 *K. pneumoniae* izolatının, elde edildiği hasta örnek türüne göre incelendiğinde ise, %32,8'i derin trakeal aspirat, %26,92'si kan, %21,8'i idrar ve %8,7'si yara örneklerinden elde edilmiştir.

Bizim çalışmamıza dahil edilen tüm *K. pneumoniae* izolatlarının %28,5'i derin trakeal aspirat, %26,1'i idrar ve %22,2'si kan örneklerinden elde edilirken, 136 kolistin dirençli *K. pneumoniae* izolatı incelendiğinde bu oranların %36'sı solunum yolu örneği, %24,3'ü kan, %22,8'i idrar, %8,8'i yumuşak doku, %5,1'i idrar sonda ve %2,9'u steril numunelerden elde edilmiştir. *K. pneumoniae* kolistin dirençli izolat eldesinde numune tipi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (p=0,486) Çalışmamızda hastanemiz verileriyle benzer şekilde kolistin dirençli *K. pneumoniae* izolatları daha çok solunum yolu örneklerinden elde edilmiştir. Uğraklı ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da bizim çalışmamıza benzer şekilde en çok kolistin direnci solunum yolu örneklerinde tespit edilmiştir (123).

Suudi Arabistan'daki bir çalışmada toplanan *K. pneumoniae* izolatlarının elde edildiği hastaların cinsiyet dağılımı %60,18'i erkek, %39,81'i kadın hasta şeklinde sınıflandırılmıştır (121). Hindistan'da yapılan bir çalışmada *K. pneumoniae* prevalansı kadınlarda %66,95 erkeklerde ise %33,04 olarak belirlenmiştir (124). İbrahim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayla bu oranlar benzerlik göstermektedir (121) Ancak Tripathi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kadın cinsiyette daha çok *K. pneumoniae* izole edilmiştir (124). Pnigrahi ve arkadaşları yoğun bakım hastalarından izole edilen ÇİD Gram negatif basillerde kolistin direnç oranlarını cinsiyete göre erkeklerde %72,8, kadınlarda %27,2 olarak hesaplamışlardır (120).

Hastanemizin altı aylık verilerine göre, kolistin duyarlılık testi yapılan tüm *K. pneumoniae* izolatlarının %59'u erkek hasta örneğinden izole edilmiştir. Bu sonuçlar, tez çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Çalışmamızdaki tüm izolatlar cinsiyete göre incelendiğinde %58,1'i erkek, %41,9'u ise kadın hasta örneklerinden elde edilmiş olup, kolistin dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının %56,6'sının erkek, %43,4'ünün kadın hastalara ait olduğu tespit edilmiştir. Pnigrahi ve arkadaşları da kadınlarda daha

düşük oranda kolistin dirençli izolat tespit etmiştir ancak bizim çalışmamızdan çok daha düşük oranlar saptanmıştır. Burada dikkat edilmesi gereken nokta, bizim çalışmamızda sadece *K. pneumoniae* türü incelenirken Pnigrahi ve arkadaşlarının çalışmasında ÇİD Gram negatif bakterilerin incelenmiş olmasıdır (120).

Demografik verilerden yaş incelendiğinde; klinik örneklerden *K. pneumoniae* izole edilen bir çalışmada hasta yaş ortalaması 63,98 saptanmıştır (121). Bizim çalışmamızda ise *K. pneumoniae* ile enfekte hasta yaş ortalaması 61,5, ortanca ise 68 bulunmuştur. Çalışmamızda yaş ile kolistin dirençli *K. pneumoniae* arasında anlamlı bir fark bulunmamış olup, bu çalışmayla benzer yaş ortalamasına sahiptir.

Kolistin, ÇİD Gram-negatif bakterilerin neden olduğu ağır enfeksiyonların tedavisinde son seçenektir (106). Kolistin duyarlılık testleri bu antibiyotiğin moleküler özellikleri, kation dengesi ve plastik yüzeylere tutunması gibi nedenlerden dolayı oldukça zordur ve bu durum kolistin için pek çok test yöntemine güveni azaltmaktadır (89). Kolistin duyarlılık tespitinde EUCAST, SMD'ü referans yöntem olarak kabul etmektedir (88). Ancak bu yöntemde antibiyotik çözeltilerinin manuel olarak hazırlanması ve diğer otomatize sistemlere göre zahmetli ve zaman alıcı oluşu nedeniyle çoğu klinik mikrobiyoloji laboratuvarında bu test hala uygulanamamaktadır.

Antibiyotik duyarlılık testlerinde hata oranlarını değerlendirmek için belirli yüzdelerin kullanılması önerilmiştir. Jorgensen, yeni bir antibiyotik duyarlılık testinin doğruluğunu değerlendirmek için bazı kriterler önermiştir: ÇBH oranının %3'ten az, toplam BH ve küçük hata oranlarının %7'den az ve EU oranının %90'dan fazla olması gerektiğini belirtmiştir (125). Chew ve arkadaşları CLSI standartları önerisinde çalışmalarında $EU \geq 90$, $KU \geq 90$, $\text{ÇBH} \leq 1,5$ ve $BH \leq 3,0$ oranlarının kabul edilebilir olduğunu belirtmiştir (126). Bizim çalışmamızda ise VITEK 2 ile SMD kolistin duyarlılık performansı karşılaştırıldığında EU %93, KU %96,6, ÇBH %0,1 ve BH %3,3 olarak saptanmış olup Chew ve arkadaşlarının çalışmasına göre kabul edilemez oranda büyük hataya sahipken, Jorgensen'e göre kabul edilebilir oranlara sahiptir. Bu nedenle çalışmamızın verileri iş yükü yoğun rutin laboratuvarlarda VITEK 2 kullanılabileceği, VITEK2 %3,3 büyük hata payı içermektedir diye rapora not düşülmeli, ancak imkân var ise altın standart yöntem olan kolistin sıvı mikrodilüsyon yönteminin kullanılması gerektiğini düşündürmektedir.

Günümüzde gelişmekte olan ülkelerdeki tanısal mikrobiyoloji laboratuvarlarının temelini otomatize sistemler oluşturmaktadır. Önerilen standart sıvı mikrodilüsyon yöntemini uygulamak oldukça zor ve zaman alıcıdır; bu nedenle, genellikle ticari otomatize sistemler veya gradyan şeritler kullanılarak antimikrobiyal duyarlılık testleri yapılır. Ayrıca, eğitilmiş teknik personel eksikliği, yarı veya tam otomatize tanı/antimikrobiyal duyarlılık testi sistemlerinin kullanımını arttırmaktadır. Otomatize sistemlerin çoğu standart yöntemler izlemesine rağmen, üreticiden üreticiye performans farklılıkları gözlemlenebilir. Chew ve arkadaşları yaptıkları çalışmada VITEK 2'nin kolistin duyarlılık testinde %36 ÇBH oranıyla güvenilirliğinin sorgulanabileceğini bildirmiştir (126). VITEK 2 sistemi, önceki çalışmalarda *Enterobacterales* için çelişkili bulgular sunmaktadır. Dafopoulou ve arkadaşlarının çalışmasında ÇBH olmaksızın yüksek oranda EU ve KU gösterilmiştir (127). Chew ve arkadaşları ise kolistin duyarlılık tespitinde VITEK 2 kullanımından kaçınılmasını tavsiye etmiştir (126). Bunun sebebi daha önce yukarıda bahsettiğimiz gibi çalışmalarda kabul edilemeyecek oranda yüksek ÇBH oranlarının bulunması olabilir. Şöyle ki; Bir ve arkadaşları 48 *K. pneumoniae* izolatını kolistin direnci açısından incelemiş ve VITEK 2 ile %70,8 kolistin duyarlı, %29,2 dirençli tespit etmiştir, ancak SMD'da bu oranlar %85,4 duyarlı, %14,6 dirençli şeklinde tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda VITEK 2'nin dirençli sonuç vermeye daha yatkın olduğu yani BH yapmaya yatkın olduğu sonucuna varılmıştır. SMD ile kabul edilebilir bir uyum sağlanmasına ve KU ile EU oranlarının güvenilir olmasına rağmen, VITEK 2'nin ÇBH oranları (%13,3) ve BH oranları (%11,8) kabul edilemez olarak değerlendirilmiştir (128).

Lellouche ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise 44 *K. pneumoniae* izolatının SMD ile %61,4'ü duyarlı, %38,6'sı dirençli tespit edilmiş ve VITEK 2'nin performansı kıyaslandığında EU %84, KU %93,2, ÇBH %17,6 olarak oldukça yüksek hesaplanmıştır (129).

Ülkemizde 2021 yılında Uğraklı ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, SMD yöntemiyle yapılan testler sonucunda 264 *K. pneumoniae* izolatının %50,9'unun kolistin duyarlı olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, VITEK 2 sistemi kullanılarak yapılan testlerde ise bu izolatların %54,6'sının kolistin duyarlı olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre, VITEK 2, SMD yöntemine göre daha yüksek oranda duyarlı izolat

saptamıştır. Bu çalışmanın VITEK 2 sonuçları ÇİD Gram negatif bakteri izolatları için incelendiğinde KU %92,4, *K. pneumoniae* özelinde bakıldığında ise KU %93,3 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada da VITEK 2 otomatize sistemi ile *K. pneumoniae* izolatlarında ÇBH %12,04 ve BH %1,1 gibi kabul edilemez sonuçlar bulunmuştur (123).

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi'nde kolistin antimikrobiyal duyarlılık testinin Gram negatif basillerde VITEK 2 ile SMD referans alınarak yapılan hesaplamalarda VITEK 2 için duyarlılık % 95,8 özgüllük % 12,5, PPD % 92,9, NPD % 20 olarak tespit edilmiştir. VITEK 2 'de PPD yüksek olmasına rağmen BH oranı % 3,8, ÇBH oranı % 6,7 olarak tespit edilmiştir. *K. pneumoniae* için bu çalışmada EU %60, ÇBH %2, BH %1 olarak tespit edilmiştir (130).

Türkiye'de ÇİD olduğu bilinen *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarının dahil edildiği bir çalışmada, SMD ile 61 izolat kolistine dirençli 39'u kolistin duyarlı bulunmuştur. VITEK 2 ile EU ve KU sırasıyla %100 ve %99 olarak belirlenmiştir (131).

Bu çalışmada, Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında kolistin duyarlılık testinde, otomatize sistem VITEK 2'nin çok ilaca dirençli bakteriler için kullanılan AST XN21 Kartı ile EUCAST önerileri ışığında referans yöntem olan SMD sonuçlarının performans karşılaştırılması yapıldı. Bizim çalışmamızda altın standart SMD yöntemi ile izolatların %52,1'i duyarlı, % 47,9'u dirençli, VITEK 2 ile izolatların %49,3'ü duyarlı, %50,7'si dirençli olarak tespit edilmiştir. SMD ile karşılaştırıldığında, VITEK 2 kolistin duyarlılık tespitinde %3,3 BH, %0,1 ÇBH oranları saptanmıştır. SMD ile VITEK 2'nin kolistin antimikrobiyal duyarlılığını belirlemede, duyarlılığı %93,9, özgüllüğü %99,3, PPD %99,3 ve NPD ise %93,8 olarak saptanmış ve testin toplam geçerliliği %96,5 olarak hesaplanmıştır. Türkiye ve dünya genelinde yapılan ve kolistin duyarlılığının VITEK 2 ile SMD karşılaştırması yapıldığında ÇBH'nın daha yüksek bulunduğu diğer araştırmalardan farklı olarak, bizim çalışmamızda bu oranın daha düşük olduğu saptanmıştır (99,126). Bu durumun sebebi olarak, üretici firmanın kolistin ile ilgili önceki eleştirileri dikkate alarak performansını arttırabilmek için bu çalışmada da kullanılan güncel AST kartına (XN21) önceki kolistin formülasyonu (cs01n), karbapenem dirençli *Enterobacterales*

izolatlarında *mcr-1* gen taşıyıcılarında direnç tespiti ile ilgili sınırlamalara sahip olduğu için yeni bir kolistin (cs02n) formülasyonu eklemiş olması gösterilebilir (90) .

Kolistin antibiyotik duyarlılık tespitinde birçok yöntem mevcuttur. Ancak, kolistin moleküler yapısı nedeniyle her yöntem uygun olmayıp, duyarlılık testi açısından en doğru ve kullanışlı yöntemi belirleme arayışı devam etmektedir.

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında kolistin duyarlılık tespitinde önerilmeyen otomatize yöntemler yanında fenotipik testler de mevcuttur. Matuschek ve diğerleri Gram negatif basillerde yaptıkları çalışma sonuçlarına dayanarak, laboratuvarlarda kolistin gradyan testlerine veya disk difüzyonuna güvenilmemesi gerektiğini belirtmiştir ve EUCAST bu öneriyi kabul etmiştir (132). Disk difüzyon testinin dezavantajı, duyarlılığın zon çapına göre belirtilmesi ve MİK belirtmemesi olup, gradyan testler gibi yüksek ÇBH seviyeleri çalışmalarda gösterilmiştir. Gradyan testler kolistin duyarlı izolatlarda, kolistin dirençli izolatlara göre biraz daha iyi performans göstermektedir (132).

Referans yöntemi olarak SMD önerilmesine rağmen, bu yöntemin rutin laboratuvar uygulamalarında kullanımını sınırlayan bazı zorluklar bulunmaktadır. SMD yönteminin uygulanması zahmetli ve zaman alıcı olabilir, ayrıca taze hazırlanmış antibiyotik süspansiyonu gerektirir. Bu nedenle pratik uygulaması kolay birçok ticari ürün piyasaya sürülmüştür. Lakshmanan ve ark. 2023 yılında yayınladığı bir derlemede EUCAST Laboratuvarları, ISO 20776-1 standartlarına uygun olarak Sensititre, Micronaut-s, Micronaut MIC-Strip, SensiTest ve UMIC gibi ticari sıvı mikrodilüsyon kitlerin yüksek performanslı testler olduğunu ve kullanılabileceğini belirtmiş ve bu ticari test kitlerinin yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu, BH ve ÇBH oranlarının kabul edilebilir sınırlarda olduğunu gözlemlemişlerdir (64,126,133).

Kansak ve arkadaşlarının çalışmasında kolistin duyarlılık tespitinde CHROMID® Colistin R agar (bioMerieux, France) besiyerinin duyarlılığı %100, özgüllüğü %97,5 olarak saptanmıştır (131).

Kılavuzlarda 2019'a kadar, yalnızca SMD onaylanmış bir yöntem iken, rutin olarak uygulanmasında zorluklar nedeniyle, birçok laboratuvar sadece VITEK 2 sistemi ile

alınan duyarlılık sonuçlarına güvenmekte ve bunları klinisyenlere rapor etmektedir. Bu nedenle, klinisyenlere doğru ve hızlı antibiyotik duyarlılık sonucu ulaşması için günlük rutin bir şekilde uygulanabilir bir testin keşfedilmesi hayati öneme sahiptir (134).

CLSI, sıvı mikrodilüsyona ek olarak kolistin disk elüsyon testi ve kolistin agar testlerini son zamanlarda uygun yöntemler olarak önermiştir (89). Hindistan'da yapılan bir çalışma, ülkenin ekonomik durumu dolayısıyla mikrobiyoloji laboratuvarlarının kaliteli kolistin disklerini satın almada yaşadığı zorluk sebebiyle, kolistin disk elüsyon yöntemi yerine, kolistin agar testini rutin antimikrobiyal duyarlılık testlerine dahil etme gerekliliğini savunmuştur. Kolistin agar testi, kolistin disk elüsyon yöntemine göre 10 izolatı tek plakta değerlendirme imkânı dolayısıyla daha kolay uygulanabilir bulunmuştur (134). Ülkemizde yapılan bir çalışmada sıvı disk elüsyon yöntemi, kolistin antibiyotik duyarlılık testlerinde yüksek bir KU ve düşük hata oranları sağlayarak güvenilir sonuçlar sunmuştur (135). Hastanemizde yapılan bir çalışmada da *Acinetobacter*, *Pseudomonas* ve *Enterobacterales* türlerinde kolistin duyarlılığının belirlenmesinde kolistin sıvı disk elüsyon, Hızlı Resapolimiksin NP ve sıvı mikrodilüsyon yöntemlerinin karşılaştırılmasında 74 *K. pneumoniae* izolatı dahil edilmiştir. Bunların 50 (%67,56)'si kolistin duyarlı bulunmuş ve *K. pneumoniae*'nin kolistin sıvı disk elüsyon testi KU oranı %93, EU oranı %95 olarak kabul edilebilir sınırlarda saptanmıştır. ÇBH oranı %7 ve BH oranı %5 bulunmuş olup diğer çalışmalardaki otomatize sistemlerle karşılaştırıldığında benzer şekilde KU ve EU kabul edilebilir sınırlardayken hata oranları kabul edilemez olarak değerlendirilmiştir (136).

Rutin yükü fazla olan laboratuvarlarda otomatize sistemlerin kolistin duyarlılığını belirlemede kullanımı için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. VITEK 2 ile diğer yöntemlerin performans karşılaştırmasını yapan çalışmalar mevcuttur. VITEK 2 sisteminin kolistin antimikrobiyal duyarlılık testindeki performansı değerlendirildiğinde çelişkili sonuçlar elde ettiği görülmektedir. VITEK 2 yöntemi, kolistin duyarlılık tespiti için hala bazı laboratuvarlarda kullanılmaktadır ancak, suboptimal ve hata yapmaya açık bir yöntem olduğu çalışmalarda belirtilmiştir (21).

Hindistan’da yapılan bir meta analizde kolistin duyarlılık sonuçları için otomatize ticari sistem ile SMD yöntemi karşılaştırıldığında, kabul edilebilir EU ve KU değerleri tespit edilmiştir (64). Ancak, Chew ve arkadaşları otomatize yöntemlerle SMD’a kıyasla; Microscan için %10 ve VITEK 2 için %36 gibi yüksek ÇBH oranı tespit etmişlerdir. Böylece kolistin duyarlılık test yöntemleri arasında en yüksek ÇBH oranına VITEK 2 sahip olmuştur (64,126). Kolistin duyarlılık performans değerlendirmesini otomatize sistemler arasında yapan çok merkezli bir çalışmada BD Phoenix ve MicroScan için %100 KU, VITEK 2 için ise %88 KU elde edilmiş, ayrıca VITEK 2 için ÇBH oranı %12 saptanmıştır. Bu çalışmada VITEK 2, kolistin dirençli olduğu bilinen *E. coli* NCTC 13846 suşu için yanlış duyarlı sonuçlar vermiştir (137).

Angelis ve ekibinin yaptığı araştırmada, kan kültüründen izole edilen patojenlerin kolistin antimikrobiyal duyarlılık testi için otomatize ticari sistem Accelerate Pheno™ ve VITEK 2 sistemlerinin standart sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile performansı karşılaştırılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre, 18 *K. pneumoniae* izolatında VITEK 2 sistemi ile KU oranı %94,4 olarak saptanmışken, BH olmadan ÇBH oranı %50,0 olarak belirlenmiştir. *K. pneumoniae* izolat sayısı az olduğu için bu çalışmada ÇBH oranının oldukça yüksek çıktığı varsayılabilir. Diğer yandan, Accelerate Pheno™ sistemi ile aynı KU oranı %94,4 olarak hesaplanmış, ancak ÇBH tespit edilmemiş ve BH oranı %6,3 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, Accelerate Pheno™ sisteminin, VITEK 2 sistemine kıyasla kan dolaşımı enfeksiyonlarında Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin hızlı antimikrobiyal duyarlılık testleri için geçerli bir alternatif olabileceği öne sürülmüştür (138).

Koyuncu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada BD Phoenix100 (Becton Dickinson, ABD) otomatize sistemi kolistin dirençli ve duyarlı izolatları ayırt etmede yetersiz kalmış ve ÇBH oranı % 5 olarak belirtilmiştir (135).

Bizim çalışmamızda ise otomatize sistemle referans yöntem karşılaştırılmış olup ÇBH %0,1, BH %3,3 oranlarında tespit edilmiştir. Yüksek ÇBH oranları veren çalışmalara kıyasla çalışmamız kabul edilebilir sınırlar içinde ÇBH oranları saptamıştır.

Yoğun bakımlarda sıklıkla son çare olarak kullanılan antibiyotiklere çok hızlı direnç geliştiğinden yeni ve alternatif antibiyotik ilaç geliştirme çalışmaları hızlanmaktadır. Artan antibiyotik direnç oranları ÇİD bakterilerin tedavisi için gelecekte önemli bir

sorun olacaktır. Bu nedenle otomatize ticari sistemler ÇİD bakteriler için yeni antibiyotikleri de içeren kartlar geliştirmiştir (90).

Enterobacteriaceae insan mikrobiyotasında yer alır ve bu grupta *K. pneumoniae*, antibiyotik direnç genlerini de novo mutasyonlar yoluyla, plazmid transferi (konjugasyon) yoluyla veya bakteriyofajlar aracılığıyla yatay gen transferi yoluyla elde edebilmekte olduğu için Navon ve arkadaşları bu bakteriyi "antibiyotik direnci için kaynak ve taşıyıcı" olarak tanımlamışlardır (28). Bu nedenle *K. pneumoniae* antibiyotik direnç gelişimi açısından yakın takip edilmeli ve yeni nesil antibiyotikler için duyarlılık profili izlenmeli, süveyans çalışmaları arttırılmalıdır.

2023 yılında analiz edilen 82 *K. pneumoniae* izolatının %53,6'sının kolistin dışındaki tüm antibiyotiklere dirençli olduğu görülmüştür (139). Bir başka çalışmada tüm *K. pneumoniae*'larda direnç oranları imipeneme %31,3, meropeneme %43,3, gentamisine %49,3 iken kolistine %10,9 olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada ÇİD *K. pneumoniae* izolatlarında gentamisine %73, imipeneme %46,8, meropeneme %63,8, kolistine %16,3 oranında direnç saptanmıştır (121). Ancak Tayvan'daki 300 *K. pneumoniae* izolatının dahil edildiği bir çalışmada meropeneme %15 oranında direnç saptanmıştır (142). Huang ve arkadaşlarının yapmış olduğu 2024 yılındaki bir çalışmada ise *K. pneumoniae* kompleksine dahil 160 izolat kolistin, seftazidim-avibaktam ve meropenem-vaborbaktam'a sırasıyla %37,5, %41,9 ve %45,0 dirençli saptanmıştır (140).

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesinde karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında kolistin ve seftazidim-avibaktam in vitro etkinliğinin araştırılmasında 78 kolistin dirençli *K. pneumoniae* izolatından sadece birinde seftazidim-avibaktam direnci tespit edilmiştir (141). Türkiye'de 2022 yılında yapılmış olan retrospektif bir çalışmada 703 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* 'nın %22,5'i seftazidim-avibaktam dirençli ve %16,74'si kolistin dirençli saptanmıştır(118).

Bizim çalışmamızda, otomatize sistemin ÇİD XN21 kartı ile yapılan duyarlılık çalışmasında hastanemiz yoğun bakım ve servislerinde tedavide kullanılan seftazidim-avibaktama direnç oranı tüm izolatlarda %54,2 iken, kolistin dirençli izolatlarda bu oran %63,2 olarak tespit edilmiştir. Yüksek direnç oranları, seftazidim avibaktamın

kolistin dirençli enfeksiyon etkenlerinde özellikle yoğun bakım hastalarında ikinci bir alternatif olması ve hali hazırda 3. kuşak sefalosporin, aminoglikozid ve florokinolon grubu antibiyotiklere direnç profili sergileyen etkenlerde kullanılması ile ilişkili olabilir.

Humphries ve arkadaşlarının çalışmasında seftazidim-avibaktam duyarlılık tespiti için VITEK 2 ile sıvı mikrodilüsyon karşılaştırması yapılmış *K. pneumoniae* izolatlarında EU %97, KU %100, BH %0, ÇBH %0 saptanmıştır (142).

Son yıllarda geliştirilen antibiyotikler arasında eravasiklin gibi yeni ilaçlar, antibiyotik direncinin artmasıyla mücadelede umut verici bir potansiyele sahiptir. Eravasiklin, tigesiklin'e göre daha etkili bir florosiklin olup, karbapenem dirençli Gram-negatif bakterilere, özellikle NDM ve VIM üreten kolistin dirençli *K.pneumoniae* izolatlarına karşı güçlü bir etkiye sahiptir (143). 2013-2017 yılları arasında yapılmış olan küresel surveyans çalışmasında, eravasiklin duyarlılık oranları *Enterobacterales* için(% 92,6), *Klebsiella spp. için* (% 90,6), *Enterobacter spp. için* (% 89,6), *Citrobacter spp. için* (% 94,6) ve *E. coli için* (% 98,8) olarak gösterilmiştir (144).

Tayvan'da 2023 yılında *Enterobacterales* 'lerde eravasiklin duyarlılığının EUCAST standartlarına uygun olarak mikrodilüsyon yöntemiyle saptandığı bir çalışmada izolatlar %67,7 duyarlı tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 300 *K. pneumoniae* izolatı incelendiğinde ise %52,3'ü eravasikline duyarlı saptanmıştır (140).

Bizim çalışmamızda, tüm izolatlarımızın %77,5'i eravasikline karşı duyarlı saptanmıştır ve diğer antibiyotikler içinde en az direnç gösterilen antibiyotiktir. Bu durum, bu antibiyotiğin henüz ülkemizde kullanıma girmemiş olmasıyla ilişkili olabilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, kolistin dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında, eravasiklin direncini akış pompalarının aşırı ekspresyonu ile ilişkilendirmiştir (143). Bu nedenle, etkili bir şekilde antibiyotik direnciyle mücadele etmek için sürdürülebilir antibiyotik kullanımı ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi önemlidir.

Çalışmamızın asıl amacı kolistin duyarlılık test yöntemlerini kıyaslayıp *mcr* gen araştırması yapmak olduğundan VITEK 2 'nin sonuç verdiği diğer antibiyotikler için mikrodilüsyon yöntemiyle çalışılmamıştır. Bu nedenle eravasiklin duyarlılık sonucu

mikrodilüsyonla doğrulanmamış olup VITEK 2 verileri paylaşılmıştır. Bu tezin yazıldığı tarihlerde bu antibiyotik Türkiye’de bulunmamaktadır. Bununla birlikte çalışmamızda kolistin dirençli izolatların %75,7’si eravasikline duyarlı tespit edilmiştir.

2012-2018 yılları arasında izole edilmiş imipenem dirençli 163 *K. pneumoniae* izolatının dahil edildiği bir araştırmada kolistin direnç oranı %12,9 saptanırken eravasiklin %63,2, seftazidim- avibaktam % 9,2, meropenem vaborbaktam %6,7, levofloksasin %89, gentamisin %66,5 direnç oranları göstermiştir (145). Bizim çalışmamızda tüm *K. pneumoniae* izolatları incelendiğine meropenem vaborbaktam %51,1, gentamisin %47,5, levofloksasin %79,6 dirençli bulunmuş olup, VITEK-2 sonuçlarına göre kolistin direnci olan izolatlarda eravasiklin, seftazidim avibaktam, gentamisin ve meropenem vaborbaktam haricinde diğer antibiyotiklere karşı da %90’ın üzerinde direnç saptanmıştır.

Bu durum hastanemizin merkezi bir üçüncü basamak hastane olmasından kaynaklanabilir. Bunun yanında antibiyotik direnci ile ilgili hastanemiz özelinde de önlem alınması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Yunanistan’da yapılan bir süveyans çalışmasında bakterilerin %9’u tüm antibiyotiklere dirençli olarak bulunmuştur (98). Bizim çalışmamıza dahil edilen 284 izolatın %7,04’ü ticari otomatize sistem sonuçlarına göre tüm antibiyotiklere dirençli bulunmuştur.

2019 yılında Dünya Sağlık Örgütü, antimikrobiyal direncin küresel yayılmasıyla ilişkilendirilen kritik öncelikli patojenler grubunu belirlemiştir. Bu grubun içinde, dikkate değer bir patojen olan *K. pneumoniae* bulunmakta ve antimikrobiyal direncin yayılmasıyla güçlü bir şekilde ilişkilendirilmektedir (147). Bu türün yatay gen transferine duyarlı olması, direnç genlerinin edinilmesi ve yayılmasına önemli ölçüde katkı sağlamaktadır. Bu durum sağlık sektöründe ciddi bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (148).

2016’da keşfedilen plazmid aracılığıyla aktarılan *mcr* geninin varlığı, kolistin direncinin kromozomal direnç genlerinin ötesinde bir mekanizmaya sahip olduğunu göstermiştir. Bu durum, gelecekte kolistin direnç oranlarının artmasına yönelik bir

endişe yaratmaktadır (37). Bu genin tespit edilmesi hasta izolasyonu ve tedavisi açısından oldukça kıymetlidir.

Özellikle hayvan yetiştiriciliğinde kolistin, büyümeyi arttırıcı olarak kullanılmaktadır. Bu durum kolistin direncindeki artışın belki de en önemli sebebidir. Dünya çapındaki araştırmalar, kolistinin büyüme destekleyicisi olarak tarım ve hayvancılık ortamlarında aşırı miktarda kullanılmasının kolistine dirençli *mcr-1* pozitif *Enterobacteriaceae* ile sonuçlandığını düşündürmektedir (101). Birçok ülke bu nedenle hayvancılıkta büyüme faktörü olarak kolistinin kullanımını yasaklamıştır. 2017'de Çin hükümetinin hayvanlarda kolistin kullanımını yasaklamasından bu yana, *mcr-1* geninin hayvan kaynaklı yaygınlığı belirgin şekilde azalmıştır. Wang ve ekibi yaptığı bir araştırmada, Çin'in 23 bölgesini incelemiş ve domuzlardaki *mcr-1* yaygınlığının 2015-2016'da %34 iken 2017-2018'de %5,1'e, tavuklardaki yaygınlığının ise aynı dönemde sırasıyla %18,1'den %5,0'a düştüğünü ortaya koymuştur (150). Smelikova yaptığı çalışmada Asya'dan dönen hastalar, çiftçiler, işleme tesisleri çalışanları ve çiğ et tüketicilerinin, *mcr* aracılı kolistine dirençli bakteri kolonizasyonu için risk grubunda olduğundan, hastaneye yatış sırasında incelenmeleri gerektiği sonucuna ulaşmıştır(151). Türkiye'de veteriner hekimlerin yapmış olduğu bir çalışmada genel olarak, fenotipik kolistin direnci test edilen *E. coli* izolatlarının %2,2'sinde kolistin direnci tespit edilmiştir. Kolistin direncine sahip 11 izolatın bir tanesinin (çiğ tavuk etinden kaynaklanan) *mcr-1* genini taşıdığı gösterilmiştir (152).

Bu bulgular, tedavide antibiyotik seçiminin ve doğru dozlarda kullanımının dışında özellikle antimikrobiyal direnç gibi küresel sağlık tehditleriyle mücadelede, ‘‘Tek Sağlık’’ yaklaşımının hayati önem taşıdığını göstermektedir. Bu yaklaşım, veteriner hekimler, doktorlar, çevre bilimciler ve diğer sağlık profesyonellerinin iş birliği içinde çalışmasını sağlayarak, sağlık sistemlerinin daha etkili bir şekilde yönetilmesine ve hastalıkların kontrol altına alınmasına yardımcı olur.

Klinik örneklerden izole edilen bakterilerde *mcr* gen araştırıldığında ise yıllara göre artış tespit edilmiştir. Bunun sebebi olarak yakın zamanda tüm dünyayı etkisi altına alan COVID-19 pandemisi ile hastane ilişkili enfeksiyonların artışı gösterilebilir. Zelendova ve ark. 2018-2020 yılları arasında yaptıkları bir araştırmada 1932 kolistin dirençli *Enterobacterales* izolatını incelemiş ve 73'ünün (%3,8) *mcr* genlerini

taşıdığını belirlemiş ve bunlardan sadece dördünün *K. pneumoniae*'da bulunduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada 2018-2020 yılları arasında *mcr* genlerinin yaygınlığının artması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (p=0,007) (153).

Türkiye'de yapılmış bir çalışmada ÇİD izolatlarında *mcr-1* prevalansı %8 olarak tespit edilmiş, ancak iki *mcr-1* pozitif izolatın sıvı mikrodilüsyona göre kolistine duyarlı olduğu tespit edilmiştir (131). Hoşbul ve arkadaşları 2022'de karbapenem ve kolistin dirençli 78 *K.pneumoniae* izolatında *mcr* 1-5 varlığını PCR ile araştırmış ve hiçbirinde bu genler tespit edilmemiştir (141).

Bizim çalışmamızda 136 kolistin dirençli *K. pneumoniae* izolatında *mcr* 1-10 gen varlığı qPCR ile araştırılmış olup, hiçbirinde *mcr* geni saptanmamıştır.

Simner ve arkadaşları kolistin MİK değeri ≥ 2 µg/mL olan *Enterobacterales* izolatlarının SMD ile doğrulanması gerektiğini ve ardından pozitif izolatlarının *mcr* genleri açısından genotipik olarak test edilmesinin önerildiğini ifade etmişlerdir (154).

Wattal ve arkadaşları tarafından yapılan *mcr-1* geni taşıyan 109 *K. pneumoniae* izolatının dahil edildiği bir çalışmada kolistin duyarlılığı açısından, VITEK2 ile SMD performansları değerlendirildiğinde %100 KU, %93,6 EU hesaplayıp, BH ve ÇBH tespit edilmemiştir (155).

Zhang ve arkadaşları *mcr* pozitif ve negatif toplam 215 *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarının kolistine duyarlılık testlerini inceleyen bir çalışmada, *mcr-1* pozitif *E. coli* %31,62 ve *mcr-8* pozitif *K. pneumoniae* %13 olarak belirlenmiş ve bunlar PCR ile doğrulanmıştır. Bu çalışmada *mcr-1* pozitif *E. coli* izolatlarında VITEK 2 ile kolistin duyarlılık sonuçlarının KU oranları %97,1 ve EU oranları %97,0 şeklinde belirlenmiştir. Ancak, VITEK 2 *mcr-8*-pozitif *K. pneumoniae* izolatları için düşük performans sergilemiş ve %78,5 gibi yüksek ÇBH oranları ve çok düşük oranda EU (%21,4) ve düşük oranda KU (%17,9) performansı göstermiş ve sonuç olarak otomatize sistemin *K. pneumoniae* için yüksek ÇBU oranlarına sahip olduğu ve zayıf performans sergilediği ifade edilmiştir (155).

Rapid Polymyxin NP, Colistin Drop veya Colistin Agar Test gibi testler kolistin duyarlılığının yanında *mcr* gen varlığını da tespit etmektedir. Kolistin direncini hızlı ve etkili bir şekilde tespit etmek için kullanılan bu testler, kolistine dirençli olduğu

şüphelenilen izolatların seçiminde ve sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle doğrulanması gereken durumlarda uygulanabilir (151). Kolistine karşı *mcr* aracılı direnç, moleküler yöntemlerle genlerin saptanmasıyla veya EDTA-kolistin sıvı besiyeri disk elüsyonu kullanılarak fenotipik olarak doğrulanabilir. *MCR*-1 enziminin üretimi, Maldi-TOF-MS kullanılarak yanal akışlı immünolojik testlerle doğrulanabilir. Tam genom dizilimi nihai tiplendirme yöntemidir ve taşınan *mcr* genlerinin tiplendirilmesine olanak tanımıştır (151).

Fenotipik yöntemlerle kolistin duyarlı saptanan izolatlarda *mcr* geni pozitif bulunabilir. Kromozomal mutasyonlar genellikle yüksek MİK'lere (≥ 16 µg/ml) yol açsa da *mcr*-1 geninin ifadesinin, düşük kolistin MİK'lerine (4–8 µg/ml) ve genellikle EUCAST kırılma noktasına (>2 µg/ml) daha yakın değerlere yol açtığı daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (151,156). Chew ve arkadaşları otomatize sistem ile kolistin duyarlılık tayini yaptığında, *mcr*-1 üreten izolatlarda en yüksek ÇBH oranı saptanmıştır (126). Wang ve arkadaşları ile, Kieffer ve arkadaşları yaptıkları dizi analizleri sonucunda *mcr*-9 ve *mcr*-10 genlerini tanımlamış ve bu genleri taşıyan izolatların kolistine karşı duyarlı olabileceği bildirilmiştir (157,158). Ancak, *mcr*-9 genini taşıyan *E. coli* izolatlarında, kolistine düşük konsantrasyonlarda maruz kalındığında, kolistin etkinliğinde bir azalma gözlemlenmiştir (157).

Türkiye'de yapılan bir çalışmada, 57 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatından üçünde *mcr*-1 pozitifliği saptanmış olup, bu izolatlardan ikisinin MİK değeri 64 µg/ml iken, diğer izolatın MİK değeri 32 µg/ml olarak belirlenmiştir (78). Çalışmamızda, kolistin dirençli olduğu belirlenen 136 *K. pneumoniae* izolatında *mcr* 1-10 genlerinin varlığı araştırılmış, ancak hiçbir izolatta *mcr* genleri saptanmamıştır. Bu sonuçlar, ülkemizdeki diğer klinik çalışmalarla uyumludur.

mcr geninin tarım ve hayvancılıktan gelen örneklerde daha yüksek pozitiflik gösterdiği göz önüne alındığında, klinik izolatlarda *mcr* sıklığının düşük olması beklenen bir sonuçtur. Ülkemizde domuz eti üretiminin ve tüketiminin neredeyse hiç olmaması, bu durumu etkileyen faktörlerden biri olabilir. Ancak bu durum sadece domuz tüketimi ile ilgili olmayıp, araştırmalarda ülkemizde tavuk çiftliklerinde de *mcr* pozitifliği saptanmıştır (152). Türkiye'de hayvan ve insanlarda *mcr* genlerinin daha kapsamlı bir şekilde araştırılması gereklidir.

Kolistin direncinin, taşınabilir *mcr* genleri nedeniyle ortaya çıkması, kısıtlı terapötik seçenekler nedeniyle insan ve hayvan sağlığını tehdit etmektedir. Kolistin son çare antibiyotiklerden biri olduğundan, direncinin yayılmasını sınırlamak ve etkinliğini korumak için tedbir alınması gerekmektedir. Bu nedenle, daha hızlı klinik teşhis seçimleri için güncel ve gelişmekte olan kolistin direnci tanısının önemi büyüktür (159). *mcr* genlerinin tespitinde pek çok yöntem kullanılabilmektedir (64). Esposito ve arkadaşları şelatör bazlı bir yöntem olan Modifiye Hızlı *Polimiksin NP* test kullanıldığından bahsetmiştir ancak bu test *mcr* gen varlığını tespit etse de, spesifik olarak hangi *mcr* varyantının tespit edildiği bilinmemektedir (64,94). Bernasconi ve arkadaşları *mcr*-1/-2 ve β -laktamaz genlerini eşzamanlı olarak tespit edebilen ve 6.5 saate sonuç veren ticari CT103XL mikroarray sistemini 106 insan, hayvan ve gıda kaynaklı *Enterobacteriaceae* izolatında değerlendirmiş ve 61'i kolistin dirençli olan izolatların 30'unda *mcr* -1 geni ikisinde *mcr*-2 için geni tespit etmişlerdir. Bu 32 izolatın 7'sinde eş zamanlı olarak blaESBL ve blaCMY-2 varlığı tespit edilmiştir (160).

Klinik izolatlardan *mcr*-9 genini 10 dakika gibi kısa sürede tespit etmek için Rodriguez-Manzano ve ark. 2020 yılında LAMP tabanlı bir Lab-on-a-Chip cihazı geliştirmiş ve izole ettikleri 138 karbapenemaz üreten mikroorganizmanın 41(%29,7)'inde *mcr*-9 pozitifliği saptamışlardır. Bunlardan 10'u blaIMP geni taşıyan *Klebsiella spp.* izolatlarıdır. Hem blaIMP hem de *mcr*-9, genellikle plazmidler üzerinde taşınan genlerdir, dolayısıyla antibiyotik direncinin yayılmasında önemli bir rol oynarlar (161).

mcr genleri ile plazmid aracılı gelişen kolistin direnci yanı sıra bir dizi başka mekanizma tarafından da kolistine karşı direnç meydana gelebilir. Lipopolisakkarit yapısındaki değişiklikler, dış membran porinlerindeki eksiklikler veya değişiklikler, kolistinin hücre içine girmesini engelleyen aktif transport sistemlerinin artması ve kolistine karşı yanıtta yer alan genlerin ekspresyonu bu mekanizmalar arasında yer alır (64). Kolistin direnci mekanizmalarını araştıran çok merkezli bir çalışmada, 185 kolistin dirençli *K. pneumoniae* izolatı analiz edilmiş ve kromozomal direnç mekanizmalarından olan *mcrB*, *pmrAB* ve *phoPQ* genlerinde değişiklik saptanmayan 33(%17,83) izolat belirlenmiş ve ek olarak bu 33 izolatla *mcr*-1 ve *mcr*-2 genleri tespit edilmemiştir. Bu izolatlardan 14(%7,5)'ünde *CrrAB* geninde meydana gelen

mutasyonlar tespit edilmiştir. Araştırmanın sonucunda CrrB genindeki mutasyonların *K. pneumoniae*'nin yüksek MİK değerli kolistin direnci geliştirebileceği sonucuna varılmıştır (162).

Çin'de yapılan bir çalışmada 662 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatının %15,26'sı kolistin dirençli bulunmuştur. Kolistin dirençli izolatların %70,29'unda en sık olarak *acrR* genleri, ardından %26,73 oranında *mgrB*, %10,89 oranında *ramR* genleri saptanmış olup, sadece birinde (%0,15) *mcr 9* geni gösterilmiştir (36).

Türkiye'den bir çalışmada 61 kolistin dirençli ÇİD *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarının sadece, sekizinde (%13,1) *mcr-1* tespit edilmiştir ancak diğer *mcr* genleri tespit edilmemiştir (131). Kromozomal direnç genlerine kıyasla plazmidle aktarılan *mcr* genlerinin direncin türler arasında yayılımını daha hızlı gerçekleştirdiği bilindiğinden, bizim çalışmamızda *K. pneumoniae* izolatlarında sadece *mcr* (1-10) genlerinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızın güçlü yanları izolat sayımızın güç analizinin oldukça üzerinde olmasıdır. Otomatize sistem (VITEK 2) duyarlılık kartının güncel formunun (XN21) kullanılmış olması ve Türkiye'de henüz kullanıma girmemiş antibiyotiklere dair direnç bilgisinin de verilmesi çalışmanın bir diğer güçlü yanıdır. Çalışmamızın kısıtlılığı plazmid aracılı direnç dışında diğer direnç mekanizmalarının araştırılmamasıdır. Bu da kolistin dirençli izolatlarımızın hiçbirinde *mcr* gen varlığını tespit etmemiş olmamızı açıklayabilir.

6. SONUÇ

Sonuç olarak bu prospektif tez çalışmasında 284 adet *K. pneumoniae* izolatında kolistin duyarlılık tespiti için altın standart yöntem olan standart sıvı mikrodilüsyon ile ticari otomatize sistem VITEK 2'nin performans kıyaslaması yapılmış ve kolistin dirençli izolatlarda *mcr* 1-10 gen varlığı araştırılmıştır.

Kolistin dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının %75,73'ü yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan elde edilmiştir. Altın standart yöntemle göre izolatların %52,1'i, VITEK-2'ye göre ise %49,3'ü kolistin duyarlı tespit edilmiştir. Türkiye ve dünya genelinde yapılan ve kolistin duyarlılığının VITEK 2 ile daha yüksek bulunduğu diğer araştırmalardan farklı olarak, bizim çalışmamızda VITEK 2, kolistin direncini daha yüksek oranda tespit etmiştir. SMD ile otomatize sistem karşılaştırıldığında %93,0 EU, %96,6 KU saptanmış olup kabul edilebilir aralıkta bulunmuştur. Chew ve arkadaşların önerisine göre kabul edilebilir düzeyde çok büyük hata oranı (%0,1) ve kabul edilebilir düzeyin üstünde büyük hata oranı (%3,3) tespit edilmiş, Jorgensen ve arkadaşların önerilerine göre ise tüm oranlar kabul edilebilir düzeyde saptanmıştır.

Çalışmamızın verilerine dayanarak, kolistin duyarlılığını belirlemede VITEK 2 AST XN-21 kartlarının kullanılabileceği ancak otomatize sistemlerin büyük hata yapma potansiyelinin göz önünde bulundurulması gerektiği belirlenmiştir. Bu durumda, rutin uygulamada SMD yöntemi uygulanamıyorsa VITEK 2 AST XN-21 kartları kullanılabilir, bu yöntemin SMD ile doğrulanması gerektiği not olarak eklenmelidir. Laboratuvarımızda ise EUCAST önerilerine uygun olarak sıvı mikrodilüsyon yönteminin kullanılmaya devam edileceği kararı alınmıştır.

Otomatize sistem sonuçlarına göre kolistin direnci olan izolatlarda eravasiklin, seftazidim avibaktam, gentamisin ve meropenem vaborbaktam haricinde diğer antibiyotiklere karşı da %90'ın üzerinde direnç saptanmıştır. Yeni antibiyotiklere karşı gelişen direnç oranları endişe vericidir.

Çalışmamızda 136 kolistin dirençli *K. pneumoniae* izolatına *mcr* (1-10) gen qPCR çalışılmış olup hiçbir izolatta *mcr* gen varlığı tespit edilmemiştir. Bu sonuç kolistin direncinde plazmid aracılı direnç yanında, diğer mekanizmaların da her zaman dikkate alınması gerektiğini vurgulamaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Procop Gary, Church Deirdre, Hall Geraldine, Janda William, Koneman Elmer, Schreckenberger Paul, et al. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Vol. 70, Lippincott Williams & Wilkins. 2017.
2. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. 1998;11(4):589–603.
3. Yokochi T, Nakashima I, Kato N. Further Studies on Generation of Macrophages in: In Vitro Cultures of Mouse Spleen Cells and Its Inhibition by the Capsular Polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. Microbiol Immunol. 1979;23(6).
4. Schroll C, Barken KB, Krogfelt KA, Struve C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. BMC Microbiol. 2010;10.
5. Li Y, Ni M. Regulation of biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. Vol. 14, Frontiers in Microbiology. 2023.
6. Tarkkanen AM, Virkola R, Clegg S, Korhonen TK. Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. Infect Immun. 1997;65(4).
7. Allen BL, Gerlach GF, Clegg S. Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. J Bacteriol. 1991;173(2):916–20.
8. Lam MMC, Wyres KL, Judd LM, Wick RR, Jenney A, Brisse S, et al. Tracking key virulence loci encoding aerobactin and salmochelin siderophore synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. Genome Med. 2018;10(1).
9. Lan Y, Zhou M, Jian Z, Yan Q, Wang S, Liu W. Prevalence of pks gene cluster and characteristics of *Klebsiella pneumoniae*-induced bloodstream infections. J Clin Lab Anal. 2019 May 1;33(4).
10. Highsmith AK, Jarvis WR. *Klebsiella pneumoniae*: Selected virulence factors that contribute to pathogenicity. Infection Control. 1985;6(2).
11. Choby JE, Howard-Anderson J, Weiss DS. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* – clinical and molecular perspectives. Vol. 287, Journal of Internal Medicine. 2020.

12. Lee CR, Lee JH, Park KS, Jeon JH, Kim YB, Cha CJ, et al. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 Nov 21;7(NOV).
13. Huang X, Li X, An H, Wang J, Ding M, Wang L, et al. Capsule type defines the capability of *Klebsiella pneumoniae* in evading Kupffer cell capture in the liver. *PLoS Pathog*. 2022;18(8).
14. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *klebsiella pneumoniae*. Vol. 17, *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020.
15. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jul 7;112(27):E3574–81.
16. Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. Vol. 8, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018.
17. Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018 Jan 22;8(JAN).
18. Casewell M, journal IPB medical, 1977 undefined. Hands as route of transmission for *Klebsiella* species. [ncbi.nlm.nih.gov](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1632544/) Casewell, IAN Phillips *British medical journal*, 1977•[ncbi.nlm.nih.gov](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1632544/) [Internet]. [cited 2024 Feb 2]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1632544/>
19. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Front Microbiol*. 2019;10(APR).
20. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, et al. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(3).
21. Khurana S, Malhotra R, Mathur P. Evaluation of Vitek®2 performance for colistin susceptibility testing for Gram-negative isolates. *JAC Antimicrob Resist*. 2020;2(4).

22. Karampatakis T, Tsergouli K, Behzadi P. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Virulence Factors, Molecular Epidemiology and Latest Updates in Treatment Options. Vol. 12, Antibiotics. 2023.
23. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(5):413–31.
24. Ozgen AO, Eyupoglu OE. Antibiotic susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from clinical samples. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*. 2020;7(1).
25. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(1).
26. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023–2021 data [Internet]. [cited 2024 Jan 16]. Available from: <https://www.who.int/europe/publications/i/item/9789289058537>
27. Yang J, Zhang K, Ding C, Wang S, Wu W, Liu X. Exploring multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* antimicrobial resistance mechanisms through whole genome sequencing analysis. *BMC Microbiol*. 2023;23(1).
28. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. Vol. 41, *FEMS Microbiology Reviews*. 2017.
29. Labarca J, Poirel L, Özdamar M, Turkoglu S, Hakko E, Nordmann P. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*, finally targeting Turkey. *New Microbes New Infect*. 2014 Mar 1;2(2):50–1.
30. Helander IM, Kato Y, Kilpeläinen I, Kostianen R, Lindner B, Nummila K, et al. Characterization of lipopolysaccharides of polymyxin-resistant and polymyxin-sensitive *Klebsiella pneumoniae* O3. *Eur J Biochem*. 1996;237(1).
31. Velkov T, Deris ZZ, Huang JX, Azad MAK, Butler M, Sivanesan S, et al. Surface changes and polymyxin interactions with a resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Innate Immun*. 2014;20(4).

32. Srinivas P, Rivard K. Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. Vol. 19, Current Infectious Disease Reports. 2017.
33. Huang J, Li C, Song J, Velkov T, Wang L, Zhu Y, et al. Regulating polymyxin resistance in Gram-negative bacteria: Roles of two-component systems PhoPQ and PmrAB. Vol. 15, Future Microbiology. 2020.
34. Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, Pilato V Di, Arena F, Conte V, et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(10).
35. Xu Y, Wei W, Lei S, Lin J, Srinivas S, Feng Y. An evolutionarily conserved mechanism for intrinsic and transferable polymyxin resistance. mBio. 2018 Mar 1;9(2).
36. Li Z, Liu X, Lei Z, Li C, Zhang F, Wu Y, et al. Genetic Diversity of Polymyxin-Resistance Mechanisms in Clinical Isolates of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: a Multicenter Study in China. Microbiol Spectr. 2023;11(2).
37. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016;16(2).
38. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr*-1, *mcr*-2, *mcr*-3, *mcr*-4 and *mcr*-5 for surveillance purposes. Eurosurveillance [Internet]. 2018 Feb 8 [cited 2023 Dec 4];23(6):17–00672. Available from: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672>
39. Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr*-10. Emerg Microbes Infect. 2020 Jan 1;9(1):508–16.
40. Mendes AC, Novais Â, Campos J, Rodrigues C, Santos C, Antunes P, et al. *mcr*-1 in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with hospitalized patients, Portugal, 2016–2017. Emerg Infect Dis. 2018 Apr 1;24(4):762–6.

41. Hamel M, Rolain JM, Baron SA. The history of colistin resistance mechanisms in bacteria: Progress and challenges. *Microorganisms*. 2021 Feb 1;9(2):1–18.
42. Stefaniuk EM. Colistin Resistance in Enterobacterales Strains – A Current View. *Pol J Microbiol* [Internet]. 2019 [cited 2023 Oct 29];68(4):417–27. Available from: <https://doi.org/10.33073/pjm-2019-055>
43. Cai Y, Lee W, Kwa AL. Polymyxin B versus colistin: An update. Vol. 13, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2015.
44. Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. Vol. 25, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005.
45. Lim LM, Ly N, Anderson D, Yang JC, Macander L, Jarkowski A, et al. Resurgence of colistin: A review of resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing. Vol. 30, *Pharmacotherapy*. 2010.
46. Bergen PJ, Li J, Rayner CR, Nation RL. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2006 Jun [cited 2023 Oct 29];50(6):1953–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16723551/>
47. Novović K, Jovčić B. Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Molecular Mechanisms and Epidemiology. Vol. 12, *Antibiotics*. 2023.
48. Grégoire N, Aranzana-Climent V, Magréault S, Marchand S, Couet W. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Colistin. *Clin Pharmacokinet*. 2017 Dec 1;56(12):1441–60.
49. El-Sayed Ahmed MAEG, Zhong LL, Shen C, Yang Y, Doi Y, Tian GB. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000–2019). *Emerg Microbes Infect*. 2020 Jan 1;9(1):868–85.
50. Deris ZZ, Akter J, Sivanesan S, Roberts KD, Thompson PE, Nation RL, et al. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *Journal of Antibiotics*. 2014 Feb;67(2):147–51.

51. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. Vol. 40, *Clinical Infectious Diseases*. 2005.
52. Liu JH, Liu YY, Shen YB, Yang J, Walsh TR, Wang Y, et al. Plasmid-mediated colistin-resistance genes: mcr. *Trends Microbiol* [Internet]. 2023 Nov [cited 2023 Dec 7]; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X23002950>
53. Biswas S, Brunel JM, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Rolain JM. Colistin: An update on the antibiotic of the 21st century. Vol. 10, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2012.
54. Michalopoulos A, Falagas ME. Colistin and Polymyxin B in Critical Care. Vol. 24, *Critical Care Clinics*. 2008.
55. Mohapatra SS, Dwibedy SK, Padhy I. Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions. Vol. 46, *Journal of Biosciences*. 2021.
56. Spapen H, Jacobs R, Van Gorp V, Troubleyn J, Honoré PM. Renal and neurological side effects of colistin in critically ill patients. *Ann Intensive Care*. 2011;1(1).
57. Petrosillo N, Giannella M, Lewis R, Viale P. Treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: The state of the art. Vol. 11, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2013.
58. Falagas ME, Kasiakou SK. Toxicity of polymyxins: A systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit Care*. 2006 Feb 13;10(1).
59. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaïou DK. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resistance Updates*. 2010;13(4–5).
60. Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı - Google'da Ara [Internet]. 2022 [cited 2023 Oct 30]. Available from: https://www.google.com/search?q=Ulusal+Sa%C4%9Fl%C4%B1k+Hizmeti+%C4%B0li%C5%9Fkili+Enfeksiyonlar+S%C3%BCrveyans+A%C4%9F%C4%B1&oq=Ulusal+Sa%C4%9Fl%C4%B1k+Hizmeti+%C4%B0li%C5%9Fkili+Enfeksiyonlar+S%C3%BCrveyans+A%C4%9F%C4%B1&gs_lcrp=EgZjaHJvbWUyBggAEEUYOTIG

CAEQIxgnMgYIAhBFGDsyBwgDEAAYgAQyBwgEEAAYgAQyCAGFEAAYFhg
eMggIBhAAGBYHtIBBzM5NmowajeoAgCwAgA&sourceid=chrome&ie=UTF-8

61. Levinson W, Chin-Hong P, Joyce EA, Schwartz B. Review of Medical Microbiology and Immunology, 16th Edition. 16th ed. Lange; 2020.
62. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria. Vol. 5, Frontiers in Microbiology. 2014.
63. Wright MS, Suzuki Y, Jones MB, Marshall SH, Rudin SD, Van Duin D, et al. Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Jan 1;59(1):536–43.
64. Lakshmanan D, Ramasamy D, Subramanyam V, Saravanan SK. Mobile colistin resistance (*mcr*) genes and recent developments in colistin resistance detection. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2023 Sep 1 [cited 2023 Oct 28];76(9):1–13. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/lambio/ovad102>
65. Osei Sekyere J, Govinden U, Bester LA, Essack SY. Colistin and tigecycline resistance in carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: emerging resistance mechanisms and detection methods. Vol. 121, *Journal of Applied Microbiology*. 2016.
66. Kong Y, Li C, Chen H, Zheng W, Sun Q, Xie X, et al. In vivo Emergence of Colistin Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Mediated by Premature Termination of the *mgrB* Gene Regulator. *Front Microbiol*. 2021 Jun 21;12.
67. Mmatli M, Mbelle NM, Maningi NE, Osei Sekyere J. Emerging Transcriptional and Genomic Mechanisms Mediating Carbapenem and Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae : a Systematic Review of Current Reports . *mSystems*. 2020 Dec 22;5(6).
68. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JDF, Vinogradov E, Seemann T, et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Dec;54(12):4971–7.

69. Berglund B. Acquired Resistance to Colistin via Chromosomal And Plasmid-Mediated Mechanisms in *Klebsiella pneumoniae*. Vol. 1, Infectious Microbes and Diseases. 2019.
70. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(1).
71. Srinivasan VB, Rajamohan G. KpnEF, a new member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(9).
72. Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1).
73. Cahill N, Hooban B, Fitzhenry K, Joyce A, O'Connor L, Miliotis G, et al. First reported detection of the mobile colistin resistance genes, mcr-8 and mcr-9, in the Irish environment. *Science of the Total Environment*. 2023;876.
74. Ling Z, Yin W, Shen Z, Wang Y, Shen J, Walsh TR. Epidemiology of mobile colistin resistance genes mcr-1 to mcr-9. Vol. 75, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020.
75. Martiny HM, Munk P, Brinch C, Szarvas J, Aarestrup FM, Petersen TN. Global Distribution of mcr Gene Variants in 214K Metagenomic Samples . *mSystems*. 2022 Apr 26;7(2).
76. Liu Y, Liu JH. Monitoring Colistin Resistance in Food Animals, An Urgent Threat. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018 Jun 3;16(6):443–6.
77. Sun J, Zhang H, Liu YH, Feng Y. Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. *Trends Microbiol*. 2018 Sep 1;26(9):794–808.
78. Arabacı Ç, Dal T, Başıyigit T, Genişel N, Durmaz R. Investigation of carbapenemase and MCR-1 genes in carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae* isolates. *J Infect Dev Ctries*. 2019;13(6).
79. Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Malhotra-Kumar S, Butaye P, Goossens H, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistinresistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, june 2016. *Eurosurveillance*. 2016 Jul 7;21(27).

80. Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *mBio*. 2017 May 1;8(3).
81. Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*. 2017 Aug 3;22(31).
82. Khedher M Ben, Baron SA, Riziki T, Ruimy R, Raoult D, Diene SM, et al. Massive analysis of 64,628 bacterial genomes to decipher water reservoir and origin of mobile colistin resistance genes: is there another role for these enzymes? *Sci Rep*. 2020;10(1).
83. Zhang H, Hou M, Xu Y, Srinivas S, Huang M, Liu L, et al. Action and mechanism of the colistin resistance enzyme MCR-4. *Commun Biol*. 2019;2(1).
84. Yang Y, Li Y, Lei C, ... AZJ of A, 2018 undefined. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *academic.oup.com* YQ Yang, YX Li, CW Lei, AY Zhang, HN Wang *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2018•*academic.oup.com* [Internet]. [cited 2023 Dec 5]; Available from: <https://academic.oup.com/jac/article-abstract/73/7/1791/4975457>
85. Carroll LM, Gaballa A, Guldemann C, Sullivan G, Henderson LO, Wiedmann M. Identification of novel mobilized colistin resistance gene *mcr-9* in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *salmonella enterica* serotype typhimurium isolate. *mBio*. 2019 May 1;10(3).
86. Wang X, Song H, Yi T, Shen Y, ... CDZ, 2023 undefined. Dihydroartemisinin inhibits plasmid transfer in drug-resistant *Escherichia coli* via limiting energy supply. *ncbi.nlm.nih.gov* XY Wang, HW Song, T Yi, YB Shen, CS Dai, CT Sun, DJ Liu, JZ Shen, CM Wu, Y Wang *Zoological Research*, 2023•*ncbi.nlm.nih.gov* [Internet]. [cited 2023 Dec 7]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10559095/>
87. ISO. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 1. International Standard ISO 20776-1:2006. 2019;(Retrieved from <https://www.iso.org/standard/41630.html>).
88. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. EUCAST Breakpoint Tables [Internet]. 2023. Available from: <http://www.eucast.org>.

89. EUCAST. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. [Http://WwwEucastOrg](http://www.EucastOrg). 2016;(March, 22).
90. bioMérieux. VITEK® 2 AST Cards. www.biomerieux-diagnostics.com. Accessed 29Nov2022. VITEK® 2 AST Cards - clinical diagnostics products | bioMérieux Clinical Diagnostics (biomerieux-diagnostics.com). VITEK® 2 AST Cards [Internet]. [cited 2024 Feb 19]. Available from: bioMérieux. VITEK® 2 AST Cards. www.biomerieux-diagnostics.com. Accessed 29Nov2022. VITEK® 2 AST Cards - clinical diagnostics products | bioMérieux Clinical Diagnostics (biomerieux-diagnostics.com)
91. The Antimicrobial Susceptibility Test: Principles and Practices. *Ann Intern Med*. 1977;87(3).
92. Osei Sekyere J, Sephofane AK, Mbelle NM. Comparative Evaluation of CHROMagar COL-APSE, MicroScan Walkaway, ComASP Colistin, and Colistin MAC Test in Detecting Colistin-resistant Gram-Negative Bacteria. *Sci Rep*. 2020;10(1).
93. Satlin MJ, Lewis JS, Weinstein MP, Patel J, Humphries RM, Kahlmeter G, et al. Clinical and Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Position Statements on Polymyxin B and Colistin Clinical Breakpoints. *Clinical Infectious Diseases*. 2020;71(9).
94. Esposito F, Fernandes MR, Lopes R, Muñoz M, Sabino CP, Cunha MP, et al. Detection of colistin-resistant mcr-1-positive *Escherichia coli* by use of assays based on inhibition by EDTA and zeta potential. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2024 Jan 21];55(12):3454–65. Available from: <https://doi.org/10.1128/JCM.00835-17>.
95. Birol ŞAFAK1, Özge TOMBAK1, Aynur EREN TOPKAYA2. *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Sıvı Mikrodilüsyon Temelli İki Ticari Sistemin Referans Mikrodilüsyon Yöntemine Göre Değerlendirilmesi [Internet]. [cited 2023 Nov 17]. Available from: <https://www.google.com/search?q=Klebsiella+pneumoniae+%C4%B0zolatlar%C4%B1nda+S%C4%B1v%C4%B1Mikrodil%C3%BCsyon+Temelli+%C4%B0ki+Ticari+Sistemin+Referans+Mikrodil%C3%BCsyon+Y%C3%B6ntemine+G%C3%B6re+Değerlendirilmesi&oq=Klebsiella+pneumoniae+%C4%B0zolatlar%C4%B1nd>

a+S%C4%B1v%C4%B1+Mikrodil%C3%BCsyon+Temelli+%C4%B0ki+Ticari+Sistemin+Referans+Mikrodil%C3%BCsyon+Y%C3%B6ntemine+G%C3%B6re+De%C4%9Ferlendirilmesi&gs_lcrp=EgZjaHJvbWUyBggAEEUYOdIBBzg2N2owajeoAgCwAgA&sourceid=chrome&ie=UTF-8

96. Furniss RCD, Dortet L, Bolland W, Drews O, Sparbier K, Bonnin RA, et al. Detection of colistin resistance in *Escherichia coli* by use of the MALDI biotyper sirius mass spectrometry system. *J Clin Microbiol.* 2019;57(12).
97. Wang H, Chen Y, Strich JR, Drake SK, Youn JH, Rosenberg AZ, et al. Rapid detection of colistin resistance protein MCR-1 by LC-MS/MS. *Clin Proteomics.* 2019 Feb 26;16(1).
98. Zhang H, Yu F, Lu X, Li Y, Peng D, Wang Z, et al. Rapid Detection of MCR-Mediated Colistin Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* 2022 Jun 29;10(3).
99. TANRIVERDİ Y, ÇINAR C, BİLGİN K, GÜR VURAL D, BİRİNCİ A. KOLİSTİN DİRENCİNİN SAPTANMASINDA SIVI MİKRODİLÜSYON VE OTOMATİZE SİSTEM SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi.* 2020;
100. Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. Vol. 61, *Clinical Chemistry.* 2015.
101. eucast: Clinical breakpoints and dosing of antibiotics [Internet]. [cited 2024 Jan 29]. Available from: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints
102. <https://www.tmc-online.org/index.php?func=Content&ID=8>.
103. Kilic S. Kappa test. *Journal of Mood Disorders.* 2015;5(3).
104. Binsker U, Käsbohrer A, Hammerl JA. Global colistin use: A review of the emergence of resistant Enterobacterales and the impact on their genetic basis. Vol. 46, *FEMS Microbiology Reviews.* 2022.
105. Choby JE, Howard-Anderson J, Weiss DS. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* – clinical and molecular perspectives. Vol. 287, *Journal of Internal Medicine.* 2020.
106. Organization WH. Critically important antimicrobials for human medicine. 2019 [cited 2024 Jan 29]; Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf>

107. CDC. COVID-19 & Antibiotic Resistance | CDC. Antimicrobial Resistance. 2022.
108. CDC. COVID-19: U.S. Impact on Antimicrobial Resistance, Special Report 2022. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services. 2022;399(10325).
109. Koupaei M, Asadi A, Ari M, Disease ZS... and I, 2023 undefined. Secondary *Klebsiella pneumoniae* infection in patients with COVID-19: A systematic review. Elsevier [Internet]. [cited 2024 Feb 7]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889323002146>
110. Binsker U, Käsbohrer A, Hammerl JA. Global colistin use: A review of the emergence of resistant Enterobacterales and the impact on their genetic basis. Vol. 46, FEMS Microbiology Reviews. 2022.
111. Bir R, Gautam H, Arif N, Chakravarti P, Verma J, Banerjee S, et al. Analysis of colistin resistance in carbapenem-resistant Enterobacterales and XDR *Klebsiella pneumoniae*. *Ther Adv Infect Dis*. 2022 Feb 1;9.
112. Markovska R, Marteva-Proevska Y, Velinov T, Pavlov I, Kaneva R, Boyanova L. Detection of different colistin resistance mechanisms among multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Bulgaria. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2022;69(3).
113. Galani I, Karaïskos I, Karantani I, Papoutsaki V, Maraki S, Papaioannou V, et al. Epidemiology and resistance phenotypes of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece, 2014 to 2016. *Eurosurveillance*. 2018;23(31).
114. Palmieri M, D'Andrea MM, Pelegrin AC, Mirande C, Brkic S, Cirkovic I, et al. Genomic Epidemiology of Carbapenem- and Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates From Serbia: Predominance of ST101 Strains Carrying a Novel OXA-48 Plasmid. *Front Microbiol*. 2020;11.
115. Cizmeci Z, Aktas E, Otlu B, Acikgoz O, Ordekci S. Molecular characterization of carbapenem- resistant Enterobacteriaceae yields increasing rates of NDM-1 carbapenemases and colistin resistance in an OXA-48- endemic area. *Journal of Chemotherapy*. 2017;29(6).
116. Popivanov G, Markovska R, Gergova KM, Cirocchi R, Kjossev K, Mutafchiyski V. An Intra-hospital Spread of Colistin-Resistant *K. pneumoniae* Isolates–

Epidemiological, Clinical, and Genetic Analysis. 2024 [cited 2024 Feb 12]; Available from: <https://www.preprints.org/manuscript/202401.2136>

117. Uzairue L, Rabaan A, Adewumi F, Pathogens OO, 2022 undefined. Global Prevalence of Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* from Bloodstream Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *mdpi.com*LI Uzairue, AA Rabaan, FA Adewumi, OJ Okolie, JB Folorunso, MA Bakhrebah, M GaroutPathogens, 2022•*mdpi.com* [Internet]. 2022 Oct 1 [cited 2023 Dec 1];11(10). Available from: <https://www.mdpi.com/2076-0817/11/10/1092>
118. ÖZTAŞ S, ER DK, DÜNDAR D. Karbapenemlere Dirençli ve Duyarlı *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Çeşitli Antimikrobiyallere Direnç Oranları. *Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2022;8(3).
119. 'Ongen B, ' Uşak CŞ. Investigation of colistin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates by flow cytometry method. *Research Square* . 2024;
120. Panigrahi K, Pathi BK, Poddar N, Sabat S, Pradhan S, Pattnaik D, et al. Colistin Resistance Among Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacterial Isolates From Different Clinical Samples of ICU Patients: Prevalence and Clinical Outcomes. *Cureus*. 2022;
121. Ibrahim ME. Risk factors in acquiring multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in a hospital setting in Saudi Arabia. *Sci Rep*. 2023;13(1).
122. Sodhi K, Mittal V, Arya M, Kumar M, Phillips A, Kajla B. Pattern of colistin resistance in *Klebsiella* isolates in an Intensive Care Unit of a tertiary care hospital in India. *J Infect Public Health*. 2020;13(7).
123. Uğraklı S, Doğan M. Comparative Evaluation of Vitek 2 and Etest Methods with the Reference Broth Microdilution for Antimicrobial Susceptibility Testing of Colistin Among Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacteria. *Flora the Journal of Infectious Diseases and Clinical Microbiology*. 2021;26(3).
124. Tripathi P, Ramnani VK, Pandey A, Scholar P. PREVALENCE OF COLISTIN RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* IN VARIOUS CLINICAL SAMPLES IN RURAL MADHYA PRADESH. 2023;30(03):921–7.
125. Jorgensen JH. Selection criteria for an antimicrobial susceptibility testing system. Vol. 31, *Journal of Clinical Microbiology*. 1993.

126. Chew KL, La M Van, Lin RTP, Teo JWP. Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and mcr-positive enterobacteriaceae: Comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution. *J Clin Microbiol.* 2017;55(9).
127. Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, Hadjichristodoulou C, Gennimata V, Pournaras S, et al. Comparative evaluation of colistin susceptibility testing methods among carbapenem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(8).
128. Bir R, Gautam H, Arif N, Chakravarti P, Verma J, Banerjee S, et al. Analysis of colistin resistance in carbapenem-resistant Enterobacterales and XDR *Klebsiella pneumoniae*. *Ther Adv Infect Dis.* 2022;9.
129. Lellouche J, Schwartz D, Elmalech N, Ben Dalak MA, Temkin E, Paul M, et al. Combining VITEK® 2 with colistin agar dilution screening assist timely reporting of colistin susceptibility. *Clinical Microbiology and Infection.* 2019;25(6).
130. ŞAFAK B, TOMBAK Ö, EREN TOPKAYA A. Kolistin Antimikrobiyal Duyarlılık Testinin Vitek-2 Ve Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemleriyle Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi. *Namık Kemal Tıp Dergisi.* 2020 Apr 20;
131. Kansak N, Aksaray S, Aslan M, Adaleti R, Gönüllü N. Detection of colistin resistance among multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates in Turkey. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2021 Jun 1;68(2):99–106.
132. Matuschek E, Åhman J, Webster C, Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin – evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clinical Microbiology and Infection.* 2018;24(8).
133. Lutgring JD, Kim A, Campbell D, Karlsson M, Brown AC, Burd EM. Evaluation of the MicroScan colistin well and gradient diffusion strips for colistin susceptibility testing in enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2019;57(5).
134. Sujatha SR, Deepashree R, Tejashree A, Sai S. Evaluation of Colistin Broth Disk Elution and Colistin Agar Test: A study from Tertiary Care Hospital, South India. *J Pure Appl Microbiol.* 2022;16(2).

135. Koyuncu Özyurt Ö, Özhak B, Ögünç D, Yıldız E, Çolak D, Günseren F, et al. Evaluation of the BD Phoenix100 System and Colistin Broth Disk Elution Method for Antimicrobial Susceptibility Testing of Colistin against Gram-negative Bacteria. *Mikrobiyol Bul.* 2019;53(3).
136. Sarikaya A, Mumcuoğlu İ, Baran I, Aksoy A, Dinç B. Comparison of Colistin Broth Disc Elution, Rapid Resapolymyxin NP and Broth Microdilution Methods in Determining Colistin Sensitivity in *Acinetobacter*, *Pseudomonas* and *Enterobacterales* species. *Mikrobiyol Bul.* 2022 Jul 1;56(3):404–15.
137. Anantharajah A, Glupczynski Y, Hoebeke M, Bogaerts P, Declercq P, Denis O, et al. Multicenter study of automated systems for colistin susceptibility testing. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 2021;40(3).
138. De Angelis G, Posteraro B, Menchinelli G, Liotti FM, Spanu T, Sanguinetti M. Antimicrobial susceptibility testing of pathogens isolated from blood culture: A performance comparison of Accelerate Pheno™ and VITEK® 2 systems with the broth microdilution method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2019;74.
139. Abozahra R, Gaballah A, Abdelhamid SM. Prevalence of the colistin resistance gene MCR-1 in colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Egypt. *AIMS Microbiol.* 2023;9(2).
140. Huang CF, Wang JT, Chuang YC, Sheng WH, Chen YC. In vitro susceptibility of common *Enterobacterales* to eravacycline in Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* 2023;56(2).
141. Hoşbul T, Aydoğan CN, Kaya S, Bedir O, Gümrall R, Albay A. In Vitro Activity of Ceftazidime-avibactam and Colistin Against Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates. *Mikrobiyol Bul.* 2022;56(2).
142. Humphries R, Campeau S, Davis TE, Nagaro KJ, LaBombardi VJ, Franklin S, et al. Multicenter evaluation of ceftazidime-avibactam susceptibility testing of *enterobacterales* and *pseudomonas aeruginosa* on the vitek 2 system. *J Clin Microbiol.* 2021;59(3).
143. Maraki S, Mavromanolaki VE, Magkafouraki E, Moraitis P, Stafylaki D, Kasimati A, et al. Epidemiology and in vitro activity of ceftazidime–avibactam, meropenem–vaborbactam, imipenem–relebactam, eravacycline, plazomicin, and comparators

- against Greek carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Infection*. 2022 Apr 1;50(2):467–74.
144. Morrissey I, Olesky M, Hawser S, Lob SH, Karlowsky JA, Corey GR, et al. In vitro activity of eravacycline against Gram-negative bacilli isolated in clinical laboratories worldwide from 2013 to 2017. Vol. 64, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2020.
 145. Kuo SC, Wang YC, Tan MC, Huang WC, Shiau YR, Wang HY, et al. In vitro activity of imipenem/relebactam, meropenem/vaborbactam, ceftazidime/avibactam, cefepime/zidebactam and other novel antibiotics against imipenem-non-susceptible Gram-negative bacilli from Taiwan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2021;76(8).
 146. Tsalidou M, Stergiopoulou T, Bostanitis I, Nikaki C, Skoumpa K, Koutsoukou T, et al. Surveillance of Antimicrobial Resistance and Multidrug Resistance Prevalence of Clinical Isolates in a Regional Hospital in Northern Greece. *Antibiotics*. 2023 Nov 1;12(11).
 147. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(3).
 148. Morgado S, Fonseca E, Vicente AC. Genomics of *Klebsiella pneumoniae* Species Complex Reveals the Circulation of High-Risk Multidrug-Resistant Pandemic Clones in Human, Animal, and Environmental Sources. *Microorganisms*. 2022;10(11).
 149. Nguyen NT, Nguyen HM, Nguyen C V., Nguyen T V., Nguyen MT, Thai HQ, et al. Use of colistin and other critical antimicrobials on pig and chicken farms in southern Vietnam and its association with resistance in commensal *Escherichia coli* bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 2016;82(13).
 150. Wang Y, Xu C, Zhang R, Chen Y, Shen Y, Hu F, et al. Changes in colistin resistance and *mcr-1* abundance in *Escherichia coli* of animal and human origins following the ban of colistin-positive additives in China: an epidemiological comparative study. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(10).
 151. Smelikova E, Tkadlec J, Krutova M. How to: screening for *mcr*-mediated resistance to colistin. Vol. 28, *Clinical Microbiology and Infection*. 2022.

152. Adiguzel MC, Baran A, Wu Z, Cengiz S, Dai L, Oz C, et al. Prevalence of Colistin Resistance in *Escherichia coli* in Eastern Turkey and Genomic Characterization of an *mcr-1* Positive Strain from Retail Chicken Meat. *Microbial Drug Resistance*. 2021;27(3).
153. Zelendova M, Papagiannitsis CC, Sismova P, Medvecky M, Pomorska K, Palkovicova J, et al. Plasmid-mediated colistin resistance among human clinical *Enterobacterales* isolates: national surveillance in the Czech Republic. *Front Microbiol*. 2023;14.
154. Simner PJ, Bergman Y, Trejo M, Roberts AA, Marayan R, Tekle T, et al. Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test To Determine Colistin In Vitro Activity against Gram-Negative Bacilli. *Am Soc Microbiol* PJ Simner, Y Bergman, M Trejo, AA Roberts, R Marayan, T Tekle, S Campeau, AQ Kazmi *Journal of clinical microbiology*, 2019•*Am Soc Microbiol* [Internet]. 2019 [cited 2024 Jan 16]; Available from: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/jcm.01163-18>
155. Wattal C, Goel N, Oberoi JK, Datta S, Raveendran R. Performance of three commercial assays for colistin susceptibility in clinical isolates and *Mcr-1* carrying reference strain. *Indian J Med Microbiol*. 2019;37(4).
156. Luo Q, Yu W, Zhou K, Guo L, Shen P, Lu H, et al. Molecular epidemiology and colistin resistant mechanism of *mcr*-positive and *mcr*-negative clinical isolated *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2017;8(NOV).
157. Kieffer N, Royer G, Decousser JW, Bourrel AS, Palmieri M, De La Rosa JMO, et al. *Mcr-9*, an Inducible Gene Encoding an Acquired Phosphoethanolamine Transferase in *Escherichia coli*, and Its Origin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(9).
158. Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerg Microbes Infect*. 2020 Jan 1;9(1):508–16.
159. Leshaba TMS, Mbelle NM, Osei Sekyere J. Current and emerging polymyxin resistance diagnostics: A systematic review of established and novel detection methods. Vol. 132, *Journal of Applied Microbiology*. 2022.
160. Bernasconi OJ, Principe L, Tinguely R, Karczmarek A, Perreten V, Luzzaro F, et al. Evaluation of a new commercial microarray platform for the simultaneous detection of β -lactamase and *mcr-1* and *mcr-2* genes in *Enterobacteriaceae*. Vol. 55, *Journal of Clinical Microbiology*. 2017.

161. Rodriguez-Manzano J, Moser N, Malpartida-Cardenas K, Moniri A, Fisarova L, Pennisi I, et al. Rapid Detection of Mobilized Colistin Resistance using a Nucleic Acid Based Lab-on-a-Chip Diagnostic System. *Sci Rep.* 2020;10(1).
162. Jayol A, Nordmann P, Brink A, Villegas MV, Dubois V, Poirrel L. High-level resistance to colistin mediated by various mutations in the *crrB* gene among carbapenemase-producing *klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Nov 1;61(11).



EK1



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
İL SAĞLIK MÜDÜRLÜĞÜ
Ankara Bilkent Şehir Hastanesi
2 Nolu Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

Sayı : E.Kurul –E2-23-5872 No’lu çalışma

Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği’nde yapılması planlanan; Prof. Dr. Bedi DİNÇ’in sorumlu araştırmacısı olduğu “Klinik Örneklerden İzole Edilen Klebsiella Pneumoniae İzolatlarında Kolistin Duyarlılığının Değerlendirilmesinde Altın Standart Mikrodilüsyon ve Güncel Otomatize Ticari Sistemin Performans Kıyaslaması ve mcr Gen Varlığının Araştırılması” konulu çalışma incelenmiş olup, Etik açıdan oy birliği ile uygun görülmüştür.

06/12/2023

Prof. Dr. Fıfat Emre CANPOLAT
2 Nolu Etik Kurul Başkanı

Etik Kurul Sekreterliği Üniversiteler Mah. Bilkent Cnd. No:1 Çankaya/Ankara

İrtibat; 2nolu Etik Kurul: B.Özkan
K.Çetindağ
G.Uzun

Tel: 0 (312) 552 66 00 Dahili:721197--721198

TEZ KONUSU ONAY FORMU (V.3)

Uzmanlık Öğrencisinin Adı Soyadı: Telefon: E-Posta:	Irmak ÖZKUBAT KORKMAZ
Uzmanlık Dalı:	Tıbbi Mikrobiyoloji
Eğitim Kurumu:	Ankara Bilkent Şehir Hastanesi
Uzmanlık Eğitimine Başlama Tarihi:	13.05.2020
Uzmanlık Eğitimini Bitirme Tarihi:	13.07.2024
Program Yöneticisinin Adı Soyadı:	Bedia DİNÇ
Tez Danışmanının Adı Soyadı: Telefon: E-Posta:	Bedia DİNÇ

*Araştırma/Tez Konusu (Study Title)

Klebsiella pneumoniae izolatlarında Kolistin Duyarlılığının Değerlendirilmesinde Altın Standart Mikrodilüsyon ve Güncel Otomatize Ticari Sistemin Performans Kıyaslaması ve mcr Gen Varlığının Araştırılması

1-Araştırma Sorusu (Research problem)

Kolistin duyarlılığı ölçümünde yeni otomatize sistem, altın standart olan standart mikrodilüsyon yönteminin yerini alabilir mi ?

Hastanemize gelen örneklerden izole edilen kolistin dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarında direktten sorumlu mcr gen pozitifliği oranı nedir?

mcr gen varlığının MİK ile ilişkisi nedir?

Bu genle yayılan direncinin nasıl önüne geçilebilir?

2-Arka Plan ve Gerekçe (Background/rationale)

Çok ilaca dirençli Gram-negatif bakterilerle gelişen enfeksiyonların artması karşısında kolistin iyi bir tedavi seçeneğidir ve kullanımı son zamanlarda çok yaygınlaşmıştır. Ancak kolistine karşı gelişen direnç artmaktadır. Günümüzde oldukça önemli bir problem olan antibiyotiklere karşı artan oranda gelişen direnç, hasta kliniği için antibiyotik duyarlılık testlerinin en hızlı ve doğru şekilde sonuçlanmasını gerektirmektedir. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ticari yöntemlerle kolistin duyarlılığının saptanmasını önermemektedir. Standart mikrodilüsyon yöntemi kolistin antibiyotik duyarlılık testlerinde altın standarttır ve laboratuvarımızda rutin olarak uygulanmaktadır. Ancak Ticari Otomatize sistem VITEK® 2 AST-XN21 (Piyasada yeni) ile çalışılması 1 gün kadar bir süreyi kısaltarak daha hızlı teşhis etmemizi sağlayacaktır ve klinikte hastanın doğru antibiyotiğe ulaşmasını hızlandıracaktır.

Kolistin direncine neden olan ve son yıllarda popüler hale gelen *mcr* geni transfer edilebilir bir plazmid üzerine kodlanmış durumdadır. Bu da bakteriler arasında kolistin direncini aktarılabilir bir hale getirmektedir. Hastanemiz gibi özellikle büyük hastanelerde kolistin direncinin artışı ve yayılmasında bu gen çok önemlidir.

3-Araştırma amacı (Objectives)

Bu çalışmanın amacı *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında kolistin duyarlılığının altın standart mikrodilüsyon yöntemi ve güncel otomatize sistem kıyaslanarak, bulunan sonuçlar doğrultusunda hastanemiz laboratuvarında en hızlı ve doğru tanı yöntemini kullanmaktır. Ek olarak hastanemiz klinik örneklerinden izole edilen *K. pneumoniae* izolatlarında "*mcr*" gen varlığını araştırmaktır.

4-Hipotez (Hypothesis)

Güncel otomatize sistem sonuçları ile altın standart mikrodilüsyon yöntemi sonuçları arasında istatistiksel bir fark bulunmamaktadır.

Hastanemize başvuran hasta örneklerinden izole edilen *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında *mcr* gen varlığını saptanmaktadır.

5-Araştırma türü/tasarım (Study Design)

Tek merkezli, laboratuvar ortamında, prospektif gözlemsel

6- Araştırma yeri (Study Setting/ Location)

T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı

7- Araştırmaya katılanlar/denekler (Study Population)

Hastanemize gelen klinik örneklerden izole edilen toplam 300 *Klebsiella pneumoniae*
(200 kolistin duyarlı -100 kolistin dirençli)

8- Araştırmanın birincil ve ikincil sonuç değişkenleri (Primary and Secondary Outcome)

Mik değerine göre kolistin duyarlı Mik ≤ 2 µg/ml- dirençli Mik >2 µg/ml
mcr 1-8 gen pozitifliği ve negatifliği

9- Araştırma Süreçleri (Study procedures)

Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen hasta örneklerinden izole edilen *Klebsiella pneumoniae* suşları rutin tanı için kullanılan kolistin sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle çalışılıp 100 dirençli 200 duyarlı suş otomatize sistem olan Vitek ile çalışılacak ve sonuçlar kıyaslanacaktır.

EUCAST' a göre Kolistin Mik >2 µg/ml olan *Klebsiella pneumoniae* izolatları dirençli kabul edilecektir.

100 kolistin duyarlı 100 kolistin dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatında Real Time PCR ile mcr (1-8) gen varlığı araştırılacaktır.

10-Örnek büyüklüğü ve istatistiksel güç (Sample size and statistical power)

%80 güç 0.05 hata payı ile literatürdeki örnek çalışma sonuçları değerlendirilerek minimum örneklem sayısı 67 olarak bulunmuştur. 100 kolistin dirençli ve 200 duyarlı toplam 300 izolat kullanılacaktır.

11- İstatistiksel yöntemler (Statistical methods)

Elde edilen veriler, bilgisayar ortamında IBM-SPSS (Version 24.0) istatistik paket programı kullanılarak değerlendirilecek olup tanımlayıcı istatistikler için sayı, yüzde, ortalama $\pm$ standart sapma (SD), minimum (min), maksimum (maks) değerleri kullanılacaktır. İstatistiksel anlamlılık için $p \leq 0.05$ kabul edilecektir.

12-Etik Öngörü (Ethical Considerations)

Araştırma Helsinki deklarasyonu, İyi Klinik Uygulama (Good Clinical Practice) ilkelerine uygun olarak gerçekleştirilecektir. Denek kullanılmayacağından denek araştırma etik kuralları ile çalışmayacaktır.

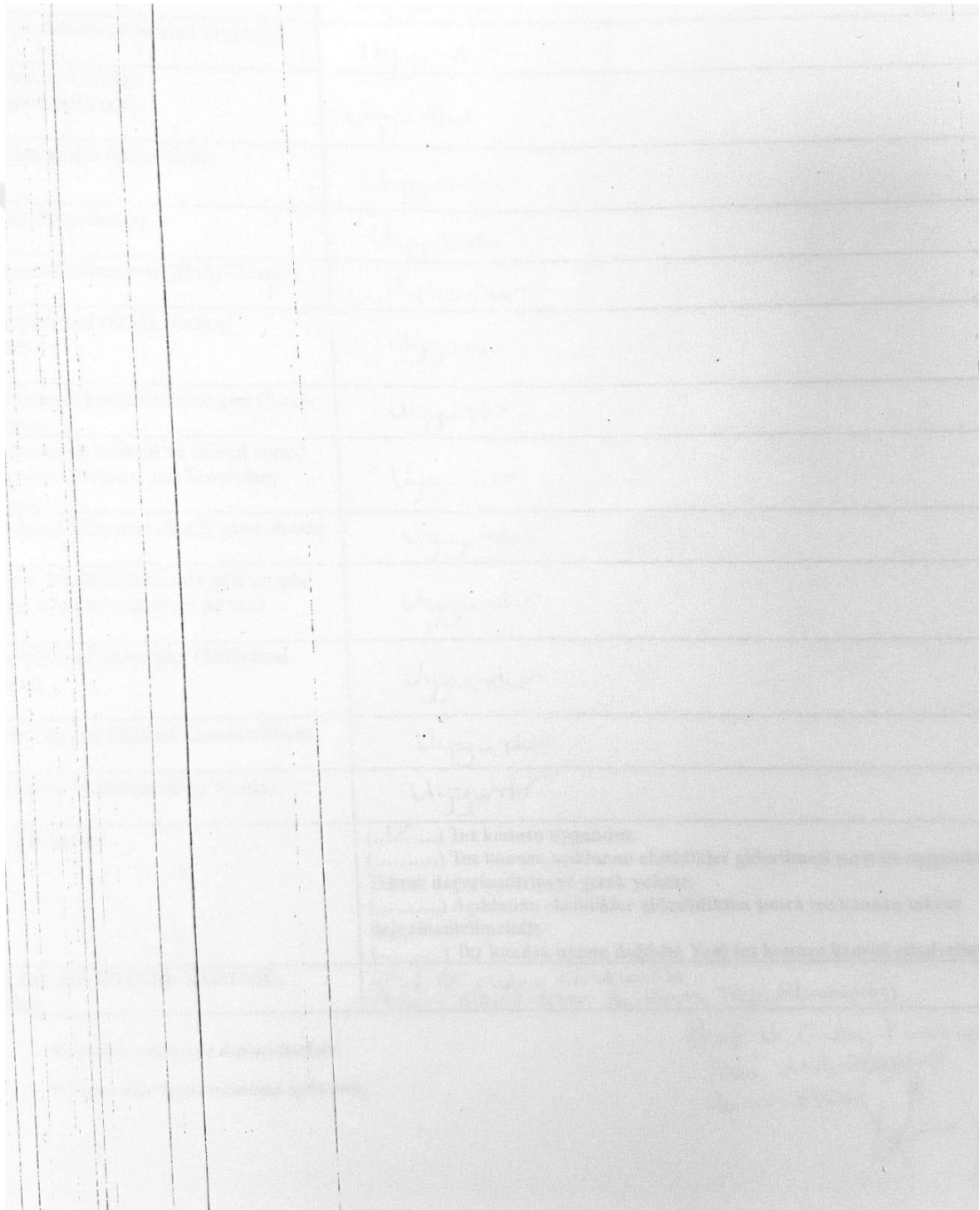
13- Anahtar kelimeler (Key words)

kolistin, mcr, mikrodilüsyon, *Klebsiella pneumoniae*, kolistin direnç geni

Tez konusu onay formu açıklamalar:

*Araştırma/Tez Konusu (Study Title): Araştırmayı yeterince tanımlayıcı olmalı. Yapılacak çalışmanın tanımlayıcı özellikleri yer almalıdır.

1-Araştırma sorusu (Research problem): Araştırmanın yapılmasına neden olacak soru cümlesi yazılmalıdır. Sorular "neden ve nasıl" içermelidir, hedefe odaklanmış ve özgün olmalıdır. Soru basit bir evet/hayır ile açıklanamamalıdır.



EK 3 ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı Irmak ÖZKUBAT KORKMAZ

Doğum yeri ve tarihi

Uyruğu TC

Medeni durumu Evli

İletişim adresi ve telefonu:

Yabancı dili: İngilizce

Eğitimi

Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi

Çorum Anadolu Lisesi

Bahçelievler İlköğretim Okulu

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti

Ankara Mikrobiyoloji Derneği

Bilimsel İlgi Alanları

- Klinik Örneklerden Artan Sıklıkta İzole Edilen Serratia Türlerinin Değerlendirilmesi (TMC 2020)
- SARS-CoV-2'ye Rapel Aşılamının (TURKOVAC) Etkililiğini, Güvenliliğini ve İmmünojenitesini Belirlemek için İki Kollu, Açık Etiketli, Çok Merkezli, Faz 2b Klinik Çalışma
- Ankara Şehir Hastanesi Solunum Yolu Örneklerinin Bir Yıllık Kümülatif Antibiyogram Verileri (TMC 2022)
- Ankara Şehir Hastanesinde Anti-Düz Kas Antikor Pozitifliği Olan Hastaların Demografik İncelenmesi(TMC 2022)
- Are SARS-CoV-2 viral loads in children lower than in adults?(JOURNAL OF INFECTION-YAYIN)
- Viral Load in of Patients Vaccinated with Various Vaccination Schemes DOI:10.1007/s42399-023-01511-2 (SN Comprehensive Clinical Medicine 5) Yayın
- Kontrol Altına Alınmamış Diyabetes Mellitus Olan Hastada Gelişen Rinoserebral Mukormikozis Olgusu(TMC 2022)
- Kolistin Duyarlılığını Belirlemede Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Agar Dilüsyon ve Modifiye Disk Elüsyon Yöntemlerini Karşılaştırmak (TMC 2022 POSTER)

