

ŞAFAK CEREN UÇAK

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2023



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

KARBAPENEME DİRENÇLİ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
SUŞLARINDA KOLİSTİN DİRENCİNİN FLOW
SİTOMETRİ YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

ŞAFAK CEREN UÇAK

DANIŞMAN
PROF.DR. BETİGÜL ÖNGEN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2023

İTHAF

Dinozor seven, biricik oğlum DEMİR'e

TEŞEKKÜR

Öncelikle, doktora eğitimim boyunca bana her konuda destek olan, yol gösteren, asla yalnız bırakmayan, sevincimde ve üzüntümde yanımda olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Betigül ÖNGEN'e eşsiz bilgi ve deneyimleri ile beni büyüttüğü için çok teşekkür ederim.

Ayrıca doktora eğitimim boyunca verdikleri destekler için tez izleme komitesi üyeleri, değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ali AĞAÇFİDAN'a ve Sayın Prof. Dr. Tanju KADİR'e minnetlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen ve beni cesaretlendiren Prof. Dr. Gülseren AKTAŞ hocama ve Anabilim Dalı öğretim üyeleri; Prof. Dr. Meltem UZUN, Prof. Dr. Zayre ERTURAN, Prof. Dr. Dilek ŞATANA, Doç. Dr. Yaşar NAKİPOĞLU, Doç. Dr. Lütfiye ÖKSÜZ, Doç. Dr. Hayriye KIRKOYUN UYSAL, Doç. Dr. Gonca ERKÖSE GENÇ, Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÖNEL ve Öğr. Gör. Uzm. Dr. Bahar AKGÜN KARAPINAR'a teşekkür ederim.

Tezim için örnek sayısının belirlenmesinde ve istatistiksel analizlerin yapılmasında değerli bilgilerimi benimle paylaşarak desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Sevda ÖZEL YILDIZ hocama teşekkür ederim.

İstanbul Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında çalışan tüm arkadaşlarıma, Dr. Pınar SOĞUKSU, Dr. Sena TÜRKDOĞAN ve doktora öğrencisi Bio. Ahmet AKTAŞ'a değerli yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca yanımda olan anneme ve babama, manevi desteklerinden dolayı ablama, enişteme ve güzel yeğenlerime, eşimin değerli annesi ve babasına bu süreçte beni yalnız bırakmadıkları için teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitim yolculuğumda elimi asla bırakmayan sevgili eşim Emir Levent UÇAK'a çok teşekkür ederim.

Son olarak, en özel teşekkürüm biricik oğlum Demir Osman UÇAK'a, sen olmasan asla başaramazdım. Her düştüğümde beni yine ayağa sen kaldırdın. Gösterdiğin anlayış, destek ve olgun duruş için sana minnettarım. Umarım ileride ben de senin teşekkür sayfanda yer alma gururunu yaşarım ve bilime beraber katkı sağlarız.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2021-38205

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
RESİMLER LİSTESİ.....	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
ZUSAMMENFASSUNG.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
2.1.1. Mikrobiyolojik Özellikler.....	3
2.1.2. Virulans Faktörleri ve Patogenez.....	4
2.1.3. Yaptığı Hastalıklar ve Epidemiyoloji.....	5
2.1.4. Antibiyotik Direnci.....	6
2.2. Karbapenemler.....	7
2.2.1. Karbapenemlerin Yapısı ve Özellikleri.....	7
2.2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'de Karbapeneme Direnç Mekanizmaları.....	8
2.3. Kolistin (Polimiksin E).....	10
2.3.1. Kolistinin Yapısı ve Özellikleri.....	10
2.3.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'de Kolistine Direnç Mekanizmaları.....	10
2.3.2.1. Mutasyona Bağlı Kolistin Direnci.....	11
2.3.2.2. Aktarılabılır Kolistin Direnci.....	11
2.4. Kolistin Direncinin Saptanması için Kullanılan Yöntemler.....	12
2.4.1. Önerilen Yöntemler.....	12
2.4.1.1. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi (SMD).....	12
2.4.1.2. Sıvı Makrodilüsyon Yöntemi (SMAD).....	13
2.4.1.3. Kolistin Sıvı Disk Elüsyon Yöntemi (KSDE).....	13

2.4.1.4. Kolistin Agar Test Yöntemi (KAT).....	14
2.4.2. Önerilmeyen Yöntemler	14
2.4.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi.....	14
2.4.2.2. Gradyent Test (E-test) Yöntemi.....	14
2.4.3. Otomatize Yöntemler.....	15
2.4.3.1. VITEK 2	15
2.4.3.2. Phoenix	15
2.4.3.3. Sensititre	16
2.4.3.4. MicroScan.....	16
2.4.4. Hızlı, Alternatif Test Yöntemleri.....	16
2.4.4.1. MALDI-TOF MS Yöntemi.....	16
2.4.4.2. BacterioScan FLLS.....	17
2.4.4.3. Flow Sitometri (FCM) Yöntemi	17
2.4.4.3.1. Flow Sitometrinin Gelişimi.....	18
2.4.4.3.2. Flow Sitometri Temel Bileşenleri ve Çalışma Prensibi.....	18
2.4.4.3.3. Flow Sitometrinin Kullanım Alanları	19
2.4.4.3.4. Flow Sitometride Kullanılan Floresan Boyalar	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Gereçler.....	23
3.1.1. Etik Kurul Onayı.....	23
3.1.2. Çalışma Grubu: Suşların Seçimi ve Çalışmaya Dahil Etme Kriterleri	23
3.1.3. Besiyerleri	23
3.1.3.1. Tryptik Soy Agar (Biolab, Macaristan)	23
3.1.3.2. Katyon-ayarlı Mueller Hinton II Buyyonu (KAMHB) (Becton Dickinson, ABD).....	23
3.1.3.3. Beyin Kalp İnfüzyon Buyyonu (Becton Dickinson, ABD)	24
3.1.4. Antibiyotik, Boya ve Kitler.....	24
3.1.4.1. Antibiyotik	24
3.1.4.2. Boyalar.....	24
3.1.4.3. Kitler	24
3.1.5. Standart Referans Suşlar	24
3.1.6. Kullanılan Cihazlar	24
3.1.7. Kullanılan Sarf Malzemeler	25

3.2. Yöntemler.....	25
3.2.1. Besiyerlerin Hazırlanması.....	25
3.2.1.1. Triptik Soy Agar (Biolab, Macaristan)	25
3.2.1.2. Katyon-ayarlı Mueller Hinton II Buyyonu (KAMHB) (Becton Dickinson, ABD).....	25
3.2.1.3. %20 Gliserollü Buyyon	26
3.2.2. Saklama Besiyerinde Dondurulan Suşların Üretilmesi	26
3.2.3. VITEK 2 Otomatize Sistemiyle Tanımlama Yapılması ve Karbapenem Duyarlılığının Saptanması	26
3.2.4. Sıvı Mikrodilüsyon (SMD) Yöntemiyle Kolistin Duyarlılığının Saptanması	26
3.2.4.1. Kolistin için Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi	27
3.2.5. Flow Sitometri (FCM) Yöntemiyle Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi..	29
3.2.5.1. Boyaların Hazırlanması.....	29
3.2.5.1.1. DiBAC ₄ (3) [bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol].....	29
3.2.5.1.2. 7-AAD (7-Aminoactinomycin-D).....	29
3.2.5.2. Flow Sitometri Yöntemi için Optimizasyon Çalışmaları.....	29
3.2.5.3. Flow Sitometri Yöntemiyle Kolistin Duyarlılığının Saptanması	31
3.2.6. İstatistiksel Değerlendirme	33
3.2.6.1. Örneklem Büyüklüğünün Hesaplanması	33
3.2.6.2. Verilerin İstatistiksel Analizi	33
4. BULGULAR	36
4.1. Suşların İzole Edildiği Hastalara ve Klinik Örneklerle Ait Özellikler	36
4.2. VITEK 2 Otomatize Sistemiyle Saptanan Tanımlama ve Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları	36
4.3. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemiyle Saptanan Kolistine Duyarlılık ve MİK Sonuçları	37
4.4. Flow Sitometri Yöntemiyle Kolistine Duyarlılık Sonuçları	38
4.5. Bulguların İstatistiksel Analiz Sonuçları	54
5. TARTIŞMA	56
KAYNAKLAR	67
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	80

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2-1 Flow sitometri yönteminde kullanılan bazı floresan boyalar

Tablo 3-1: EUCAST'a göre kolistin için klinik sınır değerleri

Tablo 3-2 İstatiksel analiz parametreleri

Tablo 4-1 İzolatların VITEK 2 sistemiyle elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları

Tablo 4-2 Karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle tespit edilen kolistin MİK dağılımı

Tablo 4-3 SMD ve FCM yöntemlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

Tablo 4-4: FCM yönteminin istatistiksel analiz sonuçları

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 Karbapenemlerin moleküler yapısı

Şekil 2-2 *Enterobacteriaceae*'de karbapenem direncinin mekanizmaları

Şekil 2-3 Polimiksin E'nin (Kolistin) moleküler yapısı

Şekil 2-4 Flow sitometrinin temel bileşenleri ve çalışma şeması

Şekil 3-2 Antibiyotik eklenmemiş ve boyanmamış bakteri popülasyonu

Şekil 3-3 7-AAD boyasıyla boyanmış hücrelerin PC5 kanalındaki dot plot grafiği

Şekil 3-4 Dot plot grafiği üzerinde kapılama işlemi

Şekil 3-5 Antibiyotik duyarlılık testleri iş akışı

Şekil 3-6 Canlı ve ölü hücrelerin toplam hücre popülasyonu içerisindeki yüzdelerinin histogram grafikleri üzerinde belirlenmesi

Şekil 4-2 Standart referans suşların (*E. coli* NCTC 13846 (*mcr-1* +), *E. coli* ATCC 25922) overlay histogram grafikleri

Şekil 4-3 Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değeri >2 µg/ml bulunan dirençli izolatların overlay histogram grafikleri

Şekil 4-4 Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değeri ≤ 2 µg/ml bulunan duyarlı izolatların overlay histogram grafikleri

Şekil 4-5 Büyük hata tespit edilen izolatın overlay histogram görüntüsü

RESİMLER LİSTESİ

Resim 2-1 TSA besiyerinde *K. pneumoniae*'nin mukoid özellikteki kolonileri

Resim 3-1 Kolistin mikrodilüsyon deneyinin örnek mikroplak görüntüsü



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

7-AAD	“7-Aminoactinomicin D”
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADT	Antibiyotik duyarlılık testi
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu “American Type Culture Collection”
Atm	Atmosfer
AUC	Eğri altında kalan alan “Area Under Curve”
BH	Büyük hata
CAZ	Seftazidim
CFU	Koloni oluşturan birim “Colony Forming Unit”
CLA	Klavulanik asit
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü “Clinical and Laboratory Standarts Institute Klinik”
CTX	Sefotaksim
ÇBH	Çok büyük hata
DiBAC ₄ (3)	“bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol”
dk.	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü “World Health Organization”
ECDC	Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Ağı “European Centre for Disease Prevention and Control”
EUCAST	Avrupa Antibiyotik Duyarlılık Testi Komitesi “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”
FCM	Flow sitometri
FSC	İleri saçılım “Forward scatter”
GSBL	Geniş spektrumlu beta-Laktamaz
ISO	Uluslararası Standart Kurumu “International Organization for Standardization”
KAMHB	Katyon ayarlı Mueller Hinton buyyon
KAT	Kolistin agar test
KRKP	Karbapeneme dirençli <i>Klebsiella pneumoniae</i>
KSDE	Kolistin sıvı disk elüsyon

LPS	Lipopolisakkarit
MALDI-TOF MS	Matris destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi “Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry”
µg	Mikrogram
mg	Miligram
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyon
ml	Mililitre
MRSA	Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
n	Örnek sayısı
NCTC	Ulusal Tip Kültür Koleksiyonu “The National Collection of Type Cultures”
nm	Nanometre
NPD	Negatif prediktif değer
PBP	Penisilin bağlayan protein
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu “Polymerase Chain Reaction”
PI	“Propidium iodide”
PPD	Pozitif prediktif değer
R	Dirençli
RNA	Ribonükleik asit
ROC	Alıcı İşletim Karakteristiği “Receiver Operating Characteristic”
S	Duyarlı
SMAD	Sıvı makrodilüsyon “Broth macrodilution”
SMD	Sıvı mikrodilüsyon “Broth microdilution”
SSC	Yana saçılım “Side scatter”
TO	“Thiazole orange”
TSA	Triptik soy agar

ÖZET

Uçak ŞC. (2023). Karbapeneme Dirençli *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında Kolistin Direncinin Flow Sitometri Yöntemi ile Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi. İstanbul.

Çalışmamızda, karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae* (KRKP) gibi dirençli bakteri enfeksiyonu olan hastaların tedavisine doğru antibiyotikle ve en kısa sürede başlanmasına olanak sağlamak üzere KRKP izolatlarında kolistin direncinin flow sitometri (FCM) yöntemiyle doğru ve hızlı bir şekilde saptanıp saptanamadığı ve bu yöntemin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin kullanıma uygun olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bakteriyoloji laboratuvarına rutin inceleme amacı ile gönderilen klinik hasta örneklerinden izole edilmiş ve rutin yöntemlerle karbapeneme dirençli olduğu belirlenmiş 85 *K. pneumoniae* suşu çalışma kapsamına alınmıştır. Çalışmada *K. pneumoniae* suşlarının tür düzeyinde tanımlanması ayrıca karbapenem ve diğer antibiyotiklere direncinin saptanması için VITEK 2 otomatize sistemi kullanılmıştır. Karbapeneme dirençli olduğu doğrulanan 85 *K. pneumoniae* suşunun kolistin için MİK değerleri, referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemiyle saptanmıştır. SMD yönteminde pozitif ve negatif kontrol olarak sırasıyla *Escherichia coli* NCTC 13846 (*mcr-1* +) ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşları kullanılmıştır. Kolistin duyarlılığının saptanması için ayrıca flow sitometri (FCM) yöntemi uygulanmış ve hücreler canlı/ölü olarak katagorize edilmiştir. Canlı/ölü hücre ayrımı için, antibiyotik muamelesinin neden olduğu bakteriyel membran potansiyel değişikliklerini saptayabilen DiBAC₄(3) floresan boyası kullanılmıştır. KRKP suşlarının tamamı sefazolin, sefuroksim, seftazidim ve piperasilin/tazobaktam, %98,8'i siprofloksasine, %88,2'si amikasine, %87'si trimetoprim/sülfametoksazole ve %83,5'i gentamisine dirençli bulunmuştur. SMD yöntemi ile 68'i (%80) kolistine dirençli, 17'si (%20) kolistine duyarlı bulunan suşların MİK₅₀ değerinin 16 µg/ml, MİK₉₀ değerinin ise 32 µg/ml olduğu saptanmıştır. FCM yöntemi referans yöntemle karşılaştırıldığında her iki yöntem arasındaki kategorik uyumun %98,8 olduğu ayrıca FCM yönteminin özgüllüğünün %94, duyarlılığının %100, pozitif prediktif değerinin %98,5 ve negatif prediktif değerinin ise %100 olduğu belirlenmiştir. FCM yöntemi ile kolistin duyarlılık sonuçları ortalama 2 saatte elde edilmiştir. Sonuç olarak, FCM yönteminin *K. pneumoniae* suşlarında kolistin direncinin saptanmasında hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğu ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında alternatif bir duyarlılık testi olarak kullanılabileceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Klebsiella pneumoniae*, sıvı mikrodilüsyon, MİK, flow sitometri, DiBAC₄(3)

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2021-38205

ABSTRACT

Uçak ŞC. (2023). Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains' Investigation of Colistin Resistance by Flow Cytometry. İstanbul University, Institute of Health Science, Medical Microbiology. PhD Thesis. İstanbul.

In our study, it was aimed to investigate whether colistin resistance in carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) isolates can be detected accurately and quickly by flow cytometry (FCM) to allow the treatment of patients to be started with the right antibiotic and as soon as possible, and whether this method is suitable for routine use in clinical microbiology laboratories. Eighty five *K. pneumoniae* strains isolated from clinical patient samples sent to İstanbul Medical Faculty, Department of Medical Microbiology, Bacteriology laboratory for routine examination and determined to be resistant to carbapenem by routine methods were included in the study. In the study, the VITEK 2 automated system was used to identify *K. pneumoniae* strains at the species level and to determine their resistance to carbapenems and other antibiotics. MIC values for colistin of 85 *K. pneumoniae* strains confirmed to be carbapenem resistant were determined by the reference method, broth microdilution (BMD). *Escherichia coli* NCTC 13846 (*mcr-1* +) and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 strains were used as positive and negative controls in the BMD method, respectively. Flow cytometry (FCM) method was also applied to determine colistin sensitivity and cells were categorized as live/dead. DiBAC₄(3) fluorescent dye, which can detect bacterial membrane potential changes induced by antibiotic treatment, was used for live/dead cell differentiation. All CRKP strains were resistant to cefazolin, cefuroxime, ceftazidime and piperacillin/tazobactam, 98.8% to ciprofloxacin, 88.2% to amikacin, 87% to trimethoprim/sulfamethoxazole and 83.5% to gentamicin. According to the BMD method, 68 (80%) colistin-resistant strains, 17 (20%) colistin-sensitive strains were found. The MIC₅₀ value of 16 µg/ml and the MIC₉₀ value was 32 µg/ml. When the FCM method was compared with the reference method, it was determined that the categorical agreement between the two methods was 98.8%, and the specificity of the FCM method was 94%, the sensitivity was 100%, the positive predictive value was 98.5%, and the negative predictive value was 100%. Colistin susceptibility results were obtained in an average of 2 hours with the FCM method. In conclusion, it was seen that the FCM method is a fast and reliable method for detecting colistin resistance in *K. pneumoniae* strains and can be used as an alternative susceptibility test in clinical microbiology laboratories.

Key Words: *Klebsiella pneumoniae*, broth microdilution, MIC, flow cytometry, DiBAC₄(3)

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TDK-2021-38205

ZUSAMMENFASSUNG

Uçak ŞC. (2023). Untersuchung der Colistin Resistenz in Carbapenem resistenten *Klebsiella pneumoniae* Stämmen mittels Durchflusszytometrie Methode. Institut für Gesundheitswissenschaften der Universität Istanbul, Abteilung für medizinische Mikrobiologie. Doktorarbeit. İstanbul.

Ziel unserer Studie war es zu untersuchen, ob die Colistin Resistenz bei Carbapenem-resistenten *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) Isolaten mithilfe der Durchflusszytometrie (DFZ) genau und schnell erkannt werden kann, um die Behandlung von Patienten mit dem richtigen Antibiotikum schnellstmöglich beginnen zu können möglich ist und ob diese Methode für den routinemäßigen Einsatz in Laboren der klinischen Mikrobiologie geeignet ist. In die Studie wurden 85 *K. pneumoniae* Stämme einbezogen, die aus klinischen Patientenproben isoliert wurden, die zur Routineuntersuchung an die Medizinische Fakultät Istanbul, Abteilung für Medizinische Mikrobiologie, Bakteriologielabor geschickt wurden und bei denen durch Routinemethoden eine Resistenz gegen Carbapenem festgestellt wurde. In der Studie wurde das automatisierte System VITEK 2 verwendet, um *K. pneumoniae* Stämme auf Artenebene zu identifizieren und ihre Resistenz gegen Carbapeneme und andere Antibiotika zu bestimmen. Die MHK Werte für Colistin von 85 *K. pneumoniae* Stämmen, bei denen bestätigt wurde, dass sie Carbapenem resistent sind, wurden mit der Referenzmethode, der Bürühe Mikroverdünnung, bestimmt. *Escherichia coli* NCTC 13846 (*mcr-1* +) und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 wurden als positive und negative Kontrollstämmen in der Bürühe Mikroverdünnung Methode verwendet. Zur Bestimmung der Colistin Empfindlichkeit wurde auch die Methode der Durchflusszytometrie (DFZ) angewendet und die Zellen wurden in lebende/tote Zellen eingeteilt. Für die Differenzierung lebender/toter Zellen wurde der Fluoreszenzfarbstoff DiBAC₄(3) verwendet, der durch eine Antibiotikabehandlung induzierte bakterielle Membranpotentialveränderungen erkennen kann. Alle CRKP Stämme waren resistent gegen Cefazolin, Cefuroxim, Ceftazidim und Piperacillin/Tazobactam, 98,8% gegen Ciprofloxacin, 88,2% gegen Amikacin, 87% gegen Trimethoprim/Sulfamethoxazol und 83,5% gegen Gentamicin. Nach der Bürühe Mikroverdünnung Methode wurden 68 (80 %) Colistin resistente Stämme und 17 (20 %) Colistin sensitive Stämme gefunden. Der MHK₅₀ Wert betrug 16 µg/ml und der MHK₉₀ Wert betrug 32 µg/ml. Dementsprechend wurde festgestellt, dass die kategorische Harmonie zwischen Brühe der Mikroverdünnung und DFZ Methoden 98,8% beträgt. Die Spezifität der Durchflusszytometrie Methode beträgt 94%, die Sensitivität 100%, der positiv prädiktive Wert beträgt 98,5% und der negativ prädiktive Wert beträgt 100%. Ergebnisse zur Colistin Empfindlichkeit wurden mit der DFZ Methode in durchschnittlich 2 Stunden ermittelt. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die DFZ Methode eine schnelle und zuverlässige Methode zum Nachweis der Colistin Resistenz bei *K. pneumoniae* Stämmen ist und als alternativer Empfindlichkeitstest in Laboren der klinischen Mikrobiologie eingesetzt werden kann.

Schlüsselwörter: *Klebsiella pneumoniae*, Brühe Mikroverdünnung, MHK, Durchflusszytometrie, DiBAC₄(3)

Die vorliegende Arbeit wurde vom Forschungsfonds der Universität Istanbul unterstützt. Projekt Nr. TDK-2021-38205

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Antibiyotiklerin yanlış kullanımı sonucu mikroorganizmaların direnç geliştirmesi çok eskiye dayanmaktadır (1). Ampirik tedavi ile desteklenen direnç gelişimi, tedaviyi güçleştirmiş, hastanede yatış sürelerini uzatmış, mortalite oranlarını artırmış ve maliyeti yükseltmiştir. Birçok geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *Enterobactereceae* üyesi bakteri, aynı zamanda diğer antimikrobiyal ajanlara karşı da dirençli hale gelmiştir. Çoklu ilaç direnci gelişen bakteriler için karbapenem kullanımındaki artış sonucunda karbapenem direncinin de dünya çapında arttığı görülmektedir (2). Bu durum, dirençli bakterilerin sebep olduğu hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılacak ilaç seçeneklerini azalmıştır. Dünya Sağlık Örgütü, üçüncü kuşak sefalosporinlere ve karbapenemlere dirençli *K. pneumoniae* (KRKP)'yi, tedavide yaygın kullanılan antibakteriyel ilaçlara direnç geliştirmesi nedeniyle endişe uyandıran dokuz bakteriden biri olarak bildirmiş ve yeni tedavilere acil ihtiyaç duyulan dirençli bakterileri listelediği küresel öncelikli patojenler listesinde kritik öncelikli sınıfta gruplandırmıştır (1, 3).

Bu koşullarda polimiksinler (kolistin), kliniklerde çoklu ilaca dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonları için tedavi seçeneği ve hatta son çare antibiyotik haline gelmiştir. Kolistin kullanımındaki artış ile birlikte, dünya çapında kolistine dirençli *K. pneumoniae* tedavide sorun yaratmaya başlamıştır (4, 5). Dirençli *K. pneumoniae*'nin kolistin direncinin saptanmasında laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan disk difüzyon ve gradient test yöntemlerinin, kolistinin ağara kolay difüze olmaması nedeniyle kullanım olanağı ortadan kalkmıştır (6). Uluslararası antibiyotik duyarlılık komiteleri (CLSI ve EUCAST) tarafından önerilen yöntem sıvı mikrodilüsyon yöntemidir (6-8). Ancak bu yöntemin zaman alıcı olması ve rutin kullanıma uygun olmaması ayrıca otomatize sistemlerden de güvenilir sonuçlar alınamaması nedeniyle rutin laboratuvarlarda daha kısa sürede ve doğru sonuç veren yöntemlere olan gereksinim artmıştır. Bu durum, ampirik tedavi hatalarının ve direnç gelişiminin önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır (9).

Alternatif yöntemler arasında yer alan flow sitometri yöntemi, uzun yıllardır çeşitli hastalıkların tanı ve tedavisinin takibinde kullanılmaktadır. Son yıllarda meydana gelen teknolojik gelişmeler ve yapılan çalışmalar, flow sitometri yönteminin bakteriyel

popülasyonlar içindeki hücresel canlılığın ve membran potansiyelinin değerlendirilmesinde kullanılabileceğini göstermektedir (10). Bu gelişmelerle beraber araştırmacılar flow sitometri yöntemi ile duyarlılık çalışmaları yapma olanağını keşfetmişlerdir (11-13). Tedaviden en fazla yarar elde edebilmenin temel koşulu doğru antibiyotik en hızlı sürede seçilebilmesidir. Konvansiyonel kültür yöntemleri ve antibiyotik duyarlılık testlerinin 18-24 saat gibi uzun bir zaman alması, tanı ve tedavi açısından önemli bir dezavantajdır.

FCM yöntemi kullanılarak kolistin dışındaki diğer antibiyotiklerle yapılan duyarlılık çalışmaları, 2-4 saat gibi kısa bir sürede sonuç alınabileceğini göstermiştir. Literatürde, bu konu ile ilgili az sayıda çalışma mevcut olup, kolistin ile yapılan çalışmalar ise çok daha sınırlı sayıdadır (12-15).

Çalışmamızda, hastaların tedavisine daha kısa sürede ve doğru antibiyotik ile başlanmasına olanak sağlamak üzere *K. pneumoniae*'de kolistine karşı gelişen direncin flow sitometri yöntemi ile hızlı ve doğru olarak belirlenip belirlenemediği ve bu yöntemin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin kullanıma uygun olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Klebsiella pneumoniae*

2.1.1. Mikrobiyolojik Özellikler

K. pneumoniae, *Enterobacteriaceae* ailesinin *Klebsiella* cinsinin bir üyesidir. *Klebsiella* cinsi, adını 19. yüzyılın sonlarında yaşamış olan Alman mikrobiyolog Edwin Klebs'ten almıştır (16). Daha sonraları, *K. pneumoniae*'nin yaptığı ağır öldürücü pnömoni tablosu araştırmacı Carl Friedlander tarafından ayrıntılı bir biçimde tanımlanmıştır ve bundan dolayı yıllarca "Friedlander basili" olarak isimlendirilmiştir (17). İnsanlarda hastalıkla ilişkili başlıca türler, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* ve *K. granulomatis*'dir. Farklı klinik tablolara yol açan *K. ozaenae* ve *K. rhinoscleromatis* ise Deoksiribonükleik asit (DNA) homoloji çalışmalarına dayalı olarak *K. pneumoniae*'nin nonfermentatif özellikteki alt türleri olarak sınıflandırılmıştır (16).

K. pneumoniae Gram negatif, hareketsiz, çomak şeklinde, kapsüllü, laktozu fermente eden, fakültatif anaerobik, katalaz pozitif, oksidaz negatif bir bakteridir. 1- 2 µm boyunda ve 0.5-0.8 µm eninde olan *K. pneumoniae*'nin üremesi için gerekli optimum sıcaklık 37°C ve optimum pH 7,0'dir (16, 17).

K. pneumoniae triptik soy agarda (TSA) büyük, parlak, mukoid yapıda ve krem renkli koloniler oluşturur. Belirgin bir polisakkarit kapsülü vardır. Bu, izole kolonilerin mukoid görünümünden sorumludur (17). *K. pneumoniae*'nin TSA besiyerindeki karakteristik mukoid kolonileri resim 2-1'de gösterilmektedir.



Resim 2-1: TSA besiyerinde *K. pneumoniae*'nin mukoid özellikteki kolonileri

Özellikle kan dolaşımı enfeksiyonları gibi invaziv enfeksiyonlara neden olan suşlarının karbapenemler dahil geniş spektrumlu antibiyotiklere giderek artan oranda dirençli hale gelmesi nedeniyle *K. pneumoniae* dünya genelinde antimikrobiyal direncinin takip edildiği bir patojen haline gelmiştir (1).

2.1.2. Virulans Faktörleri ve Patogenez

K. pneumoniae'nin ana virülans faktörlerinden biri, suşların çoğunluğu tarafından üretilen polisakkarit kapsülüdür. Bakterinin virülansı için gerekli olan kapsül bakteriyi fagositoza karşı korur ve serumun bakterisidal aktivitesine karşı dirençte rol oynar. Kapsül antijenlerine göre, coğrafik varyasyon gösteren en az 77 kapsül tipi tanımlanmıştır. K1 ve K2 kapsül tipleri daha virulandır ve daha ciddi seyirli enfeksiyonlara neden olmaktadır (16, 18). K1 tipi suşlar, dünya çapında toplum kökenli piyozjenik karaciğer absesinin önemli bir nedeni olarak ortaya çıkmıştır (19). K1 ve K2 serotipleri, yüksek oranlarda hipermukoviskoz fenotip gösterir ancak hiperviskoz fenotipler sadece K1 ve K2 serotipleri ile sınırlı değildir. Uzun süre hipermukoviskoz fenotipteki *Klebsiella* suşlarının daha invaziv olduğu ve metastatik karaciğer absesinde rol oynadığı düşünülse de virülans faktörlerinin çeşitliliği ve karaciğer absesinde mukoid olmayan izolatların da gözlenmesi nedeniyle hipermukoviskozite artık tek başına hipervirülansın bir göstergesi olarak görülmemektedir. Daha az invaziv suşlarla karşılaştırıldığında invaziv sendromu olan hastalardan izole edilen suşların, farklı virülans özelliklerine sahip olduğu ancak coğrafi çeşitliliğe rağmen invaziv hastalık izolatlarının birbirleri ile genetik benzerliği olduğu görülmektedir. Mutant kapsülsüz suşların virülansı ise düşüktür (16).

K. pneumoniae'de tanımlanan ana adezyon faktörleri tip 1 ve tip 3 fimbriyalardır (16). Tip 1 fimbria, *Enterobacteriaceae*'nin farklı türleri arasında yaygındır ve murin idrar yolu enfeksiyonunda önemli bir virülans faktörü olduğu gösterilmiştir. Tip 3 fimbria, solunum epiteline, endotele, idrar kesesi hücrelerine ve kollajen tip V'e bağlanmada ve biyofilm oluşumunda rol oynamaktadır. Kateter ilişkili idrar yolu enfeksiyonlarında önemli bir kolonizasyon faktörü olarak gösterilmiştir (20).

K. pneumoniae enfeksiyonlarının virülansında çeşitli demir alım sistemleri de rol oynamaktadır (18). *K. pneumoniae*'nin; enterobaktin, yersiniabaktin, salmokekin ve aerobaktin olmak üzere dört siderofor kodladığı gösterilmiştir ve çoğunluğu *tonB* tarafından düzenlenmektedir (16, 18). Enterobaktin, *K. pneumoniae* izolatları arasında

en yaygın olarak kullanılan siderefordur, ancak aktivitesi lipokalsin-2 ile bozulabilir (21). Salmokelin ise, enterobaktin'in glikolize edilmiş bir türevidir ve lipokalsin-2 ile bağlanmaya direnç gösterebilir (22). Salmokelinin pnömonide de önemli bir virülans belirleyicisi olduğu doğrulanmıştır (21). Yersiniabaktinin aktivitesi lipokalin-2 tarafından inhibe edilmez ve özellikle solunum yolu enfeksiyonlarında önemlidir (23). İnvaziv hastalıklardaki rolü daha fazla olan hipervirülan fenotiplerde aerobaktin üretimini artır ve böylece *K. pneumoniae*'nin virülansı da artmış olur (16).

Lipopolisakkarit (endotoksin), Gram negatif bakterilerin hücre zarının dış kısmının bir bileşenidir ve tipik olarak bir O antijeni, lipit A ve bir çekirdek oligosakkaritten oluşur (24). *K. pneumoniae* izolatlarında 9 farklı O-antijen tipi tespit edilmiştir. O1, klinik *K. pneumoniae* izolatlarında en sık görülen serotiptir ve invaziv enfeksiyonlarda daha yaygındır (18).

Porinler, küçük hidrofilik moleküllerin taşınmasında rol alan proteinlerdir ve Gram negatif bakterilerin dış zarında bulunur. *K. pneumoniae* izolatlarının ürettiği majör porinler OmpK35 ve OmpK36'dır. GSBL üreten ve karbapeneme dirençli izolatlar dahil olmak üzere, antibiyotiğe dirençli *K. pneumoniae* suşlarında zayıf ifade edilirler ya da hiç ifade edilmezler. OmpK35'in kaybı, bazı antibiyotiklere karşı duyarlılığı değiştirmezken; OmpK35 ve OmpK36'nın eş zamanlı kaybı, OmpK36 delesyon mutantından bile daha yüksek antibiyotik direncine yol açar (25).

Dış zar proteini A (OmpA), Gram negatif bakterilerin dış zar proteinlerinden biridir. OmpA'nın kaybı, *K. pneumoniae*'yi antimikrobiyal peptidlere karşı daha duyarlı hale getirir ayrıca alveoler makrofajların fagositozuna karşı direncine de katkıda bulunur (26).

K. pneumoniae, kalın bir biyofilm tabakası oluşturabilmektedir. Biyofilm, ekzopolimerik maddelerden oluşan bir matrise gömülü farklı türdeki mikroorganizmaların aralarında iletişim kurarak haberleşmesini ve yüzeylere tutunabilmesini sağlayan mikroorganizma topluluklarıdır (27).

2.1.3. Yaptığı Hastalıklar ve Epidemiyoloji

K. pneumoniae, çevrede yaygın olarak bulunan fırsatçı bir patojendir. İnsanda; nazofarenks, gastrointestinal sistem ve daha az sıklıkla diğer bölgelerde asemptomatik olarak kolonize olabilir. Gastrointestinal kolonizasyon özellikle antibiyotik tedavisi altında olan ve uzun süre hastanede yatan hastalarda abdominal enfeksiyon riskini yedi

kata kadar artırabilmektedir. Sıklıkla nozokomiyal salgınlara neden olduğu bildirilmektedir (16, 28). Gaitadan yakalanma oranı %5-38, nazofarenksten yakalanma oranı ise %1-6'dır. Taşıyıcılık oranları ise hastanede kalma süresine ve antibiyotik kullanımına bağlı olarak artmaktadır. Hastanede yatan hastaların dışkılarında *Klebsiella* taşıma oranları %77, farinkslerinde %19 ve ellerinde %42'dir (18).

K. pneumoniae enfeksiyonlarının çoğu hastane kaynaklı (özellikle yoğun bakım ünitesi) olmakla birlikte sağlıklı insanlarda da ortaya çıkabilir. İdrar yolu enfeksiyonu, pnömoni ve bakteriyemi en sık karşılaşılan enfeksiyonlar olup, bunu karaciğer apsesi, diğer intraabdominal enfeksiyonlar, yara enfeksiyonları, nörocerrahi sonrası enfeksiyonlar, intravasküler enfeksiyonlar ve diğer invaziv enfeksiyonlar izlemektedir. Alkol kullanımı, diyabet, malignite, böbrek hastalığı ve bağışıklık baskılanması gibi altta yatan predispozan faktörler enfeksiyon riskini arttırmaktadır (16, 29). İntraabdominal *Klebsiella* enfeksiyonu oranları göz önüne alındığında, Doğu Asya ülkeleri, özellikle Tayvan'dan yüksek oranlar bildirilmektedir; hastalığın belirli bölgelerde artışı, coğrafyaya göre değişen bağırsak kolonizasyon oranları ve mevsimsel değişikliklerle ilişkilendirilmektedir. (16).

K. pneumoniae bakteriyemi nedeni olarak *E. coli*'den sonra ikinci en sık karşılaşılan etkidir (16). *K. pneumoniae*'nin sebep olduğu pnömoninin (Friedlander pnömonisi) tipik özellikleri arasında şiddetli seyretmesi, alkoliklerde sık görülmesi, akciğerlerde daha çok üst lobları etkilemesi, apse oluşumuna eğilimi ve hemoptiziye bağlı olarak "frenk üzümü jölesi" görünümünde balgam oluşumu yer alır (17). İdrar yolu enfeksiyonları doğrudan veya kalıcı kateterleri olan hastalarda ortaya çıkabilir. *K. pneumoniae* ayrıca toplumdan edinilmiş primer invaziv karaciğer apselerinin önemli bir nedenidir ve genellikle endoftalmi, menenjit ve beyin apseline yol açan metastatik yayılımla ilişkilidir (16).

2.1.4. Antibiyotik Direnci

Tedavide yaygın olarak kullanılan beta-laktam antibiyotikler ve aminoglikozitler; 1960'larda penisilin direncinin ve daha sonra aminoglikozit direncinin gelişmesi nedeniyle 1980'lerden itibaren yerini sefalosporinler ve florokinolonlara bırakmıştır (30). 1983 yılından itibaren GSBL oluşturarak geniş spektrumlu sefalosporinlere direnç gösteren *K. pneumoniae* suşlarının bildirilmesi ve sonrasında plazmitte kodlanan GSBL varyantlarının gelişimiyle birlikte direnç kısa sürede

Enterobacteriaceae ailesinin diğer üyelerine de yayılmıştır. GSBL oluşturan suşların geniş spektrumlu sefalosporinler dışında çoğunlukla birçok farklı grup antibiyotiğe de dirençli olması *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarında yaygın olarak karbapenemlerin kullanılmasına yol açmıştır (31).

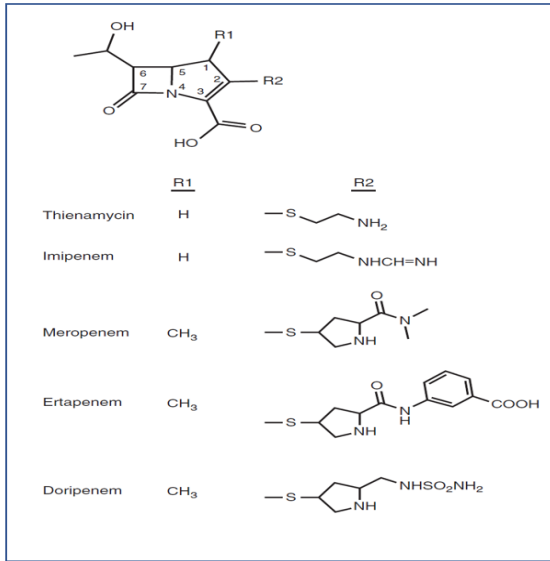
K. pneumoniae'de 1990'lı yılların ikinci yarısından itibaren karbapenem direnci bildirilmeye başlamıştır. 2001 yılında Türkiye'de izole edilen bir *K. pneumoniae* suşunun karbapenemler dahil tüm β -laktamlara dirençli olduğu bulunmuştur (32). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2018 yılında *K. pneumoniae*'de, çoklu ilaç direncinin Avrupa Bölgesi'nde oldukça yaygınlaştığını, karbapenem direncinin Gürcistan, İtalya, Sırbistan, Türkiye ve Ukrayna'da %25-50 arasında değiştiğini, Beyaz Rusya ve Yunanistan'da %50'yi aştığını bildirmiştir (33). Dünyada karbapeneme dirençli bakteri sayısındaki artışla beraber tedavi gittikçe zorlaşmıştır. Bu koşullar altında polimiksinler (kolistin) kliniklerde çoklu ilaca dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonları için tedavi seçeneği haline gelmiştir. Kolistin kullanımının artışı, kolistine doğal olarak dirençli olmadığı bilinen *K. pneumoniae* ve diğer bazı bakterilerde kolistin direncinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. 2015 yılında *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında plazmit kaynaklı kolistin direnç geni olan *mcr-1* bildirilmiştir (34).

2.2. Karbapenemler

2.2.1. Karbapenemlerin Yapısı ve Özellikleri

Karbapenemler, β -laktam halkasına sahip olan β -laktam grubu antibiyotiklerin bir üyesidir. Beş üyeli bir halkaya sahip benzersiz moleküler yapısı vardır ve geniş spektrumlu β -laktamazlara karşı belirgin bir direnç sağlar (35).

Klinik olarak kullanılan karbapenemlerden genel olarak imipenem, panipenem ve doripenem Gram pozitif bakterilere karşı etkili antibiyotiklerdir. Meropenem, biapenem ve ertapenem ise Gram negatif bakterilere karşı daha fazla etkilidir (35). Karbapenemlerin moleküler yapısı şekil 2-1'de gösterilmiştir (36).

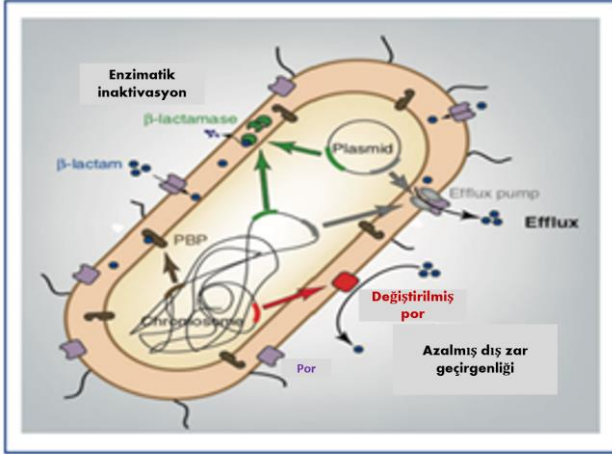


Şekil 2-1: Karbapenemlerin moleküler yapısı

İlk karbapenem olan tienamisin, 1976 yılında *Streptomyces cattleya*'dan elde edilmiştir. İmipenem, sentetik olarak geliştirilmiş ilk karbapenemdir. Aynı zamanda kompleks mikrobiyal enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan ilk karbapenem, imipenem olmuştur. Fakat imipenem, insan böbreğinde bulunan dehidropeptidaz I (DHP-I) tarafından deaktive edilmektedir. Bu olumsuz durum, imipenemin silastatin ile birlikte uygulanmasıyla çözülmüştür. Silastatin antimikrobiyal aktiviteye katılmamakta ancak imipenemin DHP-I tarafından bozulmasını önlemektedir (36). Doripenem; hidrolize en az duyarlı karbapenemdir ve hidrolizi imipenemden 2-150 kat daha yavaştır (35). Doripenem, meropenem ve ertapenem; C2'de bir 1 β -metil, 2-tiyo pirolidinil yapısı farklılığı sebebi ile DHP-I bozunmasına karşı kararlı ve tek başlarına uygulanabilmeleri bakımından imipenemden farklıdırlar (36).

2.2.2. *Klebsiella pneumoniae*'de Karbapeneme Direnç Mekanizmaları

β -laktam grubu antibiyotiklerden biri olan karbapeneme karşı Gram negatif çomaklarda oluşan direnç üç ana mekanizmadan kaynaklanır. Bu mekanizmalar; porin aracılı direnç ve penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) fonksiyonu, pompa ile atılım ve β -laktamaz enzim üretimidir (35). Porin kaybı veya karbapenemin atılımının artması ile alımın azalması genellikle karbapenem için çok zayıf afiniteye sahip olan β -laktamazların aşırı ekspresyonu ile ilişkilidir. Karbapenem direncinin mekanizmaları şekil 2-2'de gösterilmiştir (37).



Şekil 2-2: Enterobacteriaceae'de karbapenem direncinin mekanizmaları

K. pneumoniae'nin dış zarında üç ana porin proteini vardır: OmpK35, OmpK36 ve OmpK37. Özellikle OmpK35 ve OmpK36 antibiyotiklerin hücre içine penetrasyonundan sorumludur. *K. pneumoniae*, PBP'lere bağlandığı periplazmik alana karbapenemin girişini en aza indirmek için dış zardaki porin proteinlerinin ekspresyonunu düzenler. Çalışmalar, OmpK36 porin varyantının, ertapenem direncinin, meropenem ve imipenem duyarlılığının azalmasına neden olduğunu göstermiştir (38).

Enterobacteriaceae'de çoklu ilaca direncin ana mekanizmalarından birini oluşturan farklı atım pompası sistemlerinden bugüne kadar *K. pneumoniae*'de tanımlananlar; RND ("resistance-nodulation-cell division") ailesinde yer alan, çok sayıda antibiyotiğe direnç sağlayan ve farklı atım pompa sistemleri arasında en yaygın olan AcrAB-TolC sistemi, MATE ("multidrug and toxic compound extrusion") ailesinde yer alan ve kloramfenikol, norfloksasin, akriflavin ve etidyum bromür direncinde rol oynayan KdeA sistemi ayrıca birkaç antimikrobiyal bileşiğe direnç sağlayan MFS ("major facilitator super family") ailesinden olan KmrA sistemleridir (39, 40). Bu pompa sistemlerini kodlayan genler bir mikroorganizmadan diğerine plazmitler yoluyla kolayca aktarılabilir (39).

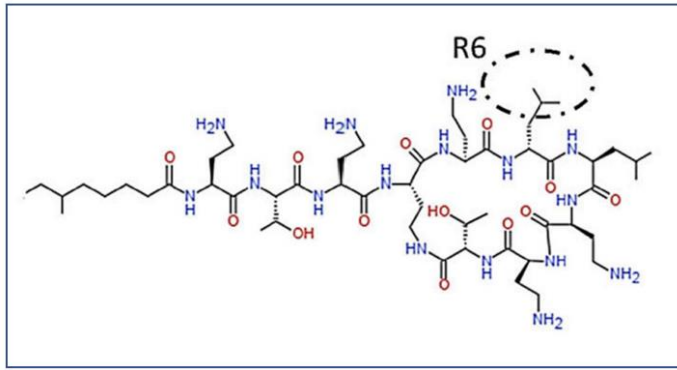
Karbapenem direncinden sorumlu olan en önemli mekanizma karbapenemaz üretimidir. Karbapenemazlar, karbapenemleri de hidrolize eden β-laktamazlardır. Günümüzde, A, B, D sınıflarından olan üç enzim; KPC, NDM ve OXA-48, farklı ülkelerden köken almış ve tüm dünyaya yayılmıştır. Bu enzimler içinde ülkemiz için en önemlisi OXA-48'dir (35). Karbapeneme dirençli olup karbapenemaz üretmeyen suşlar, genellikle kinolonlar, aminoglikozitler, polimiksinler gibi diğer grup antibiyotiklere göre daha az dirençlidir. Karbapenemaz üretmeyen bu izolatların aksine karbapenemaz

üreten izolatlarda direnç genleri aktarıldığı için bu izolatlar daha fazla klinik soruna neden olmaktadır (37).

2.3. Kolistin (Polimiksin E)

2.3.1. Kolistinin Yapısı ve Özellikleri

1947 yılında keşfedilen polimiksinler, polimiksin A-E olmak üzere beş farklı bileşikten oluşan bir katyonik antimikrobiyal peptit (CAMP) sınıfıdır (41). Kolistin (polimiksin E), polipeptit yapıda bakterisidal bir ajandır ve polimiksinlerin klinik olarak mevcut iki formundan biridir (polimiksin B ve polimiksin E). Kolistin, sporlu bir toprak bakterisi olan *Bacillus polymyxa*'dan doğal yollarla sentezlenen bir antibiyotiktir. 10 aminoasitten ve hidrofilik polikasyonik peptit zinciri ile bir hidrofobik yağ asit kuyruğundan oluşan, 1750 Da ağırlığında büyük bir moleküldür (41-43). Polimiksin E (kolistin)'in moleküler yapısı şekil 2-3'de gösterilmiştir (44).



Şekil 2-3: Polimiksin E'nin (Kolistin) moleküler yapısı

Florokinolonlara ve aminoglikozitlere ayrıca karbapenem, monobaktam, sefalosporinler ve geniş spektrumlu penisilinler de dahil olmak üzere tüm β -laktamlara dirençli Gram negatif patojenlerin prevalansındaki hızlı artış, kolistinin yeniden değerlendirilmesini sağlamıştır. Dirençli *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. ve *Enterobacteriaceae* gibi Gram negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde kolistin kullanımının artmasıyla birlikte, dünya çapında kolistine karşı direnç sorunuyla karşı karşıya kalınmıştır (4).

2.3.2. *Klebsiella pneumoniae*'de Kolistine Direnç Mekanizmaları

Kolistinin antimikrobiyal etki gösterdiği hedef, hücre membranıdır. Katyonik bir polipeptit olan kolistin ilk etkileşimini, anyonik bakteri membran lipopolisakaritleri (LPS) ile yapmaktadır. Kolistinde, pozitif yüklü hidrofilik peptit uç ve negatif yüklü

hidrofobik yağ asidi ucu bulunmaktadır. Pozitif yüklü ucu, bakterinin LPS'leriyle kuvvetli bir elektrostatik etkileşime girmektedir. Negatif yüklü ucu ise LPS'lerin lipitlerine bağlanarak, lipitlerin etkileşimini güçlendirmekte ve böylece membran lipitlerinin fosfat gruplarının negatif yükünü stabilize eden Mg^{2+} ve Ca^{2+} kanyonları membrandan ayrılmaktadır. LPS'lerin kararlılığının bozulmasına yol açan bu durumun sonucunda kolistin geçeceği stabilize olmayan alanlar genişlemektedir. Hücre içerisine giren kolistin, membranın geçirgenliğinin artmasına, sitoplazma içeriğinin sızmasına ve bakterin ölmesine neden olmaktadır (4, 44).

Yapılan genomik analizler, *K. pneumoniae* de dahil olmak üzere patojenlerde kolistin ile ilgili, LPS'ye bağlı dirence *mgrB* geninin inaktivasyonunun, *PhoP / PhoQ* sinyal sisteminin üst regülasyonunun, PmrA düzenlenmiş *pmrHFIJKLM* operonunun aktivasyonunun ve ArnB'nin varlığının yol açtığını ileri sürmektedir (45, 46).

Başka bir alternatif yol ise, kolistin proteinlere, DNA'ya ve lipidlere zarar veren hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit (O_2^-) ve hidroksil radikallerinin ($\bullet OH$) reaktif oksijen türlerinin oluşumunu indükleyerek hücre ölümüne sebep olan hidroksil radikal yoludur (47).

2.3.2.1. Mutasyona Bağlı Kolistin Direnci

Doğal olarak duyarlı türlerde polimiksinlere karşı kazanılmış direnç, genellikle lipopolisakkarit yapısındaki değişiklikler de dahil olmak üzere bakteri hücre yüzeyindeki değişikliklerin sonucudur. *K. pneumoniae*'nin bazı izolatlarında olduğu gibi polimiksinleri yakalayan veya bağlayan kapsüller polisakkaritlerin kaybolması bildirilen diğer direnç mekanizmaları arasında yer almaktadır. Kromozomal mutasyonlardan kaynaklanan direnç, genellikle bakteriler arasında yatay (horizontal) olarak aktarılmaz (48).

2.3.2.2. Aktarılabılır Kolistin Direnci

2015 yılının Kasım ayında Liu ve ark. (34) bir tür fosfoetanolamin transferaz kodlamakla görevli olan, *mcr-1* olarak isimlendirdikleri, plazmit aracılığıyla aktarılan ve kolistin direncinden sorumlu geni bulduklarını Çin'den bildirmişlerdir. Araştırmacılar, *mcr-1* genini 2011-2014 yılları arasında gıda hayvanları ve etlerinden elde edilen *E. coli* ile 2014 yılında hastalardan izole edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında saptamışlardır. Uzun yıllar tüm dünyada gıda olarak tüketilen hayvanlarda

yaygın olarak kullanılmasına rağmen, kolistin Çin'de 2017 yılına kadar insanlar için klinik kullanımının mevcut olmaması *mcr-1*'in yayılmasında hayvansal kullanımın etkisini göstermektedir (48). Daha sonra bu süreç genin varyantları olan (*mcr-1.2*, *mcr-1.3*, ...) ile diğer *mcr* genlerinin (*mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8*, *mcr-9* ve *mcr-10*) tespiti ile devam etmiştir (48, 49). 2016 yılı Mayıs ayında, *mcr-1* pozitif *E. coli* izolatu üriner sistem enfeksiyonu etkeni olarak Amerika'lı bir hastada saptanmıştır (50). Ardından bildirilen yeni vakalar ve çalışmalarla, Çin, Güney Afrika, Fransa, Danimarka ve Almanya'da farklı *Enterobacteriaceae* türleri arasında *mcr-1*'in yayıldığı gösterilmiştir (51-54).

2.4. Kolistin Direncinin Saptanması için Kullanılan Yöntemler

2.4.1. Önerilen Yöntemler

2.4.1.1. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi (SMD)

SMD, kolistin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) tayini için hem CLSI (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü) hem de EUCAST (Avrupa Antibiyotik Duyarlılık Testi Komitesi) tarafından onaylanmış standart yöntemdir (6-8, 55). MİK, bir gece inkübasyon sonrasında mikroorganizmanın görülebilir üremesini inhibe eden antibiyotigin en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır (55). Bu yöntemde, 96 kuyucuk içeren mikropaklar kullanılır ve her suş için bir sıraya iki kat sulandırılmış konsantrasyonlarda antibiyotik eklenir. Küçük hacimli olması nedeniyle bir mikropakta birden fazla antibiyotik ve/veya suş eş zamanlı olarak test edilebilir. Mikropakların 16-20 saat $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ 'de inkübasyonu sonunda bakterilerin üremesi sonucu oluşan bulanıklık görsel olarak gözlemlenir (6-8, 55).

Kolistin MİK seviyelerinin doğru şekilde belirlenmesi için 'CLSI-EUCAST Polimiksin Sınır Değerleri Çalışma Grubu' kapsamlı bir araştırma yaparak *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* türleri için kullanılacak referans testin ISO (Uluslararası Standart Kurumu) standartına (20776-1) göre yapılan sıvı mikrodilüsyon yöntemi olduğu ve aşağıdaki önerilerle birlikte uygulanması gerektiği ortak fikrine varmışlardır (56):

- Katyon ayarlı Mueller Hinton buyyon (KAMHB) kullanılmalıdır.
- Katkı maddesi eklenmemelidir (özellikle polisorb-80 surfaktanın kolistin ile etkileşime girdiği fark edilmiş ve eklenmemesi gerektiği bildirilmiştir).

- Plak kuyucukları polistren yapıda olmalı ve kullanılmadan önce işlem görmemelidir.
- Polimiksinlerin sülfat tuzları kullanılmalıdır.

Bu yöntemde, kullanılan antibiyotik solüsyonları ile sıvı besiyerinin manuel olarak hazırlanması gerekmektedir. Dolayısıyla bu durum zaman alıcı ve zahmetli olduğundan mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin kullanım için uygun bir yöntem değildir (57, 58).

2.4.1.2. Sıvı Makrodilüsyon Yöntemi (SMAD)

SMAD yönteminde, SMD yönteminde kullanılan küçük hacimli kuyucuklar yerine her biri iki kat artan konsantrasyonda antibiyotik içeren daha büyük hacimli deney tüpleri kullanılmaktadır. Bu yöntemde SMD yönteminde olduğu gibi katyon ayarlı Mueller Hinton buyyonu kullanılır, antibiyotik dilüsyonu ve yorumlanması da SMD yöntemi ile aynıdır (6). Tüp başına kullanılan hacimler tipik olarak 1 ml veya daha fazladır, bu nedenle makro seyreltme yöntemi olarak kabul edilir. Suşlar ve değişen konsantrasyonlarda antibiyotik içeren tüpler 16-20 saat $35^{\circ}\text{C} \pm 2'$ de inkübe edilir. Bunu takiben, bakteri üremeleri görsel olarak gözlemlenir. Bakteri üremesi gözlemlenmeyen antibiyotiğin en düşük konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenir (8, 59). SMAD, CLSI (6) rehberine göre önerilen kolistin duyarlılık test yöntemleri arasında olmakla birlikte emek ve malzeme açısından yoğun bir yöntem olması, aynı anda çok sayıda suşla çalışmanın zor ve zaman alıcı olması nedeniyle mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin kullanım için uygun bir yöntem değildir (57-59).

2.4.1.3. Kolistin Sıvı Disk Elüsyon Yöntemi (KSDE)

KSDE yöntemi, tarihsel olarak polimiksinler gibi sorunlu ajanların test edilmesi için yakın zamanda yeniden kullanıma sunulan eski bir antibiyotik duyarlılık testi (ADT) yöntemidir (60).

Kolistinin büyük molekül yapısı sebebiyle agar difüzyonu zorlaşmaktadır. Bu nedenle disk difüzyon ve gradient test yöntemlerinin kullanılması CLSI ve EUCAST tarafından önerilmemektedir (6, 7). 2018 yılının Ekim ayında Simner ve ark. (61), alternatif bir yöntem olarak kolistin sıvı disk elüsyon (KSDE) yöntemini yeniden tanımlamışlardır. Bu yöntemde her suş için, içerisinde 10 ml Mueller Hinton buyyonu bulunan tüpler kullanılmakta ve tüpün içerisine klinik sınır değer konsantrasyonlarını

(1, 2 ve 4 µg/ml) sağlamak üzere belirli sayıda kolistin diskleri eklenmektedir. Tüpler, önce kolistin disklerden ayrışması için oda ısısında inkübe edilir. Daha sonra tüplere bakteri süspansiyonu eklenir ve üreme olup olmadığı 16-20 saatlik inkübasyondan sonra görsel olarak değerlendirilir. KSDE yöntemi, CLSI'a göre kolistin için yeni bir yöntem tanımlanana kadar önerilen yöntemler arasında olmakla birlikte zaman alıcı ve maliyetli bir yöntemdir (6).

2.4.1.4. Kolistin Agar Test Yöntemi (KAT)

Bu yöntem, her biri iki kat artan konsantrasyonda kolistin içeren Mueller Hinton agar plaklarında uygulanmaktadır. Bu plaklara bakteri süspansiyonu inoküle edildikten sonra 16-20 saat süreyle inkübe edilir. Herhangi bir üreme görülmeyen en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenir (62). KSDE ve KAT yöntemlerinin rutin laboratuvarlarda uygulanabilirliği SMD yöntemine göre daha kolaydır. KAT yönteminin dezavantajları, farklı dilüsyonlarda kolistin içeren MHA plaklarının hazırlanması ve her plakta bir seferde en fazla 10 suşla çalışılabilir olmasıdır (6, 63).

2.4.2. Önerilmeyen Yöntemler

2.4.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Bu yöntemde, suşlar Mueller Hinton agara yayılır ve farklı belirli konsantrasyonlardaki antibiyotik diskleri besiyeri yüzeye yerleştirilir, 16-18 saat 35°C ± 2'de inkübe edilir. Daha sonra, her antibiyotik diskinin çevresinde oluşan zon çapı ölçülür ve referans rehberlerdeki değerlerle karşılaştırılarak bakterinin o antibiyotiğe duyarlılık kategorisi belirlenir. (59).

Polimiksinlerin büyük molekül yapısı sebebiyle agara zayıf şekilde yayılması nedeniyle, güncel EUCAST ve CLSI rehberlerinde disk difüzyon yöntemi için kolistin zon çapı değerleri bulunmamaktadır (6, 7, 55).

2.4.2.2. Gradyent Test (E-test) Yöntemi

Antibiyotiğin kademeli olarak azalan konsantrasyonlarının emdirildiği ticari olarak sağlanan şerit (strip)'lerin (E-test, vb.) kullanıldığı bu yöntemde şerit, test edilecek olan bakterinin yayıldığı agar plağın yüzeyine yerleştirilir. Plaklar, 18-24 saat 35°C ± 2'de inkübe edilir. Gradyent test şeritleri ile üremenin inhibe olduğu alanın kesiştiği bölge MİK değerini verir (59).

Uygulaması kolay bir test olan gradiyent test, agara dayalı bir yöntem olduğu için kolistin MİK değerlerinin doğruluğu kabul edilmemektedir (6). Kolistine dirençli az sayıdaki örnek ile yapılan çalışmalarda, gradiyent test ve SMD arasında uyum bulunmaktadır ancak çok sayıda dirençli örnek içeren çalışmalarda, gradiyent testte yüksek oranlarda çok büyük hata (ÇBH) gösterilmiştir (60, 64, 65).

2.4.3. Otomatize Yöntemler

2.4.3.1. VITEK 2

VITEK 2 sistemi, sıvı mikrodilüsyon prensibi ile çalışan, manuel olarak hazırlanmış bir inokulum üzerinde otomatik olarak hızlı tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık testi yapan bir sistemdir. En önemli işlevi, mikroorganizmanın tanımlanması ile izolatin antimikrobiyal duyarlılığı arasındaki tutarsızlıkları aramaktır. Diğer bir önemli fonksiyonu ise duyarlılık testlerinin sonuçlarına dayalı olarak izolatin antimikrobiyal fenotipini tespit etmektir (66).

Sistemde, mikro kuyucuklar içeren antibiyotik duyarlılık test kartları kullanılmaktadır ve her kart bir 64 tane mikro kuyucuk içermektedir. Bu kuyucuklarda, farklı konsantrasyonlardaki antibiyotikler ve kuru besiyeri bulunmaktadır. Ayrıca kartta bir adet pozitif kontrol kuyucuğu yer almaktadır. Sistem, her kuyucuktaki üremeyi periyodik olarak izler; periyodik izlem süresi bakteriler için 18-24 saattir. İzolatların antibiyotik duyarlılığını, cihazda yüklü bulunan verilere göre istatistiksel tahminler doğrultusunda değerlendirip, sonuca ulaşmaktadır (59).

VITEK 2 otomatize sisteminin bazı aşamalarında kolistin, plastik ile temas edebilmekte ve kolistin plastikte yapışmasından kaynaklanan konsantrasyon kayıpları oluşabilmektedir. Bu durum da cihazın yanlış sonuçlar vermesine neden olmaktadır. Bazı çalışmalarda VITEK 2'nin kolistin duyarlılığını saptamada güvenilir olmadığı belirtilmiştir (59, 67, 68).

2.4.3.2. Phoenix

Bu sistemde, sıvı mikrodilüsyon prensibi gibi çalışan mikro kuyucuklu paneller kullanılır. 84 adet mikro kuyucuk, değişik konsantrasyonlarda toz antibiyotik içerir ve bir adet de pozitif kontrol kuyucuğu bulunur (59). MİK değerlerini 6-16 saat içerisinde verebilmektedir (69). Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan bir sistem olmasına rağmen elde edilen MİK değerleri altın standart olan SMD yöntemiyle

karşılaştırıldığında ÇBH oranları görülmesi sebebiyle kolistine duyarlılığı saptamak için güvenilir bir sistem olmadığı sonucuna varılmıştır (68, 70).

2.4.3.3. Sensititre

Bu sistem de sıvı mikrodilüsyon prensibi gibi çalışan, VITEK 2 ve Phoenix'e benzeyen otomatize bir sistemdir. 64 panel kapasiteli okuma sağlayabilen bu otomatize sistemde inkübasyon süresi boyunca mikroorganizma tarafından üretilen belirli enzimlerin aktivitesi floresan teknolojisi ile izlenir (59). Test panelleri standart 96 kuyucuklu mikrodilüsyon plaklarıdır. Sensititre'de üreme 18-24 saatlik inkübasyondan sonra oluşan floresan ölçümü ile belirlenmektedir. Floresans miktarı MİK değerini belirlemeyle doğrudan ilişkilidir (69).

2.4.3.4. MicroScan

Otomatize sistemlerden biri olan MicroScan, bakteriyel tanımlama ve ADT için otomatikleştirilmiş bir sistemdir. Antibiyotik duyarlılığını belirlemek için standart boyutlu sıvı mikrodilüsyon panelleri ve bakteriyel üremeyi belirlemek için fotometre ve florometrenin kullanımına dayanan kolorimetrik okumaları kullanır. Diğer otomatize sistemlerde olduğu gibi, kuyucuklara bakteriyel süspansiyonlar inoküle edilir ve herbir kuyucukta kurutulmuş farklı konsantrasyonlardaki antibiyotikler bulunur (59). Hızlı çoğalan mikroorganizmalar için ADT profilleri 4,5-7 saat arasında belirlenirken, yavaş çoğalan mikroorganizmalar için süre 18 saate kadar uzayabilmektedir. Ayrıca cihazda, mikroorganizmaların üreme hızlarını ve MİK değerlerini analiz etmek için geliştirilmiş yazılım programları da mevcuttur (69).

2.4.4. Hızlı, Alternatif Test Yöntemleri

2.4.4.1. MALDI-TOF MS Yöntemi

MALDI-TOF MS (Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon-iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi) yönteminde kültürde üretilen mikroorganizmaya ait organik moleküller, ultraviyole ışınlarını absorblayan kristalleşmiş bir matrikse gömülerek iyonize gaz molekülleri haline dönüştürülür. Cihazda UV lazeriyle ışınlama sonrasında, vakum altında bir tüp içinden geçen iyonların uçuş zamanına göre molekül (protein) profilleri belirlenir. Bu profilin (uçuş kütle spektrumu), sistemin veritabanındaki referans mikroorganizmalarla karşılaştırılmasıyla mikroorganizma tür düzeyinde tanımlanabilmektedir. Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılmaya

başlanan, ucuz ve kısa sürede sonuç veren hızlı bir yöntemdir. MALDI-TOF MS bakterinin tanımlanma süresini yaklaşık bir gün kısaltabilmektedir (71).

Son yıllarda MALDI-TOF MS yönteminin, antimikrobiyal direncin saptanması amacıyla kullanımı gündeme gelmiştir. Yapılan çalışmalarda spesifik piklerin değerlendirilmesi ile dirençli ve duyarlı suşlar arasındaki profil farkı ortaya konularak başarılı sonuçlar elde edilmektedir (72). Dortet ve ark. (73) polimiksin direncini saptamak amacıyla yaptıkları çalışmada karbapenemaz üreten *E. coli* suşlarında, bu yöntemin kromozom ve plazmitte kodlanan (*mcr* benzeri genler) direnç mekanizmaları arasında ayırım da yaparak polimiksin direncini 15 dakika gibi kısa bir sürede ve doğru bir şekilde tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

2.4.4.2. BacterioScan FLLS

BacterioScan, ADT'nin hızlı belirlenmesi için geliştirilmiş ve ileri lazer ışık saçılımı (FLLS) teknolojisini kullanan bir yöntemdir. Bu yöntem sıvı örneklerde optik yoğunluk (OD) ve lazer ışınının yakınına dağılmış yoğunluğu ölçmek için bir lazer ışık kaynağı kullanır. BacterioScan FLLS yöntemi ile 16 örneğe kadar aynı anda çalışılabilir ve doğru yoğunluk değişimi ölçümleri her üç dakikada bir otomatik olarak yapılmaktadır. Başlangıçta idrar tahlili için geliştirilmiş olan bu yöntem daha sonra ADT için optimize edilmiştir. Hızlı çoğalan mikroorganizmalar için yaklaşık 6 saat içinde, yavaş çoğalan mikroorganizmalar için ise 18 saat içinde sonuç verebilmektedir (59).

Hayden ve ark. (74), BacterioScan FLLS yöntemi ile yaptıkları antibiyotik duyarlılık çalışmasında elde ettikleri sonuçları VITEK 2 ve MicroScan test sonuçları ile karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucunda, kategorik uyumun BacterioScan ve MicroScan için %88,9 (iki minör hata), BacterioScan ve VITEK 2 için ise %72,2 (beş minör hata) olduğu ve çoğu izolatla hızlı sonuç (<6 saat) alınmasına rağmen, 10 saatten fazla ve nadiren 12 saatte de sonuç alındığı bildirilmiştir.

BacterioScan FLLS'in en büyük dezavantajı, numunelerdeki canlı ve ölü hücreleri ayırt edememesi ve ADT süresinin uzun olmasıdır (59).

2.4.4.3. Flow Sitometri (FCM) Yöntemi

FCM, floresan boyalarla işaretlenen milyonlarca hücreyi tek tek inceleyebilen ve hızla gelişen bir teknolojidir. Bunun yanı sıra daha ileri çalışmalar için bu hücrelerin saf alt popülasyonlarını tespit etme yeteneğine de sahiptir (10).

FCM yönteminde, süspansiyon halindeki hücrelerin her biri, akım kanalı boyunca ilerleyerek lazer demetinin içinden geçmektedir ve bu esnada floresan ışığın bir kısmını yansıtmaktadır. Hücreler tarafından yansıtılan bu floresan ışınlar flow sitometri cihazının optik sistemi tarafından toplanıp, analiz edilir ve dijitalleştirilerek bilgisayara aktarılır (75).

Son yıllarda meydana gelen teknolojik gelişmeler ve yapılan bilimsel çalışmalar, flow sitometri yönteminin, bakteriyel popülasyonlar içindeki hücresel canlılığı ve membran potansiyeli değerlendirmesine izin vermiştir (10). Bu gelişmelerle beraber araştırmacılar, FCM yöntemi ile duyarlılık testi yapma olanağını gündeme getirmişlerdir (11-13). Daha sonra yapılan çeşitli çalışmalarda bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının ortalama 4-6 saat gibi kısa bir sürede belirlenebileceği gösterilmiş ve bu tekniğin rutin duyarlılık testi olarak laboratuvarlarda kullanılabileceği ileri sürülmüştür (13, 14, 76, 77).

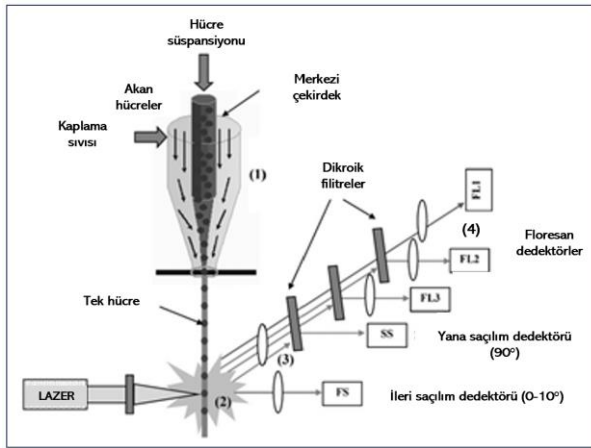
2.4.4.3.1. Flow Sitometrinin Gelişimi

Moldoven tarafından 1934 yılında geliştirilen bu teknik, 1940'lı yılların sonunda II. Dünya Savaşı'nda aerosoller içindeki bakterileri ve sporları tespit etmek amacıyla kullanılmıştır (77). Gucker ve ark. (78), FCM yönteminin aerosollerde kullanımından sonra, 1947 yılında, bakteri hücreleri gibi biyolojik örneklerle de çalışılabileceğini bildirmişlerdir. 1950'lerin başında, tek hücrelerin çoklu özelliklerini yüksek oranda ölçebilen ve hücresel popülasyonları analiz etmek için kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Hücreleri tek tek analiz ettiği için örnek heterojenliğinin belirlenmesine de olanak sağlamaktadır (79). Van Dilla ve ark. (80), 1967 yılında, oluşturdukları akış kanalını kullanarak DNA kantitasyonunda floresan yoğunluğu ve ploidi arasındaki ilişkiyi histogramlar oluşturarak göstermişlerdir. 1974 yılında ise, enzim substratları tarafından yayılan ışık saçılımını ve farklı dalga boylarını tanımlayabilen ilk flow sitometri cihazı, ticari hale getirilmiştir (81). 1987 yılında Human ve ark. bakterileri idrarda FCM yöntemiyle tespit etmişlerdir ve böylece yöntem, klinik mikrobiyolojide kullanılmaya başlanmıştır (82).

2.4.4.3.2. Flow Sitometri Temel Bileşenleri ve Çalışma Prensipleri

Tipik bir FCM dört ana bölümden oluşmaktadır, bunlar: akışkan sistem, sinyal algılama sistemi, optik sistem ve algılama, işleme sistemidir. Tek hücre analizi yapabilmek için hücre süspansiyonu akış kanalına basınçlı hava hatları yardımıyla itilir

ve hücreler, kanal boyunca tek tek hizalanır. Bu hizalanma sayesinde her hücre eşit şekilde analiz edilir. Hücrelerin akış hızı, analizin amacına göre kullanıcı tarafından ayarlanabilir. Örneğin, yüksek akış hızları tümör hücrelerinin immünofenotiplemesi, yavaş akış hızı ise DNA içerik analizi için kullanılabilir. Analizde hata olmaması için kullanıcının, akış sisteminde hava kabarcığı ve birikinti bulunmadığından emin olması gerekmektedir (83, 84). Şayet hücrelerde otofloresan oluşturma yeteneği varsa ya da floresan boyalarla etiketlenmiş ise oluşan ışık, akış kanalından geçerken belirli bir dalga boyuna odaklanmış olan optik sistem tarafından okunur (84, 85). Saçılan ışık, floresan optik sistem tarafından okunduktan sonra gelen sinyaller fotodedektörler tarafından algılanır ve işleme sistemine gönderilir. Buna göre, üretilen elektrik sinyalleri dijital olarak, ileri saçılım (FSC), yana saçılım (SSC), yeşil floresan (FL1), turuncu floresan (FL2), kırmızı floresan (FL3) gibi parametreleri özel bir yazılıma sahip olan cihazın bağlı olduğu bilgisayara dijital olarak yansıtır (84). FSC dedektörü, lazer ışığı ile aynı doğrultuda $0-10^\circ$ açıyla etrafa saçılan ışınları toplar ve hücrenin büyüklüğü hakkında bilgi verir. SSC dedektörü, hücrenin yüzeyinden 90° açıyla yayılan ışınları toplar ve hücrenin granülitesi hakkında bilgi verir. Flow sitometrinin çalışma şeması şekil 2-4'de gösterilmiştir (86).



Şekil 2-4: Flow sitometrinin temel bileşenleri ve çalışma şeması*

*Akışkan sistem (1), sinyal algılama sistemi (2), optik sistem (3), algılama ve işleme sistemi (4)

2.4.4.3.3. Flow Sitometrinin Kullanım Alanları

Klinik veya endüstriyel amaçla, mikroorganizmaların tanımlanması, kanser araştırmaları (hücre döngüsü analizi, DNA, RNA ve protein içeriğinin ölçülmesi), immünofenotipleme, gıda mikrobiyolojisi ve ekolojik araştırmalar dahil hücreye ait pek

çok veri bu yöntem ile kalitatif ve kantitatif olarak alınabilmektedir. FCM'de mikroskobiden farklı olarak saniyede binlerce hücre analiz edilebilir (87, 11, 88-108).

Waaaj ve ark. (88)'nin çalışmasında, FCM yöntemi kullanılarak anaerob bakterilerin tür düzeyinde tanımlanması yapılmıştır. Sağlıklı 22 gönüllünün dışkı örneğinde PI ("propidium iodide") ve FITC ("Fluorescein isothiocyanate") ile işaretli anti-human-IgA kullanarak *Bacteroides fragilis* ve *Clostridium difficile*'yi tespit etmişlerdir. Fekal anaerobik bakterilerinin rutin yöntemlerle incelenmesi zordur. Kültür ve biyokimyasal yöntemlerle tanımlanması ise zaman alıcıdır. FCM yöntemi ile bu süre 2 saate kadar düşürülebilmektedir.

Üzmez ve ark. (89)'nin çalışmasında ise, farklı kliniklerden gönderilen 995 hastanın idrar örneklerinde bakteri tanımlaması FCM yöntemi ile yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda, FCM hızlı tarama testi olarak kullanıldığında, iş yükünün ve maliyetin azalacağı belirtilmiştir.

FCM yöntemi kanser araştırmalarında da hekimlere ve araştırmacılara büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Hücrelerin DNA/RNA içeriklerinin ve hücre döngüsü fazlarının FCM yöntemi ile analiz edilmesi kanser çalışmalarına hız ve maliyet konusunda destek olmaktadır ve yine bu analiz antimikrobiyal ilaçların hücre büyümesi üzerindeki etkilerinin anlaşılması için de önemli bir parametredir. Bu tip çalışmalarda DAPI ("4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride"), "Mithramycin", "Hoechst" ve PI ("Propidium Iodide") en fazla kullanılan floresan boyalardır (11, 90-92, 109).

Ökaryot hücre tanımlamasında, değişik büyüme ve gelişme aşamalarında FCM ile RNA içeriği ölçülebilir. Fakat bakterilerde RNA içeriği, aynı bakteri olmasına rağmen büyüme sırasında değişeceğinden, bakterilerin tanımlanmasında diğer parametrelerle (DNA ya da protein içeriği) birlikte kullanılması daha iyi sonuçlar vermektedir. Bu tip çalışmalarda tavsiye edilen, "Akridin orange", "Syto9" ve "Pyronine Y" floresan boyalardır (93, 94, 109).

FCM yöntemi ile enfekte hücrelerde bulunan viral antijenler saptanabilmekte ve aynı zamanda monoklonal antikorlar kullanarak kantitatif antijen tayini yapılabilmektedir. Ayrıca virüsle enfekte bir hücrede, birden çok virüs antijen parametresine bakılabilmekte ve virüsle enfekte hücrelerin kantitatif sayımı da yapılabilmektedir (95, 96).

FCM yöntemi immünofenotiplemede de sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Floresan boylarla görünür hale gelen hücre yüzeyi ve hücre içi belirteçlerinin saptanması bu yöntemle oldukça kolaylaşmaktadır. Boyanmış özgül antikorlarla, saptanmak istenen antijenik yapıların örnekteki varlığı ya da yokluğu kolayca belirlenebilmekte ve mikroorganizmanın immün sistem hücreleri üzerindeki etkisi araştırılabilmektedir (97-100).

Hem zamandan hem de maliyetten tasarruf sağladığı için bu yöntem gıda mikrobiyolojisi alanında da tercih sebebi haline gelmektedir (101, 102). Bakterilerde olduğu gibi parazitlerde ve mantarlarda da, özellikle mayalarda FCM yöntemi kullanılarak çeşitli çalışmalar yapılmıştır (103-105). FCM yönteminin, hızlı ve maaliyetinin az olması sebebiyle alternatif bir yöntem olarak gösterildiği bir diğer alan ise ekoloji alanıdır. Toprak ve sudaki mikroorganizma analizlerinde güvenle kullanılabilen çalışmalarında belirtilmiştir (106-108).

Boi ve ark. (110)'nın yayımladığı bir çalışmada, nehir suyundan izole edilen 10 *E. coli* suşunun direnç geni PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) ile araştırılmış ve FCM yönteminde "SYBR green I" ve PI boyları birlikte kullanılarak antibiyotiklerin (gentamisin, kloramfenikol, kanamisin, ampisilin, nalidiksik asit, streptomisin-penisilin) bakteri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, nükleik asiti çift boya ile boyamasının *E. coli* suşlarının antibiyotik maruziyetinden sonraki membran hasarının derecesini ve hücrenin canlı/ölü değişimini gösterdiği belirtilmiştir.

2.4.4.3.4. Flow Sitometride Kullanılan Floresan Boyalar

Bazı hücreler, kendiliğinden floresan bileşiklere dolayısıyla otofloresan oluşturma yeteneklerine sahip olsa da bu durum hücre hakkında sınırlı bilgiler vermektedir (83). Bu nedenle, hücresel popülasyonların çeşitli özelliklerinin anlaşılmasına izin veren FCM yönteminde floresan boylar yaygın olarak kullanılmaktadır (83, 111). FCM yönteminde kullanılacak olan floresan boyanın, çalışılacak olan hücre ile uyumlu, floresan sinyal yoğunluğu yüksek ve toksisite oranının düşük olması gerekmektedir (86). Uygulama alanlarına göre birkaç gruba ayrılabilen çok sayıda floresan boya mevcuttur (83). Tablo 2-1'de flow sitometri yönteminde kullanılan bazı floresan boylar gösterilmiştir (112).

Tablo 2-1: Flow sitometri yönteminde kullanılan bazı floresan boyalar

Boya	Eksitasyon Dalga Boyu (λ_{max}) (nm)	Emisyon Dalga Boyu (λ_{max}) (nm)	Bağlanma Bölgesi/Substrat	Uygulama Alanı	Kaynak
PI ("Propidium iodide")	536	625	DNA, RNA	Canlılık, DNA miktar tayini, hücre döngüsü çalışmaları	112, 113
TOTO-3	642	660	DNA, RNA	DNA miktar tayini, hücre döngüsü çalışmaları	112
SYTO 13	488	509	DNA, RNA	Canlılık, DNA miktar tayini, hücre döngüsü çalışmaları	112
"Etidyum bromür"	510	595	DNA, RNA	DNA miktar tayini, hücre döngüsü çalışmaları	112
"SYTOX Green"	504	525	DNA, RNA	Canlılık, DNA miktar tayini çalışmaları	112
DAPI ("4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride")	461	358	DNA (AT)	Canlılık, DNA miktar tayini çalışmaları	114
"Hoechst" 33258/ 33342	340	450	DNA (GC)	Hücre döngüsü çalışmaları	112
"Mithramycin"	425	550	DNA	Hücre döngüsü çalışmaları	112
"Pyronine Y"	497	563	RNA	RNA miktar tayini	112
FITC ("Fluorescein isothiocyanate")	495	525	Protein	Mikroorganizma tayini	112
"Texas red" ("sulforhodamine isothiocyanat")	580	620	Protein	Mikroorganizma tayini	112
"Oregon green isothiocyanate"	496	526	Protein	Mikroorganizma tayini	112
DIOC6(3)	484	501	Membran potansiyeli	Antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları, metabolik değişikliklerin tespiti	112, 115
DiBAC ₄ (3) ("bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol")	490	516	Membran potansiyeli	Antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları, metabolik değişikliklerin ve ölü hücrelerin tespiti	112, 116
AFH ("Alexa fluor 633 hidrazide")	624	643	DNA, RNA	Antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları	12, 114
TO-PRO-3	642	661	DNA, RNA	Antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları	114
"SYTO 9"	RNA: 486 DNA: 485	RNA: 501 DNA: 498	DNA, RNA	Canlı/ölu hücre ayırımı	14, 114
TO ("Thiazole orange")	510	530	DNA, RNA	Canlı/ölu hücre ayırımı	113,114
7-AAD ("7-aminoactinomycin-D")	488	546	DNA	Canlı/ölu hücre ayırımı	114
"Rhodamine 123"	507	529	Membran potansiyeli (mitokondriyal)	Antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları, metabolik değişikliklerin tespiti	112, 115
FDA ("Fluorescein diacetate")	450	510	Membran potansiyeli	Canlılık, enzim aktivitesi	114, 115
"Lectinler"	Florokrom konjugatına bağlıdır	Florokrom konjugatına bağlıdır	Membran oligosakkaritleri	Hücre duvan bileşenlerinin tespiti, mikroorganizma tespiti	112
Florokrom işaretli antikorlar	-	-	Antijenler	Mikroorganizma tespiti	112
Kalkoflor beyazı	347	436	Kitin ve diğer karbonhidrat polimerleri	Mantarların tespiti	112

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Etik Kurul Onayı

Çalışmamızın etik kurul onayı; İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulu'ndan, 20.09.2021 tarih ve E-29624016-050.99-477801 sayılı kararı ile alınmıştır.

3.1.2. Çalışma Grubu: Suşların Seçimi ve Çalışmaya Dahil Etme Kriterleri

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bakterioloji laboratuvarına Kasım 2020-Nisan 2022 tarihleri arasında rutin inceleme amacı ile gönderilen klinik hasta örneklerinden izole edilmiş ve rutin olarak karbapeneme dirençli olduğu belirlenmiş 85 *K. pneumoniae* suşu çalışma kapsamına alınmıştır. Her hastadan sadece bir izolat çalışmaya dahil edilmiştir. Aynı hastaya ait birden fazla izolat olduğunda sadece ilk izolat çalışma kapsamına alınmıştır.

3.1.3. Besiyerleri

3.1.3.1. Tryptik Soy Agar (Biolab, Macaristan)

Kazein Peptonu 17 g
Soya Peptonu 3 g
Glikoz 2,5 g
Sodyum klorür 5 g
Tamponlar 2,5 g
Agar 15 g

3.1.3.2. Katyon-ayarlı Mueller Hinton II Buyyonu (KAMHB) (Becton Dickinson, ABD)

Sığır eti özü 3 g
Kazein asit hidrolizati 17,5 g
Nişasta 1,5 g

3.1.3.3. Beyin Kalp İnfüzyon Buyyonu (Becton Dickinson, ABD)

- Beyin kalp infüzyonu 6 g
- Pepton 6 g
- Sodyum klorür 5 g
- Dekstroz 3 g
- Pankreatik jelatin 14,5 g
- Disodyum fosfat 2,5 g

3.1.4. Antibiyotik, Boya ve Kitler

3.1.4.1. Antibiyotik

- Kolistin sülfat toz maddesi (Biosynth-Carbosynth AC20542; Potens: 785.86 µg/mg)

3.1.4.2. Boyalar

- DiBAC4(3) boyası (bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol) (Cayman Chemical Company, ABD)
- 7-AAD boyası (7-Amino-actinomycin D) (BD Biosciences Pharmingen, California, ABD)

3.1.4.3. Kitler

- VITEK 2 GN 21341 tanımlama kiti (BioMérieux, Fransa)
- VITEK 2 AST-N325 antibiyogram kiti (BioMérieux, Fransa)

3.1.5. Standart Referans Suşlar

- *Escherichia coli* NCTC 13846 (*mcr-1* +)
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Escherichia coli* ATCC 25922

3.1.6. Kullanılan Cihazlar

- Biyolojik güvenlik kabini (Heraeus, Almanya)
- Etüv (İnkübatör) (Heraeus, Almanya)
- VITEK 2 kompakt otomatik ID/AST cihazı (BioMérieux, Fransa)
- Otoklav (Hirayama, Japonya)
- Flow sitometri cihazı (NAVIOS EX, Beckman Coulter, ABD)
- Buzdolabı (4 °C), (Arçelik, Türkiye)
- Dondurucu (-20 °C), (Bosch, Almanya)

- Dondurucu (-80 °C), (Heraeus, Almanya)
- McFarland densitometre (BioMérieux, Fransa)
- Vortex karıştırıcı (Heidolph, Almanya)
- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (IKA Labortechnik, Almanya)
- Mikropipetler (10 µL–1000 µL) (MediSis, Türkiye)
- Terazi (Hassas terazi), (Axis, Türkiye)
- pH metre (Xylem, Almanya)

3.1.7. Kullanılan Sarf Malzemeler

- Pipet ucu (10 µL–1000 µL), (Microcult, Türkiye)
- Cam deney tüpü (Laborant, Türkiye)
- Mikroplak 96 kuyucuklu, steril kapaklı (Laborant, Türkiye)
- Ependorf tüpü (Laposel, Türkiye)
- Steril Petri kutusu (Laposel, Türkiye)
- Steril eküvyon, (Laposel, Türkiye)
- Falkon tüpü (Microcult, Türkiye)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Besiyerlerin Hazırlanması

3.2.1.1. Triptik Soy Agar (Biolab, Macaristan)

Hazır toz halindeki besiyerinden 45 g tartılmış, 1000 ml distile su ile çözdürülerek pH değeri $7.3 \pm 0,1$ 'e ayarlanmıştır. Besiyeri 121 °C'de 1 atm basınç altında 20 dk. steril edildikten sonra 45-50°C'ye soğutulup 90 mm'lik Petri kutularına 4 mm kalınlığında olacak şekilde dökülmüş ve katılaştıktan sonra +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.2. Katyon-ayarlı Mueller Hinton II Buyyonu (KAMHB) (Becton Dickinson, ABD)

Hazır toz halindeki besiyerinden 22 g tartılmış, 1000 ml distile suda çözdürülerek pH $7.3 \pm 0,1$ 'e ayarlanmıştır. Besiyeri 121 °C'de 1 atm basınç altında 20 dk. steril edildikten sonra steril tüplere dağıtılmış ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.3. %20 Gliserollü Buyyon

Hazır toz halindeki beyin kalp infüzyon buyyonundan 37 g tartılmış, 800 ml distile suda çözdürülmüş ve içerisine 200 ml gliserin eklenmiştir. pH $7,2 \pm 0,2$ 'e ayarlanmıştır. Besiyeri 100 cc'lik steril tüplere dağıtılmış ve 121 °C'de 1 atm basınç altında 20 dk. steril edildikten sonra +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Saklama Besiyerinde Dondurulan Suşların Üretilmesi

Çalışma tarihine kadar -80 °C'de %20 gliserollü buyyonda saklanan suşların üretilmesi amacıyla saklama besiyerinden triptik soy agara (TSA) azaltma yöntemiyle ekim yapılmış ve 35°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Üreyen kolonilerin TSA besiyerine ikinci pasajları yapılmış ve ikinci pasaj sonrası saf kültür halinde izole edilen suşlar deneylerde kullanılmıştır.

3.2.3. VITEK 2 Otomatize Sistemiyle Tanımlama Yapılması ve Karbapenem Duyarlılığının Saptanması

Rutin konvansiyonel yöntemlerle tanımlanan ve karbapeneme dirençli olduğu saptanan *K. pneumoniae* suşlarının tür düzeyinde tanımlanması ayrıca karbapenem ve kolistin hariç diğer antibiyotiklere direncinin saptanması amacıyla VITEK 2 otomatize sistemi ile çalışılmıştır.

Bakteri süspansiyonları üretici firmanın önerileri doğrultusunda 0,5 McFarland yoğunluğunda olacak şekilde fotometrik yöntemle hazırlanmış ve tanımlama için VITEK 2 GN-21341 tanımlama kartı, antibiyogram için VITEK 2 AST-N325 antibiyogram kartı kullanılmıştır. Otomatize sistemle 85 *K. pneumoniae* suşu tanımlanmış ve karbapenemler için MİK sınır değerleri belirlenerek duyarlı ve dirençli olarak kategorize edilmiştir (117).

3.2.4. Sıvı Mikrodilüsyon (SMD) Yöntemiyle Kolistin Duyarlılığının Saptanması Kolistin Stok Solüsyonunun Hazırlanışı

Çalışmada potensi 23.576 IU/mg (=785.86 µg/mg) olan toz kolistin sülfat kullanılmıştır. Antibiyotik stok solüsyonunun hazırlanması için aşağıdaki formülden yararlanılmıştır (8).

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

$$\text{Kolistin ağırlık (mg)} = (20 \text{ ml} \times 1280 \text{ µg/ml}) / 785.86 \text{ µg/mg} = 32.5 \text{ mg}$$

1280 µg/ml konsantrasyonda antibiyotik solüsyonu hazırlamak için 32.5 mg toz antibiyotik tartılıp 20 ml steril distile su içinde çözündürülmüş ve 1'er ml'lik ependorflara bölünerek -80°C'de muhafaza edilmiştir. Çalışma gününde kullanılacak miktara göre 1280 µg/ml konsantrasyondaki solüsyondan 100 µl alınıp 900 µl steril distile suda çözdürülmüş ve 1:10 sulandırım hazırlanmıştır (8, 118).

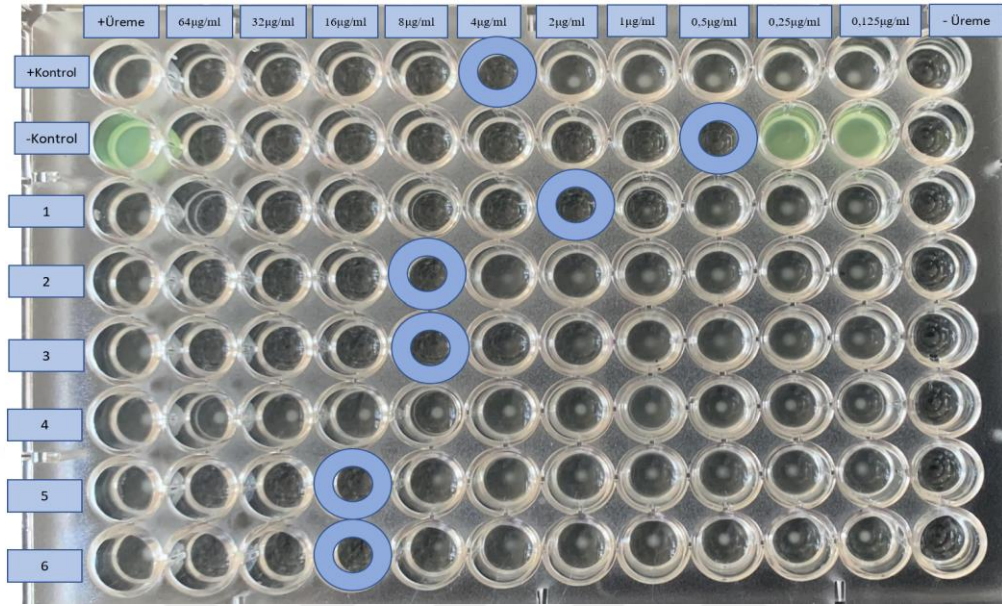
3.2.4.1. Kolistin için Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi

Karbapeneme dirençli olduğu doğrulanan 85 *K. pneumoniae* suşunun kolistin için MİK değerleri, sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle saptanmıştır. Kolistin için MİK değerinin SMD yöntemiyle saptanması amacıyla kolistin sülfat kullanılmıştır (8, 118, 119).

Triptik soy agar besiyerinde üretilmiş taze pasajlardan, 5 ml'lik KAMHB sıvı besiyerine birkaç koloni aktararak koloni süspansiyon yöntemiyle 0,5 McFarland (1×10^8 CFU/ml) bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandıktan sonra bu süspansiyondan başka bir KAMHB içinde 1:20 sulandırma yapılarak son konsantrasyonu 5×10^6 CFU/ml olan bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır (8, 55, 118, 119).

Sıvı mikrodilüsyon uygulanacak olan 96 kuyucuklu mikroplakların her kuyucuğuna, mikropipet vasıtasıyla 100 µl steril KAMHB sıvı besiyeri dağıtılmıştır. İlk kuyucuk, sadece bakteri süspansiyonu içerecek olan üreme kontrol kuyucuğu, 12. kuyucuk ise antibiyotik içerecek fakat bakteri süspansiyonu içermeyecek olan sterilite kontrol kuyucuğu olarak belirlenmiştir. Mikroplaktaki her sıranın ikinci kuyucuğuna 128 µg/ml konsantrasyondaki antibiyotik solüsyonundan 100 µl koyularak ikinci kuyucukta 64 µg/ml konsantrasyon elde edilmiştir. Her sıradaki ikinci kuyucuktan 100 µl alınıp, tüm kuyucuklara iki kat seri dilüsyon yapılmıştır. Son seri dilüsyonu yapılan 12. kuyucuktan, 100 µl sıvı çekilip dışarıya atılmıştır. Daha sonra sterilite kontrol kuyucuğu (12. kuyucuk) dışındaki tüm kuyucuklara hazırlanan bakteri süspansiyonundan 10 µl inoküle edilmiştir. Mikroplağın birinci ve ikinci sırasına kontrol referans suşlar [*E. coli* NCTC 13846 (*mcr-1* +) (dirençli) ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 (duyarlı)] inoküle edilmiştir (55, 118-120). Bu şekilde mikroplak içinde 64-0,125 µg/ml aralığındaki iki kat azalan antibiyotik konsantrasyonları ve her kuyucukta 5×10^5 CFU/ml bakteri

konsantrasyonu elde edilmiştir. Geriye kalan altı sıraya da aynı şekilde diğer bakteri şuşları inoküle edilmiştir. Örnek mikroplak görüntüsü resim 3-1’ de verilmiştir.



Resim 3-1: Kolistin mikrodilüsyon deneyinin örnek mikroplak görüntüsü*

*MİK’I gösteren kuyucuklar daire içerisine alınmıştır. 4 numaralı izolatta duyarlılık tespit edilemediği için daha yüksek antibiyotik konsantrasyonu ile test tekrarlanmıştır.

Mikroplaklar steril şeffaf kapaklarıyla kapatılıp 35°C’de, 18-24 saat aerop koşullarda etüvde inkübasyona bırakıldıktan sonra gözle okunmuş, bulanıklık gözlenmeyen ilk kuyucuk, MİK değeri olarak kaydedilip, sonuçlar EUCAST klinik sınır değerine göre yorumlanmıştır. Buna göre $MİK \leq 2 \mu\text{g/ml}$ olan izolatlar duyarlı (S), $MİK > 2 \mu\text{g/ml}$ olan izolatlar dirençli (R) olarak değerlendirilmiştir (7, 55, 119). Tablo 3-1’de EUCAST’a göre kolistin için son birkaç yılda güncellenen sınır değerleri verilmiştir.

Tablo 3-1: EUCAST’a göre kolistin için klinik sınır değerleri

Antibiyotik	Önceki Sınır Değer v11.0 (2021)		Önerilen Sınır Değer v12.0 (2022-2023)	
	S _≤	R _{>}	S _≤	R _{>}
Kolistin MİK µg/ml	2	2	(2)	(2)

2022 yılında EUCAST, monoterapi için klinik kanıtın genellikle yetersiz olduğunu, ancak yine de belirli bir endikasyon için veya başka bir aktif ajanla kombinasyon halinde kullanılabileceğini vurgulamak amacıyla kolistin de dahil olmak

üzere bazı antibiyotikler için sınır değerlerini parantez içine alarak göstermeye başlamıştır (Tablo 3-1) (7, 55, 119).

Sıvı mikrodilüsyon yönteminin iş akışı şekil 3-5’de gösterilmiştir.

3.2.5. Flow Sitometri (FCM) Yöntemiyle Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

3.2.5.1. Boyaların Hazırlanması

3.2.5.1.1. DiBAC₄(3) [bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol]

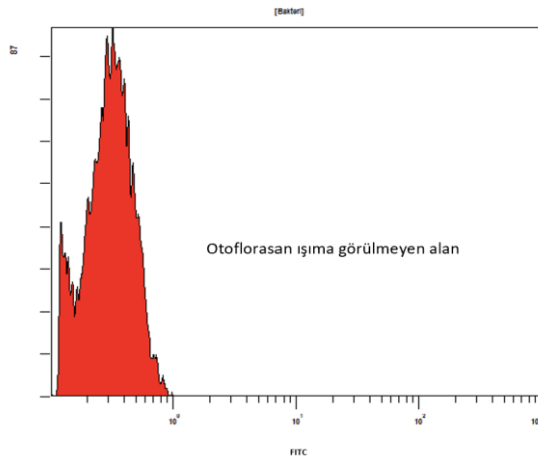
Toz haldeki DiBAC₄(3)’ten 5 g/ml tartılıp, 1 ml dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözdürülmüştür. Hazırlanan DiBAC₄(3) boyası her çalışma sonunda tüketilecek şekilde, az miktarlarda ependorf tüplere ayrılmış ve -80°C’de saklanmıştır. Çalışma süresini içeren kısa süreli saklamalar ise -20°C’de yapılmıştır (116).

3.2.5.1.2. 7-AAD (7-Aminoactinomycin-D)

7-aminoactinomycin-D (7-AAD) boyası İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hematoloji laboratuvarından hazır olarak temin edilmiştir.

3.2.5.2. Flow Sitometri Yöntemi için Optimizasyon Çalışmaları

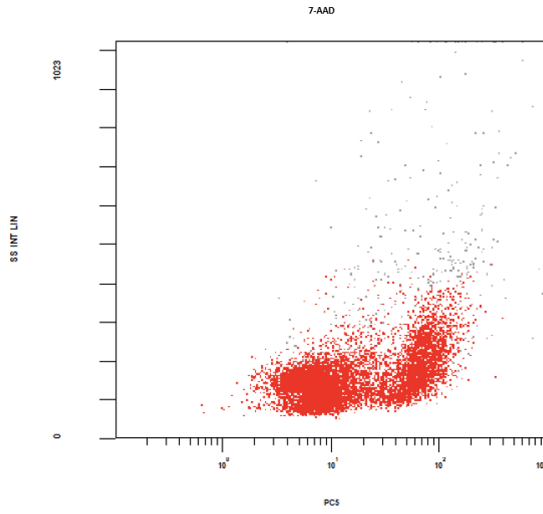
Optimizasyon çalışmalarında, öncelikle hücrelerin doğal yapısından kaynaklanan otofloresan ışımının çalışmayı etkileyecek düzeyde olup olmadığı kontrol edilmiştir. Bunun için antibiyotiksiz ve boyanmamış bakteri süspansiyonları FCM ile FITC kanalında analiz edilmiştir. Analiz sonrasında, akım sitometri çalışmalarını etkileyecek düzeyde otofloresan ışımaya görülmemiştir (Şekil 3-2).



Şekil 3-2: Antibiyotik eklenmemiş ve boyanmamış bakteri popülasyonu

Bu ön çalışmalardan sonra bakterilerin 0,5 McFarland bulanıklığına ayarlanmış atık/hücre ayırımını yapabilmek için bakteriler, antibiyotik eklenmeden 7-AAD

boyasıyla boyanmıştır. Sonuçlar PC5 kanalında incelenmiştir (121). İncelemeler sonucunda dot plot grafiğinde kapılanacak alan belirlenmiştir (Şekil 3-3).

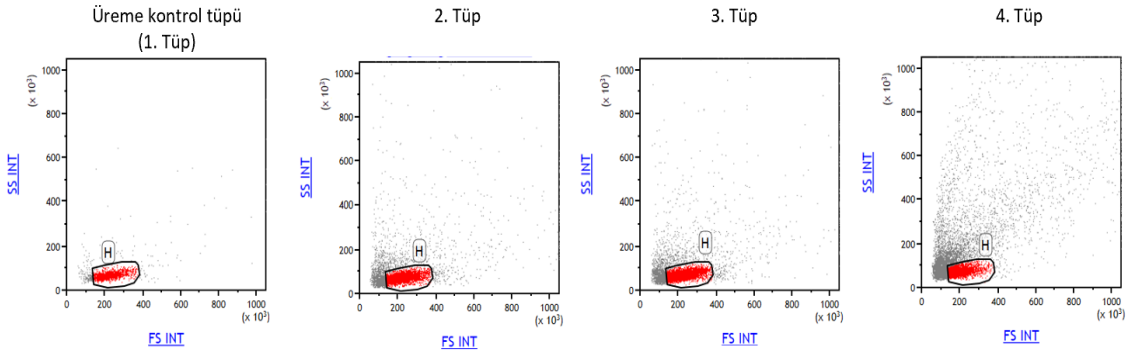


Şekil 3-3: 7-AAD boyasıyla boyanmış hücrelerin PC5 kanalındaki dot plot grafiği

Değişik miktarlarda boya kullanılarak optimizasyon çalışmaları sürdürülmüştür. Bunun sonucunda yüksek miktarda floresan boya kullanmanın fazla ışımalara yol açarak kalitesiz dot plot görüntülerine neden olduğu, düşük miktarlarda ise, bakterilerin bir kısmının boyanmadığı belirlenmiştir. Boyama için uygun miktara bu çalışmalar sonucunda karar verilmiştir.

Bakteri yoğunluğunun 0,5 McFarland düzeyinde olmasının daha iyi dot plot görüntüleri oluşturduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu bakteri yoğunluğu CLSI ve EUCAST'in sıvı mikrodilüsyon testi için önerdiği bakteri yoğunluğu ile aynıdır (8, 55, 119, 120).

Herbir izolat için antibiyotik eklenmemiş, DiBAC₄(3) boyası ile boyanmış olan 1. tüp (üreme kontrol tüpü) FCM cihazında okutulmuş, çıkan dot plot grafiği üzerinde ilk kapılama yapılmış ve farklı miktarlarda antibiyotik eklenen diğer tüplerin dot plot sonuçlarında da her zaman aynı alanın kapılanması için cihazda gerekli düzenlemeler yapılmıştır (Şekil 3-4).



Şekil 3-4: Dot plot grafiği üzerinde kapılama işlemi

3.2.5.3. Flow Sitometri Yöntemiyle Kolistin Duyarlılığının Saptanması

FCM yöntemi ile kolistin direnci tespiti NAVIOS EX (Beckman Coulter, ABD) cihazı ile yapılmıştır. Her bir suş için farklı antibiyotik konsantrasyonları denenmek üzere dört FCM tüpü kullanılmıştır. Triptik soy agarda üretilmiş taze pasajlardan 2 ml'lik KAMHB besiyerine alınan kolonilerden 0,5 McFarland (1×10^8 CFU/ml) bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandıktan sonra tüplerdeki bakteri süspansiyonları 1:100 sulandırılmış ve böylece her suş için kullanılan dört farklı tüpte son bakteri süspansiyonu 1×10^6 CFU/ml olacak şekilde hazırlanmıştır (118, 120, 77).

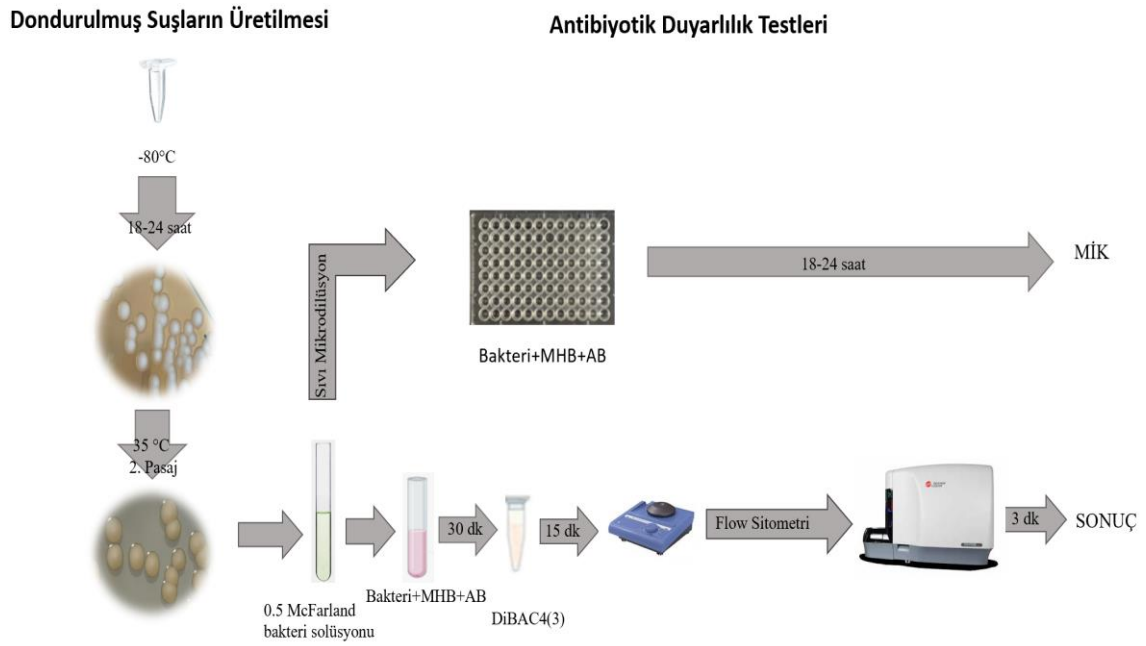
SMD ile dirençli olduğu tespit edilen ($MİK > 2 \mu\text{g/ml}$) tüm suşlar için hazırlanan 1. tüpler üreme kontrol tüpü olarak belirlenmiştir ve bu tüpe antibiyotik eklenmemiştir. 2. tüpe konsantrasyonu $1 \mu\text{g/ml}$ olan antibiyotikten 500 μl eklenmiştir. 3. tüpe konsantrasyonu $2 \mu\text{g/ml}$ olan antibiyotikten 500 μl ve 4. tüpe ise, $MİK$ değeri konsantrasyonundaki antibiyotikten 500 μl eklenmiştir.

SMD ile duyarlı olduğu tespit edilen ve $MİK$ değeri $2 \mu\text{g/ml}$ ile $0,5 \mu\text{g/ml}$ arasında olan suşlar için hazırlanan 1. tüpler yine üreme kontrol tüpü olarak belirlenmiştir. 2. tüpe $0,5 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonundaki antibiyotikten 500 μl eklenmiştir. 3. tüpe konsantrasyonu $1 \mu\text{g/ml}$ olan antibiyotikten 500 μl ve 4. tüpe konsantrasyonu $2 \mu\text{g/ml}$ olan antibiyotikten 500 μl eklenmiştir.

$MİK \leq 0,25 \mu\text{g/ml}$ olan suşlar için ise yine 1. tüpler üreme kontrol tüpü olarak belirlenmiştir. 2. tüpe SMD yöntemi ile belirlenen $MİK$ değerinin bir alt konsantrasyonundaki antibiyotikten 500 μl eklenmiştir. 3. tüpe $MİK$ değeri konsantrasyonundaki antibiyotikten 500 μl ve 4. tüpe konsantrasyonu $2 \mu\text{g/ml}$ olan antibiyotikten 500 μl eklenmiştir.

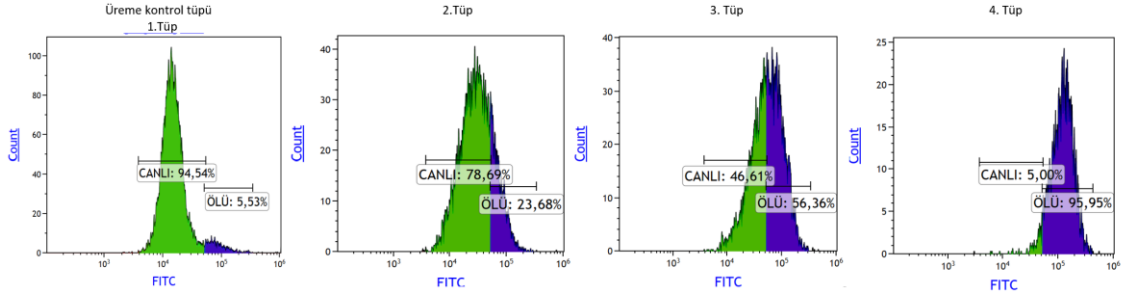
Hazırlanan tüpler 37°C 'lik etüvde 30 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüm tüplere 2 μl DiBAC₄(3) boyası eklenmiştir ve örnekler karanlık ortamda, oda

sıcaklığında 15 dk. bekletilerek bakterilerin boyanması sağlanmıştır (12, 15). Her çalışmada, standart referans suşları (*Escherichia coli* NCTC 13846 (*mcr-1* +), *E. coli* ATCC 25922) içeren pozitif/negatif kontrol tüpleri hazırlanmıştır. Boyama işlemi sonunda vortekslenen her bir tüp flow sitometri cihazında 490 nm dalga boyundaki lazer ve 516 nm dalga boyundaki optik filtre kullanılarak okunmuştur. Flow sitometride DiBAC₄(3) boyasının floresan kanalı FITC, dalga boyu FL-1 530/30 nm'dir (116). Flow sitometri yönteminin iş akışı şekil 3-5'de gösterilmiştir.



Şekil 3-5: Antibiyotik duyarlılık testleri iş akışı

Herbir izolat için ilk olarak, antibiyotik eklenmemiş ve DiBAC₄(3) boyası ile boyanmış üreme kontrol tüpü okutulmuş ve dot plot grafiği üzerinden kapılama işlemi yapılmıştır (Şekil 3-4). Yine üreme kontrol tüpünün histogram grafiği üzerine canlı ve ölü hücre alanlarını belirleyen kadranlar yerleştirilmiş ve bu hücrelerin toplam hücre popülasyonu içindeki yüzdesi belirlenmiştir. Farklı antibiyotik dilüsyonlarına sahip diğer tüplerin histogram sonuçlarında da her zaman aynı kadranlar kullanılmıştır (Şekil 3-6) (13, 76, 87).



Şekil 3-6: Canlı ve ölü hücrelerin toplam hücre popülasyonu içerisindeki yüzdelerinin histogram grafikleri üzerinde belirlenmesi

Her izolat için çalışılan, farklı antibiyotik miktarlarını içeren dört tüpün histogram grafikleri overlay (üst üste getirme) histogram grafiğine dönüştürülmüş ve sonuçlar bu grafikler üzerinden değerlendirilmiştir (Şekil 4-2, 4-3, 4-4). Histogram grafiklerinin, overlay histogram grafiklerine dönüştürülmesi için Beckman Coulter-Kaluza 2.2 analiz programı kullanılmıştır.

3.2.6. İstatistiksel Değerlendirme

3.2.6.1. Örneklem Büyüklüğünün Hesaplanması

Çalışmaya dâhil edilecek olan suş sayısı, evreni bilinmeyen örneklem hesaplama formülüne göre ($n=t^2pq/d^2$) hesaplanmıştır (122). Formülde, p; incelenen olayın görülme sıklığını, q; incelenen olayın görülmemesi sıklığını, t; belirli bir anlamlılık düzeyinde t tablosuna göre bulunan teorik değeri ve d; olayın görülme sıklığına göre kabul edilen +/- örnekleme hatasını ifade etmektedir. p, q ve d değerleri literatür taramaları sonucunda belirlenmiş olup, KRKP suşlarının kolistin MİK değerlerini CLSI ve EUCAST'a göre referans yöntem olarak kabul edilen SMD yöntemi ile saptamış olan çalışmaların sonuçları kullanılmış, SMD dışında yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar istatistiksel hesaplamalara dahil edilmemiştir. Literatür taraması sonucunda, (p; 35, q;65, d;13) örneklem büyüklüğü %95 güven aralığında (Tip 1 hata= $\alpha=0.05$) ve çalışmanın gücü %80 (Tip 2 hata= $\beta= 0.20$; 1- $\beta= 0.80$) olacak şekilde tahmini örneklem büyüklüğü hesaplanmış ve 85 karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* suşunun çalışmaya dahil edilmesine karar verilmiştir.

3.2.6.2. Verilerin İstatistiksel Analizi

Duyarlılık: Referans yöntemin dirençli (R) olarak saptadığı suşların ne kadarının çalışılan yöntemle dirençli (R) olarak saptanabildiğini ifade eder (78).

$$D = a/(a+c) \times 100$$

Özgüllük: Referans yöntemin duyarlı (S) olarak saptadığı suşların ne kadarının çalışılan yöntemle duyarlı (S) olarak saptanabildiğini ifade eder (123).

$$Ö = d/(b+d) \times 100$$

Pozitif prediktif değer (PPD): Çalışılan yöntemin dirençli (R) olarak saptadığı suşlar içinde gerçek dirençli (R) olanların yüzdesidir (123).

$$PPD = a/(a+b) \times 100$$

Negatif prediktif değer (NPD): Çalışılan yöntemin duyarlı (S) olarak saptadığı suşlar içinde gerçek duyarlı (S) olanların yüzdesidir (123).

$$NPD = d/(c+d) \times 100$$

Kategorik uyum (KU): Referans test yönteminde duyarlı bulunan suşların çalışılan test yönteminde de duyarlı, dirençli bulunan suşların ise dirençli olarak bulunmasıdır (\geq %90 üzeri olması anlamlı kabul edilir) (124).

$$KU = (a+c+d) / (a+b+c+d) \times 100$$

Çok büyük hata (ÇBH): Referans test yönteminde dirençli bulunan suşların çalışılan test yönteminde duyarlı olarak saptanmasıdır. (\geq %95 güven aralığında yapılan çalışmalarda \leq %3 olması anlamlı, $<$ %95 güven aralığındaki çalışmalarda \leq %1,5 olması anlamlı kabul edilir) (124).

$$ÇBH = c/(a+c) \times 100$$

Büyük hata (BH): Referans test yönteminde duyarlı bulunan suşların çalışılan test yönteminde dirençli olarak saptanmasıdır. (\leq %7 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir) (124).

$$BH = b/(b+d) \times 100$$

İstatistiksel analiz, tablo 3-2’de verilen parametrelere göre yapılmıştır (76).

Tablo 3-2: İstatistiksel analiz parametreleri

		Referans Yöntem		
Çalışılan Test Yöntemi	R	S	Toplam	
R	Doğru pozitif (a)	Yanlış pozitif (b)	Doğru pozitif+Yanlış pozitif (a+b)	
S	Yanlış negatif (c)	Doğru negatif (d)	Yanlış negatif+Doğru negatif (c+d)	
Toplam	Doğru pozitif+Yanlış negatif (a+c)	Yanlış pozitif+ Doğru negatif (b+d)	a+b+c+d	

4. BULGULAR

4.1. Suşların İzole Edildiği Hastalara ve Klinik Örneklerle Ait Özellikler

Klinik örneklerin 46 (%54)'sı 15-88 yaş aralığındaki erkek hastalardan, 29 (%34)'u 13-83 yaş aralığındaki kadın hastalardan ve 10 (%12)'u 0-4 yaş aralığında çocuk hastalardan alınmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 85 suşun; 23 (%27)'ü idrar, 18 (%21)'i kan, 17 (%20)'si balgam, 5 (%5,9)'i derin enfeksiyon, 5 (%5,9)'i doku, 5 (%5,9)'i apse, 4 (%4,9)'ü trakeal aspirat, 3 (%3,5)'ü plevra sıvısı, 3 (%3,5)'ü periton sıvısı, 1 (%1,2)'i yüzeysel enfeksiyon örneğinden ve 1 (%1,2)'i de katater kültüründen izole edilmiştir.

Kültürü yapılan örnekler gönderilen kliniklere göre incelendiğinde; örneklerin 21 (%25)'i Genel Cerrahi, 18 (%21,1)'i Pandemi, 14 (%16,5)'ü İç Hastalıkları, 8 (%9,5)'i Çocuk Hastalıkları, 5 (%5,9)'i Üroloji, 4 (%4,9)'ü Göğüs Hastalıkları, 4 (%4,9)'ü Yoğun Bakım, 2 (%2,2)'si Kalp Damar Cerrahisi Yoğun Bakım, 2 (%2,2)'si Kadın Hastalıkları, 2 (%2,2)'si Acil Cerrahi, 2 (%2,2)'si Nöroloji, 2 (%2,2)'si Ortopedi ve 1 (%1,2)'inin Plastik Cerrahi servisinden gönderildiği belirlenmiştir.

4.2. VITEK 2 Otomatize Sistemiyle Saptanan Tanımlama ve Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

VITEK 2 sistemi ile tür düzeyinde tanımlaması yapılan izolatların tümü *K. pneumoniae* olarak belirlenmiştir. Otomatize sistemle antibiyogramı yapılan 85 izolatın tamamı karbapeneme dirençli (ertapenem >4) bulunmuştur. VITEK 2 sistemi ile elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları tablo 4-1'de gösterilmiştir.

Karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* suşlarının tamamı sefazolin, sefuroksim, seftazidim ve piperasilin/tazobaktama, %98,8'i siprofloksasine, %88,2'si amikasine, %87'si trimetoprim/sülfametoksazole ve %83,5'i gentamisine dirençli bulunmuştur.

Tablo 4-1: İzolatların VITEK 2 sistemiyle elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları

Antibiyotik	Dirençli (R) n (%)	Duyarlı (S) n (%)
Ertapenem	85 (100)	0
Sefazolin	85 (100)	0
Sefuroksim	85 (100)	0
Seftazidim	85 (100)	0
Piperasilin/ tozobaktam	85 (100)	0
Siprofloksasin	84 (98,8)	1 (1,2)
Amikasin	75 (88,2)	10 (11,8)
Trimetoprim/sülfametoksazol	74 (87)	11 (13)
Gentamisin	71 (83,5)	14 (16,5)

4.3. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemiyle Saptanan Kolistin Duyarlılık ve MİK Sonuçları

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile 85 karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* suşunun kolistin için saptanan MİK değerleri EUCAST kriterlerine göre değerlendirilmiş ve suşların 68'i (%80) dirençli, 17'si (%20) duyarlı bulunmuştur. Çalışmamızda kolistin için pozitif ve negatif kontrol suşlarında saptanan MİK değerleri sırasıyla; *Escherichia coli* NCTC 13846 (*mcr-1* +) için 4 µg/ml ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 için 0,5 µg/ml olarak tespit edilmiştir.

Duyarlı ve dirençli izolatların sayıları, MİK dağılımları ve MİK₅₀-MİK₉₀ değerleri tablo 4-2'de gösterilmiştir.

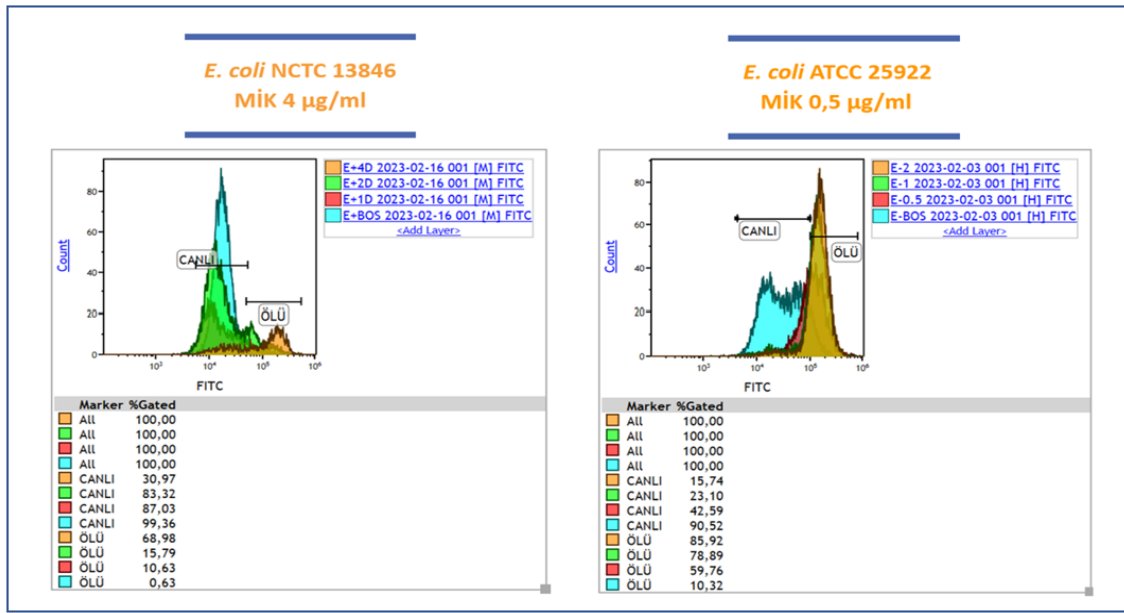
Tablo 4-2: Karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle tespit edilen kolistin MİK dağılımı

Kolistin MİK (µg/ml)	Duyarlı														Dirençli					MİK ₅₀	MİK ₉₀
	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	128	512	16	32						
Sayı (n)	1	2	2	2	3	2	5	5	12	29	20	1	1								
Toplam (n)	17 (%20)							68 (%80)													

4.4. Flow Sitometri Yöntemiyle Kolistine Duyarlılık Sonuçları

Flow sitometri ile yapılan antibiyotik duyarlılığını saptama çalışmalarında, bakteri duyarlılığını belirlemek için standardize edilmiş bir sınır değer yoktur. Bu sebeple, sonuçlar değerlendirilirken, referans yöntem olan SMD yöntemine göre kolistine duyarlı bulunan izolatlar, hücre membran potansiyeli bozulmuş ve DiBAC₄(3) boyası ile boyanabilen ölü hücreler; dirençli bulunan izolatlar ise, hücre membran potansiyeli bozulmamış canlı hücreler olarak değerlendirilmiştir.

Her çalışmada, önce standart referans suşları [*Escherichia coli* NCTC 13846 (mcr-1 +), *E. coli* ATCC 25922] içeren pozitif/negatif kontrol tüpleri çalışılmıştır. Kontrol tüplerinin sonuçları SMD yöntemi ile uyumsuz ise optimizasyon koşulları kontrol edilerek tekrar çalışılmıştır. Şekil 4-2’de standart referans suşların overlay histogram grafiklerinden biri verilmiştir.

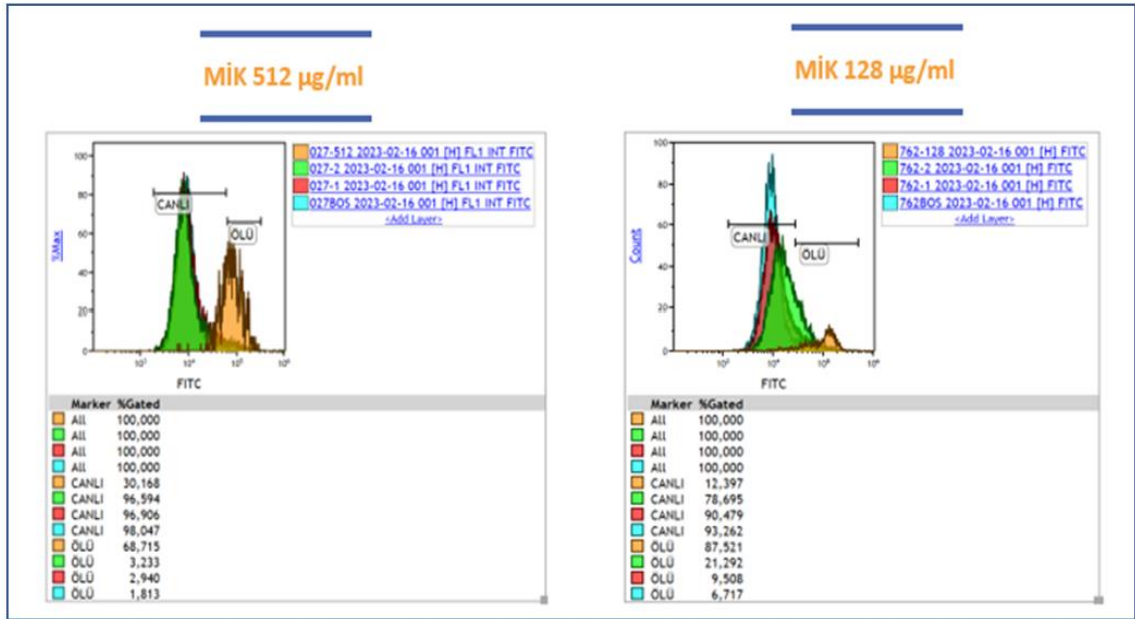


Şekil 4-2: Standart referans suşların [*E. coli* NCTC 13846 (mcr-1 +), *E. coli* ATCC 25922] overlay histogram grafikleri

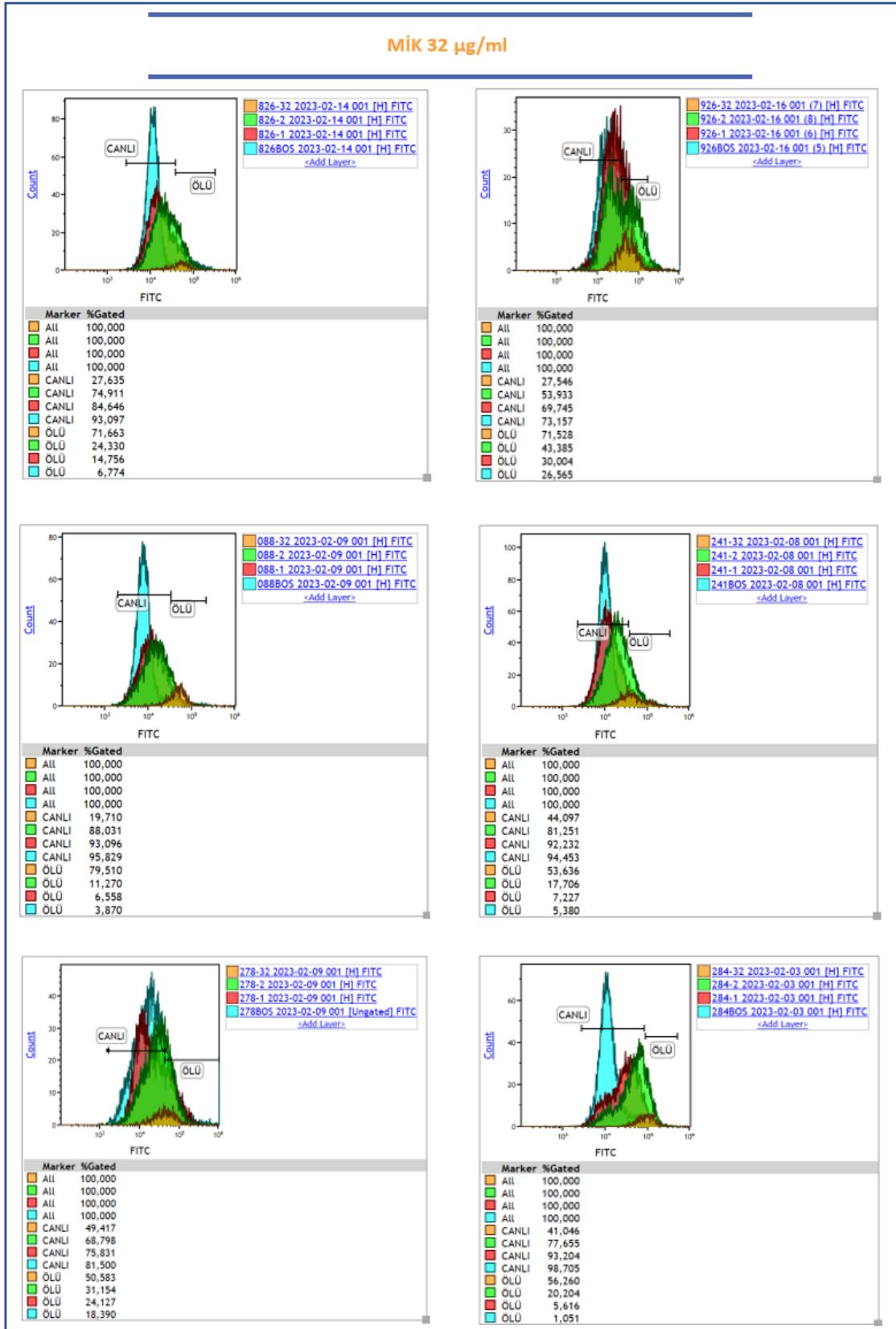
Üreme kontrol tüpü ile benzer histogram grafiği oluşturan tüp (antibiyotik dilüsyonu), dirençli (canlı) olarak, üreme kontrol tüpünden farklı bir grafik paterni oluşturan tüp (antibiyotik dilüsyonu), duyarlı (ölü) olarak kabul edilmiştir. Canlı ve ölü hücreler arasındaki sınır değer ise %50 kabul edilmiştir. Bütün tüplerin histogram grafik sonuçları overlay histogram grafiğine dönüştürülmüş ve bulgular bu grafik üzerinden değerlendirilmiştir. Standart suşların overlay histogram grafikleri şekil 4-2’de, dirençli

izolatların overlay histogram grafikleri şekil 4-3'de, duyarlı izolatların overlay histogram grafikleri ise şekil 4-4'de gösterilmiştir.

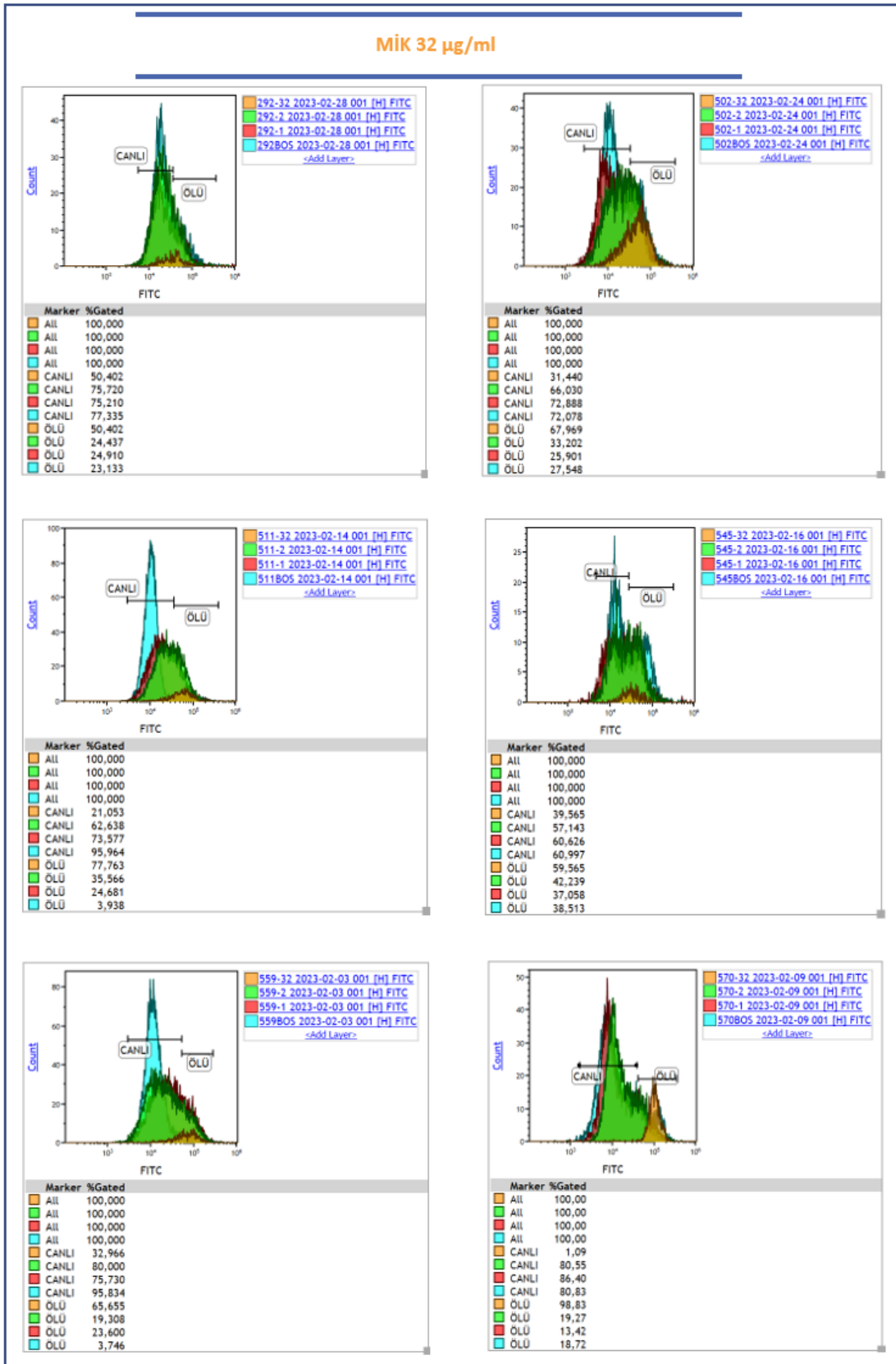
Çalışmamızda flow sitometri yöntemi ile kolistin direncinin saptanması ortalama 2 saat sürmüştür. Bu sürenin ortalama 1,5 saati flow sitometri cihazına yüklenmek üzere bakteri süspansiyonlarının hazırlanmasında, 5 dakikasını cihazın analizinde ve yarım saati de oluşturduğumuz overlay histogramlarının yorumlanmasında kullanılmıştır.



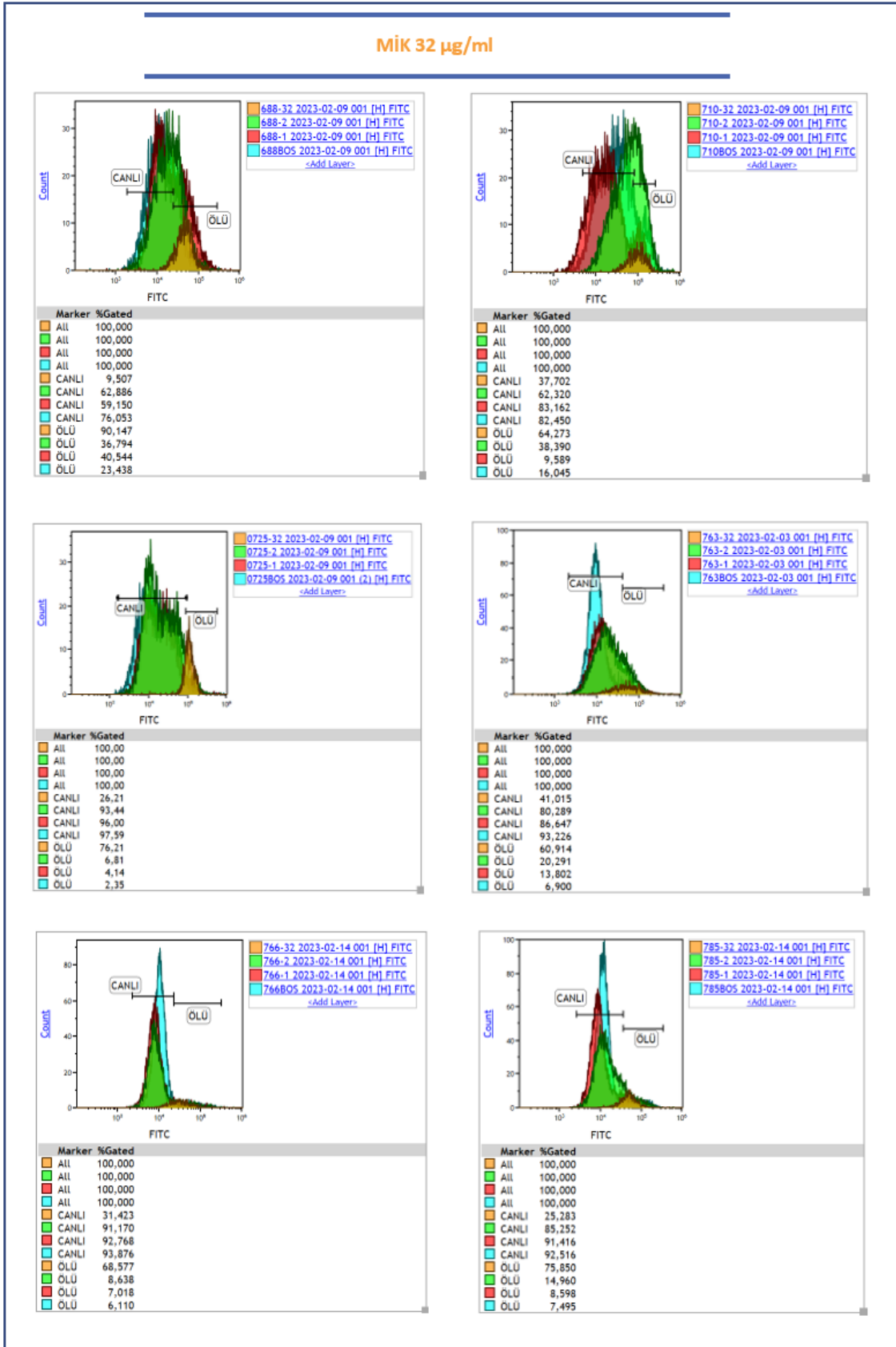
Şekil 4-3: Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değeri >2 µg/ml bulunan dirençli izolatların overlay histogram grafikleri



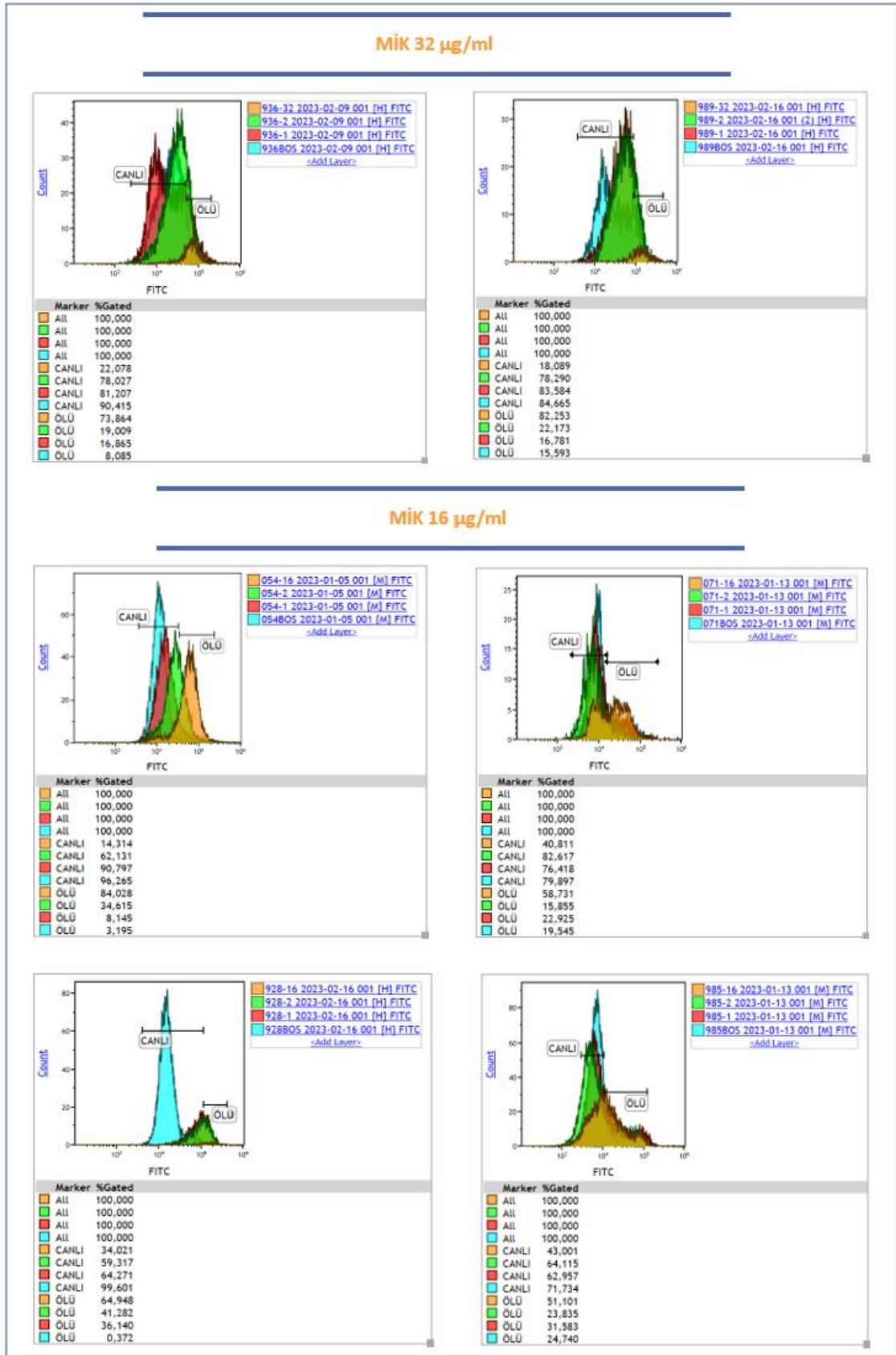
Şekil 4-3: Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değeri >2 µg/ml bulunan dirençli izolatların overlay histogram grafikleri (devam)



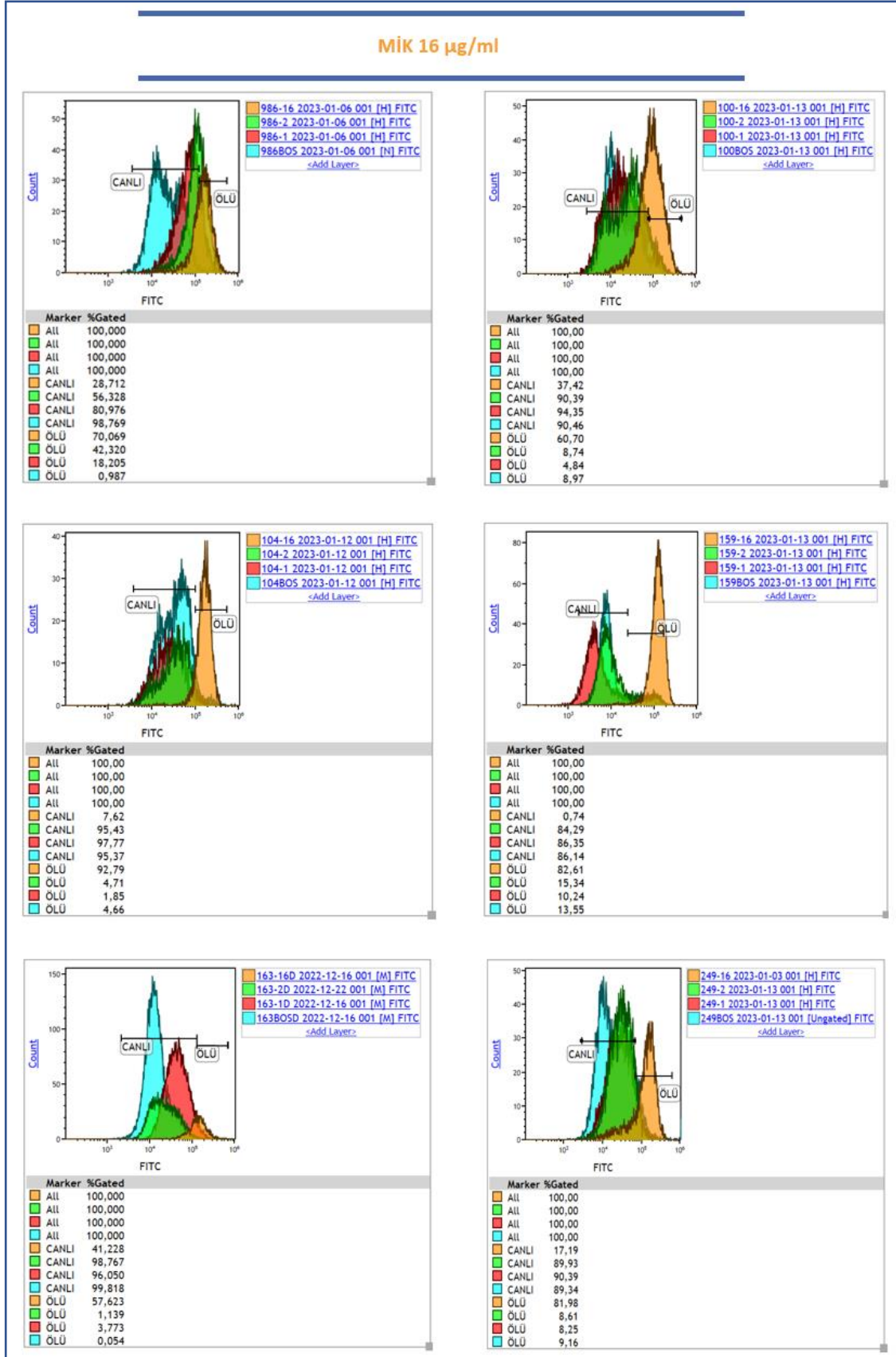
Şekil 4-3: Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değeri >2 µg/ml bulunan dirençli izolatların overlay histogram grafikleri (devam)



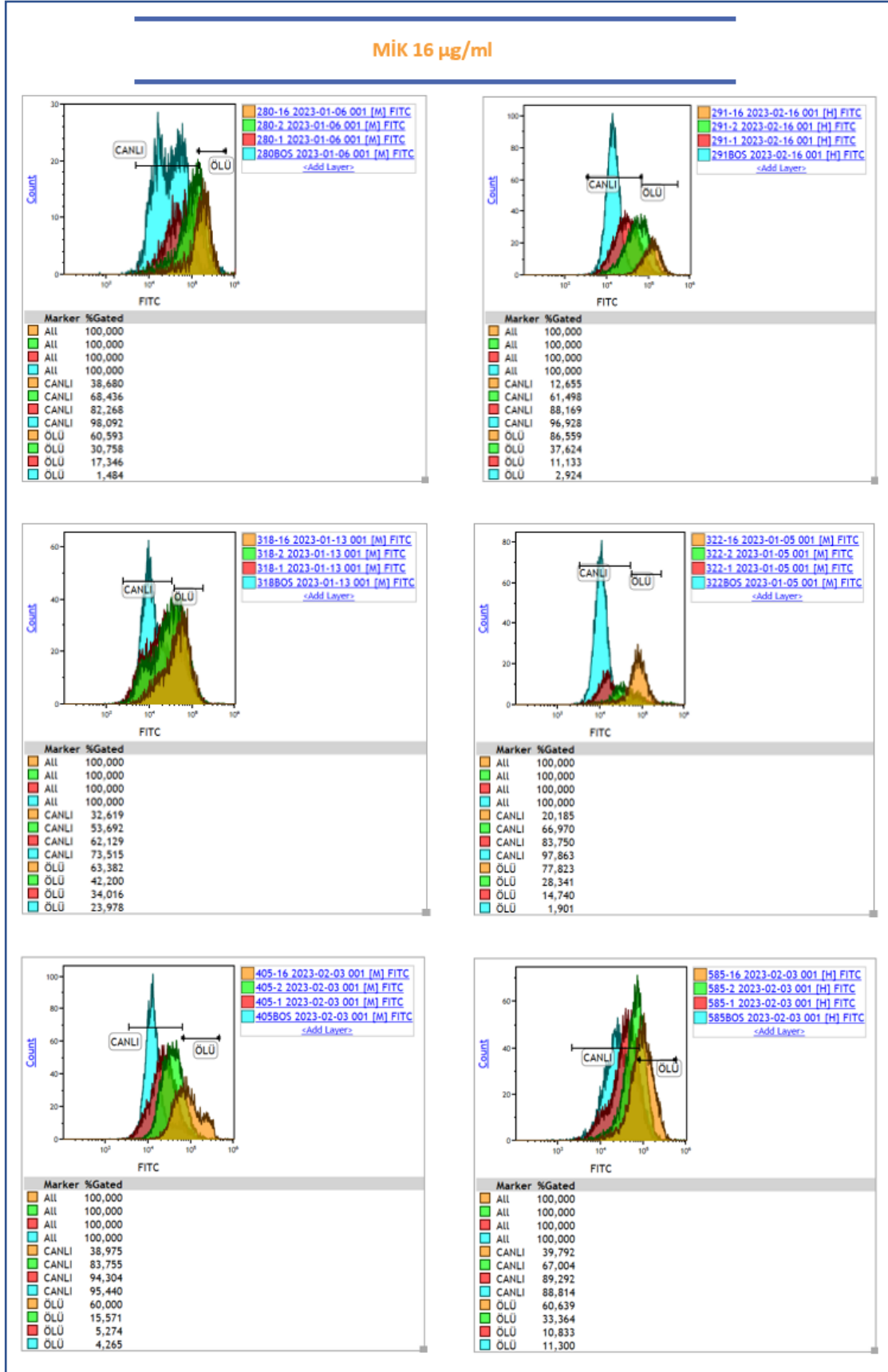
Şekil 4-3: Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değeri >2 µg/ml bulunan dirençli izolatların overlay histogram grafikleri (devam)



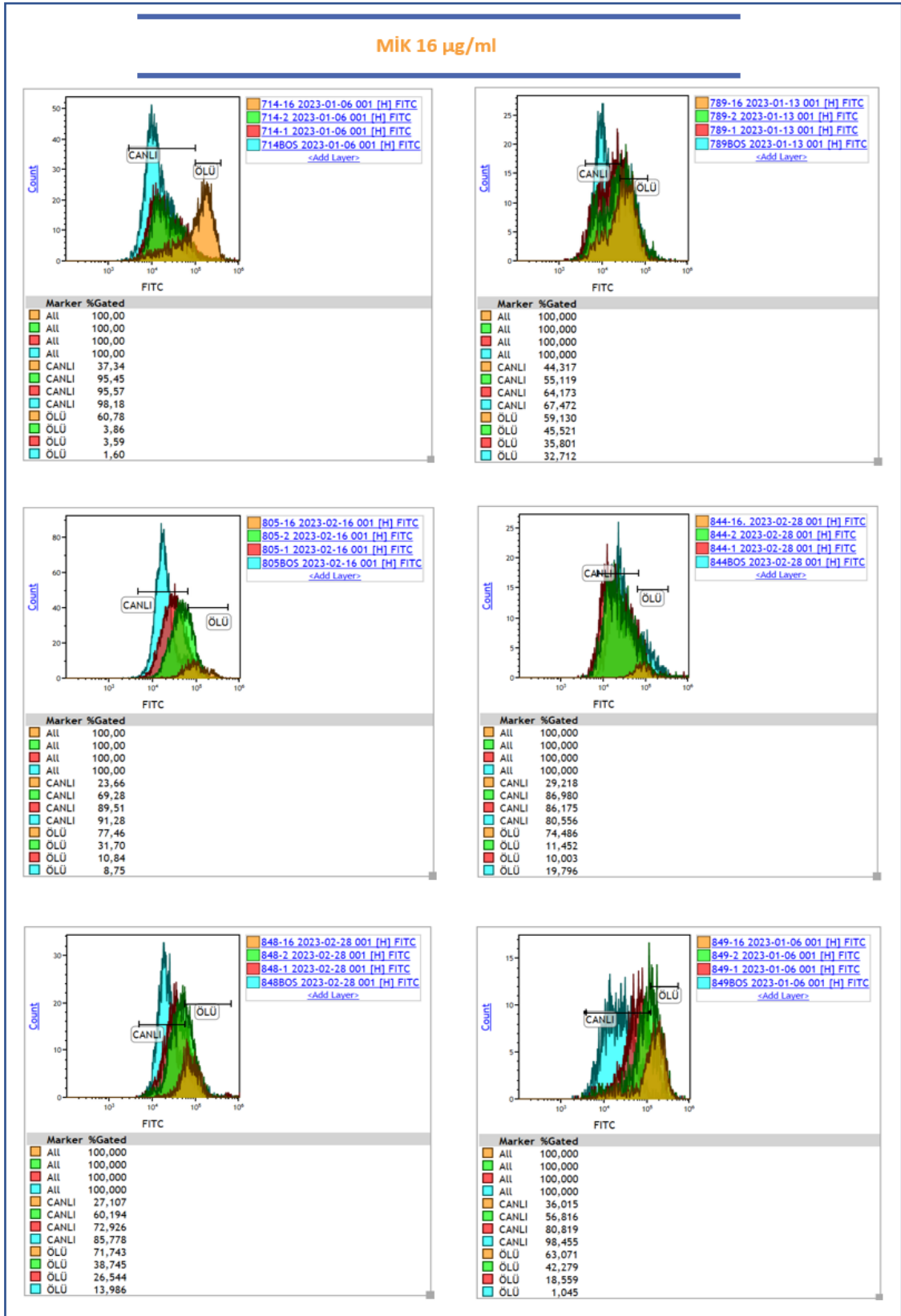
Şekil 4-3: Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değeri >2 µg/ml bulunan dirençli izolatların overlay histogram grafikleri (devam)



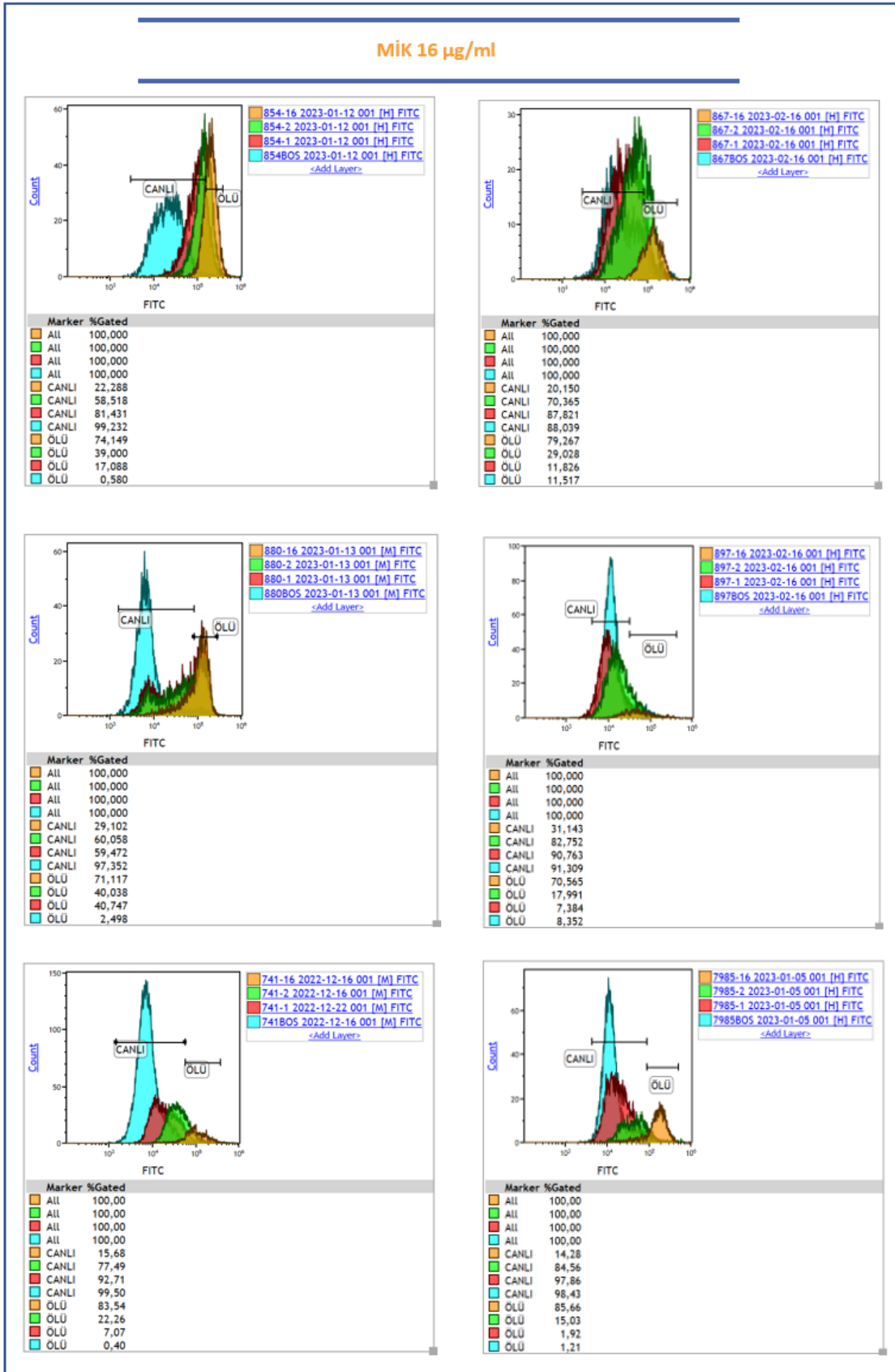
Şekil 4-3: Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değeri >2 µg/ml bulunan dirençli izolatların overlay histogram grafikleri (devam)



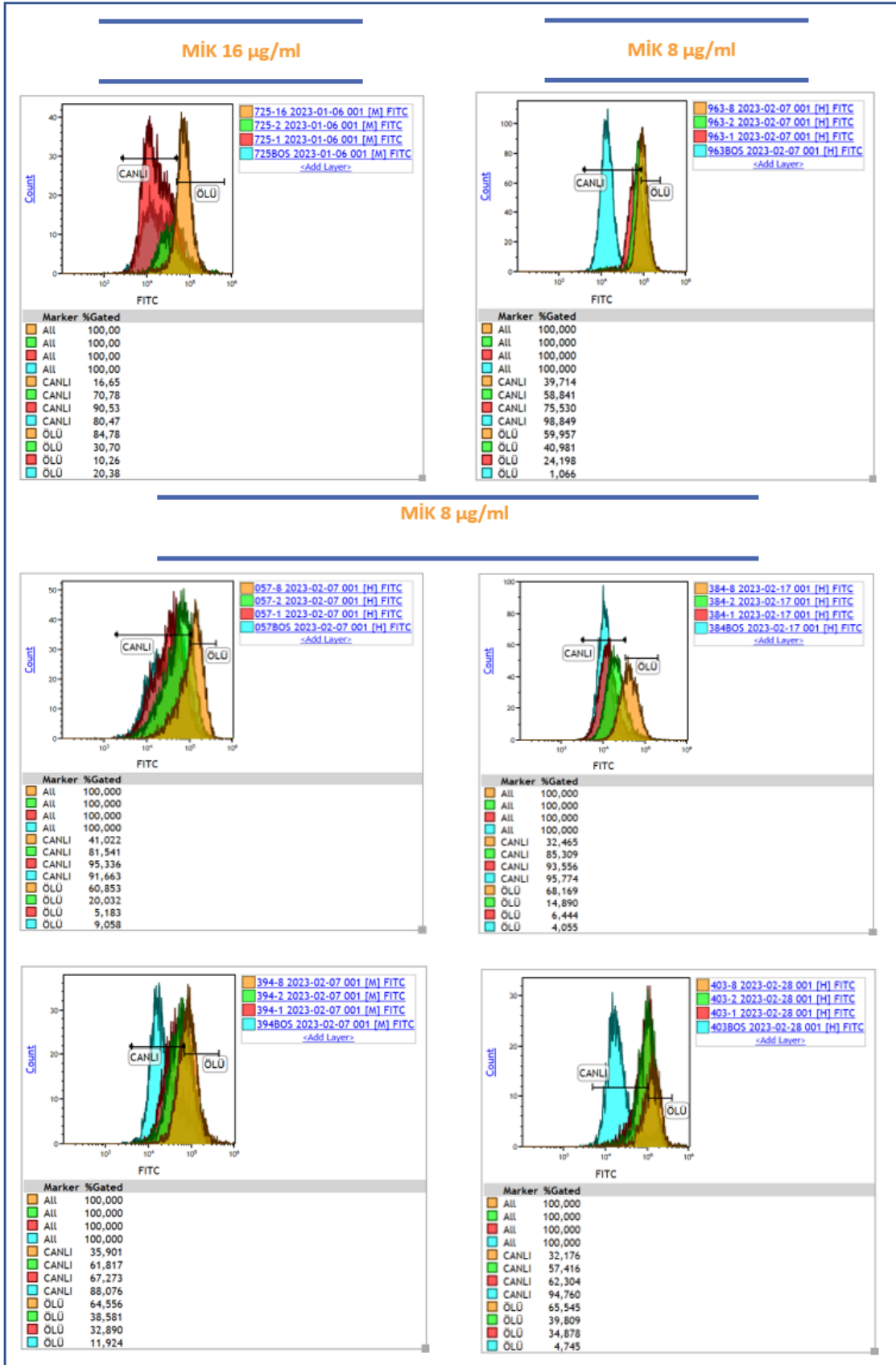
Şekil 4-3: Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değeri >2 µg/ml bulunan dirençli izolatların overlay histogram grafikleri (devam)



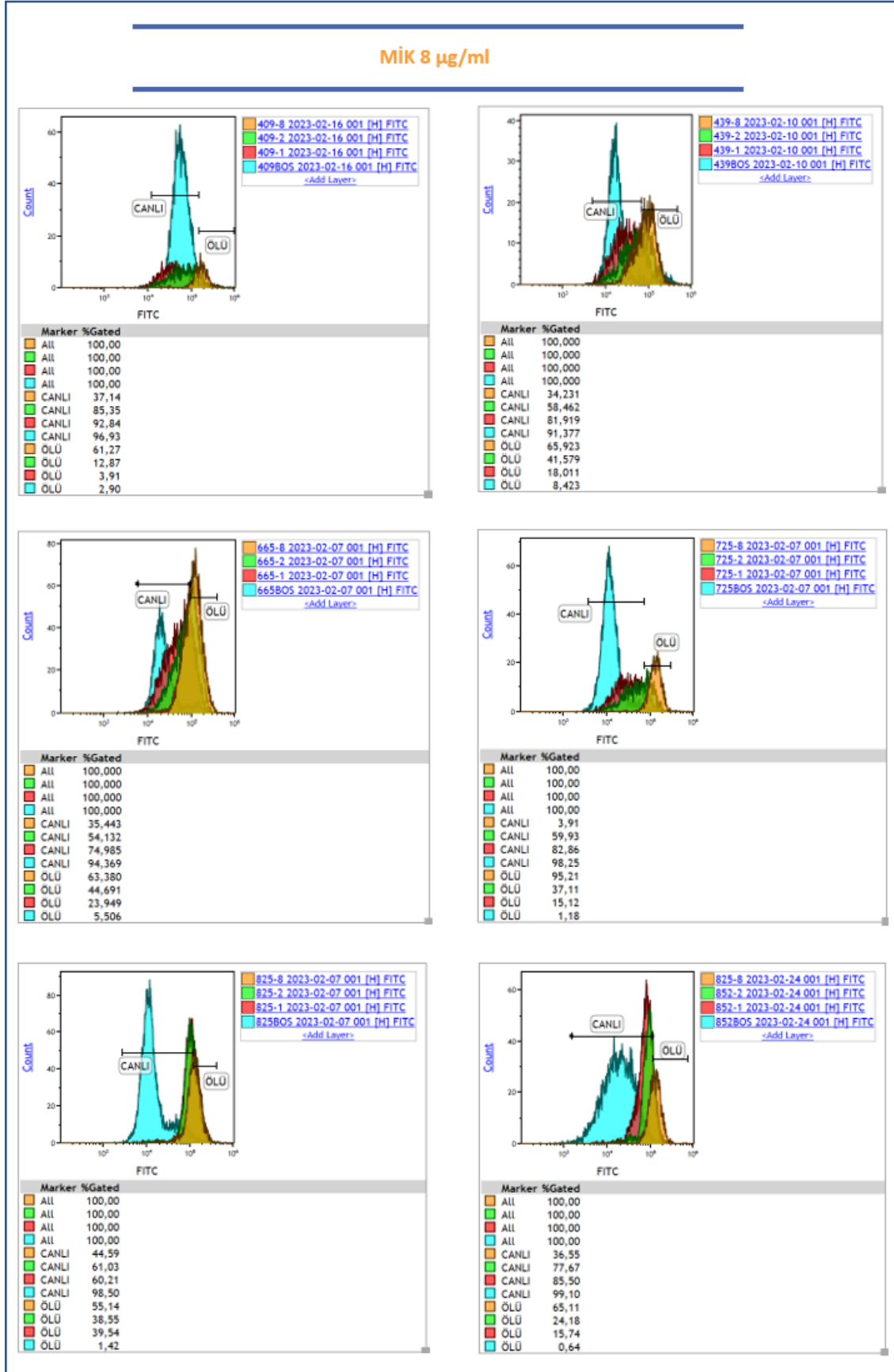
Şekil 4-3: Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değeri >2 µg/ml bulunan dirençli izolatların overlay histogram grafikleri (devam)



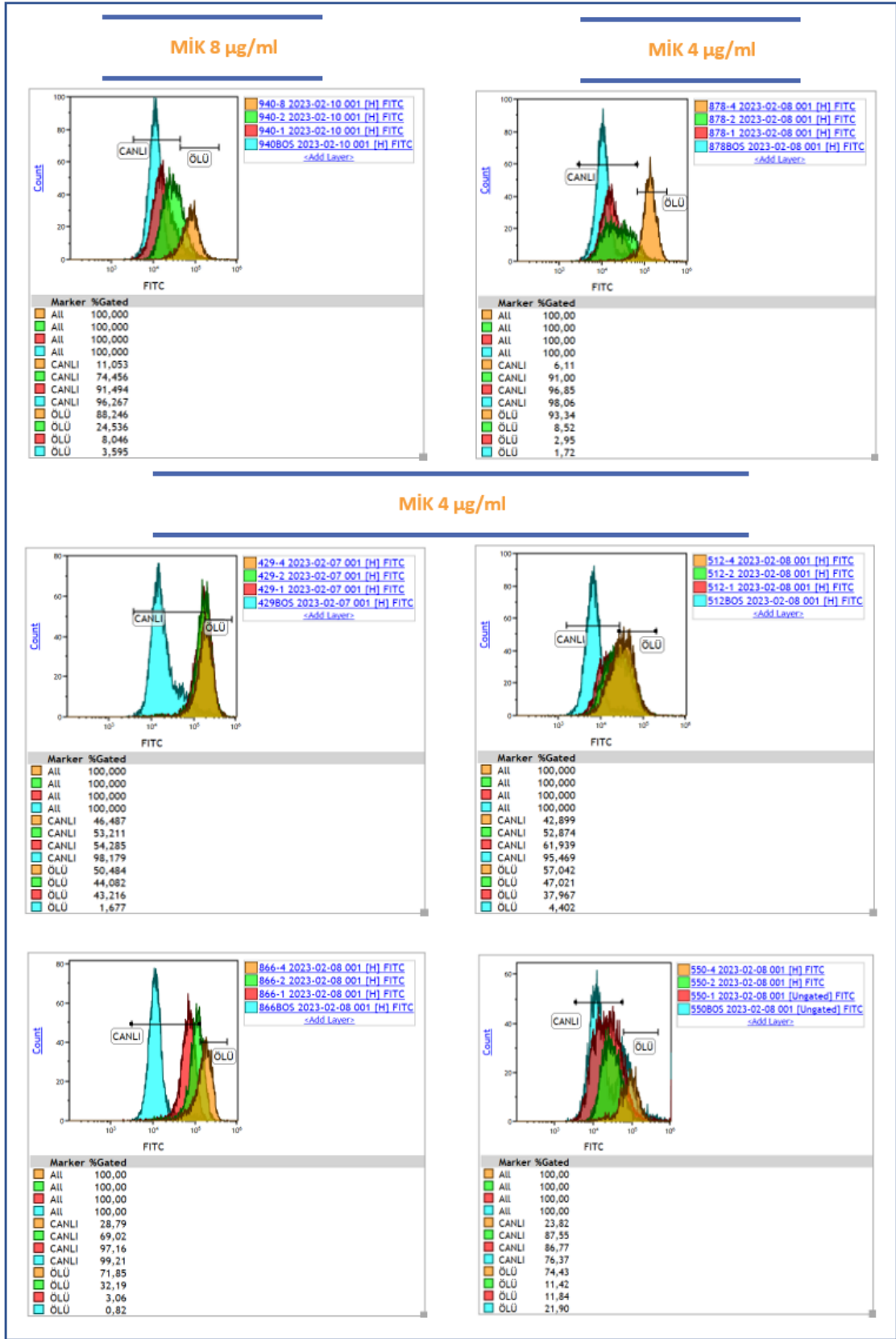
Şekil 4-3: Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değeri >2 µg/ml bulunan dirençli izolatların overlay histogram grafikleri (devam)



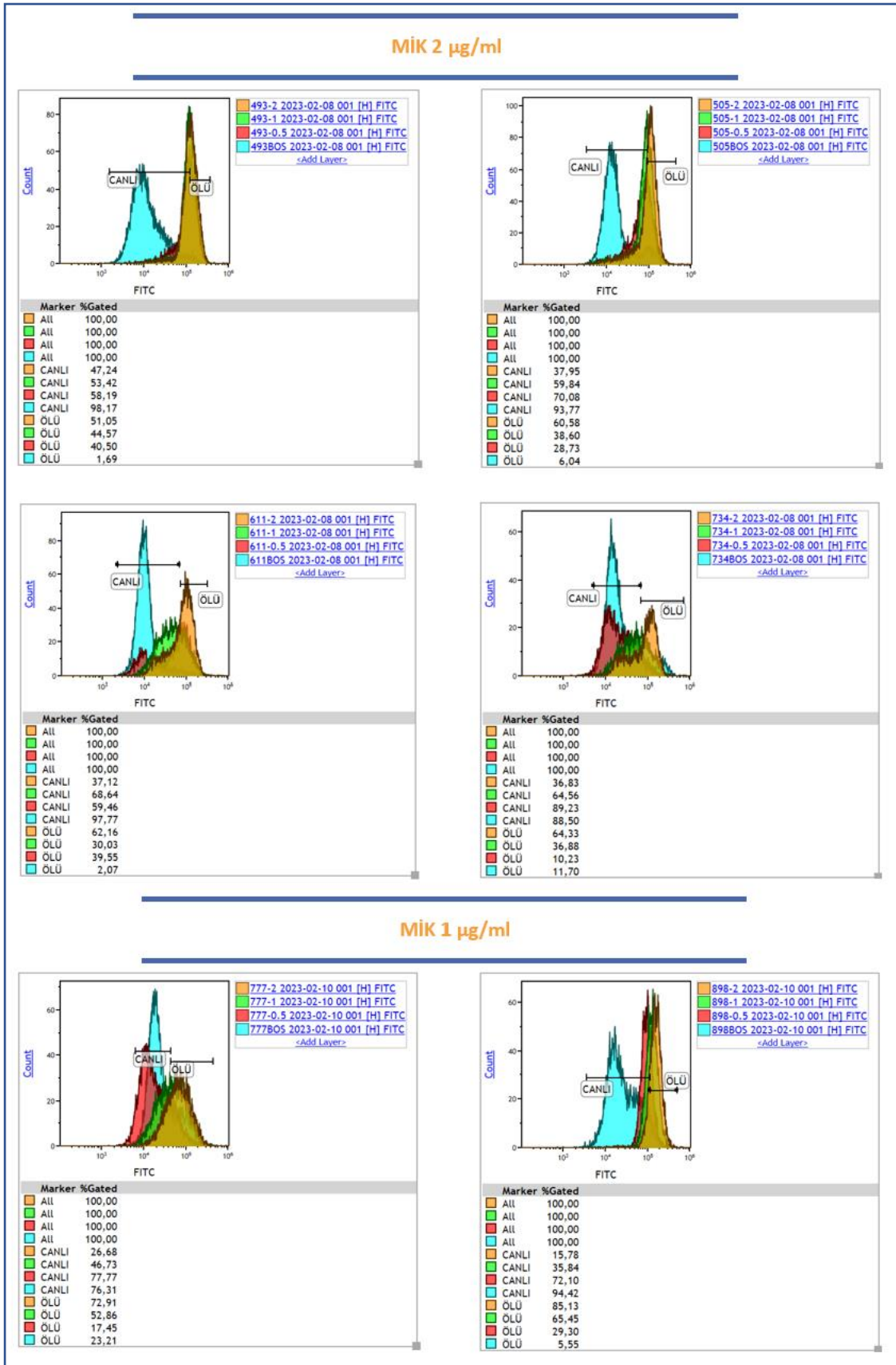
Şekil 4-3: Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değeri >2 µg/ml bulunan dirençli izolatların overlay histogram grafikleri (devam)



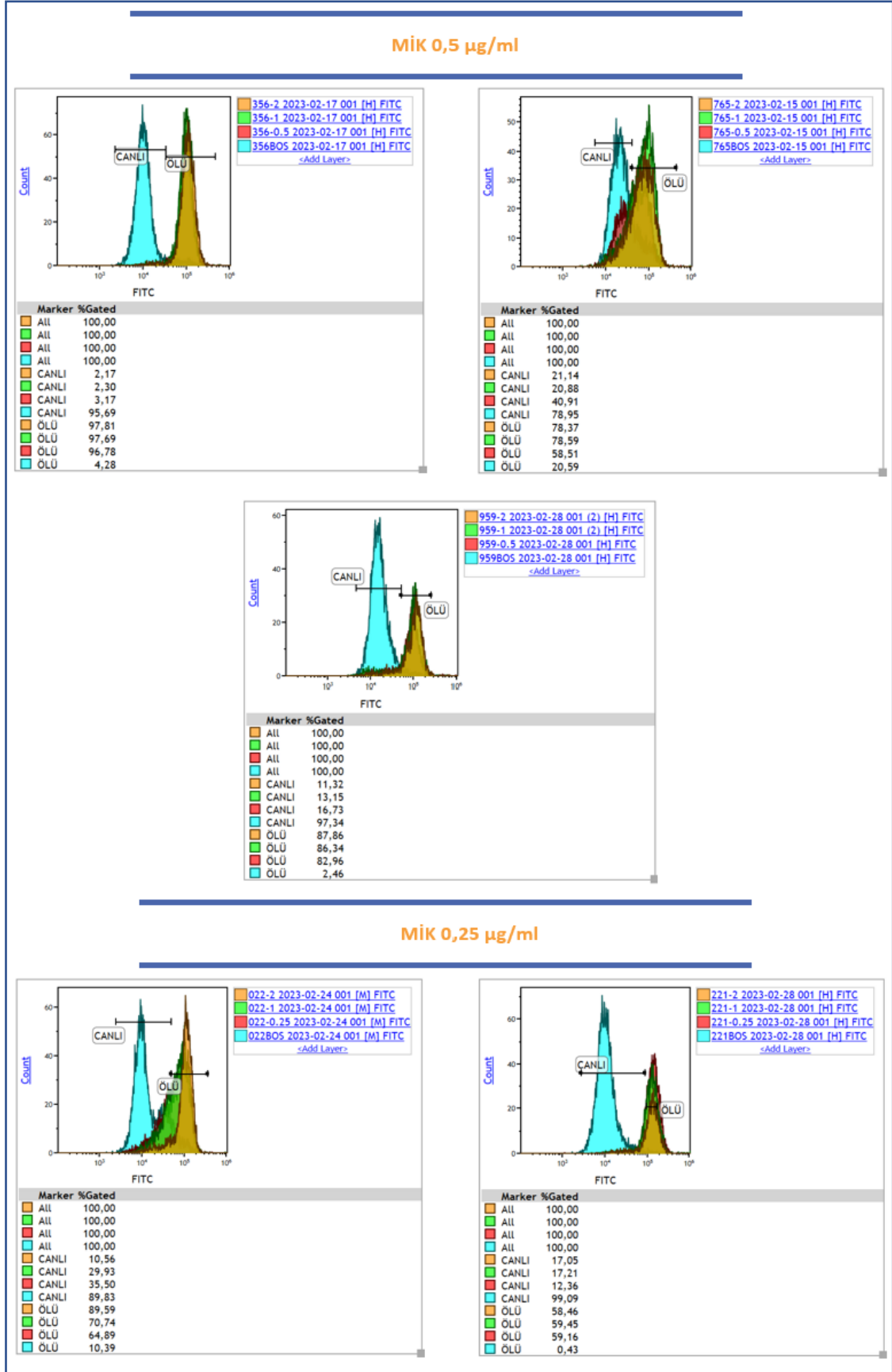
Şekil 4-3: Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değeri >2 µg/ml bulunan dirençli izolatların overlay histogram grafikleri (devam)



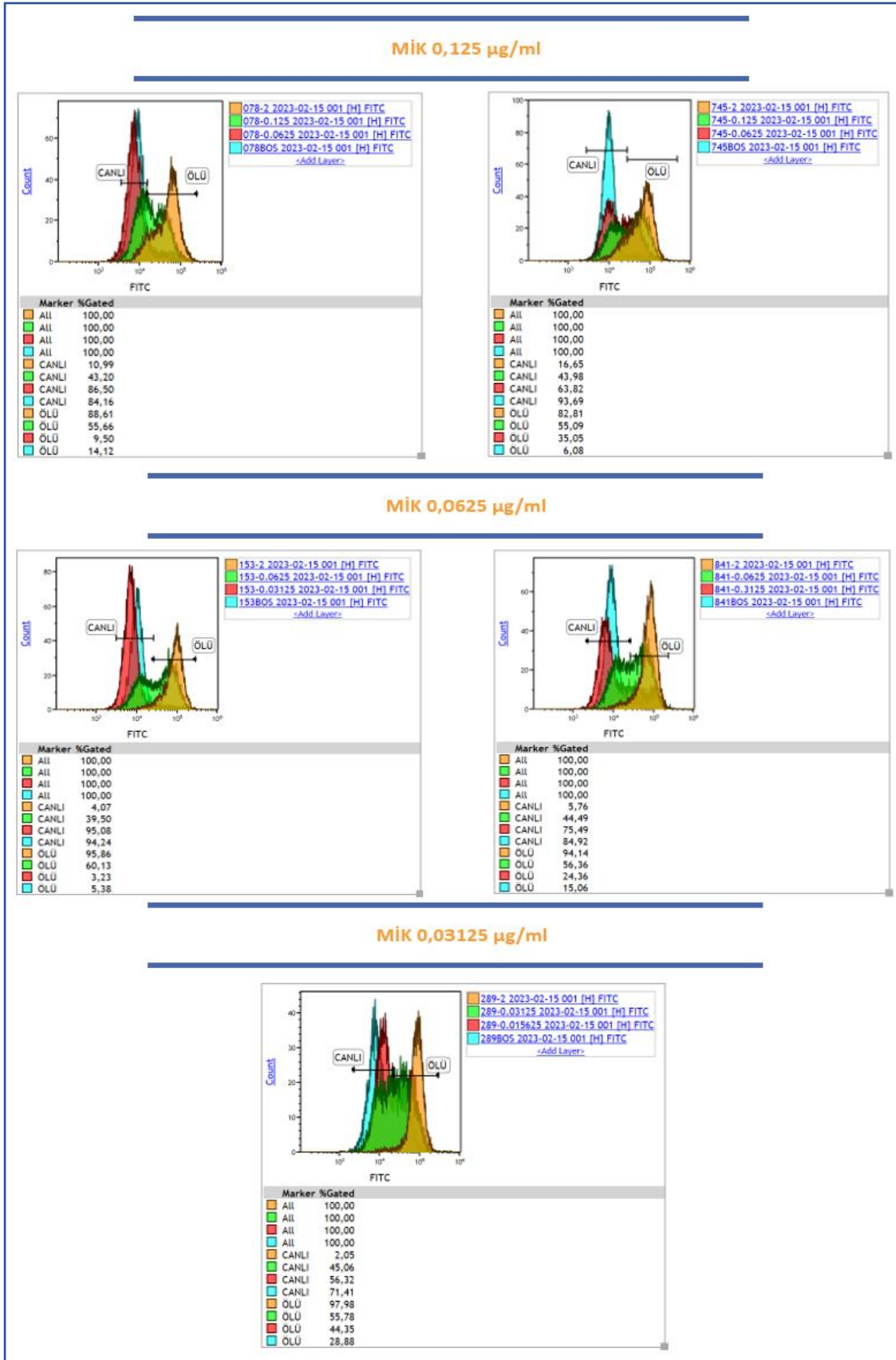
Şekil 4-3: Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değeri >2 µg/ml bulunan dirençli izolatların overlay histogram grafikleri (devam)



Şekil 4-4: Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değeri ≤ 2 µg/ml bulunan duyarlı izolatların overlay histogram grafikleri

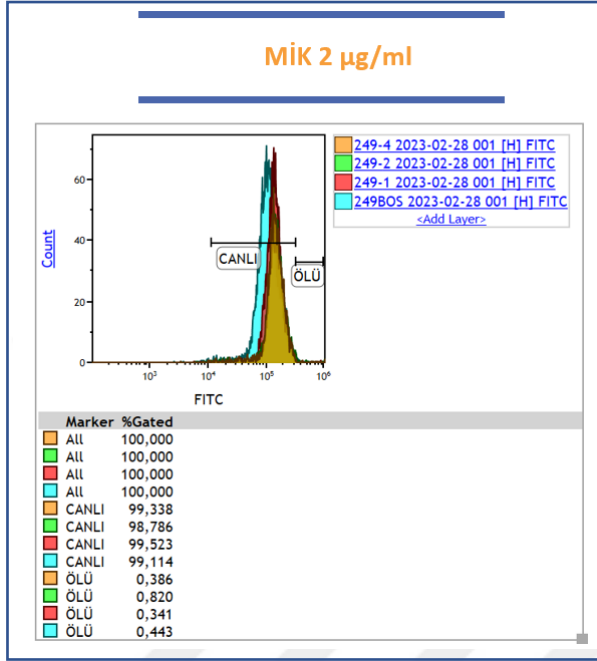


Şekil 4-4: Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değeri ≤ 2 µg/ml bulunan duyarlı izolatların overlay histogram grafikleri (devam)



Şekil 4-4: Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değeri ≤ 2 µg/ml bulunan duyarlı izolatların overlay histogram grafikleri (devam)

İzolatlardan birinde büyük hata tespit edilmiştir. İzolatın SMD yöntemi ile bulunan MİK değeri 2 µg/ml (S) olmasına rağmen FCM yöntemi ile dirençli (R) bulunmuştur. Büyük hataya neden olan izolatın overlay histogram grafiği şekil 4-5’de görülmektedir.



Şekil 4-5: Büyük hata tespit edilen izolatın overlay histogram görüntüsü

4.5. Bulguların İstatistiksel Analiz Sonuçları

Bulguların istatistiksel analizi tablo 4-3’deki SMD ve FCM yöntemlerinden elde edilen sonuçlara göre yapılmıştır.

Tablo 4-3: SMD ve FCM yöntemlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

Flow Sitometri (FCM)	Sıvı Mikrodilüsyon (SMD)		
	R	S	Toplam
R	68	1	69
S	0	16	16
Toplam	68	17	85

Duyarlılık= %100

Özgüllük= %94,1

Pozitif Prediktif Değer= %98,5

Negatif Prediktif Değer= %100

Kategorik Uyum= %98,8

Çok Büyük Hata= %0

Büyük Hata= %5,8

\geq %95 güven aralığında yapılan çalışmalarda çok büyük hatanın \leq %3 olması, büyük hatanın ise \leq %7 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir (123, 124). Sonuçlar tablo 4-4'de verilmiştir.

Tablo 4-4: FCM yönteminin istatistiksel analiz sonuçları

	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD	KU	ÇBH	BH
FCM	%100	%94,1	%98,5	%100	%98,8	%0	%5,8

5. TARTIŞMA

Antibiyotiklerin keşfinden bu yana insan sağlığı açısından devrim yaratan gücü ve etkisine karşın gereksiz ve uygunsuz kullanım sonucu dirençli bakteriler dünya genelinde gittikçe artan oranlarda görülmeye başlamış ve yeni antibiyotiklerin geliştirilmesindeki güçlükler de göz önüne alındığında antibiyotik direnci günümüzde tedavide büyük bir sorun haline gelmiştir. Antimikrobiyal direnci küresel sağlık için ciddi bir tehdit olarak kabul eden Dünya Sağlık Örgütü, 2014 yılında yayımladığı antimikrobiyal direnç ile ilgili ilk küresel sürveyans raporunda GSBL oluşturanlar da dahil olmak üzere üçüncü kuşak sefalosporinlere ve karbapenemlere dirençli *K. pneumoniae* (KRKP) suşlarını, tedavide yaygın kullanılan antibakteriyel ilaçlara direnç geliştirmesi nedeniyle, endişe uyandıran dokuz bakteriden biri olarak bildirmiştir (1). DSÖ bundan birkaç yıl sonra, yeni tedavilere acil ihtiyaç duyulan dirençli bakterileri listelediği küresel öncelikli patojenler listesinde ise GSBL üreten ve karbapeneme dirençli *Enterobacteriaceae* bakterilerini karbapeneme dirençli *Acinetobacter baumannii* ve *P. aeruginosa* ile birlikte kritik öncelikli sınıfta gruplandırmıştır (3).

GSBL üreten *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerin birçoğu üçüncü kuşak sefalosporinlerle birlikte aynı zamanda amioglikozitler, trimetoprim ve kinolonlar gibi diğer antimikrobiyal ajanlara karşı da dirençlidir. Bu tür çoklu ilaç direnci gelişen bakteriler için artan karbapenem kullanımı sonucunda karbapenem direnci de giderek artmıştır (2). *K. pneumoniae* (ayrıca *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp.) gibi karbapenemaz üreten bakteriler, tedavideki zorluklar nedeniyle yüksek mortalite oranlarıyla seyreden enfeksiyonlara yol açmaktadırlar. Karbapenemaz genlerinin hareketli genetik elementler aracılığı ile aktarılabilmesi bakteriler arasındaki yayılım açısından kritik öneme sahiptir. Diğer bazı bakteriler gibi KRKP suşlarının hastalar arasında kolayca yayılarak yoğun bakım ve yenidoğan üniteleri başta olmak üzere hastanelerde salgınlara yol açabilmesi ayrıca sorun teşkil etmektedir (1, 3, 125, 126).

Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Ağı (ECDC)'nin 29 Avrupa Birliği/Avrupa Ekonomik Alanı (AB/AEA) ülkesi verilerine göre hazırladığı 2021 yılı raporunda, invaziv *K. pneumoniae* suşlarının karbapenem direncinin ülkelere göre farklılıklar (%0-73,7) gösterdiği belirtilmiştir (2). Türkiye Ulusal Antimikrobiyal

Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS) 2016 yılı verilerine göre, 4013 invaziv *K. pneumoniae* izolatında karbapenem (ertapenem) direnci %48,9 olup suşların % 75,3'ü seftazidime, %66,6'sı piperasilin/tazobaktama, %76,8'i amoksisilin-klavulanik asit/ampisilin-sulbaktama, % 49,2'si gentamisine, %30'u amikasine ve % 62,7'si siprofloksasin/ levofloksasine dirençli bildirilmiştir. KRKP suşları özelinde saptanan antibiyotik direnç oranları incelendiğinde oranların karbapeneme dirençli olmayanlara göre daha yüksek saptanarak KRKP suşlarının %94,8'i seftazidime, %95,8'i piperasilin/tazobaktama, %96,6'sı amoksisilin-klavulanik asit/ampisilin-sulbaktama, %69,6'sı gentamisine, %54,9'u amikasine ve %89,8'i siprofloksasin/levofloksasine dirençli bulunmuştur (127). Bizim çalışmamızda ise KRKP suşlarının %100'ü seftazidim ve piperasilin/tozobaktama, %83,5'u gentamisine, %88,2'si amikasine ve %98,8'i siprofloksasine dirençli bulunmuştur. Çalışmamızdaki veriler UAMDSS verileri ile karşılaştırıldığında benzer şekilde KRKP izolatlarında da direnç oranlarının daha yüksek olduğu ve yıllar içerisinde artış gösterdiği görülmektedir.

Karbapenem direncindeki artış, çoklu ilaca dirençli enfeksiyonları tedavi etmek için son çare antimikrobiyal ajanlar haline gelen polimiksinlerin (kolistin ve polimiksin B) genel olarak kombinasyon tedavilerinin bir parçası olarak klinikte kullanımını hızlandırmıştır (6, 44, 73). Ancak kolistin kullanımındaki artış, bu defa hızla kolistine dirençli *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. ile birlikte *K. pneumoniae* gibi *Enterobacteriaceae* bakterilerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur (4, 5, 34, 128). Bu durum, ciddi renal ve nörolojik toksisite gibi yan etkilerinin gözlemlenmesi nedeniyle 1970'lerde kullanımına ara verilen kolistin için klinik sınır değerlerin yeniden gözden geçirilmesi, hızlı ve güvenilir duyarlılık yöntemlerinin belirlenebilmesi amacıyla klinik ve laboratuvar çalışmaları ile birlikte CLSI ve EUCAST gibi uluslararası antibiyotik komiteleri tarafından yapılan standardizasyon çalışmalarını başlatmıştır (42, 44, 119, 120).

Polimiksinlerin büyük katyonik molekül yapısı ve agara zayıf difüze olma özelliği nedeniyle rutin laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan difüzyon testlerinde duyarlılığın doğru bir şekilde saptanamaması sorunu gündeme gelmiş (42, 44) ve referans yöntemle karşılaştırılarak, hem disk difüzyon hem de yine agara dayalı bir yöntem olan gradient test yöntemiyle yapılan çeşitli çalışmalarda uyumsuz sonuçlar bildirilmeye başlanmıştır (67, 68, 129). Dolayısıyla dirençli *K. pneumoniae* (ve ayrıca diğer *Enterobacterales* bakterileri ile *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* gibi

nonfermentatif bakteriler)'nin kolistin direncinin saptanmasında disk diffüzyon veya gradient test (E-test, vb.) yöntemleri kullanılamamaktadır. Bu sebeple güncel EUCAST ve CLSI rehberlerinde disk difüzyon yöntemi uygulandığında kullanılacak bir kolistin klinik sınır değeri de bulunmamaktadır (6, 7).

Kolistin duyarlılık çalışmaları için CLSI ve EUCAST tarafından önerilen yöntemler; MİK değerlerinin saptanabildiği SMD, SMAD, KSDE ve KAT yöntemleridir. Bugün için kabul edilen standart yöntem SMD yöntemidir (55, 118-120). Direnç nedeniyle alternatif ajanların mevcut olmadığı durumlarda kolistin MİK'i hakkında veri sağlanması tedavi kararları için önemli olmakla birlikte, önerilen bu yöntemlerin zaman alıcı olması rutin kullanımlarını kısıtlamaktadır (57, 58).

VITEK 2, Phoenix, MicroScan, Sensititre gibi otomatize sistemlerin rutin laboratuvarlarda kullanım kolaylığı olmasına karşın bu sistemlerin de kolistin direncinin saptanmasında güvenilirliği konusu tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda, VITEK 2'nin kolistin duyarlılık çalışmalarında güvenilir olmadığı belirtilmiştir (59, 67, 68). Phonex ile yapılan bazı çalışmalarda ise, ÇBH oranları görülmesi sebebiyle kolistin duyarlılığının saptanması için güvenilir bir sistem olmadığı sonucuna varılmıştır (68, 70). Türkiye Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS) de otomotize sistemlerin duyarlılık sonuçlarının doğruluğu konusundaki kuşkusunu 2016 yılı raporunda belirtmiştir (127).

Rutin yöntemlerin kullanımının kısıtlanması ve standart yöntemin getirdiği metodolojik zorluklar Gram negatif bakterilerde kolistin direncinin hızlı ve doğru bir şekilde saptanması için alternatif yöntem bulma arayışlarına yol açmıştır.

Alternatif yöntemler arasında yer alan FCM yönteminin, diğer duyarlılık yöntemleri ile karşılaştırıldığında hem oldukça hızlı hem de referans yöntemle uyumlu bir yöntem olduğu bildirilmektedir. FCM yöntemi kullanılarak yapılan antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları genel olarak 2-4 saat gibi kısa bir sürede sonuç alınabileceğini göstermiştir (11, 13-15, 76, 77, 130). Ancak kullanılan floresan boya türleri ve boya türleri, etkilerini farklı mekanizmalarla gösteren antibiyotik gruplarında değişen etkinliklerinin olması, bazı boya türleri beraber kullanılmasının gerekliliği, bazı bakterilerde otofloresan ışığa görülmesi ve validasyon için yeterli verinin henüz mevcut olmaması yöntemin kısıtlılıkları arasındadır (109, 131).

Mason ve ark. (15)'nin 1994 yılında yayımlanan çalışmalarında, *E. coli*, *Staphylococcus epidermidis* ve iki referans suşun antibiyotik duyarlılıklarının (ampisilin, gentamisin ve siprofloksasin) DiBAC₄(3) boyası kullanılarak FCM yöntemi ile 2-5 saat içerisinde değerlendirilebileceği ortaya konulmuştur. Referans yöntem olarak tüp titrasyon yöntemi (makrodilüsyon yöntemi)'nin kullanıldığı çalışmada referans suşlarda (*S. aureus* NCTC 6571, *E. coli* NCTC 10418) gentamisin duyarlılığını tespit etmek için gerekli sürenin 30 dk., direncin tespiti için gerekli sürenin ise 150 dk. olduğu bildirilmiştir. *E.coli*'nin siprofloksasin direnci 120 dk. içinde tespit edilirken, ampisilin duyarlılığı antibiyotiğin eklenmesinden sonraki 30 dk. içinde saptanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, FCM yöntemi ile bakterilerin antibiyotiğe bağlı membran potansiyel hasarının türe bağlı olarak 2-5 saat içerisinde gösterilebileceği ve antibiyotik duyarlılığının değerlendirilmesinin mümkün olacağı düşünülmüştür. DiBAC₄(3) boyasının kullanım amacı olarak, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler için kullanılabilmesi, doğrudan sıvı besiyerine eklenebilmesi, boyanın yalnızca hasarlı hücreler tarafından biriktirilmesi ve sağlam zardan geçemeyip canlı hücrelerin gelişimine engel olmaması gösterilmiştir.

Yine 1990'lı yılların sonlarında Suller ve ark. (132)'nin yaptıkları çalışmada, epidemiyolojik öneme sahip direnç profillerinden birisi olan metisiline dirençli beş *S. aureus* (MRSA) suşu ve iki duyarlı referans suşunun penisilin G, metisilin ve vankomisin duyarlılığını belirlemek için yöntem olarak FCM ve floresan boya olarak da DiBAC₄(3) kullanılmıştır. FCM öncesinde, referans yöntem olan SMD yöntemi ile suşların MİK değerleri belirlenmiştir. FCM yönteminin etkinliğini değerlendirmek ve canlı/ölü hücreler arasındaki ayrımı yapabilmek için bir kontrol deneyi olarak; tüm izolatlar FCM öncesinde ısıtılma tabii tutulmuş (70°C'de 30 dk.) ve iyonofor gramisidin S (20 µg/ml 15 dk.) varlığında izole edilmiştir. Böylelikle bakterinin plazma zarının depolarizasyonuna yol açılmış ve boyanın hücre içerisine girmesi sağlanmıştır. Çalışmanın sonucunda, antibiyotiğe duyarlı referans suşlar ve tüm MRSA klinik izolatlarında floresan artışı gösterilmiştir. Sonuçlar SMD yöntemi ile uyumlu bulunmuştur.

Silva ve ark. (13)'nin 'ultra hızlı ADT yöntemi' olarak tanımladıkları FCM yöntemi ile yaptıkları çalışmada ise, 116 Gram negatif (*Enterobacterales*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*) bakteri ve referans suşlarla kolistin duyarlılığı çalışılmış ve yöntem SMD yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar, her iki yöntemle uyumlu sonuçlar

elde ettiklerini bildirmişler ayrıca BMD yöntemi ile sonuca 16-24 saat arasında ulaştıklarını ve FCM yöntemi ile bu sürenin 1,5 saate kadar düşürüldüğünü vurgulamışlardır. Yaptıkları performans değerlendirmesinde yüksek tekrarlanabilirlik (%100) ve yeniden üretilebilirlik (%97) oranlarıyla birlikte, kategorik uyumu %100 ve temel uyumu %95,7 bulmuşlardır. Silva ve ark. (13)'ün çalışmasında olduğu gibi bazı FCM cihazlarında floresan boyalı hazır plaklarla çalışılabilmektedir. Bizim çalışmamız ise FCM cihazının modeline göre özel üretilmiş tüplerde gerçekleştirilmiştir. Floresan boyalar plak kuyucuklarına sonradan eklenebileceği gibi floresan boyalı hazır plaklar da bulunmaktadır.

Yine Silva ve ark. (133) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, kolistin duyarlılığını belirlemek için doğrudan pozitif kan kültürlerine FCM yöntemi uygulanmıştır. Kan kültürü şişelerine donör kanı ile birlikte MİK değerleri SMD yöntemi ile belirlenmiş olan 204 Gram negatif çomak (137 *Enterobacterales*, 35 *Pseudomonas* spp. ve 32 *Acinetobacter baumannii*) ile ikişer duyarlı ve dirençli standart kontrol suşu eklenerek inkübe edilmiş ve üreme sinyali alındıktan sonra iki farklı flow sitometri cihazında çalışılarak elde edilen kolistin duyarlılık sonuçları BioFAST yazılımı ile değerlendirilmiştir. FCM yöntemi ile standart SMD referans yöntemi arasındaki genel kategorik uyumun, *Enterobacterales* türleri ve *A. baumannii* için %100 ve *Pseudomonas* türleri için %94,3 bulunduğu bu çalışmanın sonucunda araştırmacılar FCM yönteminin, rutin laboratuvarlarda SMD yöntemine alternatif bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

FCM ile GSBL pozitif *Enterobacteriaceae* bakterilerinin araştırıldığı çalışmalar da mevcuttur. Bu konuda Ramos ve ark. (130)'ün yaptığı bir çalışmada, 18'i GSBL pozitif olan 26 *K. pneumoniae* ve 23'ü GSBL pozitif olan 35 *E. coli* suşu olmak üzere toplam 61 klinik izolatu suşunun seftazidim ve sefotaksim direnci DiBAC₄(3) boyası kullanılarak FCM yöntemi ile araştırılmıştır. GSBL direnci, VITEK 2 ile araştırılmış ve disk difüzyon yöntemi kullanılarak doğrulanmıştır. GSBL gen karakterizasyonu ise, multipleks PCR yöntemi ile belirlenmiştir. FCM yöntemi uygulanmadan önce bizim çalışmamızda olduğu gibi bakterilerin otofloresan sinyalleri değerlendirilmiş, sonuçlar DiBAC₄(3) boyası yoluyla meydana gelen membran depolarizasyonuna göre çok düşük floresan yoğunluğuna karşılık geldiği için dikkate alınmamıştır. Elde edilen sonuçların kategorik uyumu oldukça başarılı bulunmuş fakat nadiren yanlış negatif sonuçlar elde edildiği de bildirilmiştir. Çalışmanın sonucuna göre yapılan değerlendirmede, fenotipik

bir test olan FCM yönteminin mutasyonlar nedeni ile negatif sonuç verebilme ve zaman alıcı olma dezavantajına sahip olan genotipik teste (PCR) üstünlüğü olduğu ayrıca, kantitatif analiz yapabilmesi, basitliği, ortalama 3 saat gibi kısa bir sürede sonuç verebilmesi ve maliyetinin düşük oluşu gibi avantajları ile birlikte bu yöntemin klinik mikrobiyoloji laboratuvarında günlük rutin kullanım için umut verici bir yöntem olduğu vurgulanmıştır.

Velican ve ark. (76) doğrudan, yapay olarak kontamine edilmiş idrar örneklerinde ve protokolü optimize etmek için üropatojenik *E. coli* suşlarından hazırlanan bakteriyel süspansiyonlarda *E. coli*'nin antibiyotik duyarlılığını hızlı bir şekilde saptamak amacıyla FCM yöntemini kullanmışlar ve sonuçları disk difüzyon ve SMD yöntemleri ile karşılaştırmışlardır. MALDI-TOF MS ile tanımlanmış 29 adet *E. coli* suşunun seftriakson, siprofloksasin, nitrofurantoin ve trimetoprim-sulfametoksazole duyarlılıkları disk difüzyon ve SMD yöntemleri ile 18-24 saat arasında tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, standart yöntemler ve FCM arasında büyük oranda katagorik uyum olduğu ve plazma zarının depolarizasyonu ile hücre içine girebilen DiBAC₄(3)'ün antibiyotiğe duyarlı hücrelerin saptanması için uygun bir boya olduğu, FCM yönteminin üropatojenik *E. coli* suşlarında nitrofurantoin, trimetoprim-sülfametoksazol, siprofloksasin ve seftriakson duyarlılığının idrar örneklerinin inokülasyonundan sonraki 4 saat içinde belirlenmesine olanak sağladığı bildirilmiştir.

Litaratür taraması sonucunda, antibiyotik duyarlılık çalışmalarında çeşitli floresan boyalar kullanıldığı görülmektedir (13, 15, 74, 76, 130, 132, 133). Çalışmamızda, DiBAC₄(3) floresan boyası kullanılmasının nedeni, bu boyanın antibiyotik tedavisinin neden olduğu bakteriyel membran potansiyel değişikliklerini saptayabilmesidir. Lipofilik bir anyon olan DiBAC₄(3), bozulmamış zarlar için düşük bir bağlanma kapasitesine sahiptir ve sadece zarlar depolarize olduğunda, lipid bakımından zengin olan hücre içi bileşenlere bağlanıp hücre içine girer ve böylelikle hücreler giderek floresan hale gelmiş olur (15).

FCM yönteminde, farklı floresan boyaların birlikte kullanılmasıyla da antibiyotiklerin bakteri hücreleri üzerindeki etkisi, yani ölü ve canlı hücre ayrımı yapılabilmektedir (12, 14, 110, 112, 113, 115). Ancak tek floresan boya kullanılarak yapılan çalışmalarda zamandan ve maliyetten daha fazla tasarruf edilmektedir.

Antibiyotikle muamele edilen hücrelerde hücreSEL makromoleküllerin karbonilasyonunun geri döndürülemez bir şekilde artış göstermesi nedeniyle Saint-Ruf ve ark. (12), karbonil gruplarını hedef alan “Alexa fluor 633 hidrazide” (AFH) boyasının FCM yöntemi ile antibiyotik duyarlılıkların saptanmasında kullanılıp kullanılmayacağını araştırmışlardır. Gram negatif çomakların farklı antibiyotik gruplarına (β -laktamlar, aminoglikozitler ve florokinolonlar) duyarlılıklarının SMD yöntemi ile karşılaştırılarak incelendiği çalışmada FCM yönteminde AFH'ye ek olarak, hasar görmüş membrana sahip hücrelere girerek DNA'ya bağlanan TO-PRO-3 ve depolarize membranlara sahip hücrelere girebilen DiBAC4(3) kullanılmıştır. Çalışma sonucunda antibiyotiğe göre kullanılacak boyanın da değişiklik göstermesi gerektiği, β -laktamlar için en iyi sonucun AFH boyası ile alındığı ve SMD yöntemi ile 18-24 saat sonra elde edilen ADT sonuçlarının FCM yöntemi ile 2-3 saat içerisinde elde edildiği bildirilmiştir.

MulroneY ve ark. (14)'nin karbapenem dirençli 48 *K. pneumoniae* suşu ile yaptıkları çalışmada ise, mevcut ADT'lerin zaman alıcı olması sebebiyle hızlı test olarak FCM ile çalışıldığı ve suşun izolasyonundan kısa bir süre (54 dk.) sonra duyarlı/dirençli sonucuna ulaşıldığı ve 158 dk. sonra da MİK değerlerinin belirlendiği bildirilmiştir. Çalışmada meropenem duyarlılıkları belirlenmek istenen 48 suştan ikisinde ÇBH tespit edilmiştir. Bu hatanın, suşlar dondurularak saklanırken *Klebsiella* türleri dışındaki bir izolatla kontamine olmasından kaynaklı olduğu düşünülmüş ve bu olasılığı ortadan kaldırmak için ÇBH saptanan suşlar üç gün boyunca günde bir kez pasajlanmış, katı besiyerindeki değişik koloni görünümünün her birinden ayrı ayrı kültür yapılmış, *K. pneumoniae* oldukları belirlendikten sonra PCR yöntemi ile karbapenem direnci doğrulanmış ve FCM yöntemi tekrarlanmıştır ve ikinci tekrarda aynı sonuçlar elde edilmiştir. SYTO 9 boyası kullanılan bu çalışmada, küçük parçacıkların optimum çözünürlüğünün elde edilmesi için akustik flow sitometri ve arka plandaki kalıntıları ayırt etmek için de florofor tercih edilmiştir. Floroflor daha yüksek dalga boyunda ışık saçılımı yaparak görüntünün netliğini sağlamaktadır. SYTO 9 boyasının hem ölü hem de canlı hücreleri boyaması nedeniyle bu boyanın FCM yöntemiyle yapılan antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarında tek başına kullanılması uygun değildir (112). Çalışmada floroflor ve SYTO 9'un birlikte kullanılması sonucunda optimum sonuçlar elde edilebilmiş ve meropenem duyarlılığı 1 saatte, MİK değeri ise 3 saatte belirlenmiştir. Ayrıca, SYTO 9 boyası kullanılarak dijital florasan mikroskopunda da

görüntüler elde edilmiş ve FCM ile karşılaştırılmıştır. Çalışılan tüm test yöntemleri (SMD, FCM ve dijital florasana mikroskopu) arasında anlamlı kategorik uyum farkı bulunmamıştır.

Tavenier ve ark. (113) ise 135 ateşli hastanın idrar örneğinde Gram preparasyon, kültür ve ayrıca hasta idrarlarında doğrudan FCM ile canlı/ölü bakteri ayrımı yaptıkları çalışmalarında TO (“thiazole orange”) ve PI (“propidium iodide”) boya larını birlikte kullanmışlardır. Çalışmada yöntemin duyarlılığı %100 ve özgüllüğü %78,4 bulunmuştur. Canlı bakterilerin ayrımı için yaptıkları ROC (Alıcı işletim karakteristiği) analizi sonucunda buldukları AUC (Eğri altında kalan alan) değerine (%95 güven aralığında 0,93) göre, FCM yönteminde TO ve PI boya larının birlikte kullanılmasıyla canlı/ölü hücre ayrımının net bir şekilde yapılabildiği ve kültür sonuçlarıyla uyumlu olduğu belirtilmiştir.

Diaper ve ark. (115) ise, özellikle ökaryot hücreler için kullanılan boya larından olan Rh123 (“rhodamin 123”), DiOC₆(3) (“3,3’-dihexyloxacarbocyanine iodide”) ve FDA (“fluorescein diacetate”)’yı FCM yönteminde kullanarak boya ların *Bacillus subtilis*, *Aeromonas salmonicida*, *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens* ve *S. aureus* gibi farklı bakteri türlerinde canlı/ölü ayrımı açısından etkinliklerini değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda; Rh123 floresan boya sınının *E. coli* ve *S. aureus* izolatlarında canlı ve ölü hücre ayrımını çok iyi yapılabildiği, *P. fluorescens* izolatlarının %10’dan azını belirleyebildiği ve *A. salmonicida* ve *B. subtilis* izolatlarında ise kullanılamayacağı belirtilmiştir. DiOC₆(3) ile boyanmış canlı *S. aureus* ve *E. coli* izolatları da FCM yöntemi ile kolayca tespit edilmiştir. *P. fluorescens* hücreleri de DiOC₆(3) boya sı ile FCM’de ayırt edilebilmektedir. Fakat *A. salmonicida* ve *B. subtilis* hücreleri bu boya ile tespit edilememiştir. FDA ile boyanmış *S. aureus* ve *E. coli* izolatları FCM tarafından saptanamamıştır. Aynı şekilde *P. fluorescens* ve *A. salmonicida* için FDA’nın kullanışlı olmadığı fakat *B. subtilis* hücrelerinin FDA kullanılarak boyanabildiği ve sonuçta bu üç boya içerisinde en etkin sonuç veren boya nın Rh123 olduğu belirtilmiştir.

Bu çalışmaların ışığında, FCM yöntemi ile doğru sonuçlara ulaşabilmek için hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde, duyarlılık testi yapılacak olan antibiyotiğin özelliklerine göre floresan boya seçimi yapılmasının son derece önemli olduğunu vurgulamak gerekir.

Çalışmamızda, MİK değerlerinin belirlenmesinde sonuçların kabul edilebilirliği açısından hem referans yöntem kullanılmış hem de örneklem büyüklüğü istatistiksel olarak hesaplanmıştır. Örneklem büyüklüğü için yapılan hesaplamalarda da KRKP suşlarının kolistin MİK değerlerini göre referans yöntemle kabul edilen SMD yöntemi ile saptamış olan çalışmaların sonuçları kullanılmış, SMD dışındaki yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar istatistiksel hesaplamalara dahil edilmemiştir. Litaratürde Türkiye’de SMD yöntemi ile kolistin için MİK değeri saptayan bazı çalışmalar bulunmaktadır (134-137) .

Yiş’in (134) 2018 yılında yayımladığı çalışmasında, karbapeneme dirençli 108 *K. pneumoniae*, 9 *E. coli* ve 2 *E. cloacae* izolatının SMD yöntemi ile MİK değerleri belirlenmiş ve sonuçlar otomatize sistemin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. SMD sonuçlarına göre izolatların 68’i (%56,20) kolistine duyarlı (57 *K. pneumoniae*, 9 *E. coli* ve 2 *E. cloacae*), 53’ü (%43,80) kolistine dirençli bulunmuştur. Dirençli bulunan izolatların tamamının *K. pneumoniae* olduğu belirlenmiştir. Otomatize sistem sonuçlarına göre ise, izolatların 75’i (%61,98) kolistine duyarlı (64 *K. pneumoniae*, 9 *E. coli* ve 2 *E. cloacae*) ve 46’sı (%38,02) kolistin dirençli bulunmuştur. Yine dirençli izolatların tamamının *K. pneumoniae* olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda ÇBH %10,74, BH %4,96 ve KU %84,3 olarak hesaplanarak otomatize sistemle %15,70 oranında hatalı sonuç verilebildiğini bildirmişlerdir.

Koçak ve ark.’nın (135) yaptığı çalışmada Eylül-Aralık 2018 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen karbapeneme dirençli 81 *K. pneumoniae* izolatının kolistine duyarlılığının saptanması amacıyla SMD yöntemi kullanılmış ve izolatların %39,51’i kolistine dirençli olarak saptanmıştır.

Beşli ve ark.’nın (136), 2022 yılında yayımladığı çalışmalarında, kandan izole edilen 301 izolatın (105 *E.coli* ve 196 *K.pneumoniae*) kolistine duyarlılıkları ve MİK değerleri SMD yöntemi ile tespit edilmiştir. Çalışmaya göre, *E.coli* izolatları %2,9; *K.pneumoniae* izolatları ise %28,6 oranında kolistine dirençli bulunmuştur.

Çalışmamızın sonucunda karbapeneme dirençli 85 *K. pneumoniae* suşunun %80’i kolistine dirençli olarak tespit edilmiştir. Belirli bir antibiyotiğe dirençli bakteri grubunu seçmeden SMD yöntemiyle kolistin direncini araştıran çalışmanın (136) yanı sıra çalışmamıza benzer şekilde KRKP izolatları ile çalışan Koçak ve ark. ile Yiş’in (134, 135) sonuçlarına göre de saptadığımız kolistin direnci çok yüksektir. Bu durum

büyük olasılıkla izolatlarımızın bir kısmının antibiyotiğin yoğun kullanıldığı pandemi dönemindeki hastalara ait olmasından kaynaklı olabilir.

Ülkemizde FCM yöntemi kullanılarak yapılan antimikrobiyal duyarlılık çalışması çok az sayıdadır. Literatürde bulunan birkaç çalışmadan biri olan Duyan ve ark. (77)'nin GSBL üreten 38 (29 *E. coli*, 9 *K. pneumoniae*), GSBL üretmeyen 10 (5 *E. coli*, 5 *K. pneumoniae*) izolat, üç pozitif ve iki negatif kontrol suşu ile yaptıkları çalışmada izolatların tanımlanması ve ADT Phoenix 100 otomatize sistem ile yapılmıştır. Bakterilerdeki GSBL pozitifliği, çift disk sinerji testi ve gradiyent strip test (GST) ile saptanmıştır. GSBL pozitif suşlarda β -laktamaz genlerinin varlığı ise PCR yöntemiyle gösterilmiştir. Çalışmada sefotaksim (CTX), seftazidim (CAZ) ve klavulanik asit (CLA) ile çalışılmış, floresan boya olarak ise DiBAC₄(3) tercih edilmiştir. Elde edilen verilere göre sefalosporin + CLA kombinasyonu (CAZ + CLA veya CTX + CLA) ile muamele edildiğinde ölen hücrelerin yüzdeleri, sadece sefalosporin (CAZ veya CTX) ile muamele sonrası ölen hücrelerin yüzdelere ayrı ayrı oranlanmış, ayrıca CAZ ve CTX için CLA indeks değeri (CAZ-CLA ve CTX-CLA endeks) elde edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, GSBL pozitif izolatlarda CTX-CLA ve CAZ-CLA indeksinin GSBL negatif izolatlara göre anlamlı oranda yüksek olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar, FCM yönteminin hem daha ekonomik olduğunu hem de iki saat gibi kısa bir süre içinde hızlı ve güvenilir GSBL tanımlaması yapabildiğini vurgulamışlardır.

Türkiye'deki bir diğer çalışma ise Kılıç ve ark. (137) tarafından yapılmıştır. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 174 *K. pneumoniae* suşu (87 karbapeneme dirençli ve 87 karbapeneme duyarlı) otomatize MALDI-TOF MS ve Phoenix sistemi ile tanımlanmış ve karbapenem direncinin saptanmasında Phoenix ve gradient test (E-test) yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada CLSI ve EUCAST tarafından test koşulları standardize edilmemiş olan gradient test yöntemi "standart yöntem" olarak kabul edilmiştir. Direnç genlerinin varlığı ise PCR yöntemiyle gösterilmiştir. Meropenemin denendiği FCM yönteminde öncelikle optimizasyon çalışması yapılmış ve antibiyotik içermeyen tüp cihazda okutulmuştur; bu şekilde bakterinin otofloresansı değerlendirilmiştir. Bu çalışmada boya olarak canlı ve ölü hücreleri birlikte boyayan TO ve sadece canlı hücreleri boyayan PI floresan boyaları seçilmiş ve her iki boya birlikte kullanılmıştır. Canlı bakterilerin ayrımı için yapılan ROC analizi sonucunda elde edilen AUC değerine (0,990) göre, FCM yönteminde TO ve PI boyalarının birlikte

kullanılmasıyla canlı/ölü ayrımının net bir şekilde yapılabildiği, FCM yöntemi ile E-test arasındaki uyumun %99,4 olduğu ve sadece bir izolatta, çok büyük hatanın tespit edildiği belirtilmiş ve FCM yönteminin duyarlılığının %98,9, özgüllüğünün %100 olduğu bildirilmiştir.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde, Türkiye’de FCM yöntemi ile kolistin duyarlılık çalışması yapan ve sonuçlarını referans yöntem ile karşılaştıran başka bir çalışma bulunmamıştır. Dünyada ise araştırabildiğimiz kadarıyla bu iki yöntemi kullanarak (SMD-FCM) kolistine duyarlılık testi yapan sadece birkaç çalışma bulunmaktadır ancak FCM yöntemiyle KRKP suşlarının kolistin direncini araştıran başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Diğer mikroorganizmalarla ve antibiyotiklerle yapılan duyarlılık çalışmalarında, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek bulunan FCM yönteminin en önemli avantajı olarak özellikle vurgulanan konu; ADT sonuçlarına ulaşmanın 2-4 saat sürmesi ve aynı gün içinde sonuçların rapor edilebilmesidir. Bizim çalışmamızda da flow sitometri ile kolistin duyarlılığını saptamamız yaklaşık olarak 2 saat sürmüştür. ADT süresindeki kısılma dirençli bakterilerin hızlı bir şekilde tespit edilerek tedaviye erken başlanabilmesi ve bunun sonucunda morbidite ve mortalite oranlarında düşüşe katkı sağlaması bakımından kritik öneme sahiptir. Bunun yanında hastanede yatış süresinde kısılma, hasta bakım maliyetlerinde düşme, hekimlerin ve laboratuvar personelinin iş yükünde azalma gibi yararları olacağı açıktır.

Antibiyotik direnç profilinin hızlı ve doğru bir şekilde belirlenmesinde alternatif bir seçenek olarak FCM yönteminin rutin kullanıma uygunluğunu değerlendiren daha fazla sayıda duyarlılık çalışmasının yapılması gerekmektedir. Ayrıca, FCM yöntemi ile canlı ve ölü hücreler tespit edilebildiği için heterojen direnç analizlerinde de bu yöntem ile araştırma yapılması, buna ek olarak hastane enfeksiyonuna neden olan bakterilerle çalışılması bu alana katkı sağlayacaktır.

Birçok alanda özgüllüğü ve duyarlılığı ispatlanmış olan bu yöntemin; FCM cihazının her laboratuvarında bulunmaması, FCM ile yapılan ADT yönteminin henüz tüm laboratuvarlarda kullanılabilecek şekilde standardize edilmemiş olması ve tecrübeli personele ihtiyaç duyulması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bununla birlikte, standart yöntemle karşılaştırarak elde ettiğimiz verilere göre farklı klinik suşlar, farklı floresan boyalar ve farklı antimikrobiallerle yapılan çalışmaların artması sonucunda bu yöntemin validasyonunun tamamlanacağını ve uygun bilgisayar yazılım programlarının da desteğiyle, rutin kullanıma girme potansiyelinin yüksek olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. WHO. Antimicrobial Resistance: Global Report On Surveillance. Geneva, World Health Organization (WHO), 2014.
2. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net). Annual Epidemiological Report for 2021; Erişim 26.05.2023, https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER-EARS-Net-2021_2022-final.pdf
3. WHO. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections including tuberculosis. Geneva, World Health Organization (WHO), 2017.
4. Giamarellou H, Poulakou G. Multidrug-resistant Gram-negative infections: what are the treatment options? *Drugs* 2009; **69**:1879-1901.
5. Zhang Y, Han Y, Wang L, Kong J, Pan W, Zhang X ve ark. Flufenamic Acid, a Promising Agent for the Sensitization of Colistin-Resistant Gram-Negative Bacteria to Colistin. *Microbiology Spectrum* 2023; **11**(2): e04052-22.
6. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 33rd ed. CLSI document M100-Ed33. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2023.
7. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 13.0, 2023; Erişim 13.06.2023, http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
8. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, M07, 11st Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018.
9. Li J, Nation R, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *International journal of antimicrobial agents* 2005; **25**(1): 11-25.
10. Maciorowski Z, Chattopadhyay PK, Jain P. Basic Multicolor Flow Cytometry. *Curr Protoc Immunol*. 2017; **117**: p. 5.4.1-5.4.38.
11. Walberg M, Gaustad P, Steen HB. Rapid flow cytometric assessment of mecillinam and ampicillin bacterial susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1996; **37**(6): 1063-1075.

12. Saint-Ruf C, Crussard S, Franceschi C, Orenca S, Ouattara J, Ramjeet M ve ark. Antibiotic susceptibility testing of the Gram-negative bacteria based on flow cytometry. *Frontiers in microbiology*, 2016; **7**: 1121.
13. e Silva DF, Andrade FF, Gomes R, Silva Dias A, Martins Oliveira I, Pérez Viso B ve ark. Ultra-rapid flow cytometry assay for colistin MIC determination in Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2020; **26(11)**: 1559-e1.
14. Mulrone KT, Hall JM, Huang X, Turnbull E, Bzdyl NM, Chakera A ve ark. Rapid susceptibility profiling of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Nature* 2018; Apr; 24: **8(1)**: 6697.
15. Mason DJ, Allman R, Stark JM, Lloyd D. Rapid estimation of bacterial antibiotic susceptibility with flow cytometry. *Journal of Microscopy* 1994; **176(1)**: 8-16.
16. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editor. *Mendell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 9th ed. Philadelphia, USA: Elsevier; 2020.
17. Ristuccia PA, Cunha BA. *Klebsiella*, *Infection Control & Hospital Epidemiology*; 1984. **5(7)**: 343-347.
18. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews* 1998; **11(4)**: 589-603.
19. Jorgensen JH, Pfaller MA, editor. *Manual of clinical microbiology* (Vol. 1). 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press; 2015.
20. Murphy CN, Mortensen MS, Krogfelt KA, Clegg S. Role Of *Klebsiella pneumoniae* Type 1 And Type 3 Fimbriae In Colonizing Silicone Tubes Implanted Into The Bladders Of Mice As A Model Of Catheter-Associated Urinary Tract Infections. *Infection and immunity* 2013; **81(8)**: 3009-3017.
21. Bachman MA, Lenio S, Schmidt LA, Oyler JE, Weiser JN. Interaction of Lipocalin 2, Transferrin, and Siderophores Determines the Replicative Niche of *Klebsiella pneumoniae* during Pneumonia. *mBio*. 2012; **3**.
22. Russo TA, Olson R, MacDonald U, Beanan J, Davidson BA. Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enables the growth/survival of

hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* ex vivo and in vivo. *Infection and immunity* 2015; **83(8)**: 3325-3333.

23. Bachman MA, Miller VL, Weiser JN. Mucosal lipocalin 2 has pro-inflammatory and iron-sequestering effects in response to bacterial enterobactin. *PLoS Pathog.* 2009; 5: e1000622.

24. Whitefield C, Vo Y, Schwartz BD, Hepburn C, Ahmed FH, Onagi H et al. The complex inhibitory mechanism of glycomimetics with human heparanase. *bioRxiv* 2023; 2023-01.

25. Wong JL, Romano M, Kerry LE, Kwong HS, Low WW, Brett SJ, Frankel G. OmpK36-mediated carbapenem resistance attenuates ST258 *Klebsiella pneumoniae* in vivo. *Nature communications* 2019; **10(1)**: 3957.

26. Goodarzi NN, Fereshteh S, Sabzi S, Shahbaz, S, Badmasti F. Construction of a chimeric FliC including epitopes of OmpA and OmpK36 as a multi-epitope vaccine against *Klebsiella pneumoniae*. *Health Biothechnology and Biopharma* 2021; **5**: 44-60.

27. Centeleghe I, Norville P, Hughes L, Maillard JY. *Klebsiella pneumoniae* survives on surfaces as a dry biofilm. *American Journal of Infection Control* 2023.

28. Chan GCF, Chan S, Ho PL, Ha SY. Effects of chelators (deferoxamine, deferiprone and deferasirox) on the growth of *Klebsiella pneumoniae* and *Aeromonas hydrophila* isolated from transfusion-dependent thalassemia patients. *Hemoglobin* 2009; **33(5)**: 352-360.

29. Jarvis WR, Munn VP, Highsmith AK, Culver DH, Hughes JM. The epidemiology of nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 1985; **6(2)**: 68-74.

30. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2020; **17(17)**: 6278.

31. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983; **11(6)**:315-7.

32. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2004; 48(1): 15-22.

33. World Health Organization. Regional Office for Europe. Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance: Annual report 2018. World Health Organization. Regional Office for Europe. 2018.
34. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J ve ark. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases* 2016; **16(2)**: 161-168.
35. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011; **55(11)**: 4943-4960.
36. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ ve ark. Comparative review of the carbapenems. *Drugs* 2007; **67**: p.1027-1052.
37. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm!. *Trends Mol Med* 2012; **18(5)**: p. 263-72.
38. Martínez-Martínez L, Pascual A, Hernández-Allés S, Alvarez-Díaz D, Suárez AI, Tran J ve ark. Roles of β -lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1999; **43(7)**: 1669-1673.
39. Suay-García B, Pérez-Gracia MT. Present and future of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) infections. *Antibiotics* 2019; **8(3)**: 122.
40. 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. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2013; **57(9)**: 4449-4462.
41. Falagas ME, Kasiakou SK, Saravolatz LD. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clinical infectious diseases* 2005; **40(9)**: 1333-1341.
42. Michael J, Satlin MJ. The Search for a Practical Method for Colistin Susceptibility Testing: Have We Found It by Going Back to the Future? *J Clin Microbiol* 2019; **57(2)**: e01608-18.
43. Suzuki T, Hayashi K, Fujikawa K, Tsukamoto K. The Chemical Structure of Polymyxin E: The Identities of Polymyxin E1 with Colistin A and of Polymyxin E2 with Colistin B. *The Journal of Biochemistry* 1965; **57(2)**: 226-227.

44. Jerke KH, Lee MJ, Humphries RM. Polymyxin susceptibility testing: a cold case reopened. *Clinical Microbiology Newsletter* 2016; **38(9)**: 69-77.
45. Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas MV, Ozdamar M, Türkoglu S ve ark. The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2015; **70(1)**: 75-80.
46. Wright MS, Suzuki Y, Jones MB, Marshall SH, Rudin SD, van Duin D ve ark. Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2015; **59(1)**: 536-543.
47. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological chemistry* 1969; **244(22)**: 6049-6055.
48. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS): the detection and reporting of colistin resistance, 2nd ed. 2021.
49. Bardet L, Rolain JM. Development of New Tools to Detect Colistin-Resistance among Enterobacteriaceae Strains. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiolog* 2018; 1–25.
50. Kline KE. Investigation of first identified mcr-1 gene in an isolate from a US patient Pennsylvania. *Morbidity and mortality weekly report* 2016; 65.
51. Skov RL, Monnet DL. Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, the story unfolds. *Eurosurveillance* 2016; **21(9)**: 30155.
52. Shen Z, Wang Y, Shen Y, Shen J, Wu C. Early emergence of mcr-1 in *Escherichia coli* from food-producing animals. *The Lancet infectious diseases* 2016; **16(3)**: 293.
53. Haenni M, Poirel L, Kieffer N, Châtre P, Saras E, Métayer V ve ark. Co-occurrence of extended spectrum β lactamase and MCR-1 encoding genes on plasmids. *The Lancet infectious diseases* 2016; **16(3)**: 281-282.
54. Poirel L, Kieffer N, Brink A, Coetze J, Jayol A, Nordmann P. Genetic features of MCR-1-producing colistin-resistant *Escherichia coli* isolates in South Africa. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2016; **60(7)**: 4394-4397.
55. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Colistin Breakpoints Guidance document version 12.0, 2022.

56. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. 2016.
57. Osei Sekyere J. Mcr Colistin Resistance Gene: A Systematic Review of Current Diagnostics and Detection Methods. *MicrobiologyOpen* 2018; **8(4)**.
58. Karvanen M, Malmberg C, Lagerbäck P, Friberg LE, Carsa O. Colistin Is Extensively Lost During Standard in Vitro Experimental Conditions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2017; **61(11)**.
59. Puttaswamy S, Gupta SK, Regunath H, Smith LP, Sengupta S. A comprehensive review of the present and future antibiotic susceptibility testing (AST) systems. *Arch Clin Microbiol.* 2018; Vol No: 9 Iss No:3:83.
60. Wenzler E, Maximos M, Asempa TE, Biehle L, Schuetz AN, Hirsch EB. Antimicrobial susceptibility testing: An updated primer for clinicians in the era of antimicrobial resistance: Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. Pharmacotherapy. *The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 2023; **43(4)**: 264-278.
61. Simner PJ, Bergman Y, Trejo M, Roberts AA, Marayan R, Tekle T ve ark. Two-site evaluation of the colistin broth disk elution test to determine colistin in vitro activity against Gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology* 2019; **57(2)**: e01163-18.
62. Humphries RM, Green DA, Schuetz AN, Bergman Y, Lewis S, Yee R ve ark. Multicenter evaluation of colistin broth disk elution and colistin agar test: a report from the Clinical and Laboratory Standards Institute. *Journal of clinical microbiology* (2019); **57(11)**: e01269-19.
63. 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)**: 885-890.
64. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 2013; **51**: 1678–84.
65. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews.* 2017; **30(2)**: p. 557-596.

66. Sanders CC, Peyret M, Moland ES, Cavalieri SJ, Shubert C, Thomson KS ve ark. Potential impact of the VITEK 2 system and the Advanced Expert System on the clinical laboratory of a university-based hospital. *Journal of clinical microbiology* 2001; **39(7)**: 2379-2385.
67. Tan TY, Ng SY. Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. *Clinical Microbiology and Infection* 2007; **13(5)**: 541–544.
68. Chew KL, La MV, 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. *Journal of Clinical Microbiology* 2017; **55(9)**: p. 2609-2616.
69. Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases* 2009; **49(11)**: 1749-1755.
70. Pfennigwerth N, Kaminski A, Korte-Berwanger M, Pfeifer Y, Simon M, Werner G ve ark. Evaluation of six commercial products for colistin susceptibility testing in Enterobacterales. *Clin Microbiol Infect* 2019; **25(11)**: 1385-1389.
71. Posteraro B, De Carolis E, Vella A, Sanguinetti M. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. *Expert review of proteomics* 2013; **10(2)**: 151-64.
72. Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G, Bogaerts P, Lamar E, Glupczynski Y ve ark. Efficient detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption ionization– time of flight mass spectrometry in less than 30 minutes. *Journal of clinical microbiology* 2015; **53(7)**: 2163-2171.
73. Dortet L, Bonnin RA, Pennisi I, Gauthier L, Jousset AB, Dabos L ve ark. Rapid detection and discrimination of chromosome- and MCR-plasmid-mediated resistance to polymyxins by MALDI-TOF MS in Escherichia coli: the MALDIxin test. *J Antimicrob Chemother* 2018; **73**: 3359–3367.
74. Hayden R., Clinton LK, Hewitt C, Koyamatsu T, Sun Y, Jamison G ve ark. Rapid antimicrobial susceptibility testing using forward laser light scatter technology. *Journal of clinical microbiology* 2016; **54(11)**: 2701-2706.
75. Betters DM. Use of flow cytometry in clinical practice. *Journal of the advanced practitioner in oncology* 2015; **6(5)**: 435.

76. Velican AM, Măruțescu L, Kamerzan C, Cristea VC, Banu O, Borcan E, Chifiriuc MC. Rapid detection and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* by flow cytometry. *Microorganisms* 2020; **8(8)**: 1233.
77. Duyan S, Kılıç A, Yılmaz S, Ardiç N. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazların Akım Sitometrisi Yöntemiyle Hızlı Tespiti. *Mikrobiyol Bul* 2015; **49(4)**: 600-608.
78. Gucker F., O'Konski CT, Pickard HB, Pitts JN. A Photoelectronic Counter for Colloidal Particles1. *Journal of the American Chemical Society* 1947; **69(10)**: 2422–2431.
79. Han Y, Gu Y, Zhang AC, Lo YH. Imaging technologies for flow cytometry. *Lab on a Chip* 2016; **16(24)**: 4639-4647.
80. Van Dilla MA, Fulwyler MJ, Boone IU. Volume distribution and separation of normal human leucocytes. *Exp. biol. med.* 1967; **125 (2)**: 367-70.
81. Fulwyler MJ. Status quo in flow-through cytometry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1974; **22(7)**: 605-606.
82. Human RP, Rowe GD. Automated screening for bacteriuria. *Med Lab Sci* 1987; **35**: 223.
83. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology* 2017; **37(2)**: 163-176.
84. Davey HM, Kell DB. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiological reviews* 1996; **60(4)**: 641-696.
85. Salzman GC. Light Scatter: Detection and Usage. *Current Protocols in Cytometry* 2001.
86. Diaz M, Herrero M, García LA, Quirós C. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical engineering journal* 2010; **48(3)**: 385-407.
87. Gelmez MY, Deniz G. Akan Hücre Ölçer ve Kullanım Alanları. *ÜCD Güncelleme Serileri* 2020; Nisan; Cilt: 9, Sayı: 2, p: 9-13.
88. Van der Waaij LA, Mesander G, Limburg PC, Van der Waaij D. Direct flow cytometry of anaerobic bacteria in human feces. *Cytometry. The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 1994; **16(3)**: 270-279.

89. Üzmez E, Yağcı S, Yücel M, Keseroğlu BB, Karakoç AE, Dinç B. İdrarda Lökosit/Bakteri Analizi Yapan Akım Sitometri Cihazı Sonuçları ile İdrar Kültürü Sonuçlarının Karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2018; **48(1)**: 78-85.
90. Gadalla R, Noamani B, MacLeod BL, Dickson RJ, Guo M, Xu W ve ark. Validation of CyTOF against flow cytometry for immunological studies and monitoring of human cancer clinical trials. *Frontiers in oncology* 2019; **9**: 415.
91. Darzynkiewicz Z, Huang X, Zhao H. Analysis of Cellular DNA Content by Flow Cytometry. *Current Protocols in Cytometry* 2017; 7.5.1–7.5.20.
92. Doležel J, Greilhuber J, Suda J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature protocols* 2007; **2(9)**: 2233-2244.
93. de Oliveira GP, Zigon E, Rogers G, Davodian D, Lu S, Jovanovic-Talisman T ve ark. Detection of extracellular vesicle RNA using molecular beacons. *Iscience* 2020; **23(1)**.
94. Rigottier Gois L, Le Bourhis AG, Geneviève G, Rochet V, Doré J. Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. *FEMS microbiology ecology* 2003; **43(2)**: 237-245.
95. McSharry JJ. Uses of flow cytometry in virology. *Clinical Microbiology Reviews* 1994; **7(4)**: 576-604.
96. Brussaard CP, Marie D, Bratbak G. Flow cytometric detection of viruses. *Journal of virological methods* 2000; **85(1-2)**: 175-182.
97. Carenza C, Franzese S, Calcaterra F, Mavilio D, Della Bella S. Comprehensive phenotyping of dendritic cells in cancer patients by flow cytometry. *Cytometry Part A* 2021; **99(3)**: 218-230.
98. Park LM, Lannigan J, Jaimes MC. OMIP-069: Forty-color full spectrum flow cytometry panel for deep immunophenotyping of major cell subsets in human peripheral blood. *Cytometry Part A* 2020; **97(10)**: 1044-1051.
99. Uçak ŞC, Torun M. Epstein-Barr virüs enfeksiyonu olan hastalardan alınan, IL-2 ile üretilen T hücrelerinin kontrollerle karşılaştırılması. *Anadolu Güncel Tıp Dergisi* 2019; **1(2)**: 23-25.
100. Ganji A, Farahani I, Khansarinejad B, Ghazavi A, Mosayebi G. Increased expression of CD8 marker on T-cells in COVID-19 patients. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2020; **83**: 102437.

101. Chen X, Zhao X, Deng Y, Bu X, Ye H, Guo N. Antimicrobial potential of myristic acid against *Listeria monocytogenes* in milk. *The Journal of Antibiotics* 2019; **72(5)**: 298-305.
102. D' Haese E, Nelis HJ. Rapid detection of single cell bacteria as a novel approach in food microbiology. *Journal of AOAC International* 2002; **85(4)**: 979-983.
103. Kempf VA, Mändle T, Schumacher U, Schäfer A, Autenrieth IB. Rapid detection and identification of pathogens in blood cultures by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *International journal of medical microbiology* 2005; **295(1)**: 47-55.
104. Bleichrodt RJ, Read ND. Flow cytometry and FACS applied to filamentous fungi. *Fungal Biology Reviews* 2019; **33(1)**: 1-15.
105. Klawonn I, Dunker S, Kagami M, Grossart HP, Van den Wyngaert S. Intercomparison of two fluorescent dyes to visualize parasitic fungi (Chytridiomycota) on phytoplankton. *Microbial ecology* 2023; **85(1)**: 9-23.
106. Scott LC, Aubee A, Wilson MJ, Esser S, Descamps D, Lee N ve ark. Leave No Trace? Ecological and anthropogenic determinants of antibiotic resistant bacteria in a recreational alpine environment. *Environmental Research* 2023; 216: 114617.
107. Troussellier M, Courties C, Vaquer A. Recent applications of flow cytometry in aquatic microbial ecology. *Biology of the Cell* 1993; **78(1-2)**: 111–121.
108. El Mujtar VA, Chirido F, Lagares A, Wall L, Tittonell P. Soil bacterial biodiversity characterization by flow cytometry: The bottleneck of cell extraction from soil. *Methods in Ecology and Evolution* 2022; **13(7)**: 1388-1401.
109. Rieseberg M, Kasper C, Reardon KF, Scheper T. Flow cytometry in biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology* 2001; **56**: 350-360.
110. Boi P, Manti A, Pianetti A, Sabatini L, Sisti D, Rocchi MB ve ark. Evaluation of *Escherichia coli* viability by flow cytometry: a method for determining bacterial responses to antibiotic exposure. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 2015; **88(3)**: 149-153.
111. Hiramatsu K, Ideguchi T, Yonamine Y, Lee S, Luo Y, Hashimoto K ve ark. High-throughput label-free molecular fingerprinting flow cytometry. *Science advances* 2019; **5(1)**: eaau0241.

112. Alvarez-Barrientos A, Arroyo J, Cantón R, Nombela C, Sánchez-Pérez M. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews* 2000; **13(2)**: 167-195.
113. Tavenier AH, de Boer FJ, Moshaver B, van der Leur SJ, Stegeman CA, Groeneveld PH. Flow cytometric analysis of viable bacteria in urine samples of febrile patients at the emergency department. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 2018; **94(5)**: 845-851.
114. Thermo Fisher Scientific Inc., 2023; Erişim 13.06.2023, <https://www.thermofisher.com/search/browse/category/tr/en/90332002>.
115. Diaper JP, Tither K, Edwards C. Rapid assessment of bacterial viability by flow cytometry. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1992; **38**: 268-272.
116. Cayman chemical, 2023; Erişim 24.05.2023, <https://cdn.caymanchem.com/cdn/insert/33924.pdf>
117. Biomeriux, 2022; Erişim 24.05.2023, <https://www.biomerieux.com.tr/>
118. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 32nd ed. CLSI supplement M100, Wayne PA. 2022.
119. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 11.0, 2021.
120. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 31st ed. CLSI supplement M100, Wayne PA. 2021.
121. Yumrutaş Ö, Pehlivan M, Güven C, Bozgeyik I, Bozgeyik E, Yumrutaş P ve ark. Investigation of cytotoxic effect of salvia pilifera extracts and synthetic chlorogenic and caffeic acids on DU145 prostate cancer cells line. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi* 2018; **21(2)**: 141-147.
122. Baş T. Anket Nasıl Hazırlanır, Uygulanır, Değerlendirilir? *Seçkin Yayıncılık, Ankara*. 2006; p.171-195.
123. Köksal SS. Epidemiyoloji, *Halk Sağlığı Ders Kitabı*, İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 2008; pp.46-144.
124. Elder BL. Verification and validation of procedures in the clinical microbiology laboratory. *Clinical Microbiology Newsletter* 1997; **19(20)**: 153–156.
125. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical microbiology reviews* 2007; **20(3)**: 440-458.

126. Woodford N, Tierno Jr PM, Young K, Tysall L, Palepou MFI, Ward E ve ark. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York medical center. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2004; **48(12)**: 4793-4799.
127. Ulusal Antibiyotik Direnç Sürveyans Sistemi (Uamdss) 2016 Yıllık Raporu., 2016; Erişim 25.05.2023,
https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji_Referans_Laboratuvarlari_ve_Biyolojik_Urunler_DB/uamdss/yillik_raporlar/UAMDSS_2016_Rapor.pdf
128. Dortet L, Potron A, Bonnin RA, Plesiat P, Naas T, Filloux A ve ark. Rapid detection of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* using MALDI-TOF-based lipidomics on intact bacteria. *Sci Rep.* 2018; **8(1)**: 16910.
129. Turlej-Rogacka A, Xavier BB, Janssens L, Lammens C, Zarkotou O, Pournaras S ve ark. Evaluation of colistin stability in agar and comparison of four methods for MIC testing of colistin. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2018; **37**: 345-353.
130. Faria-Ramos I, Espinar MJ, Rocha R, Santos-Antunes J, Rodrigues AG, Canto'n R ve ark. A Novel flow cytometric assay for rapid detection of extended-spectrum beta-lactamase. *Clin Microbiol Infect* 2013; **19(1)**: E8-E15.
131. Syal K, Mo M, Yu H, Iriya R, Jing W, Guodong S ve ark. Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests. *Theranostics* 2017; **7(7)**:1795.
132. Suller MT, Stark JM, Lloyd D. A flow cytometric study of antibiotic-induced damage and evaluation as a rapid antibiotic susceptibility test for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 1997; **40(1)**: 77-83.
133. e Silva DF, Silva-Dias A, Gomes R, Martins-Oliveira I, Ramos MH, Rodrigues AG ve ark. Evaluation of rapid colistin susceptibility directly from positive blood cultures using a flow cytometry assay. *International journal of antimicrobial agents* 2019; **54(6)**: 820-823.
134. Yiş R. Karbapenem dirençli Enterobacterales (KDE) izolatlarında kolistin duyarlılığını ne kadar doğru saptıyoruz? *XXXVIII Türk Mikrobiyoloji Kongresi*, 4-8 Kasım 2018, Antalya; 2018: SS-039.
135. Özkul Koçak C, Hazırolan G. Karbapeneme Dirençli *Klebsiella pneumoniae* Klinik İzolatlarında Kolistin Direnci. *Türk Mikrobiyoloji Cem Derg* 2019; **49(1)**.

136. Bešli Y, Liste Ü, Kırbaş E, Sancak B. Escherichia coli ve Klebsiella pneumoniae İzolatlarında Kolistin Duyarlılığının Belirlenmesinde ResaPolymyxin NP Testinin Kullanımı. *Mikrobiyol Bul* 2022; **56(2)**: 349-356.
137. Kilic A, Dogan E, Kaya S, Oren S, Tok D, Ardic N ve ark. Rapid Identification of Klebsiella pneumoniae by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and Detection of Meropenem Resistance by Flow Cytometric Assay. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2016; **30(6)**: 1191-1197.



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KARBAPENEME DİRENÇLİ KLEBSIELLA PNEUMONIAE SUŞLARINDA KOLİSTİN DİRENCİNİN FLOW SİTOMETRİ YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Yazar Şafak Ceren Uçak

Gönderim Tarihi: 20-Haz-2023 02:26PM (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 2119649776

Dosya adı: DI_RENCI_NI_N_FLOW_SI_TOMETRI_YO_NTEMI_I_LE_ARAS_TIRILMASI.pdf (5.16M)

Kelime sayısı: 20404

Karakter sayısı: 138874

KARBAPENEME DİRENÇLİ KLEBSIELLA PNEUMONIAE SUŞLARINDA KOLİSTİN DİRENCİNİN FLOW SİTOMETRİ YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 17 BENZERLİK ENDEKSİ	% 16 İNTERNET KAYNAKLARI	% 5 YAYINLAR	% 3 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
----------------------------------	------------------------------------	------------------------	--------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 8
2	acikerisim.sakarya.edu.tr İnternet Kaynağı	% 2
3	acikerisim.dicle.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
7	lnu.diva-portal.org İnternet Kaynağı	<% 1
8	www.turkishjic.org İnternet Kaynağı	<% 1