

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ



TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Klebsiella pneumoniae SUŞLARINDA KOLİSTİN DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI
VE YÖNTEM KARŞILAŞTIRILMASI

DR. AYÇA AYDIN UYSAL

DANIŞMAN
PROF. DR. ALPER TÜNGER

İZMİR 2023

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Klebsiella pneumoniae SUŞLARINDA KOLİSTİN DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI
VE YÖNTEM KARŞILAŞTIRILMASI

DR. AYÇA AYDIN UYSAL

DANIŞMAN
PROF. DR. ALPER TÜNGER

İZMİR 2023

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimimin ilk gününden bugüne kadar engin bilgileriyle beni aydınlatan, tez sürecimdeki her hatamda sonsuz sabrı ve anlayışla beni daha çok çalışmaya motive eden, her daim fikirlerime değer verdiğini hissettiren çok sevgili ve saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Alper TÜNGER'e,

Bu süreçte eğitimime katkıda bulunan, bilgi birikimleri ve deneyimlerini aktararak beni meslek hayatına hazırlayan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki kıymetli hocalarıma,

İş ahlakı ve mesleğe saygısını her daim örnek aldığım, arkadaşım, kıdemlim ve hocam Dr. Öğr. Üyesi Melike YAŞAR DUMAN'a,

Asistanlık serüvenimizdeki nice zorluklara ve pandemi dönemine birlikte göğüs gerdiğimiz, başta Uzm. Dr. Tansu AYDOĞAN olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma,

Memduh ÖZDEMİR, Şenay YILDIRIM, Ergül UTKUN ve Yüksel ELMAS özelinde, pratik bilgilerini ve tecrübelerini her daim benimle paylaşan, bir ekibin parçaları olarak birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm laboratuvar ekibimize,

Bugünlere gelebilmem için çok çaba sarf eden, beni her zaman destekleyen, emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim canım annem Saadet AYDIN ve biricik babam Selim AYDIN'a; ailemizin miniği, sırdaşım, kardeşim Dr. Ezgi Sena AYDIN'a,

Güzel günleri birlikte kutlayıp kötü günleri omuz omuza atlattığım, hayatın her anını kendisiyle yaşamaktan keyif aldığım, bugünüm ve geleceğim sevgili eşim Uzm. Dr. Nusret UYSAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ayça AYDIN UYSAL

İzmir-2023

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|----------|
| ÖNSÖZ..... | 0 |
| İÇİNDEKİLER..... | i |
| ÖZET..... | iv |
| ABSTRACT | v |
| TABLolar LİSTESİ..... | vi |
| ŞEKİLLER LİSTESİ..... | vii |
| KISALTMALAR LİSTESİ | viii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2.GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 4 |
| 2.1.1. Tarihçe ve sınıflandırma..... | 4 |
| 2.1.2. Mikrobiyolojik özellikler..... | 4 |
| 2.1.3. Virülans faktörleri..... | 4 |
| 2.1.3.1. Kapsül | 4 |
| 2.1.3.2. Fimbriya..... | 5 |
| 2.1.3.3. Lipopolisakkarit (LPS)..... | 5 |
| 2.1.3.4. Siderofor..... | 5 |
| 2.1.4. Sebep olduğu enfeksiyonlar..... | 5 |
| 2.1.5. Tedavi ve antibiyotik direnci | 5 |
| 2.2. Kolistin (Polimiksin E) | 6 |
| 2.2.1. Kimyasal yapı | 7 |
| 2.2.2. Farmakokinetik ve farmakodinamik özellikler..... | 8 |
| 2.2.3. Etki mekanizması..... | 8 |
| 2.2.4. Etki spektrumu..... | 9 |
| 2.2.5. Klinik kullanım | 10 |
| 2.2.6. Toksikite ve yan etkiler..... | 11 |
| 2.2.7. Kolistine karşı gelişen direnç mekanizmaları..... | 12 |
| 2.2.7.1. LPS modifikasyonları ile direnç gelişimi..... | 12 |
| 2.2.7.2. LPS sentez geni mutasyonları ile direnç gelişimi..... | 15 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.7.3. Dış zar proteinlerinin ekspresyonundaki değişiklikler ile direnç gelişimi..... | 16 |
| 2.2.7.4. Kapsül formasyonları ile direnç gelişimi | 16 |
| 2.2.7.5. Plazmid aracılı direnç gelişimi | 17 |
| 2.2.7.6. Heterorezistans | 17 |
| 2.2.8. Kolistin duyarlılığı saptanmasında denenen antibiyotik duyarlılık test yöntemleri | 18 |
| 2.2.8.1. Dilüsyon temelli yöntemler | 18 |
| 2.2.8.1.1. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi..... | 19 |
| 2.2.8.1.2. Sıvı makrodilüsyon yöntemi | 19 |
| 2.2.8.1.3. Agar dilüsyon yöntemi | 19 |
| 2.2.8.1.4. Sıvı mikrodilüsyon temelli ticari yöntemler | 20 |
| 2.2.8.2. Standart duyarlılık testleri | 20 |
| 2.2.8.2.1. Manuel yöntemler..... | 20 |
| 2.2.8.2.2. Otomatize sistemler | 21 |
| 2.2.8.3. Kolistin sıvı disk elüsyon yöntemi (CBDE)..... | 21 |
| 2.2.8.4. Hızlı kalitatif yöntemler | 22 |
| 2.2.8.5. Seçici besiyerleri ile kültür..... | 22 |
| 2.2.8.6. Fosfoetanolamin transferaz aktivitesini saptayan yöntemler | 23 |
| 2.2.8.7. Genotipik yöntemler | 23 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 26 |
| 3.1. Çalışma tasarımı | 26 |
| 3.2. Çalışma grubu..... | 26 |
| 3.3. Kültür ve tanımlama | 26 |
| 3.4. Bakteri suşlarının saklanması ve canlandırılması..... | 26 |
| 3.5. Antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanması | 26 |
| 3.5.1. Referans BMD yönteminin uygulanması | 26 |
| 3.5.1.1. CA-MHB besiyerinin hazırlanması | 27 |
| 3.5.1.2. Antibiyotik stok solüsyonunun hazırlanması | 27 |
| 3.5.1.3. Bakteri inokülumunun hazırlanması..... | 27 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5.1.4. Yöntemin uygulanışı..... | 27 |
| 3.5.1.5. MİK değerlerinin belirlenmesi | 28 |
| 3.5.2. Otomatize sistem VITEK® 2 ile kolistin duyarlılığının belirlenmesi..... | 28 |
| 3.5.3. BMD temelli ticari Sensititre™ yönteminin uygulanması | 28 |
| 3.5.4. Kolistin sıvı disk elüsyon yönteminin (CBDE) uygulanması..... | 28 |
| 3.5.5. Gradyent test yönteminin uygulanması..... | 29 |
| 3.5.6. Real Time PCR yöntemi ile <i>mcr</i> genlerinin saptanması | 29 |
| 3.5.6.1. Nükleik asit izolasyonu..... | 29 |
| 3.5.6.2. PCR reaksiyonunun kurulması | 29 |
| 3.5.6.3. Örneklerin cihaza yüklenmesi ve reaksiyonun başlatılması | 30 |
| 3.5.6.4. Sonuçların yorumlanması..... | 30 |
| 3.6. İstatistiksel parametreler..... | 31 |
| 3.7. Etik Kurul..... | 32 |
| 3.8. Bütçe desteği | 32 |
| 4. BULGULAR..... | 33 |
| 5. TARTIŞMA..... | 38 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 50 |
| 7. KAYNAKLAR | 52 |
| 8. EKLER..... | 68 |

ÖZET

Giriş ve amaç: Son yıllarda, yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) yatan hastalarda, yüksek oranda morbidite ve mortalite ile seyreden, nozokomiyal enfeksiyonlara sebep olabilen gram negatif bakterilerde çoklu ilaç direnci görülmeye başlanması, geçtiğimiz on yıllık süreçte eski bir antibiyotik olan kolistin klinik kullanımda tekrar yer bulmasına neden olmuştur. Bu yaygın kullanımın bir sonucu olarak enfeksiyon etkeni bakterilerde bu ilaca karşı da direnç gelişimi izlenmeye başlamıştır. İlacın potansiyel yan etkileri de göz önüne alındığında etkenlerin kolistin duyarlılığının belirlenebilmesi önemli bir mesele olarak görülmektedir. Sunulan çalışmanın amacı Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda incelenen kan kültürü örneklerinde üreyen *K. pneumoniae* suşlarındaki kolistin direnç oranlarını belirleyerek epidemiyolojik veri elde etmek ve kolistin duyarlılığı belirlenmesinde altın standart yöntem olarak belirlenmiş ancak uygulanması zor bir yöntem olan sıvı mikrodilüsyon (BMD) ile alternatif yöntemleri kıyaslayarak, bu yöntemlerin rutin laboratuvar işleyişine uygunluğunu belirlemektir. Ayrıca aktarılabilen, plazmid aracılı *mobil kolistin direnci (mcr)* genlerinin, gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) yöntemi ile tespiti ve prevalansının değerlendirilmesi de hedeflenmiştir.

Gereç ve yöntem: Çalışmaya, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na, Ekim 2019-Aralık 2021 arasında kabulü yapılan kan kültürü örneklerinde üreyen 151 *K. pneumoniae* suşu dahil edildi. BMD, Sensititre™, kolistin sıvı disk elüsyon (CBDE), ETEST® ve VITEK®2 yöntemleri ile, saf kültürleri elde edilen izolatların kolistin duyarlılıkları belirlendi. Alternatif yöntemlerin BMD ile uyumları değerlendirildi. Ayrıca polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çalışma grubundaki suşlarda *mcr* gen varlığı değerlendirildi.

Bulgular: Çalışma grubunda kolistin direnç oranı %16,6 saptandı. Sensititre™, CBDE, ETEST® yöntemleri duyarlılık sonucu belirlemede BMD ile %100 uyumlu bulunurken VITEK®2'nin kategorik uyum (CA), büyük hata (ME) ve çok büyük hata (VME) oranları sırasıyla %98, %0,79 ve %8 olarak belirlendi. Sensititre™, ETEST® ve VITEK®2 yöntemleri için temel uyum (EA) değerlendirmesi yapıldı ve sırasıyla %92,7, %52,3 ve %78,1 olarak belirlendi. Suşların hiçbirinde aktarılabilen kolistin direncinden sorumlu *mcr* geni saptanmadı.

Sonuç: MDR etken enfeksiyonların tedavisinde son seçenek olarak kullanılan kolistine karşı gelişen direnç endişe vericidir. BMD'nin zor uygulanabilir bir yöntem olması sebebiyle ülkemizde ve dünyada, kolistin direnci sörveyans verileri diğer antibiyotikler için yapılan izlemlere kıyasla yetersiz kalmaktadır. Direnç oranlarının takip edildiği epidemiyolojik çalışmaların sürekli hale getirilmesi gerekmektedir. BMD'ye alternatif kullanılacak yöntemler, kontrollü çalışmalarla ilerlenerek laboratuvar rutin işleyişinde yer bulabilir. İleri dönemlerde daha fazla sayılı örneklem ve daha çeşitli bakteri gruplarıyla yapılacak yöntem karşılaştırılması çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: antibiyotik direnci, kolistin, polimeraz zincir reaksiyonu, *Klebsiella pneumoniae*

ABSTRACT

Introduction and Aim: In recent years, multidrug-resistant gram-negative bacteria which causing nosocomial infections with high rates of morbidity and mortality have emerged in intensive care units (ICUs). This has led to the reintroduction of colistin, an old antibiotic, for clinical use in the past decade. However, as a consequence of its widespread use, resistance to colistin has also started to develop among the bacterial pathogens. Considering the potential side effects of the drug, determining the susceptibility of the pathogens to colistin becomes an important issue. The aim of this study is to determine the prevalence of colistin resistance in *K. pneumoniae* strains isolated from blood culture samples received in Medical Microbiology Laboratory, Ege University Faculty of Medicine Hospital, obtain epidemiological data, and evaluate alternative methods for determining colistin susceptibility by comparing them with the gold standard method, broth microdilution (BMD), which is a challenging method to implement but has been established as the gold standard. Additionally, the detection and evaluation of the prevalence of transferable plasmid-mediated *mobile colistin resistance (mcr)* genes using the polymerase chain reaction method are also targeted.

Materials and Methods: The study included 151 *K. pneumoniae* strains, isolated from blood culture samples received at the Medical Microbiology Laboratory, Ege University Faculty of Medicine Hospital, between October 2019 and December 2021. The colistin susceptibilities of the isolates obtained from pure cultures using the BMD, Sensititre™, colistin broth disk elution (CBDE), ETEST®, and VITEK®2 methods were determined. The concordance of alternative methods with BMD was evaluated. Additionally, the presence of *mcr* genes in the study group strains was assessed using polymerase chain reaction.

Results: The colistin resistance rate in the study group was found to be 16.6%. Sensititre™, colistin broth disk elution (CBDE), and ETEST® methods showed 100% concordance with BMD in determining susceptibility results, while VITEK®2 exhibited categorical agreement (CA), major error (ME), and very major error (VME) rates of 98%, 0.79%, and 8%, respectively. Essential agreement (EA) assessment was performed for Sensititre™, ETEST®, and VITEK®2 methods, resulting in 92.7%, 52.3%, and 78.1% agreement rates, respectively. No transferable *mcr* gene which responsible for colistin resistance was detected in any of the strains.

Conclusion: The development of resistance against colistin, which is used as the last resort in the treatment of multidrug-resistant bacterial infections, is concerning. Due to the challenging implementation of the broth microdilution method (BMD), surveillance data on colistin resistance remains insufficient in our country and worldwide, compared to monitoring conducted for other antibiotics. It is necessary to establish continuous epidemiological studies that monitor resistance rates. Alternative methods to BMD can be incorporated into laboratory routines through controlled studies. In the future, there is a need for a greater number of samples and comparative studies involving diverse bacterial groups.

Keywords: antibiotic resistance, colistin, polymerase chain reaction, *Klebsiella pneumoniae*

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Hedef gen bölgelerinin primer dizileri

Tablo 2. İstatistiksel parametrelerin hesaplanması için oluşturulan çapraz tablo

Tablo 3. Sensititre™ yöntemi duyarlılık sonuçlarının sıvı mikrodilüsyon sonuçlarıyla karşılaştırılması

Tablo 4. ETEST® yöntemi duyarlılık sonuçlarının sıvı mikrodilüsyon sonuçlarıyla karşılaştırılması

Tablo 5. Kolistin sıvı disk elüsyon yöntemi duyarlılık sonuçlarının sıvı mikrodilüsyon sonuçlarıyla karşılaştırılması

Tablo 6. VITEK®2 duyarlılık sonuçlarının sıvı mikrodilüsyon sonuçlarıyla karşılaştırılması

Tablo 7. Sensititre™ ile saptanan minimum inhibitör konsantrasyon değerlerinin sıvı mikrodilüsyon ile saptananlar ile karşılaştırılması

Tablo 8. VITEK®2 ile saptanan minimum inhibitör konsantrasyon değerlerinin sıvı mikrodilüsyon ile saptananlar ile karşılaştırılması

Tablo 9. ETEST® ile saptanan minimum inhibitör konsantrasyon değerlerinin sıvı mikrodilüsyon ile saptananlar ile karşılaştırılması

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Kolistinin kimyasal yapısı

Şekil 2. Kolistinin bakteriyel membran üzerindeki etki mekanizması

Şekil 3. Kolistin direnci gelişiminde rol oynayan temel mekanizmalar

Şekil 4. Suşların genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üretim ve karbapenem direnç oranları



KISALTMALAR LİSTESİ

- AST:** Antibiyotik duyarlılık testi
- BMD:** Sıvı mikrodilüsyon
- CA:** Kategorik uyum
- Ca⁺²:** Kalsiyum
- CA-MHB:** Katyon ayarlı sıvı Mueller-Hinton
- CBDE:** Kolistin sıvı disk elüsyon
- CLSI:** Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
- CMS:** Sodyum kolistin metansülfonat
- CPS:** Kapsüler polisakkarit
- Cpx:** Konjugatif pilus ekspresyon
- CRE:** Karbapenem dirençli Enterobacteriaceae
- Da:** Dalton
- DD:** Disk difüzyon
- EA:** Temel uyum
- EMB:** Eozin metilen blue
- ESBL:** Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz
- EUCAST:** Avrupa Antimikrobik Duyarlılık Testleri Komitesi
- FDA:** Food and Drug Administration
- GİS:** Gastrointestinal sistem
- Kdo:** 3-deoksi-D-mannooktulosonik asit
- KKA:** Koyun kanlı agar
- LAMP:** Loop Aracılı İzotermal Amplifikasyon
- L-Ara4N:** 4-amino-4-deoksi-L-arabinoz
- LBJMR:** Lucie-Bardet-Jean-Marc-Rolain
- LPS:** Lipopolisakkarit
- MALDI-TOF MS:** Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry
- mcr:** Mobil kolistin direnci
- MDR:** Çoklu ilaç dirençli
- ME:** Büyük hata
- Mg⁺²:** Magnezyum
- MHA:** Mueller-Hinton Agar
- MİK:** Minimum inhibitör konsantrasyon

M-PCR: Multipleks polimeraz zincir reaksiyonu
NADH: Nikotinamid adenin dinükleotid hidrit
NPD: Negatif prediktif değer
PAP: Popülasyon Analiz Profili
PBS: Fosfat buffer salin
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
PEtN: Fosfoetanolamin
PPD: Pozitif prediktif değer
Rcs: Kapsül sentez regülatörü
RNA: Ribonükleik asit
RT-qPCR: Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
SMR: Small multidrug resistance
TCS: İki bileşenli sistem
UAMDSS: Ulusal Antimikrobiyal Direnç Süreveyans Sistemi
USHİESA: Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı
VİP: Ventilator ilişkili pnömoni
VME: Çok büyük hata
WGS: Tüm genom sekanslama
YBÜ: Yoğun bakım ünitesi

1. GİRİŞ

Gram negatif bakteriler, antibiyotiklere karşı yüksek oranda direnç geliştirebilmeleri nedeniyle dünyadaki en önemli halk sağlığı sorunları arasında yer almakta ve sıklıkla yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) yatan hastalarda, yüksek oranda morbidite ve mortalite ile seyreden, nozokomiyal enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Ülkemizde de YBÜ'deki hastalarda meydana gelen enfeksiyonlarda en sık saptanan etkenlerin gram negatif bakteriler olduğu bildirilmiştir (1, 2).

Klinik örneklerden izole edilen gram negatif bakterilerin büyük bir kısmını Enterobacterales takımı ve non-fermantatifler oluşturmaktadır (1). *Klebsiella pneumoniae*, Enterobacterales takımına ait, kapsüllü ve hareketsiz bir bakteridir. Normal florada bulunabilen bir bakteri olmasına karşın, alkol kullanım bozukluğu, immunsupresyon veya diyabetes mellitusu olan hasta popülasyonlarında, başta pnömoni olmak üzere, salgınlara sebep olabilecek hastane enfeksiyonlarında etken olabildiği görülmüştür. Dünyadaki tüm hastane kökenli enfeksiyonların %11,8'inde etken olarak saptanmıştır. Bakteri, toplum kökenli pnömoniyeye de sebep olmakla beraber, bu durum daha nadir olup gelişmiş ülkelerde %3-5 oranında görülmektedir. Ancak gelişmekte olan ülkelere %15 civarı olduğu düşünülmektedir (3).

Bakteriler enzimatik aktivite ile ilacın etkisinin sonlandırılması, duyarlı dış zar proteinlerinin kaybı, biyofilm oluşumu, dışa atım pompalarında artış, ilacın bağlanma bölgesinde modifikasyonlar, membran geçirgenliğinde değişiklikler gibi mekanizmalarla antibiyotiklere direnç geliştirebilir. Diğer gram negatif bakterilerde olduğu gibi *K. pneumoniae* için de genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (ESBL) ve ardından karbapenemaz üreten suşların yayılması, bu etkenlerle meydana gelen enfeksiyonların tedavisini oldukça güçleştirmiştir (1, 4).

Kolistin (Polimiksin E) 1950 yılında kullanıma girmiş, polikatyonik yapıda, bakterisidal bir ilaçtır. Gram negatif bakterilerde, dış membran yüzeyindeki lipopolisakarit tabakanın Lipid A komponentine bağlanarak etki göstermektedir. Nörotoksisite ve nefrotoksisite gibi yan etkileri sebebiyle 1980'li yılların başında klinik kullanımdan kaldırılmıştır. Zaman içerisinde artan çoklu ilaç dirençli (MDR) bakterilerin tedavisinde karbapenemlerin de etkisiz kalması üzerine, kolistinin klinik kullanımı tekrar gündeme gelmiştir. Özellikle MDR *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* türleri, *Enterobacter* türleri, *Escherichia coli*, *Salmonella* türleri, *Shigella* türleri ve *Citrobacter* türleri gibi etkenlerle oluşan nozokomiyal enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilmesi sebebiyle yeniden önem kazanmıştır (5). Ancak yıllar içerisinde kolistine karşı direnç gelişimi de artan bir sorun haline gelmiştir. Uzun yıllar boyunca bakterilerin bu

ilaca karşı geliştirdikleri direncin kromozomal genler aracılığıyla meydana geldiği düşünölmüş, ancak 2015 yılında plazmid aracılı, aktarılabilen *mobil kolistin direnci (mcr)-1* geni saptanmıştır. Bu genin aktarımının aynı tür bakteriler arasında olabileceği gibi, Enterobacterales takımı üyeleri arasında veya *P.aeruginosa*'ya aktarım şeklinde olabileceği gösterilmiştir. Karbapenemaz içeren Enterobacterales suşlarının *mcr-1* genini kazanması, bu suşlarla oluşan enfeksiyonları tedavi edilemez hale getirme potansiyeline sahiptir (6, 7).

Ölkemizdeki sürveyans sistemleri verilerine göre kolistin direnç oranları tüm kültürlerde üreyen *K. pneumoniae* izolatlarında %17,5, hastane enfeksiyonu etkeni olarak saptananlarda ise %31,93'tür (8, 9). Dünya verilerine bakıldığında ise ölkeler arası %5 ila %35 arası değişen oranlarda kolistin direnci saptanabileceği görölmektedir (10).

MDR etken enfeksiyonlarının tedavisinde, son basamak antibiyotik olarak kullanılıyor olması, kolistinin duyarlılık durumunun belirlenmesini önemli kılmaktadır. Ölkemizde antibiyotik duyarlılık testleri (AST), Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST) standartlarına göre yapılmaktadır. EUCAST kolistin duyarlılığının belirlenmesinde altın standart yöntem olarak sıvı mikrodilüsyon (BMD) yöntemini önermektedir. Bu yöntemle duyarlılık değerlendirilmesinde, kolistin için sınır minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri Enterobacterales ve *Acinetobacter* türleri için 2 µg/ml; *P. aeruginosa* için 4 µg/ml olarak belirlenmiştir (11). Ancak BMD'nin zaman alıcı ve hatalara açık bir yöntem olması, ayrıca heterorezistansın belirlenmesinde sınırlılıklar sergilemesi, kolistin duyarlılığının belirlenmesi için kolay uygulanabilir, alternatif yöntemlerin aranmasına sebep olmaktadır. Bu amaca yönelik olarak kolistin duyarlılığının belirlenmesinde; dilüsyon temelli yöntemler, BMD temelli ticari yöntemler, disk difüzyon ve gradiyent test yöntemleri, otomatize AST sistemleri, kolistin sıvı disk elüsyon yöntemi (CBDE), hızlı kalitatif yöntemler ve "Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass" (MALDI-TOF MS) denenmektedir. Ayrıca polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve genom dizileme yöntemleriyle hem kromozomal hem plazmid aracılı genler tespit edilebilmektedir (6).

Ticari BMD yöntemleri; konsantrasyon hesaplanması, besiyerinin ayarlanması ve ilacın seri dilüsyonların yapılması gibi, referans yöntemdeki hatalara açık basamakların, firma tarafından geliştirilmiş kitler içerisinde hazırlanmış olarak temin edildiği yöntemlerdir. Referans BMD ile uyumluluk oranları başarılı bulunmuştur (6, 12).

CBDE referans yöntemine göre daha geniş hacimli tüpler içerisinde, besiyerine kolistin disklerinin eklenmesi prensibine dayanan bir yöntemdir. Rutin laboratuvar işleyişinde uygulanabilirliği kolay ve maliyet etkin bir yöntem olup, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) tarafından referans BMD alternatifi olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (13).

Gradyent test laboratuvarların rutin işleyişinde, MİK belirlenmesi için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bakteri inokulumu yayılmış agar üzerine, belirli konsantrasyonlarda antibiyotik içeren şeritlerin yerleştirilmesiyle uygulanır. Farklı çalışmalarda referans yöntemle uyumuna dair değişken sonuçlar elde edilmiştir (14, 15).

Otomatize AST'leri laboratuvarların iş akışını oldukça kolaylaştıran, enkübasyon sürelerini kısaltan sistemlerdir. Gradyent teste benzer şekilde BMD ile uyumlarında farklı sonuçlar elde edilen çalışmalar mevcuttur (16, 17).

Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyon (RT- qPCR) yöntemi kolistin direncinden sorumlu olan *mcr* genlerinin saptanmasında kullanılabilen genotipik yöntemlerden biridir. Plazmid aracılı genlerin bakteriler arasında aktarılabilirliği oluşu, kolistin direncinin yayılımını hızlandırabilme riski barındırmakta ve bu genin tespitini önemli hale getirmektedir (6).

Sunulan bu çalışmanın amaçları Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda değerlendirilen kan kültürü örneklerinde üreyen *K. pneumoniae* suşlarındaki kolistin direnç oranlarının belirleyerek epidemiyolojik veri elde etmek ve alternatif yöntemlerle elde edilen kolistin duyarlılık sonuçlarını referans yöntem ile kıyaslayarak, rutin laboratuvar işleyişinde uygulanabilecek yöntemleri değerlendirebilmektir. Ayrıca aktarılabilen, plazmid aracılı *mcr* genlerinin, RT- qPCR yöntemi ile tespiti ve prevalansının değerlendirilmesi de hedeflenmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. *Klebsiella pneumoniae*

2.1.1. Tarihçe ve sınıflandırma

K. pneumoniae ilk olarak 1875 yılında Edwin Klebs tarafından, pnömoni sebebiyle ölen iki hastanın solunum yolu örneklerinin incelenmesi sırasında izole edilmiştir. 1882 yılında Carl Friedländer bakteriyi tür olarak tanımlamış bu sebeple bakteri 1886 yılına kadar Friedlander basili olarak adlandırılmıştır (18, 19).

K. pneumoniae, Enterobacterales takımı içindeki Enterobacteriaceae ailesinde bulunan, *Klebsiella* cinsine ait bir bakteridir (3). Cins içerisinde yer alan bakteriler 16S rRNA ve bakteri RNA polimerazın β alt birimini kodlayan *rpoB* genlerinin karşılaştırmalı dizi analizleriyle üç kümeye ayrılmış ve *K. pneumoniae* küme I'de yer almıştır (20). *K. pneumoniae* alt türleri tüm genom analizi ile incelenmiş ve “*Klebsiella pneumoniae* species complex (KpSC)” olarak adlandırılmışlardır. Bu alt gruplar *Klebsiella pneumoniae* (Kp1), *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (Kp2), *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (Kp4), *Klebsiella variicola* subsp. *variicola* (Kp3), *Klebsiella variicola* subsp. *tropica* (Kp5), *Klebsiella quasivariicola* (Kp6), *Klebsiella africana* (Kp7) olarak belirlenmiştir. Bu grupların özgül etkileri henüz belirlenememiş olmakla birlikte insan enfeksiyon etkeni olarak izolasyonları yapılabilmektedir (21).

2.1.2. Mikrobiyolojik özellikler

K. pneumoniae gram negatif, kapsüllü, hareketsiz bir bakteridir. Diğer Enterobacteriaceae ailesi üyeleri gibi 0,3-1 μ m eninde 1-6 μ m boyundadır. Koyun kanlı agarda iri, mukoid koloniler oluşturur. Laktozu fermante eder. Bu fermentasyon ve asit oluşumu MacConkey agarda mor renkli, mukoid koloniler görülmesinin sebebidir. Ornitin dekarboksilasyonu yapmaz. İndol negatiftir. Üreyi yavaş hidrolize eder ve üre agarın eğik yüzünde hafif pembe renk oluşturur (20, 22).

2.1.3. Virülans faktörleri

2.1.3.1. Kapsül

Kapsül, kompleks asit polisakkaritlerden oluşur ve virülanstan sorumlu temel faktördür. Bakteri yüzeyinde kalın fibriler bir yapı oluşturur, bakteriyi fagositozdan korur ve bakterisidal serum faktörlerine karşı dayanıklılık sağlar (23). Yetmiş sekiz adet kapsüller serotip tanımlanmıştır (K1-K78). Son on yılda önem kazanan, komorbiditesi olmayan sağlıklı insanlarda yaşamı tehdit eden toplum kaynaklı enfeksiyonlara sebep olan hipervirülan *K. pneumoniae* (hvKp) türlerinin çoğunlukla K1 ve K2 serotip kapsül antijeni bulundurduğu saptanmıştır (24). K7 ve K21a serotiplerinin ise düşük virülansla ilişkili olduğu çeşitli fare deneyleri ile gösterilmiştir (25, 26).

2.1.3.2. Fimbriya

Bakteri yüzeyinde kamçılı olmayan, ipliksi çıkıntılardır. Bakterinin epiteliyal hücrelere ve immün sistem hücrelerine tutunmasını sağlar. *K. pneumoniae*'da baskın iki tip pili mevcuttur. Tip 1 fimbriya mannoza bağlanma özelliğine sahiptir. Bakterinin idrar yolu enfeksiyonu yapabilmesinde esansiyel faktördür. Ayrıca solunum yolu kolonizasyonunda görevli olduğu gösterilmiştir. Tip 3 fimbriya tannin ile muamele edilmiş eritrositlere bağlanıp aglütinasyona sebep olur. Endoteliyal hücrelere, solunum yolu ve ürogenital epitel hücrelerine bağlanmada görevlidir (23, 24, 27).

2.1.3.3. Lipopolisakkarit (LPS)

Bakteri hücre duvarında bulunan bir yapıdır. Lipid A, çekirdek polisakkaridi ve O antijeni olmak üzere üç komponenti bulunmaktadır. LPS molekülleri gram negatif bakterilerde antijenik yapıda olup, endotoksin işlevi görmektedir. Endotoksin aktivitesi kompleman yolaklarının uyarılmasına ve yaygın damar içi pıhtılaşmanın meydana gelmesine sebep olabilir (20).

2.1.3.4. Siderofor

Sideroforlar bakterilerde bulunan, konak hücrelerindeki demirin konak taşıyıcı moleküllerinden ayrılmasını sağlayan yüksek afiniteli moleküllerdir. *K. pneumoniae*'de enterobaktin, yersinyabaktin, salmoşelin ve aerobaktin olmak üzere dört tip siderofor tanımlanmıştır. Demir için en yüksek afiniteye sahip olan ve birincil siderofor olarak kullanılan enterobaktindir. Aerobaktin ve yersinyabaktin ise hvKp suşlarında daha yaygındır (24).

2.1.4. Sebep olduğu enfeksiyonlar

K. pneumoniae sağlıklı insanlarda çeşitli mukozal yüzeylerde, üst solunum yolunda ve sindirim sisteminde semptomatik bir enfeksiyona yol açmadan kolonize halde bulunabilir. Hastane yatış geçmişi olan; kronik alkol kullanan, diyabetli veya immunsuprese tedavi alan hastalarda kolonizasyon, enfeksiyona dönüşebilmektedir (4). Sıvı elektrolit bozuklukları, nörolojik bozukluklar ve sık hastaneye yatış öyküsünün de kolonizasyonun enfeksiyona dönüşümünde etkili olduğu gösterilmiştir. *K. pneumoniae* başta üriner sistem enfeksiyonları olmak üzere pnömoni, yumuşak doku enfeksiyonları ve sepsise neden olabilmektedir (28).

2.1.5. Tedavi ve antibiyotik direnci

K. pneumoniae kromozomal *SHV* beta laktamaz geni sebebiyle ampisilin, karbenisilin ve tikarsiline doğal dirençlidir (21). Tedavide, duyarlılık durumlarına göre geniş spektrumlu beta laktam antibiyotikler, karbapenemler, aminoglikozidler, tetrasiklinler, sülfonamidler, nitrofurantoin ve polipeptid antibiyotikler kullanılabilir (29).

Aminoglikozidleri modifiye ederek ilaca karşı direnç gelişimine sebep olan plazmid aracılı gen gruplarının tamamı (asetiltransferaz, nükleotidiltransferaz ve fosfotransferaz) *K. pneumoniae*'de tanımlanmıştır. Ayrıca bakteri, *KpnEF* dışa atım pompaları ve *KpnO* porin kaybı ile de aminoglikozidlere karşı direnç kazanabilmektedir (30).

Bakteri topoizomerazına etki ederek DNA sentezini inhibe eden kinolon grubu ilaçlara direnç gelişimi temelde üç mekanizmayla sağlanır. Hedef bölge değişimi bu mekanizmaların ilkidir ve *gyrA*, *gyrB*, *parC* ve *parG* genlerinin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Diğer direnç mekanizmaları çoklu ilaç dışa atım pompası genlerinin aşırı ekspresyonu ve plazmid aracılı genler ile hedef bölge koruma proteinlerinin sentezidir (30).

K. pneumoniae'nin beta laktamaz sentezleme özelliğiyle beta laktam antibiyotiklere karşı direnç kazanmasında *SVH* geni dışında *TEM-1* ve *AmpC* genlerinin de etkisi mevcuttur. Bu genlerdeki nokta mutasyonlarla bakteri ESBL üreterek üçüncü kuşak sefalosporinler ve aztreonamı inhibe edebilir. Tedavide sıklıkla karbapenem grubu antibiyotikler tercih edilmektedir (31). Karbapenemlere direnç gelişiminde ise en önemli faktör karbapenemaz genleridir. Ayrıca ESBL etkili suşlar dışa atım pompalarının aşırı ekspresyonu ve porin geçirgenliği azalması gibi modifikasyonlar ile karbapenemlere direnç özelliği kazanabilmektedir (4).

Karbapenem dirençli suşların artışı tedavide eski bir grup olan polimiksinleri tekrar gündeme getirmiştir. Kolistin (polimiksin E) çoklu ilaç direnci olan gram negatif bakterilerin tedavisinde önemli bir antibiyotiktir. *K. pneumoniae*, hücre duvar dış membranındaki LPS'nin yapısını bozarak etki eden bu antibiyotiğe karşı, LPS'nin anyonik yapısını değiştiren kromozomal veya plazmid aracılı genlerle direnç geliştirebilmektedir (32). Çoklu ilaca dirençli bakterilerin tedavisinde yaşanan zorluklar göze alındığında, kolistinin antibiyotik kombinasyonları ile kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi açısından direnç mekanizmalarının tanımlanması ve rutin laboratuvarlarda duyarlılık testlerinin yapılabilmesi önem taşımaktadır.

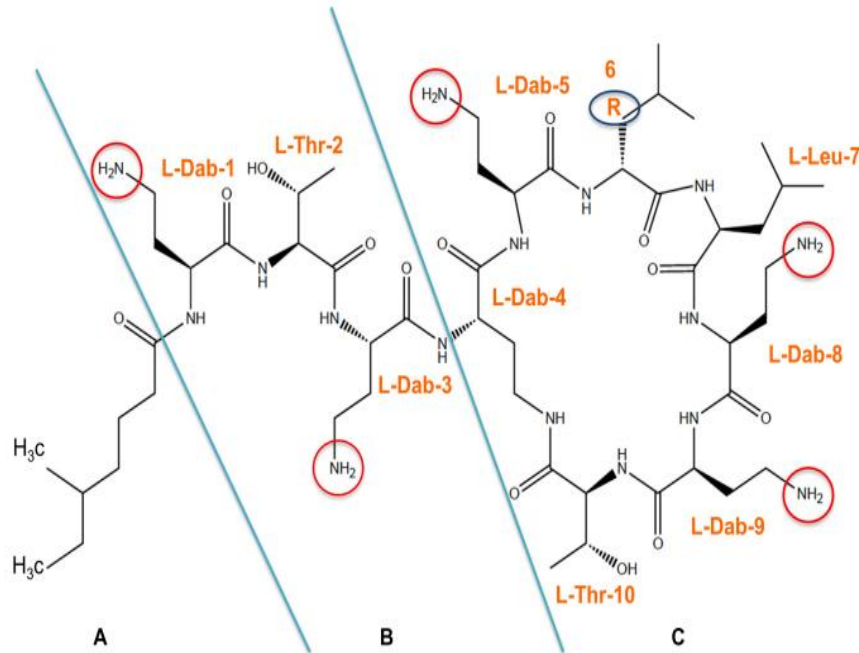
2.2. Kolistin (Polimiksin E)

Polimiksin grubu antibiyotikler özellikle MDR gram negatif bakteri kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilen, peptit yapılı ilaçlardır. Polimiksin B ve E (kolistin) klinik kullanımı olan polimiksin çeşitleridir (33).

İlk olarak 1947 yılında *Bacillus polymyxa* (günümüzdeki ismi *Paenibacillus polymyxa*) suşlarından izole edilen kolistin 1950 yılında klinik kullanıma girmiştir. Yan etkileri (nefrotoksisite ve nörotoksisite) sebebiyle seksenli yılların başında yerini aminoglikozidlere bırakmış olmasına rağmen, yıllar içinde antibiyotik direncinin büyük bir soruna dönüşmesi, günümüzde kolistinin tekrar önem kazanmasına sebep olmuştur (34, 35).

2.2.1. Kimyasal yapı

Kolistin bir heptapeptid halkası, buna bağlı bir tripeptid zinciri ve devamında bir açıl zincirinden oluşan, 1750 dalton (Da) ağırlığında bir moleküldür. Peptid yapıdaki halka ve zincir, pozitif yüklü amin grupları içerir ve molekülün hidrofilik yapılarıdır. Açıl zinciri ise hidrofobik yağ asitlerinden oluşmaktadır. Hem hidrofilik hem hidrofobik yapıları bünyesinde bulundurması sebebiyle kolistin amfipatik bir moleküldür (36). Molekülün yapısındaki amino asitler D-lösin, L-treonin ve L-diaminobutirik asittir. Açıl grupları ise 6-metil-oktanoik asit ve 6-metil-heptanoik asit olabilmektedir. 6-metil-oktanoik asit içerenler kolistin A (polimiksin E1), 6-metil-heptanoik asit içerenler kolistin B (polimiksin E2) olarak adlandırılmıştır. Farklı farmasötik preparatlar, farklı kolistin tiplerini farklı oranlarda içerebilmektedir (37). Şekil 1.'de ilacın kimyasal yapısı gösterilmiştir (36).



Şekil 1. Kolistinin kimyasal yapısı (36).

A: Hidrofobik açıl zincir, B: Tripeptit zincir, C: Heptapeptit halka

Kolistinin, kolistin sülfat ve sodyum kolistin metansülfonat (CMS) olmak üzere iki ticari formu bulunmaktadır. Kolistin sülfat katyonik ve stabil bir molekül olup, bağırsak dekontaminasyonu için oral, deri enfeksiyonlarının tedavisinde de topikal yoldan uygulanabilmektedir. CMS ise anyonik ve stabil olmayan bir moleküldür. Yalnızca parenteral (intravenöz, intramüsküler ve nebulizasyon) formülasyonu mevcuttur. CMS, kolistin sülfata göre daha az toksik etkilidir (37, 38).

2.2.2. Farmakokinetik ve farmakodinamik özellikler

Yan etkileri sebebiyle bir dönem kullanımının bırakılmış olması kolistin farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleriyle ilişkili çalışmalar planlanmasını sınırlandırmıştır (39). 2000 yılı sonrası MDR bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonlardaki artış ile kolistin tekrar gündeme gelmesi, bu konudaki çalışmaların sayısının artmasına sebep olmuştur.

CMS bir ön ilaç olup parenteral kullanımla vücuda verildikten sonra bir kısmı hidrolize olarak aktif forma dönüşürken bir kısmı böbrekler yoluyla atılır. Bu sebeple böbrek yetmezliği olan hastalarda atılımın daha az olacağı ön görülerek doz ayarlaması yapılması gerekmektedir. Kolistin sülfatın ise böbrek tübüllerinden geri emilimi fazladır ve günümüzde hala tam olarak tanımlanamamış olan böbrek dışı yollarla elimine edilir (40).

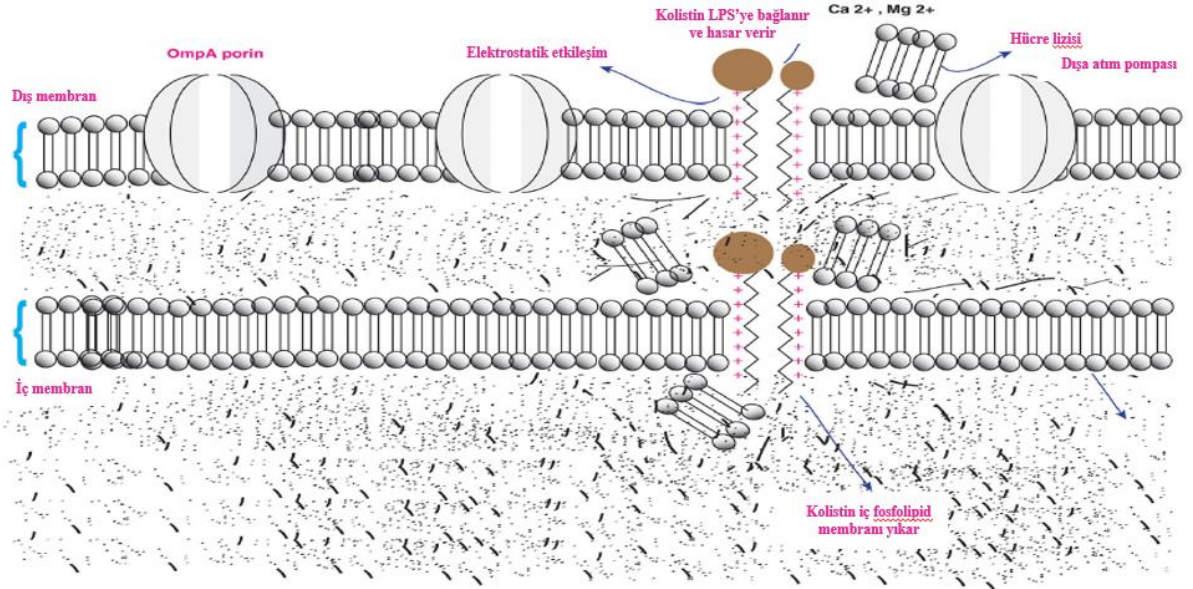
Kolistin intravenöz uygulamadan sonra 10 dakika içinde serumda pik seviyesine ulaşmaktadır. İntravenöz uygulandığında serumdaki yarılanma ömrü yaklaşık dört saattir. İlacın plevral boşluk, akciğer parankimi, kemik ve beyin omurilik sıvısında dağılımı zayıftır (% 15-25) (41). Kolistin gastrointestinal sistemden emilmemekte, mukozalar ve geniş yüzey alanlı yanıklardan zayıf oranda absorbe olabilmektedir (42).

Kolistinin, etki spektrumundaki bakteriler üzerinde doza bağımlı bir öldürme etkisi bulunmaktadır. İlk uygulamada güçlü bir öldürme etkisi göstermesine rağmen, uygulamanın 24 saat sonrasında tekrarlayan bakteri üremelerini, yüksek konsantrasyonlarla dahi engelleyememektedir. Bu durumun ilaca karşı gelişen heterorezistans kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Özellikle YBÜ hastalarındaki MDR bakteriler kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde -antimikrobiyal duyarlılık saptama yöntemleriyle duyarlı bulunmuş olsa dahi-suşların heterorezistans geliştirebilme riskleri göz önüne alınarak, kolistin tedavide tek başına kullanılmaması ve dozların uzun aralıklarla uygulanmaması önerilmektedir (41, 43).

2.2.3. Etki mekanizması

Kolistinin yapısında bulunan amino grupları, molekülün pozitif yüklü olmasını sağlamaktadır. Pozitif yüklü kolistin molekülü, gram negatif bakteri hücre duvarı dış membranında bulunan LPS tabakanın, önemli bir bileşeni olan Lipid A'nın negatif yüklü fosfatlarına bağlanır (36). Lipid A, endotoksin aktivitesi yanı sıra dış membranın dayanıklılığı ve geçirgenliğinden sorumludur. Kolistin ve LPS'nin elektrostatik etkileşimi sonrası ilaç, LPS'nin stabilizasyonunu sağlayan iki değerlikli kalsiyum (Ca^{+2}) ve magnezyum (Mg^{+2}) iyonlarıyla yer değiştirir. Bu değişim dış membran yapısında bozulmaya ve geçirgenlik artışına sebep olur. Ayrıca kolistin hidrofobik açıl yağ zincirini dış membran içine yerleştirerek bu bölgede genişleme meydana getirir. Bu süreç hücre geçirgenliği artışını, hücre içeriğinin sızmasını ve ardından hücre ölümünü beraberinde getirmektedir. Kolistin

bakterisidal etkisini esas olarak bu yolak ile gösterirken; elektrostatik etkileşim, LPS'nin nötralizasyonuna sebep olarak Lipid A'nın endotoksin aktivitesi üzerinde inhibitör etki göstermekte ve septik şok gelişiminin indüklenmesini önlemektedir (37, 44). Kolistinin bakteriyel membran üzerindeki etki mekanizması Şekil 2.'de özetlenmiştir (45).



Şekil 2. Kolistinin bakteriyel membran üzerindeki etki mekanizması (45). Pozitif yüklü kolistinin elektrostatik etkileşim ile negatif yüklü lipopolisakkarit molekülüne bağlanması, gram negatif hücre duvarı dış membranından kalsiyum ve magnezyum iyonlarının kaybı, permeabilite değişimi ve hücre içeriğinin dağılması

Kolistinin bir hedefi de dış membranın içe bakan kısmında bulunan tip II nikotinamid adenin dinükleotid hidrit (NADH) kinon oksidoredüktaz enzimi olabilmektedir. Bakteride hüresel solunumdan sorumlu olan bu enzimin inhibisyonu hücrenin geri dönüşümsüz hasarına yol açar (46). Ayrıca kolistinin LPS tabakayı geçmesinin serbest radikal oluşumunu indüklediği ve oluşan oksidatif stresin bakteri DNA, protein ve lipidlerinde hasar meydana getirerek hücre ölümüne sebep olduğu düşünülmektedir. Bu öldürme mekanizmasının, çoklu ilaç direnci bulunan kolistin duyarlı *A. baumannii* ve *E. coli* izolatlarında bulunduğu, ancak polimiksine dirençli suşlarda yer almadığı gösterilmiştir (45).

2.2.4. Etki spektrumu

Kolistin gram negatif basillerin birçoğuna etkili bakterisidal bir antibiyotiktir. Etki spektrumu içerisinde bulunan bakteriler: *Acinetobacter* türleri, *P. aeruginosa*, *Klebsiella* türleri, *Enterobacter* türleri, *Escherichia coli*, *Salmonella* ve *Shigella* türleri, *Citrobacter* türleri, *Yersinia pseudotuberculosis* ve *Haemophilus influenzae* olmakla birlikte,

Stenotrophomonas maltophilia'ya karşı in vitro etkinliği de gösterilmiştir. Aynı zamanda *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium phlei* ve *Mycobacterium smegmatis* gibi bazı mikobakter türlerine karşı aktivite gösterdiğine dair çalışmalar mevcuttur (37).

Gram pozitif bakteriler, gram negatif koklar, anaeroplara, mantar ve parazitler kolistin etki spektrumu dışındadır. Ayrıca *Pseudomonas mallei*, *Burkholderia cepacia*, *Proteus* türleri, *Morganella morganii*, *Providencia* türleri, *Serratia* türleri, *Edwardsiella* türleri ve *Brucella* türleri kolistine doğal direnç göstermektedir (37).

2.2.5. Klinik kullanım

MDR bakteri enfeksiyonları son yıllarda hızlı bir yayılım göstermektedir. Yoğun bakım üniteleri de bu durumdan fazlasıyla etkilenmekte ve YBÜ hastalarındaki mortalite artışı dikkat çekmektedir (47). Kolistin, özellikle YBÜ hastalarındaki MDR gram negatif bakteriler (sıklıkla *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*) sebebiyle oluşan, sepsis ve ventilatör ilişkili pnömoni (VİP) tablolarının tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca menenjit, osteomyelit, deri-yumuşak doku enfeksiyonları, göz ve kulak enfeksiyonları, üriner sistem ve gastrointestinal sistem (GİS) enfeksiyonlarında da kullanımı mevcuttur (48, 49).

Sepsis ve osteomyelit tablolarında ilaç, intravenöz olarak CMS formunda kullanılmaktadır. GİS enfeksiyonlarında kolistin sülfatın tablet veya süspansiyon formları oral olarak tercih edilebilmektedir. Bağırsaktan emilimin az olması sebebiyle bu bölgede iyi bir lokal etki sağlanmaktadır. Deri-yumuşak doku, göz ve kulak enfeksiyonlarında ise kolistin sülfatın topikal formları enfeksiyon bölgesine uygulanabilmektedir (48).

Antibiyotigin inhalasyon yoluyla kullanımı, öncelikli olarak kistik fibrozis tanılı hastalardaki MDR *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde denenmiş ve klinik olarak olumlu olduğu düşünülen sonuçlar elde edilmiştir (50). "Food and Drug Administration (FDA)" onayı bulunmamasına rağmen, VİP ve hastane kaynaklı pnömonilerin tedavisinde, kolistin toksik etkilerinin oluşabilme riski bulunan hasta gruplarında, CMS inhalasyon yoluyla uygulanabilmektedir. İnhaler tedavinin doğrudan enfeksiyonun bulunduğu bölgeye uygulanıyor olmasının, sistemik maruziyet ve toksisite riskini azaltırken, akciğer sıvısında etkinliği artırdığı düşünülmektedir. Ayrıca sistemik tedaviyle yanıt alınamayan MDR gram negatif bakteriler sebebiyle meydana gelen pnömonilerde de inhaler uygulaması önerilmektedir (49, 51).

Menenjit ve ventrikülit gibi santral sinir sistemi enfeksiyonlarında kolistin intratekal veya intraventriküler yolla uygulanması söz konusu olabilmektedir. Girişimsel işlemler gerektirmesi sebebiyle bu uygulama yöntemleri ancak MDR gram negatif bakterilerin sebep olduğu, intravenöz tedaviye yanıt alınamayan hastalarda

uygulanabilmektedir. Kolistinin kan bos bariyerinden geçişinin zayıf olması (serum düzeyinin %15-25'i kadar) sebebiyle lokal uygulamalarla daha etkin bir konsantrasyona ulaşmak hedeflenmektedir. Yapılan çalışmalar kolistinin intratekal/intraventriküler yolla, tek başına veya sistemik antimikrobiyallerle kombine olarak uygulanmasının gram negatif basil kaynaklı santral sinir sistemi enfeksiyonlarında etkili bir tedavi yöntemi olduğunu düşündürmüştür. Ancak bu uygulama yöntemlerinin hastalarda kimyasal menenjit, kimyasal ventrikülit ve nöbetlere sebep olabildiği de gözlenmiştir. Bu sebeple klinik kullanıma uygunluğu açısından ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (48, 49, 52).

Kolistinin klinik kullanımında monoterapi yerine başka antibiyotiklerle kombine uygulama tercih edilmektedir. Yapılan çalışmalar kolistinin ile karbapenemler, rifampisin, seftazidim ve glikopeptid antibiyotiklerin kombine kullanımında, bakterisidal etkinin arttığını göstermiştir. Yalnızca kolistine duyarlı olduğu bulunan suşlarda bile karbapenem ile kombine kullanımda, karbapenemlerin az miktarda dahi olsa yol açtığı hücre duvarı hasarının, kolistinin bakterisidal etkisinde artış sağladığı görülmüştür. Ayrıca kolistinin monoterapide kullanımı, kolistine duyarlı bulunan suşlarda heterorezistans ile direnç gelişimine sebep olabileceği için kolistinin kombine tedavi içinde kullanımı önerilmektedir (53–55).

2.2.6. Toksisite ve yan etkiler

Kolistinin en sık karşılaşılan toksik etkileri böbrekler ve sinir sistemi üzerinedir. Gelişen nefrotoksisite ve nörotoksisite doza bağımlıdır. Nefrotoksisite sıklıkla akut tübüler nekroz kliniğiyle görülmektedir. CMS'nin renal tübüllerden ekstrakte edilmesi, kolistin sülfatin ise aynı bölgeden absorbe olması toksik etkinin bu bölgede görülmesini açıklamaktadır. Kolistinin ilk kullanıma girdiği yıllarda çok sayıda hastada nefrotoksisite yan etkisi bildirilmiş olmasına rağmen yakın zamanlı çalışmalarda bu oranın aslında daha az olduğunu düşündürecek veriler rapor edilmiştir (37, 56). Başka bir nefrotoksik ilaçla (örneğin steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar) birlikte kullanımın veya hastada altta yatan böbrek hastalığı bulunmasının ilacın sebep olduğu nefrotoksisite oranlarında artışa sebebiyet verdiği, kolistinin tek başına ya da nefrotoksik olmayan bir ilaçla kombine kullanımında böbrek hasar oranlarının daha az olduğu gösterilmiştir (38). Ayrıca doğru doz ayarlaması yapılmamasının da nefrotoksik yan etkiyi artırdığı düşünülmektedir. Kolistine bağlı nefrotoksisite gelişen hastalarda doz azaltımı veya ilacın kesilmesi gerekebilmektedir (37, 38).

Nörotoksisite gelişen hastalarda parestezi, baş dönmesi, halsizlik, görme bozuklukları, ataksi, nöromusküler blokaj, konfüzyon gibi semptomlar görülebilmektedir. Bu semptomlar uzun süre kolistin tedavisi alan hastalarda meydana gelmektedir ve sıklıkla geri dönüşlüdür. Kolistine bağlı nörotoksisite oranlarının yaklaşık %7 olduğu tahmin edilmektedir (37, 38).

Kolistin kullanımında yaklaşık %2 oranında deri döküntüsü, ürtiker, yaygın kaşıntı, anafilaksi gibi alerjik reaksiyonlar görülebilmektedir. Ayrıca nadir bir yan etki olarak psödomembranöz kolit gelişebildiği bildirilmiştir (37).

2.2.7. Kolistine karşı gelişen direnç mekanizmaları

Kolistin direnci, MDR etken enfeksiyonların tedavisini oldukça kısıtlayan bir problemdir. 2010'lu yılların başlangıcından günümüze kadar olan süreçte kolistine karşı gelişen direnç oranları global olarak artış göstermektedir (57). Ülkemizde de durum benzer şekilde olup her yıl yapılan Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı (USHİESA) raporlarında 2020 yılında *A. baumannii* ve *K. pneumoniae* suşlarında kolistin direnci sırasıyla %3,88 ve %12,1 saptanmışken; 2021 yılında bu oranlar %10,96 ve %31,93 olarak belirlenmiştir (8, 58).

Kolistine karşı, bakteri türlerinin gösterdiği direnç paternleri doğal direnç ve kazanılmış direnç şeklinde sınıflandırılabilir. Gram pozitif bakteriler ve anaerob bakteriler hücre duvarlarında, kolistinin hedef bölgesi olan LPS tabakayı buldurmamaları sebebiyle kolistine karşı doğal direnç gösterir. *Brucella* türleri, *Burkholderia cepacia* kompleks, *Edwardsiella* türleri, *M. morgani*, *Proteus* türleri, *Providencia* türleri ve *Serratia* türlerindeki doğal direncin kaynağının ise LPS tabakanın yapısına pozitif yüklü moleküller ekleyerek, kolistine afiniteyi azaltan modifikasyon genleri olduğu düşünülmektedir (59, 60).

Gram negatif bakterilerde kazanılmış kolistin direncinden çeşitli mekanizmalar sorumlu tutulmuştur. Mekanizmaların birçoğu aktarılamayan kromozomal genler aracılığıyla olmakla beraber, aktarılabilen plazmid aracılı direnç mekanizması da tanımlanmıştır. En sık karşılaşılan kromozomal direnç mekanizması LPS tabakanın modifikasyonları olmakla beraber; LPS sentez geni mutasyonları, dışa atım pompaları da dahil olmak üzere dış zar proteinlerindeki değişim ve kapsül formasyonunda değişiklikler de kolistin direnci gelişiminde rol oynayabilen faktörlerdir (61, 62). Kolistin direnci gelişiminde rol oynayan temel mekanizmalar Şekil 3.'de gösterilmiştir (63).

2.2.7.1. LPS modifikasyonları ile direnç gelişimi

LPS tabakanın negatif yükünü sağlayan Lipid A'nın fosfat grupları ve 3-deoksi-D-manno-okt-ulosonik asit (Kdo) yapısına pozitif yüklü karbonhidratların eklenmesi ile bakteriler kolistine karşı direnç kazanabilmektedir. Bu değişiklik LPS tabakanın net negatif yükünde düşüklüğe sebep olarak, pozitif yüklü kolistin molekülünün bakteri hücrelerine bağlanmasını azaltmaktadır. Lipid A ve Kdo yapısına en sık eklenen karbonhidrat grupları fosfoetanolamin (PEtN) ve 4-amino-4-deoksi-L-arabinoz (L-Ara4N) olmaktadır. LPS modifikasyonları sıklıkla iki bileşenli sistemler (TCS) tarafından gerçekleştirilir. Bu sistemler

arnBCADTEF operonunu aktif hale getirebilir. Ayrıca PmrA/PmrB sistemi, PhoP/PhoQ sistemi ile aktive olabilmesi yanı sıra çevresel faktörlerle (düşük Mg^{+2} , düşük pH, yüksek oranda ferrik demir (Fe^{+3}), polimiksin antibiyotik varlığı) de aktif hale geçebilmektedir (45, 60, 64, 65).

Bu temel mekanizmaların yanı sıra farklı bakteri türlerinde farklı kromozomal genler ve TCS'ler de kolistin direncine katkıda bulunabilmektedir. Bu genlerden birisi sıklıkla *Klebsiella* türlerinde kolistin direncinden sorumlu tutulan *mgrB* genidir. Normal koşullarda *mgrB* geninin kodladığı, 47 aminoasitli bir transmembran proteini olan MgrB proteini, PhoP/PhoQ ikili sistemi üzerinde negatif bir geri bildirimde sahip olup, bakteri için düzenleyici bir görev sürdürmektedir. PhoP aktivitesinde artış, *mgrB* geninin up-regülasyonuna sebep olur. MgrB proteini, fosfoetanol transferazı kodlayan ve PhoQ aktivasyonunu sağlayan *eptB* geninin ekspresyonunu baskılar. Bu durum Kdo'ya PEtN eklenmesinde azalmayla ve LPS'nin negatif yükünün korunmasıyla sonuçlanır. Ancak *mgrB* geninin ekspresyonunda azalmaya yol açan mutasyonlar PhoP/PhoQ sistemi üzerindeki baskının kalkmasına ve kolistin direnci gelişmesine sebep olur. *K. pneumoniae*'deki kolistin direncinin büyük oranda *mgrB* genindeki insersiyon ve nokta mutasyonları olduğu düşünülmektedir. *mgrB* mutasyonları aracılığıyla gelişen direnç *E. coli* suşlarında da görülebilmektedir (60, 65, 66). *K. pneumoniae*'deki bir başka direnç mekanizmasının *crrAB* operonuyla kodlanan CrrA/CrrB iki bileşenli sistemi aracılığıyla meydana geldiği düşünülmektedir. Diğer TCS'lerde olduğu gibi bu sistemde de bir kinaz (CrrB) ve bir yanıt düzenleyici (CrrA) protein bulunmaktadır. *crrB* geninde aminoasit değişikliği ile sonuçlanan anlamlı mutasyonların *pmrAB* operonunun aşırı ekspresyonuna yol açarak LPS tabakaya pozitif yüklü karbonhidrat gruplarının eklenmesini sağlayan yolağı aktive ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (67, 68).

P. aeruginosa'da, sıklıkla karşılaşılan PmrA/PmrB ve PhoP/PhoQ TCS'ler dışında üç farklı TCS daha tanımlanmıştır. Bunlar ColR/ColS, CprR/CprS ve ParR/ParS sistemleridir. *colR/colS* ve *cprR/cprS* genlerindeki mutasyonların, bu genlerin kodladığı aynı isimli ColR/ColS ve CprR/CprS TCS'ler aracılığıyla *phoQ* genini up-regüle ederek PhoP/PhoQ sisteminin aktifleşmesini sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca ColR/ColS ve CprR/CprS sistemlerinin kolistin direncinden sorumlu tutulabilecek genleri düzenliyor olabileceği fikri ortaya atılmış, ancak bu genler henüz tanımlanamamıştır. ParR/ParS iki bileşenli sistemini kodlayan *parR* ve *parS* genlerindeki mutasyonların ise PmrA/PmrB sisteminden bağımsız olarak *arnBCADTEF* operonunun ekspresyonunu artırdığı ve kolistin direnci gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (32, 60).

Acinetobacter baumannii ise L-Ara4N biyosentezini sağlayan *arnBCADTEF* operonu ve ilgili genlerden yoksun olması sebebiyle yalnızca *pmrCAB* operonu üzerinden PEtN sentezleyerek LPS modifikasyonu yapabilmektedir. Ayrıca bu bakteride farklı bir mekanizma olarak aktifleşen PmrA/PmrB ikili sisteminin *naxD* gen ekspresyonu aracılığıyla Lipid A yapısına galaktozamin ekleme yoluyla da kolistin direnci geliştirebildiğine dair çalışmalar mevcuttur (65).

Kolistine karşı gelişen direnç için farklı LPS modifikasyonlarından biri de Lipid A yapısına yağ asidi eklenmesidir. Eklenen yağ asidi zincirlerinin dış membran geçirgenliğini azaltarak direnç gelişimine katkı sağladığı düşünülmüştür (64). Ayrıca Lipid A tabakasındaki yağ asitleri, LPS'nin L-Ara4N ile modifikasyonuna katkı sağlamaktadır. Bazı *K. pneumoniae*, *E. coli* ve *Salmonella* suşlarında görülebilen, Lipid A'ya yağ asidi eklenmesinden sorumlu enzimi kodlayan *lpxM* geninde gelişen mutasyonlar, Lipid A yapısından yağ asitlerinin eksilmesine (deaçilasyon) sebep olur. Bu durum daha kuvvetli bir pozitif yük ve kolistin direnci oluşmasını sağlayan L-Ara4N ile modifikasyonu azaltıp yolağın PEtN yönüne kaymasına yol açar. Ayrıca bu deaçilasyon dış membran geçirgenliğini artırarak kolistin hidrofobik yağ zincirlerinin bu bölgeye penetrasyonunu artırır (60).

2.2.7.2. LPS sentez geni mutasyonları ile direnç gelişimi

LPS sentez genlerindeki mutasyonlar kimi zaman LPS tabaka kaybı yoluyla, kimi zaman ise LPS tabakanın kalınlığını artırarak kolistin direncine sebep olabilmektedir. LPS tabaka kaybına bağlı direnç gelişimi *A. baumannii* suşlarında tanımlanmıştır. Lipid A sentezinde görevli olan *lpxA*, *lpxC*, *lpxD* genlerinde meydana gelen mutasyonların LPS üretiminde kayba yol açtığı gösterilmiştir. Bu durum bakteride kolistin hedef bölgesinin yokluğuna sebep olarak ilaca karşı yüksek düzeyde dirence neden olur (69). Bu mutasyonlara sahip kolistin dirençli *A. baumannii* suşları, LPS tabakanın yokluğunu telafi etmek için membran biyogenezinde, lipoprotein taşınmasında ve ekzopolisakkarit üretiminde yer alan genlerin ekspresyonunda artış gösterebilir. Ayrıca LPS yokluğundan kaynaklı artan hücre geçirgenliği sebebiyle, toksik etkenlerin hücreye zarar vermesini önlemek için dışa atım pompalarında artış meydana getirebilir (70).

Klebsiella, *Enterobacter*, *Salmonella* ve *Citrobacter* türlerinde bulunabilen *ram* gen bölgesi aracılığıyla üretilen RamA regülatuar proteininin Lipid A biyosentezinde görevli olan *lpxC*, *lpxL-2* ve *lpxO* genlerinin ekspresyonuna yol açtığı ve geçirgenlik bariyerlerini sağlamlaştırarak kolistin direncine katkıda bulunduğu düşünülmüştür. Artan RamA seviyelerinin *K. pneumoniae*'nin konak hücre immün sisteminden kaçışını ve sistemik yayılımı artırdığı, ayrıca kolistine direnç gelişimi ilişkili olduğu gösterilmiştir (71).

2.2.7.3. Dış zar proteinlerinin ekspresyonundaki değişiklikler ile direnç gelişimi

KpnEF, AcrAB and Sap gibi protein yapıları dışa atım pompalarının varlığı Enterobacteriaceae üyesi bakterilerde gösterilmiştir. Bu pompaların aktivasyonu, bakteri hücrelerine alınan antibiyotikleri dışarı atmak yoluyla direnç gelişimini sağlar. KpnEF, “small multidrug resistance” (SMR) protein ailesine aittir ve bu atım pompasını kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonların *K. pneumoniae*'de kolistin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinde iki kat azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir. Benzer biçimde AcrAB–TolC protein kompleksine ait olan AcrAB dışa atım pompası sentezini sağlayan genlerdeki mutasyonların *E. coli*'nin kolistin için MİK değerlerini sekiz kat azalttığı gösterilmiştir. Sap dışa atım pompası ise *SapABCDEF* operonu tarafından kodlanır ve bu bölgenin mutasyonlarında kolistine doğal dirençli olan *P. mirabilis* suşlarında kolistine karşı duyarlılık görülebilmektedir (62). *P. aeruginosa* suşlarında MexAB–OprM dışa atım pompasının kolistin direnci ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca kolistine karşı doğal dirençli olduğu bilinen *Burkholderia* cinsi bakterilerde NorM pompaları bu dirençten sorumlu tutulmuştur (64).

Dışa atım pompalarından başka bazı dış zar proteinleri de kolistin direnci gelişimine katkıda bulunabilmektedir. *P. aeruginosa*'da ortamdaki Mg^{+2} seviyelerinde azalma meydana gelmesi OprH proteini ekspresyonunu artırır ve bu protein negatif yüklü fosfat gruplarına bağlanarak kolistin hedef bölgesine bağlanmasını önler (65). *K.pneumoniae*'de ise ökaryotik hücrelere bağlanmaya aracılık eden dış zar proteini OmpA'daki bir eksiklik, polimiksin B'ye karşı artan duyarlılık ile ilişkilendirilmiştir (64).

2.2.7.4. Kapsül formasyonları ile direnç gelişimi

Kapsül bakterilerde fagositozdan koruma ve antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde önemli bir hücre elemanıdır (45). Kapsüller polisakkarit (CPS) sahip olduğu negatif yük sayesinde pozitif yüklü kolistin, bakteriyel hücre yüzeyine ulaşmasını ve hedef bölgeye bağlanmasını önler. Bakteri hücre yüzeyindeki CPS miktarının, kolistine karşı gelişen direnç ile doğru orantılı olduğu gösterilmiştir. CPS sentez genlerinde mutasyon olan bakteri suşlarının, vahşi tip kapsüllü suşlara oranla antimikrobiyal peptid yapıları ilaçlara (polimiksin B, kolistin gibi) daha duyarlı oldukları saptanmıştır (72). *K. pneumoniae*'de kapsüller biyosentez genlerinin aktivasyonu, CPS üretimini artırarak polimiksinlerin Lipid A'ya ulaşmadan CPS tarafından yakalanmasını sağlar. Ortamda kolistin bulunması kapsüller biyosentez genlerinin aktivasyonunu tetikler (65).

Bazı bakteri türleri kapsül polisakkaritlerini hücre yüzeyinden serbest bırakabilmektedir. Bu durumda serbest kalan negatif yüklü kapsül polisakkaritleri, pozitif yüklü kolistin moleküllerine bağlanarak ilacın bakteri hücrelerine ulaşarak antimikrobiyal etkinlik

göstermesini önler ve direnç gelişimi sağlar (73). Ayrıca, konjugatif pilus ekspresyon (Cpx) ve kapsül sentez regülatörü (Rcs) gibi kapsül formasyonu düzenleyicisi olan proteinler, KpnEF dışa atım pompasını ve PhoP/PhoQ ikili sistemini aktivite ederek kolistin direncine katkıda bulunabilmektedirler (45).

2.2.7.5. Plazmid aracılı direnç gelişimi

Uzun yıllar boyunca kolistine karşı gelişen direncin yalnızca aktarılamayan kromozomal genler aracılığıyla geliştiği düşünülmekteyken 2015 yılında Çin’de yapılan bir süveyans çalışması sırasında, gıda olarak kullanılan hayvanlardan izole edilen *E. coli* suşlarında artan bir kolistin direnci gözlenmesiyle, direncin suşlar arasında aktarılıyor olabileceği ihtimali değerlendirmeye alınmış ve ilk plazmid aracılı kolistin direnç geni olan *mcr-1* tanımlanmıştır (7). Ardından yapılan çalışmalarda sıklıkla *E. coli* suşlarında olmakla birlikte *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella* ve *Cronobacter* gibi Enterobacteriaceae cinslerinde de *mcr-1* geni saptanmıştır (62). Bu genin kodladığı MCR-1 proteini fosfoetanolamin transferaz ailesine ait bir enzim olup Lipid A’ya PEtN eklenmesini sağlar. Bu durum kromozomal mekanizmalarda olduğu gibi kolistin ve LPS tabaka arasındaki elektrostatik bağı zayıflatarak direnç gelişimine neden olur. Farklı bir direnç mekanizmasına sahip olmayan bakteri suşlarında, yalnızca *mcr-1* geninin varlığı tek başına kolistin MİK değerlerinde 4 ila 8 kat artışa yol açmaktadır (32).

Günümüzde 10 farklı *mcr* tipi tanımlanmıştır (*mcr-1*’den *mcr-10*’a kadar). Her bir *mcr* gen grubu da farklı varyantlar içerebilmektedir. *mcr-1* ile en çok benzerlik gösteren tip *mcr-2* olup %81 aminoasit benzerliği taşımaktadır. *mcr* genine sahip suşlarda çoğunlukla bulunan tip *mcr-1* olup bunu ikinci sırada *mcr-3* takip etmektedir (65, 74).

2.2.7.6. Heterorezistans

Heterorezistans, bir antibiyotiğe karşı duyarlı olduğu saptanan bir suşun alt popülasyonlarında, o ilaca karşı direnç gelişimini ifade etmektedir. Tüm popülasyonun antibiyotiğe dirençli olduğu geleneksel dirence göre daha riskli olabileceği düşünülmektedir. Çünkü ilaca karşı duyarlı saptanan etken için tedavi başlandığında etken duyarlı popülasyonu öldürür, dirençli popülasyon hayatta kalarak hızlı bir artış gösterebilir (75).

Kolistine karşı heterorezistans *K. pneumoniae*, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* türlerinde gösterilmiştir. Heterorezistan alt suşların daha önce kolistinle tedavi edilmiş hasta gruplarında anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Düşük doz ve yetersiz kolistin tedavisinin heterorezistans gelişimine katkı sağladığı ön görülmektedir (64, 76).

Heterorezistansın bir önemi de standart antimikrobiyal duyarlılık testlerinde saptanamıyor oluşudur. Standart bir yöntem belirlenmiş olmamakla birlikte heterorezistansın saptanması için en sık kullanılan üç yöntem: Popülasyon Analiz Profili (PAP), Etest ve disk

difüzyondur. Dirençli alt popülasyonun sıklığı ve MİK değerleri hakkında bilgi sağlayan PAP yöntemi bu direnç şeklinin saptanmasında altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak maliyetli ve uygulanması zor olması sebebiyle Etest ve disk difüzyonda inhibisyon zonu içerisinde dirençli alt popülasyon üremesinin izlenmesi daha sık tercih edilmektedir (77).

2.2.8. Kolistin duyarlılığı saptanmasında denenen antibiyotik duyarlılık test yöntemleri

Kolistin yıllar içerisinde, MDR etken kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde önemli bir ilaç haline gelmiştir. Kolistine karşı direnç gelişiminin, hastalarda yüksek mortalite oranlarıyla seyretmesi sebebiyle duyarlılık testlerinin kullanımı önem teşkil etmektedir. Ancak polimiksinlerin agar içerisindeki zayıf difüzyonu ve heterorezistans gelişimi gibi faktörler kolistin duyarlılığının belirlenmesinde kısıtlayıcı olabilmektedir (32).

CLSI ve EUCAST, kolistin duyarlılığının saptanmasında altın standart yöntem olarak ISO 20776-1 standartlarına göre yapılan sıvı mikrodilüsyon (BMD) yöntemini önermektedir. Ancak yöntemin uygulama zorluğu ve az sayıda laboratuvarın rutin işleyişinde yer bulabilmesi sebebiyle, alternatif yöntemlere gereksinim duyulmuştur. CLSI, MİK ölçümü yapan iki yöntem olan sıvı disk elüsyon ve kolistin agar testlerinin Enterobacterales üyesi bakteriler ve *Pseudomonas* türlerinde alternatif yöntemler olarak kullanılabileceğini belirtmiş olsa da, EUCAST kolistin duyarlılığı sonucunun raporlanması için BMD yöntemiyle mutlaka doğrulanması gerektiğini bildirmiştir. Ülkemizde AST sınır değerleri EUCAST standartlarına göre değerlendirilmektedir. EUCAST, kolistin için MİK sınır değerlerini Enterobacterales ve *Acinetobacter* türlerinde 2 µg/ml; *Pseudomonas* türlerinde ise 4 µg/ml olarak belirlemiştir. Kolistine duyarlı *E. coli* ATCC 25922 veya *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve kolistine dirençli *mcr-1* pozitif *E. coli* NCTC 13846 suşlarının kontrol suşlar olarak kullanılmasını önermiştir (11, 13).

Günümüzde BMD yöntemi yerine kullanılacak, maliyet etkin ve kolay uygulanabilir yöntem arayışları devam etmektedir. Bu amaç doğrultusunda dilüsyon temelli yöntemler, manuel veya otomatize standart duyarlılık testleri, seçici besiyerleri ile kültür, kalitatif yöntemler, fosfoetanolamin transferaz aktivitesini saptayan yöntemler ve kolistin direncine sebep olan genlerin saptanmasına yönelik genotipik yöntemler gibi farklı tür testler geliştirilmiştir. Bu testlerin rutin laboratuvar işleyişine uygunlukları denenmeye devam etmektedir (6, 32).

2.2.8.1. Dilüsyon temelli yöntemler

Bu yöntemlerde amaç; 35 ± 2 °C'de, 16-24 saat inkübasyon sonrası, görünür bakteri büyümesini inhibe eden en düşük ilaç konsantrasyon değeri olan MİK değerinin hesaplanmasıdır (32).

2.2.8.1.1. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi

Kolistin için antimikrobiyal duyarlılığın saptanmasında referans yöntem olarak kabul edilmektedir (11, 13). Yöntem herhangi bir sürfaktan madde eklenmemiş olan 96 kuyucuklu polistren plaklarda, kolistin sülfat etken maddesi ile uygulanır. Besiyeri olarak katyon ayarlı sıvı Mueller-Hinton (CA-MHB) kullanılır. Kolistin sülfatın iki kat seyreltilerek hazırlanmış seri dilüsyonlarına, bakteri inokulumlarının eklenmesi ve inkübasyon süresi sonunda bulanıklığın olmadığı ilk kuyucuktaki ilaç konsantrasyon değerinin MİK olarak belirlenmesi temelinde uygulanan bir yöntemdir (78).

BMD; hatalı bir kolistin konsantrasyonu hazırlanması, hatalı dilüsyon, kontaminasyon gibi risklere açık bir yöntem olması sebebiyle, her laboratuvarın rutin işleyişinde yer bulamamaktadır (6). Ayrıca kolistin sülfatın polistren plak yüzeylerinden adsorbe olabildiği gösterilmiş ve bu adsorbsiyonun MİK değerlerinde hatalı bir yüksekliğe sebep olabileceği düşünülmüştür. Bu durumu önlemek için kuyucuklara polisorbata-80 gibi sürfaktan maddeler eklenmesinin denendiği çalışmalarda, sürfaktan madde eklenmiş kuyucuklarda MİK değerlerinin eklenmemiş olanlara göre daha düşük olduğu gösterilmiştir (79). Ancak ISO 20776-1 standartları, referans yöntemde sürfaktan madde kullanılmamasını önermektedir (6). Öte yandan *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* türlerinde bakteri üremesinin görülmediği kuyucuktan sonraki kuyucuklarda “atlamalı” olarak tekrar üreme gözlemlenmektedir. Bu durum bakteri alt popülasyonlarında heterorezistans gelişmiş olabileceğini düşündürmekle beraber, tekrarlanamayan ve yorumlanamayan BMD sonuçlarına sebep olabilmektedir. Bu negatif özelliklere karşın testin uygulamasında otomasyon devreye sokularak, insan kaynaklı hata oranlarının azaltılabilmesi ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olması sebebiyle referans yöntem olarak kullanımına devam edilmektedir (6, 32).

2.2.8.1.2. Sıvı makrodilüsyon yöntemi

BMD ile aynı prensibe dayanan, polistren plaklar yerine cam tüplerde ve daha yüksek hacimde besiyeri kullanılarak uygulanan bir MİK belirleme yöntemidir (32). Sıvı makrodilüsyonun, BMD ile karşılaştırılmasında temel uyumun (EA) %83 bulunduğu, çok büyük hataya (VME) rastlanmayan bir çalışma mevcut olup aynı çalışmada testin hazırlığının zor olması ve ticari besiyerlerinin bulunmaması sebebiyle rutin laboratuvar uygulamaları için pratik bir yöntem olmadığı vurgulanmıştır (80).

2.2.8.1.3. Agar dilüsyon yöntemi

Sıvı dilüsyonların agarda uygulanan bir versiyonu olarak tanımlanabilen bir yöntemdir. CLSI tarafından kolistin duyarlılığı saptanmasında sıvı mikrodilüsyona alternatif olarak önerilen kolistin agar testi, bir agar dilüsyon yöntemidir. Kolistin sülfatın 2 kat seri dilüsyonları hazırlanarak, eritilmiş Mueller-Hinton agara (MHA) karıştırılır. Besiyeri katı

halini alınca, CLSI önerileri doğrultusunda hazırlanan bakteri inokulumunun ekimi, manuel olarak veya otomatik inokülatör ile yapılır. Yöntemin avantajı bir plakta birden fazla bakteri suşunun değerlendirilebilmesine olanak sağlamasıdır. Hazırlığın zaman alıcı ve emek yoğun olması ve hazırlanan agarların bir hafta içinde kullanılması gerekliliği testin rutin laboratuvar işleyişinde yaygın kullanılmamasına sebep olmaktadır (32). Birkaç yıl öncesine kadar BMD ile yüksek uyum gösterdiğine dair çalışmalar yapılmış olsa da yakın zamanlı bir çalışmada polimiksin B ve kolistin için sırasıyla VME oranları %12,2 ve %9,1; EA oranları %85 ve %75,1; kategorik uyum (CA) oranları %87,3 ve %90,9 olarak saptanmıştır (81).

2.2.8.1.4. Sıvı mikrodilüsyon temelli ticari yöntemler

Sıvı mikrodilüsyon yöntemindeki insan kaynaklı hataları en aza indirebilmek ve uygulamayı daha kolay hale getirebilmek amacıyla, çeşitli firmalar tarafından kolistin seri dilüsyonlarının ve CA-MHB'nin hazır halde bulunduğu kitler geliştirilmiştir. Bu testlerin referans BMD ile uyumlarının iyi olduğu yönünde çalışmalar mevcuttur (6, 12).

Sensititre sistemi (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD), kolistin 0,12'den 128 µg/ml'ye kadar, iki kat seri dilüsyonları hazırlanmış, 96 kuyucuklu mikropklara bakteri inokulumu eklenmesi prensibine dayanmaktadır. Bir plakta sekize kadar bakteri suşunun kolistin duyarlılığı değerlendirilebilir. Ekim ve değerlendirme için otomasyonun mümkün olduğu bir yöntemdir (32). UMIC (Biocentric, Bandol, Fransa) ve MICRONAUT MIC Strip (MERLIN Diagnostika Bornheim-Hersel, Almanya) testleri birbirleriyle benzer biçimde kurgulanmış olup, 12 kuyucuklu polistren stripler içerisinde uygulanır. Kolistin dilüsyonları 0,06'dan 64 µg/ml'ye kadar iki kat seri seyreltmeler şeklinde hazırlanmıştır (6). SensiTest™ (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, İtalya) ise dilüsyonların 0,25'ten 16 µg/ml'ye kadar hazırlandığı bir yöntemdir. Bir mikropklakta dört bakteriye kadar değerlendirme ve okuma aşaması için otomasyon imkanı mevcuttur (82).

2.2.8.2. Standart duyarlılık testleri

2.2.8.2.1. Manuel yöntemler

Standart antimikrobiyal duyarlılık testlerinin başında gelen yöntem Kirby-Bauer disk difüzyon (DD) testidir. Duyarlılığı tanımlanmak istenen bakterinin CLSI ve EUCAST önerileri doğrultusunda hazırlanan standart inokulumu, MHA yüzeyine yayılır ve belirli konsantrasyonda kolistin içeren disk yerleştirilir. 35 ± 2 °C'de, 16-24 saat inkübasyon sonrası zon çapı değerlendirilir. MİK değeri ölçüm imkanı yoktur. Yöntemin ucuz ve kolay uygulanabilir olması büyük avantaj sağlasa da, kolistin agara difüzyonunun zayıf ve yavaş olması sebebiyle, bakteri suşlarının bu ilaca karşı duyarlılıklarının belirlenmesinde DD testi güvenilir bulunmamaktadır. Bakteri inokulumun yayıldığı MHA yüzeyine disk yerine, 0,016'dan 256 µg/ml'ye kadar konsantrasyonlarda kolistin içeren şeritlerin yerleştirildiği

gradiyent test yöntemi de manuel standart antimikrobiyal duyarlılık testlerindedir. Bu yöntemle MİK değeri hesaplanabilir. Göreceli olarak bir miktar pahalı fakat kolay uygulanabilir bir yöntemdir. Ancak DD ile benzer sebeplerden, kolistin duyarlılığı belirlenmesi amacıyla kullanımı uygun bulunmamıştır (32). DD yöntemi için sıklıkla VME oranları yüksek saptanmış ve kolistin duyarlılığı belirlenmesi için uygun bir yöntem olmadığı düşünülmüştür (14, 83). Gradiyent test için ise VME ve EA oranlarının farklılık gösterebildiği çalışmalar mevcuttur (14, 83, 84). CLSI ve EUCAST her iki yöntemin de kolistin duyarlılığı saptanmasında kullanılamayacağını belirtmektedir (11, 13).

DD ve gradiyent test yöntemlerinde inhibisyon zonları içerisinde bakteri kolonisi görülmesi heterorezistan suşlar için bir alarm şeklinde yorumlanabilmektedir. Bu iki yöntem heterorezistansın saptanmasında PAP'a bir alternatif olarak kullanılabilir (6, 77).

2.2.8.2.2. Otomatize sistemler

Manuel duyarlılık yöntemlerine kıyasla sensitivitenin artırılması, sonuç sürelerinin kısaltılması ve yanlışlığın azaltılması amacıyla otomatize AST sistemleri geliştirilmiştir. VITEK®2 (BioMérieux, Marcy l'Étoile, Fransa) yarı otomatize bir sistemdir. Kolistin 0,5'ten 16 µg/ml'ye kadar iki kat seri konsantrasyonlarını içeren plastik reaktif kartlar kullanılır. Kısaltılmış bir inkübasyon süresi (4-10 saat) boyunca bakteri üremesi izlemine yarar. Hızlı tanıma ve AST'yi birleştiren bir yöntemdir. BD Phoenix™ (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Fransa) sistemi ise 1'den 4 µg/ml'ye kadar iki kat seri kolistin konsantrasyonları bulduran bir sistem olup, büyük bir inkübatör ve okuyucuya sahiptir. Okuma 6-16 saat inkübasyon sürecinde oksidasyon-redüksiyon göstergelerine göre yapılmaktadır. Bir diğer otomatize sistem olan MicroScan WalkAway (Beckman Coulter, San Diego, CA, ABD), 2 ve 4 µg/ml konsantrasyonlarda kolistin içeren standart mikrodilüsyon plaklarını kullanan bir sistemdir. Manuel inokülasyon sonrası cihazda 4-18 saat inkübasyon sırasında florometrik okuma gerçekleştirilir (85).

Otomatize sistemlerin MİK aralıklarının değişken olması ve çalışmaların çoğunda VME oranlarının kabul edilebilir düzeyden yüksek olması kolistin duyarlılığının değerlendirilmesinde kullanımlarını kısıtlayan etmenlerdir (16, 17, 86).

2.2.8.3. Kolistin sıvı disk elüsyon yöntemi (CBDE)

Kolistin duyarlılığı saptanması amacıyla yakın zamanda denenmeye başlanmış bir yöntemdir. Değerlendirilecek her bir bakteri suşu için dört adet steril tüpe 10'ar ml CA-MHB hazırlanır. Tüplere 10 µg kolistin disklerinden sırasıyla 0, 1, 2, 4 adet atılır ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletilir. Böylelikle ilk tüp üreme kontrolü olacak şekilde, diğer tüplerde sırasıyla 1, 2, 4 µg/ml kolistin konsantrasyonu elde edilir. CLSI önerileri doğrultusunda hazırlanan bakteri inokulumu tüplere eklenir ve 35 ± 2 °C'de 16-20 saat

inkübasyon sonrası değerlendirme yapılır. Bulanıklığın olmadığı ilk tüpün konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenir (87). Disk elüsyon yönteminin referans yöntem ile iyi uyum gösterdiğini ve VME oranlarının düşük olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (88,89). Uygulanabilirliğinin BMD'ye kıyasla daha kolay olması yöntemin avantajıdır (87). CLSI, Enterobacterales üyesi bakteriler ve *P. aeruginosa* 'da kolistin duyarlılığının belirlenmesi için, bu yöntemin BMD alternatifi olarak kullanımını uygun görmektedir (13).

2.2.8.4. Hızlı kalitatif yöntemler

MİK değeri belirlemeden, kısa sürede duyarlılık durumunu tanımlamak amacıyla geliştirilmiş testlerdir. Hızlı Polimiksin Nordmann-Poirel Testi (Elitech Microbio, Signes, Fransa) bakterilerin glukozu metabolize ederken oluşan pH değişimlerinin izlemi ile kolistin duyarlılığının saptanabilmesini amaçlayan bir yöntemdir. pH'daki düşüş, indikatör olarak kullanılan fenol kırmızısı sayesinde, testin uygulandığı kuyucuklarda renk değişimi meydana getirir. Uygun metabolitler ve kolistin sülfat tozu ile hazırlanan reaktif solüsyonlar içerisine bakteri inokülumları eklenir. Kolistine duyarlı suşların metabolik aktivite gösterememesi ve renk değişikliği olmaması; kolistine dirençli suşların ise glukozu metabolize ederek ortam pH'ını asidikleştirmesi ve renk değişikliği görülmesi beklenir. Yöntem ortalama iki saat içerisinde sonuç verebilmektedir. Maliyet etkin bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Testin duyarlılık ve özgüllüğü yüksek saptanmasına karşın heterorezistan suşları atlama riski yüksek görülmüştür (90, 91). Bir diğer kalitatif test olan Micromax Testi (Halotech DNA SL, Madrid, İspanya) ise *A. baumannii* suşları üzerinde tanımlanıp çalışılmış olup, kolistin varlığında bakteri hücrelerinde meydana gelen nükleik asit ve hücre duvar hasarının saptanması prensibine dayanır. DNA fragmanları florokrom boyalar ile işaretlenir. Kolistine dirençli suşlarda floresans görülmemesi beklenir. 3-4 saatte sonuçlar alınabilir. Hızlı Polimiksin Nordmann-Poirel Testi'ne benzer şekilde duyarlılık ve özgüllüğü yüksek bulunmuş, ancak direnç tipini belirlemede yetersiz görülmüştür (6).

2.2.8.5. Seçici besiyerleri ile kültür

Kolistine dirençli suşların belirleyebilen bir kültür ortamı oluşturabilmek amacıyla çeşitli yöntemler denenmiştir. Selektif olmayan besiyerlerine, gram pozitif bakteri kontaminasyonunu önleyecek antibiyotikler ve kolistin ilavesiyle denemeler yapılmıştır. Bu yöntemler *Serratia marcescens* ve *Burkholderia cepacia* gibi kolistine doğal dirençli bakteri suşlarının taranması için uygun bulunsa da, düşük düzey direnç gösteren suşları, özellikle plazmid aracılı direnci yakalayamadıkları görülmüştür. Bu eksilikleri giderebilmek amacıyla SuperPolimiksin (Elitech Microbio, Signes, Fransa), CHROMagar™ COL-APSE, ChromID Colistin R (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Fransa), Luria-Bertani ve Lucie-Bardet-Jean-Marc-Rolain (LBJMR) besiyerleri geliştirilmiştir. Farklı selektif olmayan ortamlara, değişik

miktarlarda kolistin eklenerek oluşturulan bu besiyerlerinin, dirençli suşları saptamada duyarlılıkları yüksek bulunmuştur. CHROMagar™ COL-APSE besiyerinin non-fermantatif bakterilerdeki direnci saptamasının SuperPolimiksin'e kıyasla daha etkili olduğu gösterilmiştir (92–95).

2.2.8.6. Fosfoetanolamin transferaz aktivitesini saptayan yöntemler

Mikroorganizmaları kütle/yük oranından faydalanarak tanımlamaya imkan sağlayan MALDI-TOF MS cihazı ile uygulanan MALDIxin testi, kolistin direnci varlığının araştırılması ve direnç mekanizmasının tanımlanabilmesi amacıyla geliştirilmiş yöntemlerden biridir. Yöntem ilk olarak *E. coli* suşlarında çalışılmıştır (96). Gram negatif bakteri hücre duvarı elemanı olan Lipid A'nın MALDI-TOF MS ile değerlendirmede belirli bir değerde pik oluşturduğu belirlenmiştir. Kolistin direnci bulunan bakteri suşlarında, LPS yapısına eklenen karbonhidrat gruplarının varlığını gösteren başka bir pik daha görülmüştür. Bu pik, o bakteri suşunda kolistine karşı direnç ile ilişkilendirilmiştir. Ancak söz konusu ikinci pik var olan direncin kaynağının kromozomal ya da plazmid aracılı olduğunu belirlenmesi için yetersizdir. Değerlendirilen suşta MCR proteini (fosfoetanol transferaz enzimi) varlığında üçüncü bir pik daha izlenmiş ve direncin plazmid aracılı olduğu sonucuna varılmıştır. Test, sonrasında diğer bakteri türleri üzerinde de denenmiştir. Lipid A'nın orijinal halinin ve direnç gelişimi sağlayan modifikasyonlarının pik değerleri bakteri türleri arasında farklılık göstermektedir. Test ile 15 dakikada kolistin direnç varlığının saptanabilmesi ve direnç mekanizmasına dair bilgi edinilebilmesi en büyük avantajlarıdır. Cihazın tüm mikrobiyoloji laboratuvarları için ulaşılabilir olmaması ise testin yaygın kullanımını engelleyen bir durumdur (96, 97).

Kolistin MAC testi, çinko şelatöleri varlığında, bir çinko metalloproteinaz olan MCR'nin inhibisyonunun gösterilmesi prensibine dayanır. Dipikolinik asit varlığında kolistin MİK değerlerinde azalma meydana gelmesi, bakteri suşlarında MCR proteininin varlığını ve dolayısıyla bu suşların plazmid aracılı kolistin direnç genine sahip olduklarını düşündürmüştür (98).

2.2.8.7. Genotipik yöntemler

Direnç genlerinin veya direnç gelişimine sebep olan gen mutasyonlarının belirlenmesinde hassas yöntemlerdir. Fenotipik yöntemleri tamamlayıcı niteliktedir ve doğrulama sağlar. Kolistine karşı kromozomal genler aracılığıyla gelişen direnç TCS'leri ve bunlara etkili birçok gen bölgelerini içerdiğinden, bu sistemlerdeki mutasyonların saptanabilmesi aktarılabilen bir direnç geninin saptanabilmesine oranla daha karmaşık olmaktadır. Bu mekanizmaların ve mutasyona uğrayan genlerin (sıklıkla *phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrB* ve *mgrB*) tanımlanması için tüm genom sekanslama (WGS) yapılması gereklidir (6).

Plazmid aracılı kolistin direnç genlerinin (*mcr*) saptanmasında altın standart yöntemler konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve WGS'dir. Konvansiyonel PCR ile her reaksiyonda tek bir tip *mcr* saptanabilirken, WGS tüm direnç genlerinin dizilenmesini sağlar. Bu iki yöntem dışında multipleks PCR (M-PCR), RT- qPCR, mikroarray ve Loop Aracılı İzotermal Amplifikasyon (LAMP) yöntemleri de *mcr* genlerinin tespiti amacıyla kullanılabilir (6, 95).

M-PCR sistemleri sıklıkla *mcr* ve karbapenem direnç genlerini tespit edecek şekilde dizayn edilmektedir. Günümüzde *mcr-9*'a kadar olan *mcr* tiplerini saptayabilen yöntemler geliştirilmiştir. Bu doğrultuda çeşitli ticari multipleks PCR kitleri de kullanıma sunulmuştur. Örneğin, Amplidiag Carba-R+ MCR (Mobidiag, Espoo, Finlandiya) ve AusDiagnostic MT CRE EU (AusDiagnostics, Chesham, Birleşik Krallık) testleri karbapenemaz ve *mcr-1/-2* genlerini saptamak amacıyla geliştirilmiş testlerdir (95, 99, 100).

mcr genlerinin tespiti için geliştirilen RT-PCR yöntemleri dsDNA bağlayıcı bir boya olan SYBR yeşili veya floresan ışımaya sağlayan TaqMan® probu kullanılarak uygulanabilir. SYBR yeşili kullanılan yöntemlerle *mcr-5*'e kadar olan *mcr* genlerinin değerlendirildiği, TaqMan® probu kullanılanlarda ise *mcr-1*'den *mcr-8*'e kadar olan genlerin saptanabildiği sistemler geliştirilmiştir. RT-PCR yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri başarılı bulunmuştur (95).

Reaksiyonun sürekli aynı sıcaklıkta gerçekleştiği bir yöntem olan LAMP yöntemi, *mcr-1* geninin saptanması amacıyla denenen yöntemlerden birisi olmuştur. LAMP prensibiyle çalışan Eazyplex SuperBug *mcr-1* (Amplex Biosystems GmbH, Giessen, Almanya) kitinin 20 dakika gibi kısa bir süre içerisinde *mcr-1* genini saptayabildiği gösterilmiştir. Ayrıca testin çalışıldığı cihazın mobil olabilmesi ve 4 saat enerji kaynağına ihtiyaç duymadan çalışabilmesi avantajları olarak değerlendirilmiştir. Testin kısıtlılıkları ise saatte maksimum altı örnek çalışabilmesi, yalnızca *mcr-1* genini tespit edebilmesi ve doğrudan klinik örneklerden denenmemiş olması olarak belirlenmiştir (101). Kitin kısıtlılıklarını azaltabilmek amacıyla çalışmalar yapılmış, *mcr-2* ve *mcr-5* için ikili ve *mcr-1*, *mcr-3* ve *mcr-4* için üçlü LAMP yöntemleri geliştirilerek beş adet *mcr* geni saptayabilir hale getirilmiştir. Yöntemin duyarlılığı konvansiyonel PCR'ye göre 10 kat fazla bulunmuştur (102).

“Gen çipi” olarak adlandırılan ve aynı anda binlerce genin ekspresyon düzeyinin izleme olarak tanıyan mikroarray yöntemi kullanılarak geliştirilen CT103XL testi ESBL, karbapenemaz genleri ile birlikte *mcr-1* ve *mcr-2* tespiti için de denenmiş, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek bulunmuştur. Aynı anda 24 örnek test edilebilmekte ve 6,5 saatte sonuçlar elde edilebilmektedir (103).

Güncel moleküler yaklaşımlarda en hassas yöntem, yeni nesil dizileme teknikleridir. Kısa gen bölgeleri dizilemesi sağlayabilen Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, ABD) ve daha uzun dizileme imkanı sağlayabilen PacBio RS II (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, ABD) bu amaç için geliştirilmiş sistemlerdir. Sistemler aracılığıyla elde edilen diziler birleştirilerek genom oluşturulur ve referans veri tabanları ile karşılaştırılarak haritalama yapılır. Böylelikle bir bakteri hücresindeki tüm genomun dizilenmesi ve barındırdığı tüm direnç genleri tespit edilebilir. Yeni genlerin saptanabilmesi için veri tabanlarının sürekli güncellenmesi gerekliliği testler için bir kısıtlılık oluştursa da, fenotipik yöntemlerle belirlenen direncin doğrulanması için son basamak olarak kabul edilirler (6).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma tasarımı

Sunulan bu çalışma referans yöntemle karşılaştırmalı olarak alternatif yöntemlerin kullanılabilirliğini test etmesi nedeniyle metodolojik özelliktedir. Bağımlı değişkenler kullanılacak olan yöntemlerle elde edilen kolistin duyarlılık sonuçları; bağımsız değişkenler ise çalışmaya dahil edilen *Klebsiella pneumoniae* suşlarıdır.

3.2. Çalışma grubu

Çalışmaya, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'na, Ekim 2019-Aralık 2021 arasında kabulü yapılan kan kültürü örneklerinde üreyen 151 *K. pneumoniae* suşu dahil edildi. Örneklem büyüklüğü, daha önce yapılmış çalışmalardaki kolistin direnç prevalansları temel alınarak, NCSS data PASS programı ile %95 (± 10) güven aralığında hesaplandı. Tekrarlayan *K. pneumoniae* üremesi olan kan kültürlerinden yalnızca ilk örnekler çalışmaya dahil edildi.

EUCAST önerileri doğrultusunda her test için kontrol grubu olarak, kolistine dirençli *mcr-1* pozitif *E. coli* NCTC 13846 (MİK hedefi:4 $\mu\text{g/ml}$, MİK aralığı 2-8 $\mu\text{g/ml}$) ve kolistine duyarlı *E. coli* ATCC 25922 (MİK hedefi:0,5-1 $\mu\text{g/ml}$, MİK aralığı 0,25-2 $\mu\text{g/ml}$) suşları kullanıldı (11, 104).

3.3. Kültür ve tanımlama

Laboratuvara kabulü yapılan kan kültürü şişeleri, inkübasyon için beş gün süreyle VersaTREK® System (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, ABD) kan kültür cihazına yerleştirildi. Beş gün içinde sinyal veren şişeler cihazdan çıkarılarak, %5 koyun kanlı agar (KKA) ve eozin metilen blue (EMB) agara ekimleri yapıldı. Plaklar 37 °C'de 48 saat inkübe edildi. Her iki besiyerinde de üreyen gram negatif bakteriler, MALDI-TOF teknolojisini kullanan VITEK® MS (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Fransa) cihazı ile tanımlandı.

3.4. Bakteri suşlarının saklanması ve canlandırılması

K. pneumoniae olarak tanımlanan ve çalışmaya dahil edilmesi planlanan bakteri kolonilerinden %5 KKA'da saf kültürler elde edildi ve uygun besiyerlerine stok yapılarak -80 °C'de saklandı. Çalışma gününden bir gün önce dondurucudan çıkarılan izolatlar %5 KKA'da 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek taze kültürler hazırlandı.

3.5. Antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanması

3.5.1. Referans BMD yönteminin uygulanması

Yöntem, ISO 20776-1 standartları temel alınarak hazırlanan CLSI M07 rehberi yönergeleri doğrultusunda uygulanmıştır (78).

3.5.1.1. CA-MHB besiyerinin hazırlanması

Üretici firmanın talimatlarına uygun olarak, 22 mg CA-MHB tozu (Sigma-Aldrich, ABD) ve 1000 ml distile su oranı korunacak şekilde 500 ml çözelti hazırlandı. Etken madde tamamen homojen çözüldükten sonra 121 °C’de 10 dakika otoklavlandı. Oda sıcaklığına geldiğinde kullanıldı.

3.5.1.2. Antibiyotik stok solüsyonunun hazırlanması

Antibiyotik stok solüsyonu $\geq 19,000$ IU/mg kolistin sülfat (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılarak hazırlandı (ürünün potensi üretici firma tarafından 22986 IU/mg olarak ölçülmüştür). Ağırlık (mg) = Hacim (ml) \times İstenilen konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$) / Potens ($\mu\text{g/mg}$) formülü kullanılarak 3 ml distile su içerisinde 13,7 mg kolistin sülfat çözüldü ve 5120 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda stok solüsyonu hazır hale getirildi. Birer ml hacimde steril tüplere bölünerek -20 °C’ye kaldırıldı.

3.5.1.3. Bakteri inokülumunun hazırlanması

%5 KKA’da 18-24 saatlik inkübasyon süresi sonrası, hazırlanan taze kültürlerden serum fizyolojik içinde 0,5 McFarland (10^8 cfu/ml) yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlandı. Ölçüm için dansitometre kullanıldı. Hazırlanan süspansiyondan 50 μl alınarak 4950 μl serum fizyolojik içinde dilüe edildi. Ardından son yoğunluğu 10^6 cfu/ml konsantrasyon olan bu çözeltiden 5×10^4 cfu içerecek şekilde 50 μl alınarak mikroplaklara inoküle edilmesi planlandı.

3.5.1.4. Yöntemin uygulanışı

Uygulama 96 kuyucuklu, U tabanlı mikroplaklar içerisinde gerçekleştirildi. Hazırlanan CA-MHB besiyerinden tüm kuyucuklara 50 μl dağıtıldı. Daha önce hazırlanıp stoklanmış antibiyotik solüsyonu oda sıcaklığına getirildi. 5120 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyondaki solüsyonun 1 ml’si 9 ml CA-MHB içinde dilüe edilerek 512 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda antibiyotik solüsyonu elde edildi. Hazırlanan bu solüsyondan 50 μl alınarak mikroplakların ilk yedi satırının, ilk kuyucuklarına eklendi. Ardından ilk kuyucuklardan 50’şer μl ikinci kuyucuklara aktarıldı ve bu işlem 11. kuyucuğa kadar devam ettirildi. Son olarak 11. kuyucuktan çekilen 50 μl atıldı. Böylelikle son satır hariç ilk kuyucuklarda 256 $\mu\text{g/ml}$, 11. kuyucuklarda 0,25 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon olacak şekilde kolistinin iki kat seri dilüsyonları hazırlandı ve tüm kuyucukların son hacmi 50 μl oldu. Her plakta 12. kuyucuklar üreme kontrolü olarak kullanılacağı için antibiyotik eklenmedi. Plakların uygulamaya hazırlanmasının ardından her bakteri için, bir satırın tüm kuyucuklarına 5×10^4 cfu bakteri içeren inokülumdan 50’şer μl eklendi. Böylece 5×10^4 cfu/kuyucuk (5×10^5 cfu/ml) bakteri konsantrasyonu sağlandı. Son satırların sterilite kontrolü olarak kullanılması planlandığından yalnızca besiyeri içerecek şekilde bırakıldı. İnokülumların eklenmesiyle kuyucuklardaki

hacim iki katına çıktığı için, son kolistin konsantrasyonları ilk kuyucuklarda 128 µg/ml, 11. kuyucuklarda 0,125 µg/ml olacak şekilde seri dilüsyonlar elde edildi. Kapağı kapatılan mikropalaklar 37 °C etüvde 18-20 saat inkübasyona bırakıldı.

3.5.1.5. MİK değerlerinin belirlenmesi

İnkübasyon süresi sonrası etüvden çıkarılan plakların her biri için ilk olarak üreme kontrolü olarak belirlenen 12. kuyucukta bakteri üremesi olduğu ve sterilizasyon kontrolü olarak belirlenen son satırda kontaminasyon olmadığı teyit edildi. Ardından gözle okuma gerçekleştirildi. Her bakteri için üremenin (kuyucukta bulanıklaşmanın) görülmediği ilk konsantrasyon değeri MİK olarak belirlendi.

3.5.2. Otomatize sistem VITEK® 2 ile kolistin duyarlılığının belirlenmesi

Bakteri suşlarının tanımlaması yapıldıktan sonra, laboratuvarında otomatize sistemle değerlendirilmesi uygun olan antibiyotiklerin duyarlılıklarının belirlemede rutin olarak uygulanan yöntem, üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Her bakteri için 3'er ml serum fizyolojik içerisine, doğrudan koloni süspansiyonu yöntemi ile 0,5 McFarland yoğunlukta bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyondan 145 µl alınarak 3 ml serum fizyolojik içerisinde dilüe edildi. Ardından tüpün içerisine gram negatif AST-N325 kartı koyularak VITEK® 2 Compact (BioMérieux, Marcy l'Étoile, Fransa) cihazına yerleştirildi. 8-18 saatlik süre sonrası cihazın $\leq 0,5$ ile ≥ 16 µg/ml arasında belirlediği MİK değerleri ve duyarlılık sonuçları kaydedildi.

3.5.3. BMD temelli ticari Sensititre™ yönteminin uygulanması

Yöntem üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı. Canlandırılan bakteri suşlarından 0,5 McFarland standartlarında inokulum hazırlandı. Bu inokulumun 10 µl'si Sensititre™ (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, USA) kit içeriğinde hazır gelen 11 ml CA-MHB içeren tüpe aktarıldı ve homojen karışma sağlanması için tüp alt üst edildi. Ardından 30 dakika içerisinde, her satır için ilk kuyucukta 0,125 µg/ml ve 11. kuyucukta 128 µg/ml konsantrasyonda olmak üzere kolistin iki kat seri dilüsyonları hazır halde bulunan mikropalaklara CA-MHB içinde hazırlanan inokulumdan 50'şer µl eklendi. Antibiyotik içermeyen 12. kuyucuklar üreme kontrolü olarak kullanıldı. Bir plakta toplam sekiz bakteri suşunun kolistin duyarlılığı değerlendirilmek üzere, plakların üzeri yapışkan şeffaf bantlarla kapatılarak 37 °C etüvde 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası etüvden çıkarılan plaklarda öncelikle 12. kuyucuklardaki üreme varlığı kontrol edildi. Ardından görünür bakteri üremesinin olmadığı ilk değerler MİK olarak belirlendi.

3.5.4. Kolistin sıvı disk elüsyon yönteminin (CBDE) uygulanması

Her bakteri suşu için 10 ml hacminde CA-MHB besiyeri içeren dört adet steril cam tüp hazırlandı. Tüplerin ilki üreme kontrolü olarak kullanılmak üzere boş bırakıldı. Diğer

tüplere 10 µg kolistin disklerinden (Oxoid, İngiltere) sırasıyla 1, 2 ve 4 adet atılarak, tüpler 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Tüplerdeki kolistin konsantrasyonlarının sırasıyla 0, 1, 2 ve 4 µg/ml olması sağlandı. Bu süre sonunda çalışma için canlandırılan bakterilerden hazırlanan 0,5 McFarland konsantrasyondaki inokülumlardan 50'şer µl tüplere eklendi ve tüpler düşük hızda vortekslendi. Böylelikle yöntem için referans alınan çalışmada belirtildiği üzere her tüpte 7.5×10^5 CFU/ml bakteri konsantrasyonu elde edildi (87). Tüpler 37 °C etüvde 16-20 saat inkübasyon sonrası değerlendirildi. Bakteri üremesinin (bulanıklığın) olmadığı ilk tüpün içerdiği konsantrasyon, MİK değeri olarak belirlendi.

3.5.5. Gradyent test yönteminin uygulanması

Doğrudan koloni süspansiyonu yöntemiyle hazırlanan 0,5 McFarland yoğunluğundaki bakteri inokulumu, steril pamuklu eküvyonla fazla suyu bırakılacak şekilde alınarak, oda sıcaklığına getirilmiş Mueller-Hinton agar yüzeyine, 60 derecelik açılarla üç kere yayıldı ve son olarak eküvyon plak çevresinde gezdirildi. ETEST® stripleri (BioMérieux, Marcy l'Étoile, Fransa) yüzeye yerleştirilmeden önce 3-5 dakika nemin agar yüzeyinden absorbe olması beklendi. Ardından dondurucudan çıkarılıp oda sıcaklığına gelen gradiyent test şeritleri ince bir penset yardımıyla, ilk olarak düşük konsantrasyonlu uçlarından agara temas edecek şekilde besiyerinin yüzeyine yerleştirildi. Plaklar 15 dakika içerisinde 37 °C etüve kaldırıldı. 16-20 saat inkübasyon sonrası çıkarılan plaklar, aydınlık bir ortamda, koyu renkli zemin üzerinde değerlendirildi. İnhibisyon zonunun gradiyent test şeridine temas ettiği konsantrasyon değeri, MİK olarak belirlendi. Bu yöntemin temel uyumunun değerlendirilebilmesi için testin MİK ölçüm aralığı (0,094-32 µg/ml), BMD dilüsyonlarına göre uyarlandı.

3.5.6. Real Time PCR yöntemi ile *mcr* genlerinin saptanması

3.5.6.1. Nükleik asit izolasyonu

Çalışma grubundaki bakterilerden nükleik asit izolasyonu kaynatma ve sonikasyon yöntemlerinin kombinasyonu ile gerçekleştirildi. 1,5 ml'lik Eppendorf tüplere birer ml fosfat buffer salin (PBS) dağıtıldı. %5 KKA'da canlandırılan bakterilerden bir öze dolusu alınarak tüplere eklendi ve karışım homojen hale gelene kadar vortekslendi. 14.000×g'de 15 dakika santrifüj sonrası üst sıvı atıldı. Peletlerin üzerine 300'er µl PBS eklendi ve vortekslendi. Ardından tüpler 95 °C su banyosunda 20 dakika bekletildi. Sürenin sonunda sonikatöre aktarıldı ve 15 dakika sonikatörde tutuldu. 14.000×g'de 10 dakika santrifüj sonrası üst sıvı PCR'de kullanılmak üzere steril tüplere alındı.

3.5.6.2. PCR reaksiyonunun kurulması

mcr genlerinin saptanması amacıyla *mcr*-1'den *mcr*-8'e kadar değerlendirme imkanı sağlayan, Kolistin Direnci Real-Time PCR Tespit Kiti (Bioeksen Ar Ge Teknolojileri A.Ş.,

İstanbul, Türkiye) kullanıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda soğuk blok üzerinde, örnek başına 5 µl DNA polimeraz, dNTP karışımı ve reaksiyon tamponu karışımı içeren “Prime qPCR Mix” ve 2,5 µl saptanması hedeflenen gen bölgesinin primerlerini içeren “Oligo Mix” olacak şekilde hesaplanarak PCR karışımı hazır hale getirildi. Kitin içerisinde her *mcr* tipi için ayrı “Oligo Mix” bulunması sebebiyle her gen için ayrı PCR karışımı hazırlandı. Soğuk blok üzerinde, her tüpte 7,5 µl karışım olacak şekilde PCR tüplerine dağıtım yapıldı. Çalışma grubundaki bakterilerden izole edilen nükleik asitleri içeren solüsyonlardan 2,5 µl tüplere eklenerek, her tüpte 10 µl reaksiyon hacmi elde edildi. Kit içeriğinde bulunan negatif/pozitif kontroller ve kontrol suşlarından (*E. coli* NCTC 13846 ve *E. coli* ATCC 25922) izole edilen nükleik asitler her reaksiyonda çalışıldı. “Oligo Mix”lerin içerdiği, hedef gen bölgelerinin primer dizileri Tablo 1.’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Hedef gen bölgelerinin primer dizileri

| | | Primer dizileri | |
|-----------|--------------|-------------------------|------------------------|
| | | F* | R** |
| Hedef gen | <i>mcr-1</i> | AGTCCGTTTGTCTTGTGGC | AGATCCTTGGTCTCGGCTTG |
| | <i>mcr-2</i> | CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT | TCTAGCCCCGACAAGCATAACC |
| | <i>mcr-3</i> | AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG | AATGGAGATCCCCGTTTTT |
| | <i>mcr-4</i> | TCACTTTCATCACTGCGTTG | TTGGTCCATGACTACCAATG |
| | <i>mcr-5</i> | ATGCGGTTGTCTGCATTTATC | TCATTGTGGTTGTCTTTTCTG |
| | <i>mcr-6</i> | GTCCGGTCAATCCCTATCTGT | ATCACGGGATTGACATAGCTAC |
| | <i>mcr-7</i> | TGCTCAAGCCCTTCTTTTCGT | TTCATCTGCGCCACCTCGT |
| | <i>mcr-8</i> | AACCGCCAGAGCACAGAATT | TTCCCCCAGCGATTCTCCAT |

F*: “forward” primer dizileri

R***: “reverse” primer dizileri

3.5.6.3. Örneklerin cihaza yüklenmesi ve reaksiyonun başlatılması

PCR döngüleri için Roto-Gene Q (Qiagen Inc., Hilden, Almanya) cihazı kullanıldı. Soğuk blok üzerinde taşınan örnekler cihaza yerleştirildi. Cihaza bağlı bilgisayarda, PCR kiti üreticisinin önerileri doğrultusunda, 95 °C’de 5 dakika denatürasyon, ardından 95 °C’de 10 saniye ve 60 °C’de 40 saniye 40 döngü olacak şekilde düzenlendi ve çalışma başlatıldı.

3.5.6.4. Sonuçların yorumlanması

Sonuçlar değerlendirilirken kit kullanım kılavuzunda önerildiği üzere; “Dynamic Tube” etkin, “Slope Correct” pasif, “Outlier Removal” sıfır ve “Threshold” 0,02 olarak ayarlandı. Kontrollerin tamamının çalışıp çalışmadığı değerlendirildi. Testin geçerli olduğu teyit edildiğinde örneklerin değerlendirilmesine geçildi. Amplifikasyon eğrilerinin şekli değerlendirilerek sigmoidal eğriler pozitif, düz çizen ya da sigmoidal olmayan eğriler negatif olarak kabul edildi.

3.6. İstatistiksel parametreler

Karşılaştırmalı tabloların hazırlanması ve istatistiksel analiz için IBM SPSS Statistic Data Editor programının 27.0 sürümü kullanıldı. Alternatif olarak kullanılma durumu araştırılan yöntemler, referans yöntem ile dört gözlü çapraz tablolarda kıyaslanarak, her test için duyarlılık (testin dirençli suşları saptayabilme yüzdesi), özgüllük (testin duyarlı suşları saptayabilme yüzdesi), pozitif prediktif değer (PPD) (yeni yöntemle dirençli bulunan suşların yüzde kaçının referans yöntemle de dirençli bulunduğu) ve negatif prediktif değer (NPD) (yeni yöntemle duyarlı bulunan suşların yüzde kaçının referans yöntemle de duyarlı bulunduğu) hesaplandı. Referans yöntemin duyarlılık kategorisi (duyarlı, dirençli) ile test edilen yöntemin duyarlılık kategorisinin uyumunu ifade eden kategorik uyum (CA) oranları değerlendirildi. Ayrıca referans test ile kolistine duyarlı bulunan suşlardan alternatif yöntemin dirençli saptadıklarının oranı olarak tanımlanan büyük hata (ME) ve referans yöntem ile kolistine dirençli saptanan suşlardan alternatif yöntemin duyarlı saptadıklarının oranı şeklinde tanımlanan çok büyük hata (VME) değerleri hesaplandı.

Tablo 2. İstatistiksel parametrelerin hesaplanması için oluşturulan çapraz tablo

| | | ALTIN STANDART YÖNTEM | | Toplam |
|-------------|--------------|--------------------------|-------------|---------|
| | | DİRENÇLİ (n) | DUYARLI (n) | |
| YENİ YÖNTEM | DİRENÇLİ (n) | a | b | a+b |
| | DUYARLI (n) | c | d | c+d |
| Toplam | | a+c | b+d | a+b+c+d |

n: tanımlanan gruplarda bulunan bakteri suşu sayısı

Her alternatif test için oluşturulan çapraz karşılaştırma tablolarının şablonu Tablo 2.'de gösterilmiştir. Tanımlanan istatistiksel parametreler bu tablo üzerinden aşağıdaki formülasyonlar ile hesaplandı:

- 1) Duyarlılık: $(a / (a+c)) \times 100$
- 2) Özgüllük: $(d / (b+d)) \times 100$
- 3) Pozitif prediktif değer: $(a / (a+b)) \times 100$
- 4) Negatif prediktif değer: $(d / (c+d)) \times 100$
- 5) Kategorik uyum (CA): $((a+d) / (a+b+c+d)) \times 100$
- 6) Büyük hata (ME): $(b / (b+d)) \times 100$
- 7) Çok büyük hata (VME): $(c / (a+c)) \times 100$

Listelenen parametreler dışında, karşılaştırmaya alınan testlerden, MİK ölçüm aralıkları uygun olan Sensititre™, VITEK®2 ve ETEST® için; bu yöntemlerle saptanan MİK değerlerinin, referans yöntemle saptanan MİK değerleri ile ± 1 konsantrasyon değerine kadar uyumu, anlamına gelen esansiyel uyum (EA) oranları korelasyon tablolarıyla incelendi. ISO 20776-2:2021 standartlarında göre veri analizi yapılmış yakın zamanlı çalışmalar referans alınarak MİK değerlerinin tek yönlü olup olmadığı açısından bias değerlendirmesi yapıldı (105, 106). CBDE testinin saptayabildiği yalnızca üç MİK değeri (1, 2 ve 4 $\mu\text{g/ml}$) olması sebebiyle bu yöntem için EA ve bias hesaplanmadı.

Elde edilen sonuçların altın standart yönteme göre uyumu değerlendirilirken kabul edilebilir CA, EA, ME ve VME oranları, CLSI verilerine göre, sırasıyla $\geq 90\%$, $\geq 90\%$, $\leq 3\%$ ve $\leq 1,5\%$ olarak; bias oranları ise ISO 20776-2:2021 standartlarına göre $\pm 30\%$ aralığı olarak belirlendi (105–107).

3.7. Etik Kurul

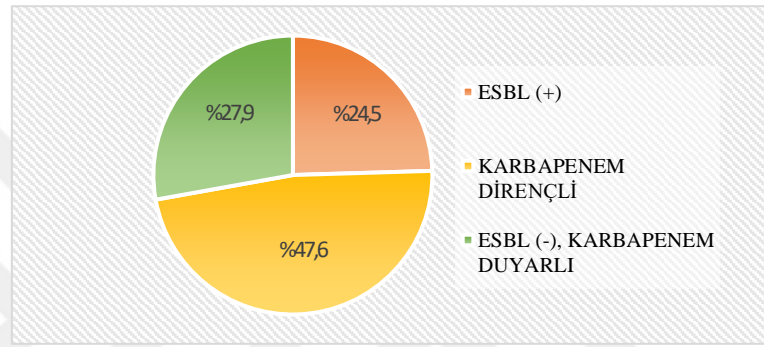
Çalışma Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'nun 17.09.2020 tarihli, 20-9.1T/18 numaralı kararına göre etik kurallara uygun bulunmuştur.

3.8. Bütçe desteği

Çalışma bütçesi Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından karşılanmıştır (Proje no. 22130).

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 151 *K. pneumoniae* suşunun laboratuvarın rutin işleyişinde çalışılan antibiyotik duyarlılık sonuçları incelendiğinde ESBL üreten suşların oranı %24,5 (n=37); karbapenem dirençli suşların oranı %47,6 (n=72) olarak belirlendi (Şekil 4). Kolistin duyarlılığının saptanmasında altın standart olan BMD yöntemi ile hastanemizde kan kültürlerinden izole edilen *K. pneumoniae* suşlarının, Ekim 2019-Aralık 2021 arasındaki kolistin direnci prevalansı %16,6 olarak bulundu. ESBL pozitif suşlarda kolistin direnç oranı %2,7 (n=1), karbapenem dirençli suşlarda ise %33,3 (n=24) olarak saptandı.



Şekil 4. Suşların genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üretim ve karbapenem direnç oranları
ESBL: genişlemiş spektrumlu beta laktamaz

Kullanılan standart suşların MİK değerleri altın standart yöntem ile *E. coli* NCTC 13846 ve *E. coli* ATCC 25922 için 4 ve 1 µg/ml olarak belirlendi. Değerlendirilen yöntemlerin tamamı ile *E. coli* NCTC 13846 suşu dirençli, *E. coli* ATCC 25922 suşu ise duyarlı bulundu. *E. coli* NCTC 13846 suşunun test edilen yöntemler ile saptanan MİK değerleri Sensititre™, VITEK®2, ETEST® ve disk elüsyon için sırasıyla 8, 8, 3 ve 4 µg/ml; *E. coli* ATCC 25922'nin MİK değerleri ise 1, ≤0,5, 0,5 ve 1 µg/ml olup, BMD ile saptanan değerler ile ±1 konsantrasyon uyumu sağladı. RT-qPCR yöntemi ile *E. coli* NCTC 13846 suşunda *mcr-1* pozitif saptanırken, *E. coli* ATCC 25922 suşunda herhangi bir *mcr* geninin varlığı belirlenmedi.

BMD temelli ticari Sensititre™, ETEST® ve CBDE yöntemleri, duyarlılık kategorilerinin belirlenmesinde altın standart yöntem ile birebir uyum gösterdi. Üç yöntem için de duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD ve CA %100; ME ve VME oranları sıfır olarak saptandı. Yöntemlerin duyarlılık sonuçlarının BMD ile karşılaştırılmaları Tablo 3, Tablo 4 ve Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Sensititre™ yöntemi duyarlılık sonuçlarının sıvı mikrodilüsyon sonuçlarıyla karşılaştırılması

| | | BMD | | Toplam |
|-------------|--------------|--------------|-------------|--------|
| | | DİRENÇLİ (n) | DUYARLI (n) | |
| Sensititre™ | DİRENÇLİ (n) | 25 | 0 | 25 |
| | DUYARLI (n) | 0 | 126 | 126 |
| Toplam | | 25 | 126 | 151 |

n: Tanımlanan gruplarda bulunan bakteri suşu sayısı; BMD: Sıvı mikrodilüsyon

Tablo 4. ETEST® yöntemi duyarlılık sonuçlarının sıvı mikrodilüsyon sonuçlarıyla karşılaştırılması

| | | BMD | | Toplam |
|--------|--------------|--------------|-------------|--------|
| | | DİRENÇLİ (n) | DUYARLI (n) | |
| EEST® | DİRENÇLİ (n) | 25 | 0 | 25 |
| | DUYARLI (n) | 0 | 126 | 126 |
| Toplam | | 25 | 126 | 151 |

n: tanımlanan gruplarda bulunan bakteri suşu sayısı; BMD: Sıvı mikrodilüsyon

Tablo 5. Kolistin sıvı disk elüsyon yöntemi duyarlılık sonuçlarının sıvı mikrodilüsyon sonuçlarıyla karşılaştırılması

| | | BMD | | Toplam |
|--------|--------------|--------------|-------------|--------|
| | | DİRENÇLİ (n) | DUYARLI (n) | |
| CBDE | DİRENÇLİ (n) | 25 | 0 | 25 |
| | DUYARLI (n) | 0 | 126 | 126 |
| Toplam | | 25 | 126 | 151 |

n: tanımlanan gruplarda bulunan bakteri suşu sayısı; BMD: Sıvı mikrodilüsyon

CBDE: Kolistin sıvı disk elüsyon

Otomatize AST sistemi VITEK®2 sonuçları incelendiğinde; BMD ile duyarlı saptanan bir suşun VITEK®2 ile dirençli, BMD ile dirençli saptanan iki suşun ise VITEK®2 ile duyarlı olarak saptandığı görüldü (Tablo 6). Yöntem için duyarlılık %92, özgüllük %99,2, PPD %95,8, NPĐ %98,4, CA %98, ME %0,79 (n=1) ve VME %8 (n=2) olarak hesaplandı. Sonuçların uyumsuz bulunduğu üç suşun altın standart yöntem ile saptanan MİK değerleri sırasıyla 1, 4 ve 8 µg/ml; VITEK®2 ile ≥16, 2 ve ≤0,5 µg/ml idi. Çalışmada denenen diğer duyarlılık yöntemlerinin bu suşlarda saptadığı MİK değerleri ise Sensititre™ için 1, 4, 32 µg/ml; CBDE için 1, 4, >4 µg/ml; EEST® için 0,38, 4, 3 µg/ml olarak belirlendi.

Tablo 6. VITEK[®]2 duyarlılık sonuçlarının sıvı mikrodilüsyon sonuçlarıyla karşılaştırılması

| | | BMD | | Toplam |
|----------------------|--------------|--------------|------------|--------|
| | | DİRENÇLİ (n) | DUYARLI(n) | |
| VITEK [®] 2 | DİRENÇLİ (n) | 23 | 1 | 24 |
| | DUYARLI (n) | 2 | 125 | 127 |
| Toplam | | 25 | 126 | 151 |

n: tanımlanan gruplarda bulunan bakteri suşu sayısı; BMD: Sıvı mikrodilüsyon

Yöntemlerin EA oranları Sensititre[™], VITEK[®]2 ve ETEST[®] için sırasıyla %92,7, %78,1 ve %52,3; bias değerleri ise +%35,1, -%68,8, -%76,8 olarak hesaplanmıştır. Her bir yöntemin saptadığı MİK değerlerinin altın standart yöntem ile bakteri sayısı üzerinden karşılaştırılması Tablo 7, Tablo 8 ve Tablo 9’da gösterilmiş, ± 1 MİK uyumları renkli işaretlenmiştir.

Tablo 7. Sensititre[™] ile saptanan minimum inhibitör konsantrasyon değerlerinin sıvı mikrodilüsyon ile saptananlar ile karşılaştırılması

| | | BMD MİK | | | | | | | | | | Toplam | |
|--------------------------------|------|---------|-----|----|----|---|---|----|----|----|-----|--------|----|
| | | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | | |
| Sensititre [™] MİK | 0,25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 0,5 | 0 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| | 1 | 1 | 19 | 43 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 75 |
| | 2 | 0 | 4 | 25 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 46 |
| | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| | 32 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| | 64 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 6 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| | 128 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 5 |
| Toplam | | 1 | 27 | 69 | 29 | 2 | 3 | 9 | 10 | 0 | 1 | 151 | |

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$); BMD: Sıvı mikrodilüsyon

Tablo 8. VITEK®2 ile saptanan minimum inhibitör konsantrasyon değerlerinin sıvı mikrodilüsyon ile saptananlar ile karşılaştırılması

| | | BMD MİK | | | | | | | | | | | Toplam |
|----------------|------|---------|------|-----|----|----|---|---|----|----|----|-----|--------|
| | | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | |
| VITEK®2 MİK | ≤0,5 | 0 | 1 | 27 | 67 | 29 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 125 |
| | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | ≥16 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 9 | 10 | 0 | 1 | 23 |
| Toplam | | 0 | 1 | 27 | 69 | 29 | 2 | 3 | 9 | 10 | 0 | 1 | 151 |

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$); BMD: Sıvı mikrodilüsyon

Tablo 9. ETEST® ile saptanan minimum inhibitör konsantrasyon değerlerinin sıvı mikrodilüsyon ile saptananlar ile karşılaştırılması

| | N* | U** | BMD MİK | | | | | | | | | | Toplam |
|---------------|-------|------|---------|-----|----|----|---|---|----|----|----|-----|--------|
| | | | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | |
| ETEST® MİK | 0,094 | 0,25 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | 0,125 | | 0 | 5 | 9 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 |
| | 0,19 | | 1 | 3 | 7 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 |
| | 0,25 | | 0 | 5 | 19 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 29 |
| | 0,38 | 0,5 | 0 | 5 | 24 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 39 |
| | 0,5 | | 0 | 5 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| | 0,75 | 1 | 0 | 4 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 |
| | 1 | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 3 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 5 |
| | 4 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| | 6 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| | 8 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 3 |
| | 12 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 3 |
| | 16 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 24 | 32 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 1 | 4 |
| 32 | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 | |
| Toplam | | | 1 | 27 | 69 | 29 | 2 | 3 | 9 | 10 | 0 | 1 | 151 |

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)

N*: Etest ile saptanan normal MİK değerleri

U**: Temel uyum değerlendirilmesinde BMD'ye göre uyarlanmış Etest MİK değerleri

BMD: Sıvı mikrodilüsyon

mcr genlerinin varlığının belirlenmesi amacıyla uygulanan RT-qPCR testinde çalışmaya dahil edilen suşların hiçbirinde *mcr-1*'den *mcr-8*'e kadar olan direnç genleri saptanmadı. Standart olarak kullanılan *mcr-1* pozitif olduğu bilinen *E. coli* NCTC 13846 suşunun RT-qPCR ile değerlendirilmesinde *mcr-1* "Oligo Mix" ile hazırlanan reaksiyonda sigmoidal eğri saptandı ve *mcr-1* pozitif olarak değerlendirildi.



5. TARTIŞMA

Enterobacteriaceae ailesindeki bakterilerin antibiyotiklere direnç oranlarında yıllar içerisinde görülen artış endişe vericidir. MDR bakteriler ile meydana gelen enfeksiyonlar, yılda 700000 ölüm ile sonuçlanmakta ve bu sayının 2050 yılına kadar 1000000'a yükselmesi beklenmektedir (108). Bu suşlarla oluşan enfeksiyonlar, tedavi başarısızlığına sebep olarak artan tedavi maliyetleri ve hastaneye yatış oranlarını beraberinde getirmekte ve ülkeler için sosyoekonomik bir yük oluşturmaktadır (108, 109). Son basamak beta laktam grubu antibiyotikler olan karbapenemlere karşı gelişen direncin ve MDR bakterilerin etken olduğu enfeksiyonların hızla artışı ve bu artışa karşı yeni geliştirilen antibiyotik olanaklarının kısıtlılığı, eski bir ilaç olan kolistin klinikte kullanımını yeniden yaygınlaştırmıştır. Kullanımının artışı ise ilaca karşı gelişen direnç oranlarındaki yükselmeyi beraberinde getirmiştir (6). Yan etkileri de göz önüne alındığında, enfeksiyon etkeni bakterilerin kolistine karşı antibiyotik duyarlılığının belirlenerek ilacın akılcı kullanımının sağlanması büyük önem teşkil etmektedir (110). CLSI ve EUCAST tarafından kolistin duyarlılığı belirlenmesinde altın standart yöntem olarak kabul edilen BMD yönteminin uygulanmasındaki zorluklar, rutin laboratuvarlarda kullanımının sınırlı olmasına sebep olmaktadır. Bu durum hem kolistin duyarlılığının hem de dünya genelinde direnç sürveyansının değerlendirilmesinde zorluklara yol açmakta ve BMD'ye alternatif olabilecek AST ihtiyacını doğurmaktadır (6, 10, 110).

K. pneumoniae suşları hastane kaynaklı enfeksiyonların yaygın etkenlerinden birisi olup, Enterobacteriaceae ailesindeki diğer üyelerde olduğu gibi antibiyotik direnç oranları istikrarlı bir şekilde artmaktadır (109, 110). Doğu ve Güneybatı Avrupa ile Akdeniz ülkeleri, 3. kuşak sefalosporinler, florokinolonlar ve aminoglikozidlere karşı %50-60 oranında direnç gösteren, ESBL üreten *K. pneumoniae* suşları için endemik bölgelerdir (109). Ülkemizde *K. pneumoniae* suşlarındaki ESBL oranı Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS) 2016 verilerine göre %58; hastane enfeksiyonu etkeni olarak değerlendirilen suşlardaki ESBL oranı ise USHİESA 2021 verilerine göre %66'dır (8,9). Avrupa sürveyans verilerine göre 2005 yılında karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* suşları yalnızca Yunanistan'da %27,8 oranında saptanmışken, 2021 yılında Yunanistan'da oranın %73,7'ye yükselmiş olduğu görülmüş ve ayrıca Romanya, Bulgaristan, Slovakya, Hırvatistan, İspanya, Portekiz, Polonya ve Kıbrıs'taki suşlarda da değişen oranlarda (%6-54) karbapenem direnci saptanmıştır (111). Ülkemizde ise bu oranlar UAMDSS 2016 verilerine göre imipenem ve meropenem için %40,1, ertapenem için ise %48,9; USHİESA 2021 verilerine göre %63,57 olarak belirlenmiştir (9).

Duyarlılık testi için kullanılan altın standart yöntemin zorluklarına rağmen, kolistin direnci yaygınlığının belirlenebilmesi için yapılan çok sayıda çalışma mevcuttur. Japonya’da ESBL üreten veya karbapenem dirençli 273 adet Enterobacteriaceae suşunun incelendiği bir çalışmada, kolistin direnç oranları tüm izolatlarda %7,7; ESBL pozitif izolatlarda %1,1 ve karbapenem dirençli Enterobacteriaceae (CRE) izolatlarında %20,4 olarak saptanmıştır (112). Amerika’da kan dolaşımı, idrar yolu, deri, solunum sistemi ve intraabdominal enfeksiyon sebebiyle YBÜ’de takip edilen hastalardan izole edilen etkenlerin değerlendirildiği bir çalışmada ise kolistin direnç oranları, tüm örneklerden izole edilen Enterobacterales üyesi bakterilerde %20,7, kan kültürü örneklerinden izole edilenlerde ise %15,7 olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada ESBL üreten suşlarda %1, CRE suşlarında %14,3 oranında kolistin direnci saptanırken, çalışmaya dahil edilen *K. pneumoniae* suşlarındaki direnç oranı %1,1 olarak izlenmiştir (113). İran’da *K. pneumoniae* suşlarındaki kolistin direnç oranlarını belirlemeyi hedefleyen ve 19 çalışmanın dahil edildiği bir meta analizde %6,9 olarak saptanan kolistin direnç oranları Mısır, Suudi Arabistan, Avustralya, Hindistan, Polonya, Pakistan ve İspanya’da yapılan çalışmalar (kolistin direnç oranı yüzdeleri %4,8-34,5 aralığında) ile kıyaslanmıştır (10). Ülkemizdeki sürveyans programlarının verileri incelendiğinde UAMDSS 2016 raporunda *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* türlerinde kolistin direnç oranları sırasıyla %17,5, %3, %5,2 ve %4 olarak belirlenmiş ancak, sürveyans kapsamındaki laboratuvarların birçoğunda altın standart yöntem yerine otomatize sistem sonuçlarının değerlendirmeye alınması sebebiyle verilerin gerçek direnç oranlarını yansıtmıyor olabileceği bildirilmiştir (9). USHİESA 2021 raporunda ise kolistine dirençli *K. pneumoniae* oranı %31,93; *A. baumannii* oranı ise %10,96 olarak açıklanmıştır (8).

Bu çalışmada kan kültürü örneklerinde üreyen *K. pneumoniae* suşlarında, CLSI ve EUCAST tarafından altın standart yöntem olarak önerilen BMD yöntemi kullanılarak belirlenen kolistin direnç oranı %16,6’dır. Suşlardan 37’si ESBL pozitif, 72’si karbapenem dirençli saptanmıştır. ESBL pozitif suşlarda kolistin direnç oranı %2,7 (n=1) iken karbapenem dirençli suşlarda %33,3 (n=24) olarak bulunmuştur. Ülkemizin farklı coğrafi bölgelerinde bulunan 20 merkezin verileriyle planlanan bir çalışmada kan kültürlerinden izole edilen 460 *K. pneumoniae* suşunun kolistin direnç oranları, çalışmamıza benzer şekilde %16,1 bulunmuş, ancak bu çalışmada kolistin duyarlılığının belirlenmesinde otomatize sistem sonuçları kullanılmıştır (114). Yine ülkemizde çeşitli örneklerden izole edilen karbapenem dirençli 150 *K. pneumoniae* suşunda kolistin direncinin araştırıldığı ve kandan izole edilen suşlardaki kolistin direncinin %38,7 olarak saptandığı bir çalışma ile sonuçlarımızın benzer olduğu görülmüştür (115). Avrupa verileri incelendiğinde CRE suşlarındaki kolistin direnç oranlarının ülkeler arası heterojenite göstermekte olduğu dikkat çekmektedir. Yunanistan’da

2007 yılında karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* suşlarında kolistin direnci bulunmazken, yıllar içerisinde kolistin direncinin arttığı ve 2014-2016 yılları arasında %40,4 oranına ulaştığı, Almanya’da bu oranın %13,3 olduğu bildirilirken İspanya ve İtalya’da CRE suşlarında %31 ve %43’e varan oranlarda direnç tespit edildiği raporlanmıştır (116). Dadashi ve ark. *E. coli* suşlarında kolistin direnci ve *mcr* gen prevalansını araştırmak üzere, 2000-2020 yılları arasında Türkiye dahil 56 ülkeden yayınlanmış 190 makaleyi dahil ederek yaptıkları meta analizlerinde, kolistin direnç oranlarını Asya, Avrupa, Amerika ve Afrika kıtalarında sırasıyla %3,6, %0,62, %0,48 ve %1,25 olarak belirlemişlerdir (74). Kamboçya, Suudi Arabistan, Cezayir, İrlanda, Finlandiya, Portekiz, Venezuela, Ekvador ve Yeni Zelanda gibi bazı ülkelerde *E. coli* suşlarındaki kolistin direnç oranı %100 saptanmakla birlikte bu yüksek direnç oranları, çalışmaya dahil edilen makalelerde izole edilen bakteri suş sayılarının azlığından kaynaklanmış olabilir. En az kolistin direnci saptanan ülkeler Asya, Avrupa, Amerika ve Afrika kıtalarında sırası ile Kore (%0,17), Rusya (%0,006), Kanada (%0,19) ve Tunus (%0,15) olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada Türkiye’deki direnç oranı %3,63 olarak bildirilmiştir (74). Aris ve ark. 2013-2018 yılları arasında yayınlanmış verilerle, Orta Doğu bölgesindeki *K. pneumoniae* suşlarında kolistin direnci prevalansını araştırdıkları çalışmalarında, Türkiye, İran, Suudi Arabistan, Birleşik Arap Emirlikleri, Kuveyt, İsrail ve Lübnan’dan rapor edilmiş 590 suşun verilerini incelemiş ve kolistin dirençli belirlenen suşların %90’dan fazlasının Türkiye ve İran’dan bildirildiğini saptamışlardır (117). Çalışmada Türkiye’de 2013-2016 yılları arasında sıfır ila %6 arası değişen kolistin direnç oranlarının 2016’da %20’lerin üzerine çıktığına dair sunulan veriler dikkat çekicidir (117).

Sıvı mikrodilüsyon temelli ticari Sensititre™, çalışmamızda değerlendirilen yöntemler arasında altın standart ile en fazla uyum gösteren test olarak belirlenmiştir. Yöntemin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer ve CA oranları %100, ME ve VME oranları sıfır, EA oranı ise %92,7 olarak saptanmıştır. ISO 20776-2:2021 kriterlerine göre değerlendirildiğinde CA, EA, ME ve VME oranlarının kabul edilebilir değerlerde olduğu görülmüştür (118). Farklı çalışmalar incelendiğinde Sensititre™ yönteminin BMD ile uyumunda değişik sonuçlar izlenmektedir. Chew ve arkadaşlarının 76 Enterobacteriaceae suşunu inceleyerek yapmış olduğu bir çalışmada, BMD ile kıyaslanmasında Sensititre™ için duyarlılık %96, özgüllük %88,2, CA %90,1, EA %89,5, ME %11,8, VME ise %4 olarak saptanmış olup, ME ve VME oranlarındaki yüksekliğin örnek sayısının kısıtlılığı kaynaklı olabileceği düşünülmüştür (86). Bu çalışmada o dönem için üretici firma tarafından temin edilen Sensititre™ plaklarının MİK belirleme aralıklarının 0,25-4 µg/ml, uygulanan manuel BMD yönteminin ise 0,06-64 µg/ml olması, kliniğe doğrudan etki edecek bir etkisi öngörülme de, in vitro koşullar için, hesaplanan EA oranlarında

tutarsızlıklar meydana gelmiş olabileceğini düşündürmektedir. Gram negatif bakteriler ile planlanmış 44'ü Enterobacterales takımına ait 70 suş ile yapılan bir çalışmada Sensititre™ yönteminin CA'sı %92,9, VME'si %14,7 ve ME'si sıfır olarak hesaplanmış; saptanan MİK değerlerinin BMD ile karşılaştırılmasında suşların tamamı için EA oranı %87,1, Enterobacterales takımındaki suşlar için %88,6, çalışmadaki 14 adet *K. pneumoniae* suşu için ise %78,6 olarak belirlenmiştir (119). Chung ve ark.'nın 213 *A. baumannii* suşu ile planladıkları çalışmalarında Sensititre™ için CA, VME ve ME oranlarını sırasıyla %99,1, %1,2 ve %0,8 olarak belirlenmiştir (120). Çalışmada MİK sınır değerlerinin BMD ile kesişim kümeleri alınarak ve alınmadan tüm suşlar üzerinden olacak şekilde iki EA oranı hesaplanmış ve her ikisi de kabul edilebilir düzeyden düşük bulunmuştur (120).

Ülkemizde Kansak ve ark. tarafından, 38 adet (35'i kolistin dirençli, 3'ü kolistin duyarlı) MDR *K. pneumoniae* suşu ile planlanan, mikrodilüsyon temelli iki ticari testin performanslarının BMD ile karşılaştırıldığı çalışmada Sensititre™ için CA %97, EA %74, VME %2,8 olarak belirlenmiş, ME saptanmamıştır (121). Yazarlar bu çalışmada izolat sayısının azlığı ve çoğu izolatin kolistin dirençli olmasını, çalışmanın kısıtlılığı olarak değerlendirmişler ve EA oranının düşüklüğünün bu kısıtlılıklara bağlı olabileceğini düşünmüşlerdir (121). Yine ülkemizde yakın zamanda Demir Çuha ve ark.'nın 218 karbapenem dirençli gram negatif bakteride %19,3 oranında kolistin direnci saptadıkları çalışmalarında Sensititre™ yönteminin BMD ile kıyasında yüksek CA (%94,9) ve EA (%89) oranları saptanırken, VME (%7,14) ve ME (%3,4) oranlarının da yüksek bulunduğu görülmektedir (122). Çalışmaya dahil edilen 93 *Klebsiella* türünde ise CA %97,8, EA %88,2, VME %7,4 ve ME sıfır olarak belirlenmiştir (122). Jayol ve arkadaşlarının 146'sı Enterobacteriaceae suşu olan 185 gram negatif bakteri üzerinde yaptıkları çalışmada ise sunulan çalışmamıza benzer biçimde Sensititre™ yöntemi %98,7 CA, %3 VME ve sıfır ME oranlarıyla altın standart yöntem ile kıyasla, oldukça başarılı bulunmuştur (123). Bu çalışmada değerlendirilen yöntemlerin EA oranlarına dair veri bilgisi paylaşılmamış olması çalışmanın bir kısıtlılığı olarak düşünülebilir. Matuschek ve arkadaşlarının 75 adet gram negatif bakteri suşu (32 tanesi *E. coli* ve *K. pneumoniae*) üzerinde yedi farklı ticari yöntemi değerlendirdikleri çalışmalarında da Sensititre™ yönteminin altın standart yöntemle yüksek uyum gösterdiği saptanmış ve EA %96, CA %95, VME sıfır olarak belirlenmiştir (12). CRE saptanan 325 suş ile yapılan bir başka çalışmada ise CA %92,9 olarak saptanmasına rağmen, bizim bulgularımızın aksine EA %81,7, VME %6,6 ve ME %7,3 bulunmuştur (17). Çalışmamız verileri ve destekleyen literatür bilgileri ile değerlendirildiğinde Sensititre™ yönteminin kolistin duyarlılığı belirlenmesinde BMD'ye alternatif olarak kullanılma ihtimali olmakla birlikte, maliyet etkinliği laboratuvarların iş yüküne göre değişkenlik gösterebilir.

Son beş yıllık dönem içinde kullanımına başlanan ve CLSI çalışma grubu tarafından, Enterobacterales üyeleri ve *P. aeruginosa*'nın kolistin duyarlılığının saptanmasında BMD'ye alternatif olarak kullanılabilen CBDE, altın standart yönteme göre kolay uygulanabilir ve laboratuvar rutininde yer bulabilir bir yöntem olarak değerlendirilmektedir (13, 87). Bu sebepten yöntemi değerlendirmek amacıyla yapılmış çok sayıda çalışma mevcuttur. Sunulan çalışmada CBDE yönteminin BMD ile duyarlılık sonuçları %100 uyumlu bulunmuş, ancak yöntem ile değerlendirilen MİK değerlerinin sayısının kısıtlı olması (1, 2, 4 µg/ml) sebebiyle EA oranı hesaplanmamıştır. Simner ve ark.'nın 2018 yılında CBDE yönteminin ilk olarak tanımlandığı çalışmalarında, altısının *mcr-1* pozitif olduğu bilinen toplam 172 gram negatif bakterinin kolistin duyarlılıkları değerlendirilmiş, BMD ile kıyaslamada CBDE yönteminin CA %98, EA %99, VME %8 ve ME sıfır olarak bulunmuştur (87). Çalışmadaki örnekler incelendiğinde, hatalı duyarlılık sonuçlarının *mcr-1* pozitif olan suşlara ait olduğu görülmektedir. *mcr-1* pozitif altı adet suşun üçünde altın standart yöntem ile kolistin MİK değeri 4 µg/ml olarak belirlenirken, CBDE ile 2 µg/ml bulunmuştur. Yazarlar bu durumu göze alarak, kullanıma sundukları bu yöntem ile 2 µg/ml saptanan MİK değerlerinin BMD ile konfirme edilmesini ve bu izolatların *mcr* pozitifliği açısından araştırılmasını önermişlerdir (87). Bizim çalışmamızdan farklı olarak bu çalışmada, hazırlanan BMD plaklarında kolistin konsantrasyon aralıkları 0,25-8 µg/ml olarak planlanmış ve CBDE yöntemi için EA oranı hesaplanmıştır. Ayrıca bizim çalışmamızda, kullanılan standart suş dışındaki hiçbir bakteride *mcr* gen pozitifliği saptanmadığı için, CBDE yönteminin *mcr* pozitif suşlarda hatalı sonuçlar verip vermediği değerlendirilememiş, *mcr* pozitif *E. coli* NCTC 13846 standart suşunun MİK değeri ise 4 µg/ml olarak bulunmuştur. Humphries ve arkadaşlarının 627 gram negatif bakterinin (348'i Enterobacterales, 148'i *P. aeruginosa*, 131'i *Acinetobacter* türleri), kolistin duyarlılıklarını iki farklı yöntemle değerlendirdikleri ve referans BMD ile karşılaştırdıkları çalışmalarında, çalışma grubunun tamamı için CA %97,9, EA %94,4, VME %3,2 ve ME %0,9 olarak saptanmıştır (124). Bu çalışmada da bizim çalışmamızdan farklı olarak, Simner ve ark. tarafından yapılan çalışmadakine benzer şekilde, referans olarak kullanılan BMD yönteminin değerlendirdiği MİK aralıkları 0,25-16 µg/ml olduğu için EA oranı da hesaplanmıştır. Ayrıca bu çalışmada Simner ve ark.'nın çalışmasında hazırlanan 0, 1, 2, 4 µg/ml konsantrasyonda kolistin içeren tüpler haricinde, 10 µg kolistin diskinin 25 ml CA-MHB içinde bekletilmesiyle 0,4 µg/ml konsantrasyonda kolistin içeren ek bir tüp kullanılmış ve yöntem ile değerlendirilebilen MİK değerlerinin artırılması hedeflenmiştir. Hesaplanan parametrelerin her bakteri grubuna göre değerleri incelendiğinde CBDE yönteminin BMD ile en yüksek *P. aeruginosa* suşlarında (CA %99,3, EA %96,6, VME sıfır, ME %0,7), en düşük ise *Acinetobacter* spp. suşlarında (CA %95,4, EA %93,1,

VME %5,6, ME %3,3) uyum gösterdiği göze çarpmaktadır. Enterobacterales takımına ait bakterilerde ise CA %98,6, EA %94,3, VME %2,5 ve ME sıfır olarak belirlenmiştir (124). Bu çalışma verileri de CLSI önerilerinde olduğu gibi Enterobacterales ve *P. aeruginosa* suşlarının kolistin duyarlılığının belirlenmesi için CBDE yönteminin kullanılmasının uygun olduğunu desteklemektedir. Butt ve ark.'nın 114'ü Enterobacterales, 16'sı *P. aeruginosa* ve 10'u *A. baumannii* suşu olan örneklem grubuyla yakın zamanlı yaptığı bir çalışmada da Humphries'inkine benzer şekilde *A. baumannii*'de CBDE yönteminin VME oranı yüksek saptanmıştır (125). Ancak bu çalışmaya dahil edilen *A. baumannii* suş sayısının azlığı değerlendirme için bir kısıtlılık teşkil etmektedir. Romanya'da, 2022 yılında, Földes ve ark.'nın, kolistin duyarlılığının değerlendirilmesi amacıyla altı farklı yöntemi altın standart yöntem ile karşılaştırdığı bir çalışmada, bizim çalışma sonuçlarımıza benzer şekilde CBDE yönteminin duyarlılık, özgüllük ve CA oranları %100; VME ve ME oranları sıfır bulunmuştur (126). Ülkemizde de CBDE testinin değerlendirilmesinde yönelik yapılan çalışmalar mevcuttur. 2019 yılında Koyuncu-Özyurt ve ark. tarafından yapılan, 419 gram negatif bakterinin kolistin duyarlılıklarının CBDE ve BMD ile karşılaştırılmalı değerlendirildiği bir çalışmada CA %99,3, VME %0,2 ve ME %0,5 olarak saptanmıştır (127). Bu çalışmada bizim çalışmamıza benzer şekilde CBDE yöntemi için EA oranı hesaplanmamıştır. Yine ülkemizde 97'si Enterobacterales takımından olan 193 gram negatif bakterinin dahil edildiği başka bir çalışmada CBDE yöntemi ile saptanan duyarlılık sonuçlarının CA, EA, VME ve ME değerleri Enterobacterales için sırasıyla %94, %89, sıfır, %5; non-fermantatif bakteri suşları için ise %94, %92, %33 ve %1 olarak saptanmıştır (128). Çalışmada değerlendirmeye alınan 96 non-fermantatif bakteriden yalnızca üç tanesi kolistine dirençli bulunmuş ve CBDE yöntemi bu üç suştan bir tanesi için hatalı sonuç vermiştir. Dirençli suş sayısının azlığının VME oranının yüksek saptanmasına sebep olmuş olabileceği akla gelmektedir. Alhamwi ve Öksüz'ün kan kültürlerinden izole edilen 102 adet gram negatif bakteriyle planladığı çalışmalarında CBDE yöntemi, çalışmamızdaki gibi BMD ile tam uyum göstermiş ve yazarlar tarafından kolay uygulanabilir, maliyet etkin bir yöntem olarak yorumlanmıştır (88).

Moleküler büyüklüğü sebebiyle katı yüzeylere absorpsiyonu kısıtlı olan kolistin duyarlılık sonuçlarının belirlenmesinde, agar yüzeyinden yayılımla etki gösterme prensibine dayanan gradiyent test (Etest) yönteminin kullanımı önerilmemektedir (6). Ancak alternatif yöntem olarak kolay uygulanabilir ve maliyet etkin olması sebebiyle gradiyent test yönteminin BMD ile uyumunun araştırıldığı çok sayıda çalışma mevcut olup, çalışmalarda farklı oranlarda uyum elde edildiği dikkat çekmektedir. van der Heijden ve ark. 2007 yılında karbapenem dirençli 109 *P. aeruginosa* suşu ile yaptıkları çalışmada, kolistin ve polimiksin B için duyarlılık sonuçlarını altın standart BMD ile karşılaştırmış ve kolistin için Etest

yönteminin CA %100, EA %79,5, VME ve ME sıfır olarak saptanmıştır (129). Arroyo ve arkadaşlarının, 115 *A. baumannii* suşu ile yaptıkları bir çalışmada ise Etest yönteminin CA %98, VME %1,7 ve ME sıfır, EA ise %16,5 olarak belirlenmiştir (130). van der Heijden ve ark. gradiyent test yönteminin daha büyük test gruplarında çalışılmasına ihtiyaç olduğunu ve o zamana kadar Etest ile saptanan kolistin duyarlılık sonuçlarının referans yöntemle doğrulanması gerektiğini vurgularken, Arroyo ve ark. yöntem ile MİK değerlerinde en çok tutarsızlık belirledikleri 1 ve 2 µg/ml değerlerinin saptanması durumunda, BMD ile doğrulama yapılmasını önermişlerdir (129, 130). Çalışmamızda gradiyent test yöntemi, duyarlılık sonuçları açısından BMD ile %100 uyum göstermiş, yöntemin EA oranı ise %52,3 olarak saptanmıştır. Sonuçlarımız van der Heijden'in çalışması ile CA, ME ve VME oranlarında bire bir, Arroyo'nun çalışması ile de yüksek uyum göstermektedir. Ancak EA açısından her iki çalışmadan farklı sonuç elde edilmiştir. Nhung ve ark. 2015 yılında Vietnam'da yaptıkları çalışmalarında, 241 gram negatif bakterinin, BMD ve Etest ile çalışılıp karşılaştırılan kolistin duyarlılık sonuçlarının, her bakteri grubu için uyum değerlendirilmesini yapmıştır (131). Araştırmacılar *A. baumannii* ve Enterobacteriaceae için CA'yı %100 hesaplarken, *P. aeruginosa* için yöntemin bir (%0,4) ME gösterdiğini saptamışlardır. Hiçbir bakteri grubunda VME'ye rastlanmamıştır. EA oranları da bakteri gruplarına göre incelendiğinde en yüksek uyum *P. aeruginosa* (%90), en düşük uyum *A. baumannii* (%76) suşlarında izlenmiştir. Enterobacteriaceae'de EA %84 saptanmış ve tür düzeyinde inceleme yapıldığında *E. coli* suşlarında %95,5, *K. pneumoniae* suşlarında ise %76 olduğu görülmüştür (131). Çalışmaya alınan suşların BMD ile saptanan kolistin duyarlılıkları incelendiğinde 241 suşun toplam 14'ünün dirençli saptandığı, *A. baumannii* suşlarının tamamının ise duyarlı olduğu görülmektedir. Dirençli suşların sayısının az olması bu çalışmada bir kısıtlılık olarak görülebilir. Bu çalışmada saptanan EA oranları çalışmamızla benzer olmamasına rağmen, araştırmacıların *K. pneumoniae* suşlarında bu uyumu diğer bakteri gruplarına göre düşük bulması, çalışmamızda da oranın %52,3 olarak saptanmasının seçilen bakteri grubundan kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Pfennigwerth ve ark.'nın çalışmasında ise 206 tanesi *K. pneumoniae* olan 325 CRE suşunun kolistin duyarlılık sonuçları, Etest yöntemi de dahil altı farklı yöntem ile çalışılıp BMD ile kıyaslanmıştır (17). Çalışmada Etest yönteminin CA, VME ve ME sırasıyla %96,3, %9,4 (n=10) ve %1; EA %80,6 olarak belirlenmiştir. VME gösteren suşların dördü *Enterobacter cloacae* olup, *K. pneumoniae* suşlarında bir adet VME saptanmıştır. EA oranları ise *E. cloacae*, *K. pneumoniae* ve *E. coli* için sırasıyla %72,2, %79,8 ve %92,2 olarak belirlenmiştir (17). Bu çalışmada saptanan EA oranları, Nhung ve arkadaşlarının çalışmasında da olduğu gibi türler arası farklılık göstermiştir. Her iki çalışmada da yöntemin EA oranı, rutin kullanım için düşük tespit edilmiş olsa da *E. coli* türlerinde >%90

bulunmuştur (17, 131). Bu durum, daha fazla çalışma ile doğrulanabilirse, Etest yönteminin *E. coli* suşlarında, kolistin duyarlılığının saptanmasında uygulanabilir bir yöntem olabileceğini düşündürebilmekle birlikte Meniño ve ark.'nın, *mcr* pozitif *E. coli* suşlarıyla yaptığı, CA %91 ve VME sıfır bulunan çalışmalarında, EA oranını %36 saptamış olmaları Etest yönteminin bu bakteri grubunda da çalışmalar arası farklı sonuçlar verebileceğini göstermektedir (14). Chew ve ark. Sensititre, VITEK®2 ve Etest yöntemlerini BMD ile karşılaştırdıkları çalışmalarında Etest için CA, VME, ME ve EA'yı sırasıyla %92,1, %12, %5,9 ve %75; Matuschek ve ark. ise kendi çalışmalarında aynı oranları %85, %25, %5 ve %47 olarak bulmuşlardır (12,86). Földes ve ark. 2022 yılında yaptıkları çalışmalarında, Etest'in altın standart ile uyum oranlarını, Matuschek'in çalışmasına benzer şekilde CA %83,7, VME %26,6 ve EA %50 olarak belirlemiş ve Etest yönteminin kolistin duyarlılık saptanması için uygun olmamakla beraber, inhibisyon zonu içerisinde üreyen heterorezistan suşların saptanmasında faydalı olabileceği yorumunda bulunmuşlardır (126). Tarafımızca sunulan çalışmada inhibisyon zonu içinde üreme gösteren ve heterorezistans şüphesi oluşturan bir suşla karşılaşmamıştır. Ranjan ve ark.'nın Hindistan'da 100 CRE suşunda, Etest'in BMD ile uyumu araştırdıkları yakın zamanlı çalışmalarında CA %97, ME sıfır, VME %33,3 ve EA %68 saptanmıştır (132). Yazarlar ülkelerinde başka çalışmaların da benzer sonuçlar verdiği dikkat çekmiş, Etest yönteminin özellikle yüksek VME oranı göstermesi sebebiyle kolistin duyarlılığının belirlenmesinde rutin bir yöntem olarak kullanılamayacağını vurgulamışlardır (132). Hindistan'da yapılan bir başka çalışmada Das ve ark. altın standart ile karşılaştırarak Etest ve VITEK®2 yöntemlerinin birbirlerine üstünlüklerini değerlendirmiş, Etest'in CA, ME, VME ve EA oranlarını - Ranjan ve ark.'nın çalışmasındakine benzer şekilde- sırasıyla %93,1, sıfır, %23,3 ve %63,7 olarak belirlemişlerdir (133). Ülkemizde ise Yiş üç farklı yöntemin performanslarını belirlemeyi amaçladığı çalışmasında Enterobacterales takımına dahil olan 120 bakteri suşunun kolistin duyarlılıklarını incelemiş ve Etest için CA %85,8, ME %1,7, VME %12,5 ve EA %71 olarak belirlemiştir (134). Hem kendi verilerimiz hem literatürdeki diğer veriler incelendiğinde, Etest yönteminin BMD ile karşılaştırıldığında çoğunlukla CA'sının yüksek olduğu, MİK uyumu açısından ise yetersiz kaldığı görülmektedir. Her ne kadar çalışmamızda duyarlılık sonuçları BMD ile %100 uyumlu bulunmuş olsa da, farklı çalışmalarda sıklıkla VME oranlarının değişken bulunmuş olması Etest yönteminin kolistin duyarlılığının belirlenebileceği bir yöntem olmadığını düşündürmektedir.

CLSI ve EUCAST tarafından rutin kullanım için önerilmeyen, ancak pratik bir yöntem olması sebebiyle çok sayıda çalışmanın kurgusunda yer alan bir başka yöntem VITEK®2 otomatize AST sistemidir. Sunulan çalışmada, altın standart ile karşılaştırılmasında VITEK®2 duyarlılık sonuçlarının CA, ME, VME ve EA oranları sırasıyla %98, %0,79, %8 ve

%78,1 olarak saptanmış, VME oranının yüksekliği ve EA oranının düşüklüğü sebebiyle kolistin duyarlılığı saptanmasında uygun bir yöntem olmadığı düşünülmüştür. Literatürde VITEK®2'nin BMD ile uyumunun araştırıldığı çalışmalarda değişken sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Dafopoulou ve ark. 2015 yılında, 20'si *A. baumannii*, 41'i *K. pneumoniae* olan 61 karbapenem dirençli gram negatif bakteri ile yaptıkları çalışmalarında VITEK®2'nin CA'sını %96,7, EA'sını %78,6, ME'sini %3,3 ve VME'sini sıfır olarak belirlemişlerdir (135). Yazarlar CA'nın yüksek olması ve yalancı negatif sonuç olmamasını göz önüne alarak, kolistin direncinin hızlı tespiti için bu yöntemi BMD alternatifi olarak kullanılabilir olarak yorumlamışlardır (135). Bu çalışmaya benzer şekilde Lo-Ten-Foe ve ark. 2007'de, Lee ve ark. 2013'te yaptıkları çalışmalarında VITEK®2'nin kolistin duyarlılığı belirlenmesinde kullanılabilir bir yöntem olduğu sonucuna varmışlardır (83,136). Ancak bu iki çalışmada altın standart yöntem olarak BMD yerine agar dilüsyon yönteminin kullanılmış olması EUCAST önerileriyle örtüşmemektedir. Daha yakın zamanlı çalışmalarda ise yöntemin CA ve EA oranlarındaki değişkenlik ve özellikle VME'nin sıklıkla kabul edilebilir orandan yüksek bulunması sebebiyle, kolistin duyarlılığının belirlenmesinde BMD'ye alternatif olarak kullanımı uygun görülmemiştir (17, 86, 126, 133). Chew ve ark. yöntemin altın standart ile uyum değerlendirmesinde CA, ME, VME ve EA oranlarını sırasıyla %88,2, sıfır, %36 ve %93,4; Pfennigwerth ve ark. %90,5, sıfır, %29,2 (n=31) ve %75,9; Földes ve ark. %91,3, sıfır, %14,28 ve %91,3; Das ve ark. ise %92,6, %4,3, %17,2 ve %88,4 olarak belirlemişlerdir. (17, 86, 126, 133). Pfennigwerth ve ark. değerlendirdikleri 325 CRE suşu içinde en yüksek VME oranını *E. cloacae* kompleks üyelerinde, %81,2 (n=13) olarak belirlemişlerdir (17). Çalışmada *K. pneumoniae* suşlarında yöntemin VME oranı %15 (n=12) bulunmuştur. Ayrıca yöntemin herhangi bir ME göstermemesi sebebiyle, VITEK®2 ile dirençli bulunan sonuçların geçerli kabul edilebileceği düşünülmüştür (17). Földes ve ark.'nın çalışmasında ise 78'i *K. pneumoniae* olan 92 CRE suşlu çalışma grubunda, yöntemin hatalı duyarlı sonuç verdiği sekiz izolatin tamamının *K. pneumoniae* olduğu belirlenmiştir. Pfennigwerth'in çalışmasına benzer şekilde, yöntemin ME oranının sıfır saptanması üzerine yazarlar BMD ve PAP yapıma imkanı bulunmayan laboratuvarlarda, heterorezistans belirlenmesine yardımcı olabilecek gradiyent test gibi bir yöntemle kombine edilerek kolistin dirençli suşların belirlenmesinde kullanılabilirliği yorumunda bulunmuşlardır (126). Bu çalışmada *K. pneumoniae* dışındaki Enterobacteriaceae suşlarının sayısının az olması, bu bakteri gruplarında yöntemin altın standart ile uyumunun yorumlanmasını kısıtlamaktadır. Das ve ark. çalışmalarında VITEK®2'nin kolistin duyarlılığı belirlenmesinde Etest'e üstün olduğunu ancak her iki yöntemin de BMD ile uyumlarının yetersiz olması sebebiyle rutin kullanıma uygun olmadığı sonucuna varmışlardır (133). Khurana ve ark. 468'i Enterobacterales, 273'ü *A. baumannii* ve 139'u *P. aeruginosa* olan 910 gram negatif

bakterinin kolistin duyarlılıklarının belirlenmesinde VITEK®2'nin performansını değerlendirmeyi amaçladıkları çalışmalarında, yöntemin altın standart ile uyumunu bakteri gruplarına ayırarak incelemişlerdir ve yöntemin tüm bakteri gruplarında VME oranını kabul edilebilir düzeyin üzerinde, CA ve EA oranları çoğunlukla kabul edilebilir düzeyin altında bulmuşlardır (137). CA ve EA oranları en yüksek *E. coli* suşlarında (%96 ve %89) saptanırken, *K. pneumoniae* suşlarında CA %86, EA %76, ME%3,5 ve VME %28 olarak belirlenmiş ve yazarlar tarafından VITEK®2'nin kolistin duyarlılık sonucu belirlenmesinde kullanılamayacağı sonucuna varılmıştır (137). Ülkemizde 104 gram negatif bakteriyle yapılan bir çalışmada ise yöntemin VME oranı bizim çalışmamızdakine benzer şekilde %6,7 bulunurken ME oranı %3,8, CA oranı %89,4 olarak belirlenmiş ve yöntem tüm uyum parametreleri açısından başarısız bulunmuştur (138). Literatür ve sunulan çalışmanın verileri göz önüne alındığında otomatize AST sistemi VITEK®2'nin kolistin duyarlılık sonucu belirlenmesinde rutin test olarak kullanımı mümkün görülmemektedir.

Kolistin direncinin aktarılabilir bir hale gelmesinden sorumlu tutulan, bir fosfoetanolamin transferaz enzimini kodlayan plazmid aracılı *mcr* geninin varlığını araştıran, insan ve hayvan verileri ile planlanmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır. İlk *mcr* geni olan *mcr-1* 2015 yılında Liu ve ark. tarafından, Çin'deki gıda kaynaklı hayvanlardan izole edilen *E. coli* suşlarında tanımlanmıştır (7). Günümüzde ise *mcr-10*'a kadar olan genler ve bunların alt tipleri saptanmış durumda olup Asya, Avrupa, Amerika, Afrika ve Okyanusya kıtalarından *mcr* pozitif suşların varlığı bildirilmiştir (74). Elbediwi ve ark. dört İngiliz ve iki Çin kaynaklı veri tabanını tarayarak yaptıkları sistematik derleme ve meta analizlerinde, insanlardan, hayvanlardan, çevreden ve gıda ürünlerinden izole edilen bakterilerde *mcr* genlerinin yaygınlığını araştırmışlardır (139). Çalışmada altı kıta ve 47 ülkeden bildirilen ortalama kümülatif *mcr* gen prevalansı %4,6 olarak belirlenmiştir. *mcr* pozitifliği en sık çevresel ürünlerden izole edilen bakterilerde saptanırken, en az klinik insan örneklerinden izole edilen suşlarda tespit edilmiştir. Pozitif saptanan suşların %95'inde *mcr* tipi *mcr-1* olarak belirlenmiş, geni barındıran bakteri suşlarının çoğunluğunun *E. coli* suşları olduğu bunu *Salmonella* türleri, *K. pneumoniae* ve *Aeromonas* türlerinin takip ettiği görülmüştür (139). Sunduğumuz çalışmada örneklem grubundaki suşlarda *mcr-1*, -2, -3, -4, -5, -6, -7 ve *mcr-8* genlerinin varlığı araştırılmış ve hiçbir bakteride pozitiflik saptanmamıştır. Wise ve ark. 2014-2016 yılları arasında "International Network for Optimal Resistance Monitoring" (INFORM) sürveys verileri kapsamındaki 908 kolistin dirençli Enterobacteriaceae üyesinde (doğal dirençli olan suşlar hariç), *mcr-1*'den *mcr-5*'e kadar olan genleri araştırmış ve suşların %3,2'sinde pozitiflik saptamışlardır (140). *mcr* pozitif saptanan 29 suştan 27'sinin *E. coli*, birinin *K. pneumoniae* ve birinin *E. cloacae*; 22'sinin *mcr-1*, ikisinin *mcr-1* alt tipleri, dördünün *mcr-3* alt tipleri ve birinin *mcr-5* olduğu

görülmüştür. Bu suşların en sık Malezya ve Tayland'da, ardından sıklıkla Avrupa ülkelerinde tespit edildiği belirlenmiştir (140). Dadashi ve ark.'nın 2707 kolistin dirençli *E. coli*'nin değerlendirildiği meta analizlerinde, *mcr* gen prevalansı kıtalara göre incelendiğinde Asya, Avrupa, Amerika, Afrika ve Okyanusya'da sırasıyla %66,72, %25,49, %5,19, %2,27 ve %0,32 olarak belirlenmiş, genlerin %97,89'unun *mcr-1* olduğu görülmüştür (74). Diğer kıtalara göre çok yüksek *mcr* pozitiflik oranı belirlenen Asya kıtasındaki ülkelerin verileri incelendiğinde 411 *mcr* pozitif suşun 252'sinin Çin'den bildirildiği, bunu 71 örnekle Vietnam'ın takip ettiği görülmektedir. Avrupa ülkelerinde ise 153 *mcr* pozitif suşun 67'si İtalya'da, 33'ü ise Almanya'da saptanmıştır. En düşük orana sahip Okyanusya kıtasında, Yeni Zelanda'da biri *mcr-1* diğeri *mcr-3* olmak üzere iki adet *mcr* pozitif *E. coli* suşu tespit edilmiştir. Asya, Avrupa ve Amerika'da en sık, Afrika'da tek saptanan *mcr* geni *mcr-1* olmakla birlikte Asya'dan *mcr-2*, *mcr-3* ve bazı *mcr-1* alt tipleri; Avrupa ve Amerika'dan *mcr-2* genleri taşıyan varyantlar bildirilmiştir (74). Ülkemizde *mcr* geni ilk olarak Kürekçi ve ark. tarafından tavuk etlerinden izole edilen kolistine dirençli *E. coli* suşlarında gösterilmiş ve WGS ile doğrulanmıştır (141). Yine ülkemizde klinik örnekler üzerinde de *mcr* gen prevalansını değerlendirmek amacıyla yapılmış çalışmalar mevcuttur. Sarı ve ark. Şubat 2015-Mart 2016 döneminde, klinik örneklerden izole edilen, 329 Enterobacteriaceae suşunda *mcr-1* ve *mcr-2* varlığını araştırdıkları çok merkezli çalışmalarında, çalışmamızdakine benzer biçimde, hiçbir örnekte pozitiflik saptayamamış, ülkemizde henüz plazmid aracılı direnç mekanizmasının yaygın olmadığını, ancak klinik örnekler dışında hayvan örnekleri üzerinde de çalışmalar yapılması gerektiğini belirtmişlerdir (142). Tekeli ve ark.'nın 10 *K. pneumoniae* suşunda karbapenemaz üretimlerini değerlendirmek için planladıkları çalışmalarında izolatlarda *mcr-1* varlığı da aranmış ve saptanamamıştır (143). Örnek sayısının azlığı bu çalışmada bir kısıtlılık olarak düşünülebilir. Ülkemizde klinik örneklerden izole edilen etkenlerde ilk *mcr* geni varlığı, Özkaya ve ark.'nın 2017-2018 yılında 40 kolistine dirençli Enterobacterales üyesi bakteride, karbapenemaz ve *mcr* (1'den 5'e) genlerinin bulunma oranını araştırdıkları çalışmalarında tespit edilmiş ve iki izolat *mcr-1* pozitif olarak saptamıştır (144). *mcr* pozitif saptanan suşların ikisi de *E. coli* izolatu olup izolatlardan birinin kolistin dışında yalnızca ampiciline, diğeri ise ampicilin, amoksisilin-klavulonik asit ve siprofloksasine dirençli bulunmuş olması MDR bulunmayan bakterilerde de kolistin direnci olabileceğini göstermesi açısından yazarlar tarafından değerli bulunmuştur (144). Hazırolan ve Karagöz, farklı klinik örneklerden izole edilen karbapenem ve kolistin dirençli 93 *K. pneumoniae* suşunda, çalışmamızdakine benzer şekilde, *mcr-1*'den *mcr-8*'e kadar olan genlerin varlığını araştırıp iki örneği *mcr-1* pozitif bulurken; Arabacı ve ark. 57 kolistin dirençli *K. pneumoniae*'de *mcr-1* araştırmış ve üç izolatta pozitiflik saptamışlardır (145, 146). Sunulan literatür verileri ışığında *mcr* gen

prevalansının ülkeler arası büyük farklılıklar gösterdiği ve ülkemizde klinik örneklerde henüz endişe verici oranda olmadığı yorumu yapılabilmekle birlikte, aktarılabilen bir direnç profiline sebep olması açısından daha geniş kapsamlı çalışmalarla takibin faydalı olacağı düşünülmüştür.

Bu çalışmada literatürdeki farklı çalışmalar kaynak alınarak, ISO 20776-2:2021 standartlarının önerileri doğrultusunda altın standart ile EA oranı belirlenen üç yöntem için bias oranları belirlenmiştir (105, 106). Sensititre™, VITEK®2 ve ETEST® için sırasıyla +%35,1, -%68,8, -%76,8 olarak hesaplanan bias değerleri, kabul edilebilir görülen (-%30)-(+%30) sınırları dışında kalmıştır. Bias değerlendirmesinin ISO tarafından yakın tarihli 2021 kriterlerine dahil edilmesi sebebiyle, literatürde kolistin duyarlılığının değerlendirilmesi için yöntem kıyaslaması yapan çalışmalarda bias verisine ulaşılamamıştır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

MDR etkenler sebebiyle oluşan enfeksiyonların artışıyla birlikte, son on yıllık süreçte tekrar gündeme gelen ve son seçenek antibiyotik olarak kullanılan kolistine karşı da direnç gelişmesi, enfeksiyonların kontrol altına alınmasındaki zorluklara ve mortalite artışına sebep olmasıyla önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Laboratuvarında kolistin duyarlılık sonuçlarının belirlenebilmesi, akılcı antibiyotik kullanımı ve akabinde kolistine direnç gelişiminin sınırlandırılabilmesi açısından önem teşkil etmektedir. Ancak altın standart yöntem olan sıvı mikrodilüsyon yönteminin zaman alıcı ve hatalara açık bir yöntem olması, rutin laboratuvar işleyişine adaptasyonunu zorlaştırmakta ve alternatif yöntem arayışına sebep olmaktadır.

Sunulan çalışmada kan kültürlerinden izole edilen *K. pneumoniae* suşlarında kolistin direnç oranı %16,6 saptanmıştır. Çalışmamız Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde kolistin direnç prevalansının araştırıldığı ilk çalışma özelliğini taşımakla birlikte direnç oranlarının takibi için planlanacak yeni çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Sensititre™ yöntemi bu çalışmada altın standart yöntem ile yüksek uyum göstermiş olması sebebiyle rutin kullanıma uygun görülebilir. Ancak laboratuvarımız gibi örnek kapasitesi yüksek laboratuvarlarda, yöntemin çalışmamızda uygulandığı gibi manuel pipetasyon ve okuma ile uygulanmasının zor olabileceği, yöntemin otomasyon imkanları ile kullanılmasının laboratuvar işleyişine adaptasyonu kolaylaştırabileceği düşünülmüştür.

Kolistin sıvı disk elüsyon yöntemi CLSI çalışma grubu tarafından kolistin duyarlılığı belirlenmesinde önerilmesi ve çalışmamızda da altın standart ile yüksek uyum göstermesi ayrıca maliyet etkin ve kolay uygulanabilir bir yöntem olması nedeniyle rutin kullanımda yer bulabilecek bir yöntem olarak değerlendirilebilir.

Çalışmamızda gradiyent test yöntemi ETEST®, Sensititre™ ve CBDE yöntemine benzer şekilde duyarlılık kategorisi açısından BMD ile yüksek uyumlu saptanırken, otomatize AST sistemi VITEK®2 kabul edilebilir orandan fazla VME göstermiştir. Her iki yöntemin de EA oranlarının düşük olması ve literatürdeki veriler göz önüne alındığında hem ETEST® hem VITEK®2 ile saptanan kolistin duyarlılık sonuçlarının doğrulanmadan bildirilmesinin uygun olmayacağı düşünülmüştür.

Aktarılabilen kolistin direncine öncülük eden *mcr* genlerinin klinik örneklerden izole edilen kolistin dirençli suşlarda taranabilmesi, hem bu suşlarla meydana gelen hastane kaynaklı salgınların oluşmasının önlenmesi hem de değerli bir epidemiyolojik veri birikimi sağlanması açısından önem teşkil etmektedir.

Sonuç olarak, MDR etken enfeksiyonların tedavisinde önemli bir antibiyotik olan kolistine karşı gelişen direnç endişe vericidir. Enfeksiyon etkeni bakterilerde ilaca karşı duyarlılığın belirlenebilmesi ve direnç mekanizmalarının tanımlanabilmesi, ilacın akılcı kullanımını sağlayarak hem gereksiz maliyetin önüne geçmek hem de dirençli suşlarla meydana gelebilecek salgınları önlemek açısından büyük önem taşımaktadır. Direnç oranlarının takip edildiği epidemiyolojik çalışmaların sürekli hale getirilmesi gerekmektedir. Ülkemizde ve dünyada, kolistin direnci sürveyans verileri diğer antibiyotikler için yapılan izlemlere kıyasla yetersiz kalmaktadır. Bunun en büyük sebebi kolistin duyarlılığının belirlenmesinde altın standart yöntem olarak kabul edilen BMD'nin zor uygulanabilir bir yöntem olmasıdır. BMD'ye alternatif kullanılacak yöntemler, kontrollü çalışmalarla ilerlenerek laboratuvar rutin işleyişinde yer bulabilir. İleri dönemlerde daha fazla sayılı örneklem ve daha çeşitli bakteri gruplarıyla yapılacak yöntem karşılaştırılması çalışmalarına ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Oliveira J, Reygaert WC. Gram Negative Bacteria. İçinde: StatPearls [Internet] [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [a.yer 16 Mart 2023]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538213/>
2. Ak O, Batirel A, Ozer S, Çolakoglu S. Nosocomial infections and risk factors in the intensive care unit of a teaching and research hospital: a prospective cohort study. *Med Sci Monit.* Mayıs 2011;17(5):PH29–34.
3. Ashurst JV, Dawson A. Klebsiella Pneumonia. İçinde: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [a.yer 14 Ekim 2022]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/>
4. Chang D, Sharma L, Dela Cruz CS, Zhang D. Clinical Epidemiology, Risk Factors, and Control Strategies of Klebsiella pneumoniae Infection. C. 12, *Frontiers in Microbiology.* Frontiers Media S.A.; 2021.
5. Michalopoulos AS, Karatza DC. Multidrug-resistant Gram-negative infections: the use of colistin. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 01 Eylül 2010;8(9):1009-17. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1586/eri.10.88>
6. Bardet L, Rolain JM. Development of New Tools to Detect Colistin-Resistance among Enterobacteriaceae Strains. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* Aralık 2018;2018:3095249.
7. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi Ling-Xian and Zhang R, Spencer J, Doi Y, vd. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* Kasım 2015;16(2):161-8.
8. Hekimoğlu CH, Batır E, Yıldırım Gözel E, Altun D. Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı (USHİESA) Özet Raporu 2021 [Internet]. 2022 [a.yer 01 Mart 2023]. s. 41-3. Erişim adresi: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Bulasici-hastaliklar-db/hastaliklar/SHIE/Raporlar/USHIESA_OZET_RAPOR_2021.pdf
9. Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi, 2016 Yıllık Raporu, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Ankara [Internet]. 2016 [a.yer 29 Mart 2023]. Erişim adresi: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji_Referans_Laboratuvarlari_ve_Biyolojik_Urunler_DB/uamdss/yillik_raporlar/UAMDSS_2016_Rapor.pdf
10. Narimisa N, Goodarzi F, Bavari S. Prevalence of colistin resistance of Klebsiella pneumoniae isolates in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* Haziran 2022;21(1):29.

11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0 [Internet]. 2023 [a.yer 02 Mart 2023]. Erişim adresi: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.0_Breakpoint_Tables.pdf
12. Matuschek E, Åhman J, Webster C, Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect*. Aralık 2017;24(8):865-70.
13. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 31th edition. CLSI supplement M100. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute. [Internet]. 2021 [a.yer 03 Mart 2023]. Erişim adresi: <https://www.treata.academy/wp-content/uploads/2021/03/CLSI-31-2021.pdf>
14. García-Meniño I, Lumbreras P, Valledor P, Díaz-Jiménez D, Lestón L, Fernández J, vd. Comprehensive Statistical Evaluation of Etest®, UMIC®, MicroScan and Disc Diffusion versus Standard Broth Microdilution: Workflow for an Accurate Detection of Colistin-Resistant and Mcr-Positive *E. coli*. *Antibiotics* [Internet]. 2020;9(12). Erişim adresi: <https://www.mdpi.com/2079-6382/9/12/861>
15. Maalej SM, Meziou MR, Rhimi FM, Hammami A. Comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution for susceptibility testing of colistin against Enterobacteriaceae. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2011;53(5):546-51. Erişim adresi: <https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1472-765X.2011.03145.x>
16. Anantharajah A, Glupczynski Y, Hoebeke M, Bogaerts P, Declercq P, Denis O, vd. Multicenter study of automated systems for colistin susceptibility testing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Ekim 2020;40(3):575-9.
17. Pfennigwerth N, Kaminski A, Korte-Berwanger M, Pfeifer Y, Simon M, Werner G, vd. Evaluation of six commercial products for colistin susceptibility testing in Enterobacterales. *Clin Microbiol Infect*. Mart 2019;25(11):1385-9.
18. Friedlaender C. XIII. Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibr sen Pneumonie [Internet]. [a.yer 30 Ocak 2023]. Erişim adresi: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF01880516.pdf>
19. Shon AS, Bajwa RPS, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence*. 15 Şubat 2013;4(2):107-18.

20. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, vd. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 7th bs. C. Chapte 6. 2017. 213-315 s.
21. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. C. 18, Nature Reviews Microbiology. Nature Research; 2020. s. 344-59.
22. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 8th bs. C. Chapter 25. Elsevier; 2016.
23. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. Ekim 1998;11(4):589-603.
24. Piperaki ET, Syrogiannopoulos GA, Tzouvelekis LS, Daikos GL. *Klebsiella pneumoniae*: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. Pediatric Infectious Disease Journal. 01 Ekim 2017;36(10):1002-5.
25. Ofek I, Kabha K, Athamna A, Frankel G, Wozniak DJ, Hasty DL, vd. Genetic Exchange of Determinants for Capsular Polysaccharide Biosynthesis between *Klebsiella pneumoniae* Strains Expressing Serotypes K2 and K2la. C. 61, Infection And Immunity. 1993.
26. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum. J Med Microbiol [Internet]. 1992;36(4):250-4. Erişim adresi: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-36-4-250>
27. Murphy CN, Mortensen MS, Krogfelt Karen A and 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. Infect Immun. Haziran 2013;81(8):3009-17.
28. Martin RM, Cao J, Brisse S, Passet V, Wu W, Zhao L, vd. Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. mSphere. Ekim 2016;1(5).
29. Ryan KJ. Enterobacteriaceae. İçinde: Pottinger P, Reller B, Ryan KJ, Vedantam G, Weissman S, editörler. Sherris & Ryan's Medical Microbiology. 8. bs McGraw Hill; 2022.
30. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *klebsiella pneumoniae*. C. 17, International Journal of Environmental Research and Public Health. MDPI AG; 2020. s. 1-17.

31. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. Ocak 2018;8:4.
32. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev*. Nisan 2017;30(2):557-96.
33. Nation RL, Li J, Cars O, Couet William and Dudley MN, Kaye KS, Mouton JW, vd. Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. *Lancet Infect Dis*. Ekim 2014;15(2):225-34.
34. Storm DR, Rosenthal KS, Swanson PE. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu Rev Biochem*. 1977;46:723-63.
35. Bergen PJ, Landersdorfer CB, Lee Hee Ji and Li J, Nation RL. "Old" antibiotics for emerging multidrug-resistant bacteria. *Curr Opin Infect Dis*. Aralık 2012;25(6):626-33.
36. Rhouma M, Beaudry F, Theriault W, Letellier A. Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. *Front Microbiol*. Aralık 2016;7:1789.
37. Falagas ME, Kasiakou SK, Saravolatz LD. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 01 Mayıs 2005;40(9):1333-41. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1086/429323>
38. Lim LM, Ly N, Anderson D, Yang JC, Macander L, Jarkowski III A, vd. Resurgence of Colistin: A Review of Resistance, Toxicity, Pharmacodynamics, and Dosing. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* [Internet]. 2010;30(12):1279-91. Erişim adresi: <https://accpjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1592/phco.30.12.1279>
39. Honore PM, Jacobs R, Waele E De, Van Gorp V, Spapen HD. Colistin pharmacokinetics/pharmacodynamics and acute kidney injury: A difficult but reasonable marriage. *Indian J Crit Care Med*. Temmuz 2014;18(7):415-6.
40. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, vd. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis*. Eylül 2006;6(9):589-601.
41. Michalopoulos AS, Falagas ME. Colistin: recent data on pharmacodynamics properties and clinical efficacy in critically ill patients. *Ann Intensive Care*. Ağustos 2011;1(1):30.
42. Katzung B. *Basic & Clinical Pharmacology*. 14. bs. Katzung B, editör. McGraw Hill Companies; 2017.

43. Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, vd. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. Eylül 2006;50(9):2946-50.
44. Andrade FF, Silva D, Rodrigues A, Pina-Vaz C. Colistin Update on Its Mechanism of Action and Resistance, Present and Future Challenges. *Microorganisms*. Kasım 2020;8(11).
45. Gogry FA, Siddiqui MT, Sultan I, Haq QMohdR. Current Update on Intrinsic and Acquired Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria. *Front Med (Lausanne)* [Internet]. 2021;8. Erişim adresi: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.677720>
46. Deris ZZ, Akter J, Sivanesan Sivashangarie and Roberts KD, Thompson PE, Nation Roger L and Li J, Velkov T. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *J Antibiot (Tokyo)*. Ekim 2013;67(2):147-51.
47. Michalopoulos A, Falagas ME. Colistin and polymyxin B in critical care. *Crit Care Clin*. Nisan 2008;24(2):377-91, x.
48. Loho T, Dharmayanti A. Colistin: an antibiotic and its role in multiresistant Gram-negative infections. *Acta Med Indones*. Nisan 2015;47(2):157-68.
49. Nation RL, Li J. Colistin in the 21st century. *Curr Opin Infect Dis*. Aralık 2009;22(6):535-43.
50. Conway SP. Nebulized antibiotic therapy: the evidence. *Chron Respir Dis*. 2005;2(1):35-41.
51. Society AT, America IDS of. Guidelines for the Management of Adults with Hospital-acquired, Ventilator-associated, and Healthcare-associated Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 15 Şubat 2005;171(4):388-416. Erişim adresi: <https://www.proquest.com/scholarly-journals/guidelines-management-adults-with-hospital/docview/199605194/se-2?accountid=10699>
52. Falagas ME, Bliziotis IA, Tam VH. Intraventricular or intrathecal use of polymyxins in patients with Gram-negative meningitis: a systematic review of the available evidence. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2007;29(1):9-25. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857906003815>
53. Öncül O. Kolistin: Endikasyon ve Klinik Kullanımı. *ANKEM Derg*. 2012;26(Ek):12-8.
54. Tripodi MF, Durante-Mangoni E, Fortunato R, Utili R, Zarrilli R. Comparative activities of colistin, rifampicin, imipenem and sulbactam/ampicillin alone or in combination against epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates

- producing OXA-58 carbapenemases. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2007;30(6):537-40. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857907003214>
55. Poudyal A, Howden BP, Bell JM, Gao W, Owen RJ, Turnidge JD, vd. In vitro pharmacodynamics of colistin against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 01 Aralık 2008;62(6):1311-8. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkn425>
56. Santamaría C, Mykietiuk A, Temporiti E, Stryjewski ME, Herrera F, Bonvehi P. Nephrotoxicity associated with the use of intravenous colistin. *Scand J Infect Dis* [Internet]. 01 Ocak 2009;41(10):767-9. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1080/00365540903147001>
57. Binsker U, Käsbohrer A, Hammerl JA. Global colistin use: a review of the emergence of resistant Enterobacterales and the impact on their genetic basis. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 18 Ocak 2022;46(1):fuab049. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab049>
58. Hekimoğlu CH, Batır E, Yıldırım Gözel E, Altun D. Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı (USHİESA) Özet Raporu 2020 [Internet]. 2021 [a.yer 01 Mart 2023]. s. 41-3. Erişim adresi: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Bulasici-hastaliklar-db/hastaliklar/SHIE/Raporlar/USHİESA_OZET_RAPORU_2020.pdf
59. Srinivas P, Rivard K. Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. *Curr Infect Dis Rep* [Internet]. 2017;19(11):38. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s11908-017-0596-3>
60. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*. Kasım 2014;5:643.
61. Huang J, Li C, Song J, Velkov Tony and Wang L, Zhu Y, Li J. Regulating polymyxin resistance in Gram-negative bacteria: roles of two-component systems PhoPQ and PmrAB. *Future Microbiol*. Nisan 2020;15(6):445-59.
62. Aghapour Z, Gholizadeh P, Ganbarov Khudaverdi and Bialvaei AZ, Mahmood SS, Tanomand A, Yousefi M, vd. Molecular mechanisms related to colistin resistance in Enterobacteriaceae. *Infect Drug Resist*. Nisan 2019;12:965-75.
63. Zhang S, Abbas M, Rehman MU, Wang M, Jia R, Chen S, vd. Updates on the global dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli*: An emerging threat to public health. *Science of The Total Environment* [Internet]. 2021;799:149280. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969721043539>

64. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an “old” class of antibiotics. *Future Microbiol.* Haziran 2013;8(6):711-24.
65. El-Sayed Ahmed MAEG, Zhong LL, Shen C, Yang Y, Doi Y, Tian GB. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). *Emerg Microbes Infect.* Aralık 2020;9(1):868-85.
66. Cannatelli A, Giani T, D’Andrea Marco Maria and Di Pilato V, Arena F, Conte V, Tryfinopoulou K, vd. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother.* Temmuz 2014;58(10):5696-703.
67. Cheng YH, Lin TL, Lin YT, Wang JT. Amino Acid Substitutions of CrrB Responsible for Resistance to Colistin through CrrC in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* Mayıs 2016;60(6):3709-16.
68. Wright MS, Suzuki Y, Jones MB, Marshall SH, Rudin SD, van Duin D, vd. Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* Kasım 2014;59(1):536-43.
69. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JDF, Vinogradov E, Seemann T, vd. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother.* Eylül 2010;54(12):4971-7.
70. Henry R, Vithanage N, Harrison P, Seemann T, Coutts S, Moffatt JH, vd. Colistin-resistant, lipopolysaccharide-deficient *Acinetobacter baumannii* responds to lipopolysaccharide loss through increased expression of genes involved in the synthesis and transport of lipoproteins, phospholipids, and poly- β -1,6-N-acetylglucosamine. *Antimicrob Agents Chemother.* Ekim 2011;56(1):59-69.
71. De Majumdar S, Yu J, Fookes M, McAteer SP, Llobet E, Finn S, vd. Elucidation of the RamA regulon in *Klebsiella pneumoniae* reveals a role in LPS regulation. *PLoS Pathog.* Ocak 2015;11(1):e1004627.
72. Campos MA, Vargas MA, Regueiro Verónica and Llompарт CM, Albert S, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun.* Aralık 2004;72(12):7107-14.
73. Llobet E, Tomás JM, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology (N Y)* [Internet]. 2008;154(12):3877-86. Erişim adresi:

- <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.2008/022301-0>
74. Dadashi M, Sameni F, Bostanshirin N, Yaslianifard S, Khosravi-Dehaghi N, Nasiri MJ, vd. Global prevalence and molecular epidemiology of mcr-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* clinical isolates: a systematic review. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2022;29:444-61. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716521002447>
 75. Sherman EX, Wozniak JE, Weiss DS. Methods to Evaluate Colistin Heteroresistance in *Acinetobacter baumannii*. *Methods Mol Biol*. 2019;1946:39-50.
 76. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaiou DK. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resistance Updates* [Internet]. 2010;13(4):132-8. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1368764610000312>
 77. Andersson DI, Nicoloff H, Hjort K. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2019;17(8):479-96. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0218-1>
 78. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012.
 79. Sader HS, Rhomberg PR, Flamm RK, Jones RN. Use of a surfactant (polysorbate 80) to improve MIC susceptibility testing results for polymyxin B and colistin. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2012;74(4):412-4. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889312003586>
 80. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol*. Mart 2013;51(6):1678-84.
 81. Hu X, Sun L, Nie T, Yang Y, Wang X, Pang J, vd. Evaluation of Agar Dilution Method in Susceptibility Testing of Polymyxins for Enterobacteriaceae and Non-Fermentative Rods: Advantages Compared to Broth Microdilution and Broth Macrodilution. *Antibiotics* [Internet]. 2022;11(10). Erişim adresi: <https://www.mdpi.com/2079-6382/11/10/1392>
 82. Carretto E, Brovarone F, Russello Giuseppe and Nardini P, El-Bouseary MM, Aboklaish Ali F and Walsh TR, Tyrrell JM. Clinical Validation of SensiTest Colistin, a Broth Microdilution-Based Method To Evaluate Colistin MICs. *J Clin Microbiol*. Mart 2018;56(4).

83. Lo-Ten-Foe JR, de Smet AMGA, Diederens BMW, Kluytmans JAJW, van Keulen PHJ. Comparative Evaluation of the VITEK 2, Disk Diffusion, Etest, Broth Microdilution, and Agar Dilution Susceptibility Testing Methods for Colistin in Clinical Isolates, Including Heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* Strains. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2007;51(10):3726-30. Erişim adresi: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/AAC.01406-06>
84. D LJ, Anny K, Davina C, Maria K, C BA, M BE. Evaluation of the MicroScan Colistin Well and Gradient Diffusion Strips for Colistin Susceptibility Testing in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* [Internet]. 26 Nisan 2019;57(5):e01866-18. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1128/JCM.01866-18>
85. Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 01 Aralık 2009;49(11):1749-55. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1086/647952>
86. 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. *J Clin Microbiol*. Haziran 2017;55(9):2609-16.
87. Simner PJ, Bergman Y, Trejo M, Roberts AA, Marayan R, Tekle T, vd. Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test To Determine Colistin In Vitro Activity against Gram-Negative Bacilli. *J Clin Microbiol*. Ocak 2019;57(2).
88. Alhamwi R, Öksüz L. Detection of colistin resistance via four methods in multidrug-resistant Gram-negative rods isolated from blood cultures. *The Journal of Infection in Developing Countries* [Internet]. 29 Kasım 2022;16(11):1748-56. Erişim adresi: <https://jidc.org/index.php/journal/article/view/36449647>
89. Kansak N, Arici N, Uzunoner Y, Adaleti R, Aksaray S, Gonullu N. Evaluation of Broth Disk Elution Method to Determine Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Strains. *Clin Lab*. Şubat 2023;69(2).
90. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. Haziran 2016;22(6):1038-43.
91. Shelby S, Diane S, Deborah A, George P. Evaluation of the Rapid Polymyxin NP Test for Polymyxin B Resistance Detection Using *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes* Isolates. *J Clin Microbiol* [Internet]. 01 Ekim 2017;55(10):3016-20. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1128/JCM.00934-17>

92. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. A Universal Culture Medium for Screening Polymyxin-Resistant Gram-Negative Isolates. *J Clin Microbiol*. Mart 2016;54(5):1395-9.
93. Abdul Momin MHF, Bean DC, Hendriksen RS, Haenni M, Phee LM, Wareham DW. CHROMagar COL-APSE: a selective bacterial culture medium for the isolation and differentiation of colistin-resistant Gram-negative pathogens. *J Med Microbiol*. Ekim 2017;66(11):1554-61.
94. Bardet L, Le Page S, Leangapichart T, Rolain JM. LBJMR medium: a new polyvalent culture medium for isolating and selecting vancomycin and colistin-resistant bacteria. *BMC Microbiol*. Kasım 2017;17(1):220.
95. Leshaba TMS, Mbelle Nontombi Marylucy and Osei Sekyere J. Current and emerging polymyxin resistance diagnostics: A systematic review of established and novel detection methods. *J Appl Microbiol*. Temmuz 2021;132(1):8-30.
96. Dortet L, Bonnin RA, Pennisi I, Gauthier L, Jousset AB, Dabos L, vd. Rapid detection and discrimination of chromosome- and MCR-plasmid-mediated resistance to polymyxins by MALDI-TOF MS in *Escherichia coli*: the MALDIxin test. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 01 Aralık 2018;73(12):3359-67. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1093/jac/dky330>
97. Dortet L, Broda A, Bernabeu S, Glupczynski Y, Bogaerts P, Bonnin R, vd. Optimization of the MALDIxin test for the rapid identification of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* using MALDI-TOF MS. *J Antimicrob Chemother*. Ocak 2020;75(1):110-6.
98. Coppi M, Cannatelli A, Antonelli A, Baccani I, Di Pilato V, Sennati S, vd. A simple phenotypic method for screening of MCR-1-mediated colistin resistance. *Clin Microbiol Infect*. Ağustos 2017;24(2):201.e1–201.e3.
99. Girlich D, Bernabeu S, Groperrin Victor and Langlois I, Begasse C, Arangia N, Creton E, vd. Evaluation of the Amplidiag CarbaR+MCR Kit for Accurate Detection of Carbapenemase-Producing and Colistin-Resistant Bacteria. *J Clin Microbiol*. Şubat 2019;57(3).
100. Meunier D, Woodford N, Hopkins KL. Evaluation of the AusDiagnostics MT CRE EU assay for the detection of carbapenemase genes and transferable colistin resistance determinants *mcr-1/-2* in MDR Gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 01 Aralık 2018;73(12):3355-8. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1093/jac/dky347>

101. Imirzalioglu C, Falgenhauer L, Schmiedel Judith and Waezsada SE, Gwozdziński K, Roschanski N, Roesler U, vd. Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification-Based Assay for the Rapid Detection of Plasmid-Encoded Colistin Resistance Gene *mcr-1* in Enterobacteriaceae Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* Mart 2017;61(4).
102. Zhong LL, Zhou Q, Tan CY, Roberts AP, El-Sayed Ahmed MAEG, Chen G, vd. Multiplex loop-mediated isothermal amplification (multi-LAMP) assay for rapid detection of *mcr-1* to *mcr-5* in colistin-resistant bacteria. *Infect Drug Resist.* Temmuz 2019;12:1877-87.
103. Bernasconi OJ, Principe L, Tinguely R, Karczmarek A, Perreten V, Luzzaro Francesco and Endimiani A. Evaluation of a New Commercial Microarray Platform for the Simultaneous Detection of β -Lactamase and *mcr-1* and *mcr-2* Genes in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* Ağustos 2017;55(10):3138-41.
104. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 13.1 [Internet]. 2023 [a.yer 24 Mart 2023]. Erişim adresi:
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/QC/v_13.1_EUCAS_T_QC_tables_routine_and_extended_QC.pdf
105. López-Cerero L, Ballesta S, López CE, Sánchez-Yebra W, Rojo-Martin MD, Pascual A. Evaluation of three commercial methods of susceptibility testing for ceftolozane/tazobactam against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica (English ed)* [Internet]. 2023; Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2529993X23000369>
106. Peradotto M, Bondi A, Bianco G, Iannaccone M, Barbui AM, Costa C, vd. Comparison of Three Different Commercial Methods for Fosfomycin Susceptibility Testing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Drug Resistance* [Internet]. 11 Ağustos 2022;28(9):911-5. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1089/mdr.2021.0410>
107. Pereira JV, Bari AK, Kokare R, Poojary A. Comparison of in vitro fosfomycin susceptibility testing methods with agar dilution for carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Indian J Med Microbiol* [Internet]. 2023;42:39-45. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0255085723000051>
108. Nagvekar V, Sawant S, Amey S. Prevalence of multidrug-resistant Gram-negative bacteria cases at admission in a multispeciality hospital. *J Glob Antimicrob Resist*

- [Internet]. 2020;22:457-61. Erişim adresi:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221371652030059X>
109. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. Klebsiella pneumoniae: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev [Internet]. 01 Mayıs 2017;41(3):252-75. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>
 110. Uzairue LI, Rabaan AA, Adewumi FA, Okolie OJ, Folorunso JB, Bakhrebah MA, vd. Global Prevalence of Colistin Resistance in Klebsiella pneumoniae from Bloodstream Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. Pathogens. Eylül 2022;11(10).
 111. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Surveillance Atlas of Infectious Diseases [Internet]. [a.yer 29 Mart 2023]. Erişim adresi: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>
 112. Kawamoto Y, Kaku N, Akamatsu N, Sakamoto K, Kosai K, Morinaga Y, vd. The surveillance of colistin resistance and mobilized colistin resistance genes in multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated in Japan. Int J Antimicrob Agents [Internet]. 2022;59(1):106480. Erişim adresi:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857921013157>
 113. Sader HS, Mendes RE, Streit JM, Carvalhaes CG, Castanheira M. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria from intensive care unit and non-intensive care unit patients from United States hospitals (2018–2020). Diagn Microbiol Infect Dis [Internet]. 2022;102(1):115557. Erişim adresi:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889321002492>
 114. Aydın M, Ergönül Ö, Azap A, Bilgin H, Aydın G, Çavuş SA, vd. Rapid emergence of colistin resistance and its impact on fatality among healthcare-associated infections. Journal of Hospital Infection [Internet]. 2018;98(3):260-3. Erişim adresi:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195670117306412>
 115. HOŞBUL T, AYDOĞAN CN, KAYA S, BEDİR O, GÜMRAL R, ALBAY A. Karbapenem Dirençli Klebsiella pneumoniae Klinik İzolatlarına Karşı Seftazidim-avibaktam ve Kolistinin In Vitro Etkinliği. Mikrobiyol Bul [Internet]. 2022;56(2):218-29. Erişim adresi: <http://search/yayin/detay/522534>
 116. Binsker U, Käsbohrer A, Hammerl JA. Global colistin use: a review of the emergence of resistant Enterobacterales and the impact on their genetic basis. FEMS Microbiol Rev. Şubat 2022;46(1).
 117. Aris P, Robatjazi S, Nikkhahi F, Amin Marashi SM. Molecular mechanisms and prevalence of colistin resistance of Klebsiella pneumoniae in the Middle East region: A

- review over the last 5 years. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2020;22:625-30. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716520301545>
118. Papadomanolaki A, Siopi M, Karakosta P, Vourli S, Pournaras S. Comparative Evaluation of Vitek 2 and Etest versus Broth Microdilution for Ceftazidime/Avibactam and Ceftolozane/Tazobactam Susceptibility Testing of Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics (Basel)*. Haziran 2022;11(7).
 119. Yusuf E, van Westreenen M, Goessens W, Croughs P. The accuracy of four commercial broth microdilution tests in the determination of the minimum inhibitory concentration of colistin. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [Internet]. 2020;19(1):42. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00383-x>
 120. Chung HS, Kim SK, Hahm C, Lee M. Performance Evaluation of the VITEK2 and Sensititre Systems to Determine Colistin Resistance and MIC for *Acinetobacter baumannii*. *Diagnostics* [Internet]. 2022;12(6). Erişim adresi: <https://www.mdpi.com/2075-4418/12/6/1487>
 121. Kansak N, Aslan M, Adaleti R, Aksaray S. Evaluation of the Two Commercial Methods Based on Broth Microdilution Against Reference Microdilution Method for *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *Mikrobiyol Bul*. 01 Ekim 2020;54:606-12.
 122. Demir-Çuha M, Hazırolan G. Comparison of MIC COL, SensititreTM and Colistin Agar Screening Plate Methods with Broth Microdilution Reference Method for Detection of Colistin Susceptibility in Carbapenem-Resistant Gram-negative Bacteria. *KLİMİK Derg*. 2021;34(3):186-91.
 123. Jayol A, Nordmann P, André C, Poirel L, Dubois V. Evaluation of three broth microdilution systems to determine colistin susceptibility of Gram-negative bacilli. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 01 Mayıs 2018;73(5):1272-8. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1093/jac/dky012>
 124. Humphries RM, Green DA, Schuetz AN, Bergman Y, Lewis S, Yee R, vd. Multicenter Evaluation of Colistin Broth Disk Elution and Colistin Agar Test: a Report from the Clinical and Laboratory Standards Institute. *J Clin Microbiol*. Ekim 2019;57(11).
 125. Butt T, Butt A, Yasmin S, Taj Shazia and Tariq N, Bano S. Antibiotic Disk Elution Method to Determine the Colistin Susceptibility against Enterobacterales and Non-fermenter Bacteria. *J Coll Physicians Surg Pak*. Haziran 2022;32(6):820-2.
 126. Földes A, Székely E, Voidăzan ST, Dobreanu M. Comparison of Six Phenotypic Assays with Reference Methods for Assessing Colistin Resistance in Clinical Isolates of Carbapenemase-Producing Enterobacterales: Challenges and Opportunities.

- Antibiotics [Internet]. 2022;11(3). Erişim adresi: <https://www.mdpi.com/2079-6382/11/3/377>
127. Koyuncu Özyurt Ö, Özhak B, Ögünç D, Yıldız E, Çolak D, Günsere F, vd. [Evaluation of the BD Phoenix100 System and Colistin Broth Disk Elution Method for Antimicrobial Susceptibility Testing of Colistin Against Gram-negative Bacteria]. *Mikrobiyol Bul.* Temmuz 2019;53(3):254-61.
 128. Özkaçmaz A, Milletli-Sezgin F. Evaluation of Colistin Susceptibility Results in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli by Colistin Broth Disk Elution Method. *KLİMİK Derg.* 2022;35(3):155-8.
 129. van der Heijden IM, Levin AS, De Pedri EH, Fung L, Rossi F, Duboc G, vd. Comparison of disc diffusion, Etest and broth microdilution for testing susceptibility of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* to polymyxins. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* Ağustos 2007;6:8.
 130. Arroyo LA, García-Curiel A, Pachón-Ibañez ME, Llanos AC, Ruiz M, Pachón J, vd. Reliability of the E-test method for detection of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* Şubat 2005;43(2):903-5.
 131. Nhung PH, Miyoshi-Akiyama T, Phuong DM, Shimada K, Anh NQ, Binh NG, vd. Evaluation of the Etest method for detecting colistin susceptibility of multidrug-resistant Gram-negative isolates in Vietnam. *Journal of Infection and Chemotherapy* [Internet]. 2015;21(8):617-9. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1341321X15000860>
 132. Ranjan R, Iyer RN, Jangam RR, Arora N. Evaluation of in-vitro colistin susceptibility and clinical profile of carbapenem resistant Enterobacteriaceae related invasive infections. *Indian J Med Microbiol* [Internet]. 2023;41:40-4. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0255085722002602>
 133. Das S, Roy S, Roy S, Goelv G, Sinha S, Mathur P, vd. Colistin susceptibility testing of gram-negative bacilli: Better performance of vitek2 system than E-test compared to broth microdilution method as the gold standard test. *Indian J Med Microbiol.* Ocak 2020;38(1):58-65.
 134. Yiş R. Comparison of Broth Microdilution Method with BD Phoenix, Micro Scan and E-test for Carbapenem-resistant Enterobacterales: Colistin Susceptibility Testing. *Journal of Academic Research in Medicine.* 25 Ağustos 2022;12(2):61-5.
 135. Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, Hadjichristodoulou C, Gennimata V, Pournaras S, vd. Comparative Evaluation of Colistin Susceptibility Testing Methods among Carbapenem-Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter*

- baumannii Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* Mayıs 2015;59(8):4625-30.
136. Lee SY, Shin JH, Lee K, Joo MY, Park KH, Shin MG, vd. Comparison of the Vitek 2, MicroScan, and Etest methods with the agar dilution method in assessing colistin susceptibility of bloodstream isolates of *Acinetobacter* species from a Korean university hospital. *J Clin Microbiol.* Mart 2013;51(6):1924-6.
137. Khurana S, Malhotra R, Mathur P. Evaluation of Vitek®2 performance for colistin susceptibility testing for Gram-negative isolates. *JAC Antimicrob Resist* [Internet]. 16 Ekim 2020;2(4):dlaa101. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlaa101>
138. Şafak B, Tombak Ö, Eren Topkaya A. Kolistin Antimikrobiyal Duyarlılık Testinin Vitek-2 ve Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemleriyle Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi. *Journal.* 2020;8(1):73-8.
139. Elbediwi M, Li Y, Paudyal N, Pan Hang and Li X, Xie S, Rajkovic A, vd. Global Burden of Colistin-Resistant Bacteria: Mobilized Colistin Resistance Genes Study (1980-2018). *Microorganisms.* Ekim 2019;7(10).
140. Wise MG, Estabrook MA, Sahm DF, Stone GG, Kazmierczak KM. Prevalence of mcr-type genes among colistin-resistant Enterobacteriaceae collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program. *PLoS One.* Nisan 2018;13(4):e0195281.
141. Kurekci C, Aydin M, Nalbantoglu OU, Gundogdu A. First report of *Escherichia coli* carrying the mobile colistin resistance gene mcr-1 in Turkey. C. 15, *Journal of Global Antimicrobial Resistance.* Elsevier Ltd; 2018. s. 169-70.
142. Sarı AN, Süzük S, Karatuna O, Ögünç D, Karakoç AE, Çizmeci Z, vd. [Results of a multicenter study investigating plasmid mediated colistin resistance genes (mcr-1 and mcr-2) in clinical Enterobacteriaceae solates from Turkey]. *Mikrobiyol Bul.* Temmuz 2017;51(3):299-303.
143. Tekeli A, Dolapci İ, Evren E, Oguzman E, Karahan ZC. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Coproducing KPC and NDM-1 Carbapenemases from Turkey. *Microbial Drug Resistance* [Internet]. 20 Eylül 2019;26(2):118-25. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0086>
144. Özkaya E, Buruk CK, Tosun İ, Toraman B, Kaklıkkaya N, Aydin F. Investigation of plasmid mediated mcr colistin resistance gene in clinical enterobacterales isolates. *Mikrobiyol Bul.* 01 Nisan 2020;54(2):191-202.
145. Hazırolan G, Karagoz A. Emergence of carbapenemase-producing and colistin resistant *Klebsiella pneumoniae* ST101 high-risk clone in Turkey. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 01 Aralık 2020;67(4):216-21.

146. Arabacı Ç, Dal T, Başığit T, Genişel N, Durmaz R. Investigation of carbapenemase and MCR-1 genes in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Infect Dev Ctries*. 01 Haziran 2019;13(6):504-9.



8. EKLER

EK1. Etik Kurul Onay Belgesi

T.C. EGE ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

Microsoft Teams Programı ile Teletoplantı gerçekleştirilmiştir.

| BAŞVURU BİLGİLERİ | ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI | Klebsiella pneumoniae suşlarında kolistin direncinin araştırılması ve yöntem karşılaştırılması |
|-------------------|---|--|
| | SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI | Prof. Dr. Alper TÜNGER |
| | YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR | Dr. Ayça AYDIN UYSAL |
| | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ | Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı |
| | DESTEKLEYİCİ | Ege Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü |

| DEĞERLENDİRİLEN BELGELER | Belge Adı | Tarihi |
|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| | ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU | - |
| | BİLGİLENDİRME FORMU | - |
| | VERİ İZLEME FORMU/ ANKET | <input type="checkbox"/> |
| | ARAŞTIRMA BÜTÇESİ | <input checked="" type="checkbox"/> |
| DİĞER | <input type="checkbox"/> | |

KARAR BİLGİLERİ
Karar Nu: 20-9.1T/18 Tarih: 17.09.2020

Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, **araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödenmediği koşullarda** araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğu toplantıyla katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.

EGE ÜNİVERSİTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

| ÇALIŞMA ESASI | Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu |
|---------------------------------|--|
| BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI: | Prof. Dr. Güzide AKSU |

| Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği | Uzmanlık Dalı | Kurumu | Cinsiyeti | İlişki (*) | Katılım (**) | İmza |
|---|--|---|-----------|---|---|----------------|
| Prof. Dr. Güzide AKSU Başkan | Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları | Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D. | K | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | ONLINE KATILDI |
| Doç. Dr. Tolga AKŞİT (Başkan Yardımcısı) | Antrenörlük Eğitimi - Hareket ve Antrenman Bilimleri | Ege Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi Hareket ve Antrenman Bilimleri AD | E | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | ONLINE KATILDI |
| Prof. Dr. Ceyda KABAROĞLU Üye | Klinik Biyokimya | Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D. Klinik Biyokimya B.D. | K | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | ONLINE KATILDI |
| Prof. Dr. Zeliha KERRY Üye | Farmakoloji | Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD | K | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | ONLINE KATILDI |
| Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU Üye | Halk Sağlığı AD | Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD | K | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | ONLINE KATILDI |

| | | | |
|--|----------------------------------|-------|-----|
| Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr.Güzide AKSU | Araştırma Başvurusu Onay Belgesi | Sayfa | 1/2 |
|--|----------------------------------|-------|-----|



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

| | |
|-----------------------|--|
| ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI | Klebsiella pneumoniae suşlarında kolistin direncinin araştırılması ve yöntem karşılaştırılması |
|-----------------------|--|

| KARAR BİLGİLERİ | | Karar Nu: 20-9.1T/18 | | | | |
|---------------------------------------|----------------------------------|--|-----------|---|---|------------------|
| Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği | Uzmanlık Dalı | Kurumu | Cinsiyeti | İlişki (*) | Katılım (**) | İmza |
| Prof. Dr. Eyüp Sabri ERCAN Üye | Çocuk Ruh Sağlığı | Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D. | E | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | ONLINE KATILDI |
| Prof. Dr. Çağdaş EKER Üye | Ruh Sağlığı ve Hastalıkları | Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları A.D. | E | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | ONLINE KATILDI |
| Prof. Dr. H. Oya TÜRKÖĞLU Üye | Periodontoloji | Ege Üniversitesi Diş Hek. Fakültesi Periodontoloji A.D. | K | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | ONLINE KATILDI |
| Prof. Dr. Meltem SEZİŞ DEMİRCİ Üye | İç Hastalıkları | Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D. | K | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | ONLINE KATILMADI |
| Prof. Dr. Şafak DAĞHAN Üye | Halk Sağlığı Hemşireliği AD. | Ege Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği AD | K | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | ONLINE KATILDI |
| Doç. Dr. Ahmet ÖZGÜRYENİEL Üye | Kadın Hastalıkları ve Doğum | Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D. | E | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | ONLINE KATILDI |
| Doç. Dr. Tahir ATIK Üye | Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları | Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları A.D. Çocuk | E | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | ONLINE KATILDI |
| Dr. Öğr. Üyesi Aysun EKŞİOĞLU Üye | Ebelik AD. | Sağlık Bilimleri Fakültesi Ebelik Anabilim Dalı | K | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | ONLINE KATILDI |

- * Araştırma ile İlişki
** Toplantıda Bulunma

| | | | | | |
|--|------|----------------------------------|------------------|---------------------------------------|--------------|
| Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Güzide AKSU | İMZA | Araştırma Başvurusu Onay Belgesi | Belge Kodu 22 | Rev. Tarihi / No.su: 28.09.2011/05 | Sayfa 2/2 |
|--|------|----------------------------------|------------------|---------------------------------------|--------------|

EK2. Tez Çalışması Orijinallik Raporu

Klebsiella pneumoniae SUŞLARINDA KOLİSTİN DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI VE YÖNTEM KARŞILAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

| | | | |
|-------------------|---------------------|------------|------------------|
| % 5 | % 4 | % 3 | % 1 |
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

BİRİNCİL KAYNAKLAR

| | | |
|----------|--|-------------|
| 1 | acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı | % 2 |
| 2 | www.researchgate.net İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 3 | docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 4 | Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi | <% 1 |
| 5 | acikerisim.dicle.edu.tr İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 6 | klimud2015.org İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 7 | www.nature.com İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 8 | www.hindawi.com İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 9 | www.ipna.csic.es İnternet Kaynağı | <% 1 |

- | | | |
|----|--|------|
| 10 | klinikmikrobiyoloji2013.org İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 11 | Submitted to Atatürk University Öğrenci Ödevi | <% 1 |
| 12 | Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi | <% 1 |
| 13 | Submitted to Nanyang Technological University Öğrenci Ödevi | <% 1 |
| 14 | Tumisho Mmatumelo Seipei Leshaba, Nontombi Marylucy Mbelle, John Osei Sekyere. "Current and emerging polymyxin resistance diagnostics: a systematic review of established and novel detection methods", Journal of Applied Microbiology, 2021 Yayın | <% 1 |
| 15 | Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi | <% 1 |
| 16 | pdffox.com İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 17 | ÇETİN, Feyza, MUMCUOĞLU, İpek, AKSOY, Altan, GÜRKAN, Yakup and AKSU, Neriman. "Kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antimikrobiyal duyarlılıkları", Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, 2014. Yayın | <% 1 |

| | | |
|----|--|------|
| 18 | www.unboundmedicine.com İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 19 | Lucie Bardet, Jean-Marc Rolain. "Development of New Tools to Detect Colistin-Resistance among Enterobacteriaceae Strains", Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology, 2018 Yayın | <% 1 |
| 20 | jag.journalagent.com İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 21 | vetmik.org İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 22 | Halit KUŞ, Uğur ARSLAN, Hatice TÜRK DAĞI, Duygu FINDIK. "Hastane Enfeksiyonu Etkeni Klebsiella pneumoniae İzolatlarında Çeşitli Virülans Faktörlerinin Araştırılması", Mikrobiyoloji Bulteni, 2017 Yayın | <% 1 |
| 23 | Nilgün Kansak, Müge Aslan, Rıza Adaleti, Sebahat Aksaray. "Klebsiella pneumoniae İzolatlarında Sıvı Mikrodilüsyon Temelli İki Ticari Sistemin Referans Mikrodilüsyon Yöntemine Göre Değerlendirilmesi", Mikrobiyoloji Bulteni, 2020 Yayın | <% 1 |

| | | |
|----|--|------|
| 24 | PELİT, Süleyman and UZUN, Meltem. "Yoğun Bakım Ünitelerinde Yatan Hastalara ait Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Candida Suşlarında Tür Dağılımının ve Antifungal Duyarlılıkların Araştırılması", AVES Yayıncılık, 2016. Yayın | <% 1 |
| 25 | www.dovepress.com İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 26 | 9lib.net İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 27 | Cengiz ÇAVUŞOĞLU, Fethiye Ferda YILMAZ. "Ege Bölgesi'nde İnsan Mycobacterium bovis Enfeksiyonlarının Moleküler Epidemiyolojisi", Mikrobiyoloji Bulteni, 2017 Yayın | <% 1 |
| 28 | acikerisim.firat.edu.tr İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 29 | assets.researchsquare.com İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 30 | dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 31 | openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 32 | openaccess.ogu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı | <% 1 |

33

www.medrxiv.org

İnternet Kaynağı

<% 1

34

www.redalyc.org

İnternet Kaynağı

<% 1

35

www.theseus.fi

İnternet Kaynağı

<% 1

36

AL-MUHTASEB, Mutazz and KAYGUSUZ, Arif. "Kan kültürlerinden izole edilen Escherichia coli ve Klebsiella pneumoniae suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) sıklığı", Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Derneği, 2008.

Yayın

<% 1

37

ERMERTCAN, Şafak, LIMONCU, Mine Hoşgör and TAŞLI, Hüseyin. "Kan kültürlerinden izole edilen Klebsiella pneumoniae suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığının araştırılması ve tiplendirilmesi", Mikrobiyoloji Derneği, 2008.

Yayın

<% 1

38

Raquel Girardello, Ana Paula Cury, Maria Renata Gomes Franco, Thais Romano Di Gióia et al. "Colistin susceptibility testing and Vitek-2™: is it really useless?", Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2018

Yayın

<% 1

acikerisim.dicle.edu.tr:8080

39

İnternet Kaynağı

<% 1

40

www.betadergi.com

İnternet Kaynağı

<% 1

41

ÇOBAN, Ahmet Yılmaz, DEMİRPEK, Uğur,
ÇİFTÇİ, Alper and BOZDOĞAN, Bülent.

"Staphylococcus aureus metisilin direncinin
hızlı saptanmasında nitrat redüktaz testi: Bir
sınır değer duyarlılık test yöntemi",
Mikrobiyoloji Derneği, 2014.

Yayın

<% 1

42

Özlem KOYUNCU ÖZYURT, Betil ÖZHAK, Dilara
ÖĞÜNÇ, Emre YILDIZ, Dilek ÇOLAK, Filiz
GÜNSEREN, Gözde ÖNGÜT. "Evaluation of the
BD Phoenix100 System and Colistin Broth
Disk Elution Method for Antimicrobial
Susceptibility Testing of Colistin Against
Gram-negative Bacteria", Mikrobiyoloji
Bulteni, 2019

Yayın

<% 1

43

"Infectious cost of leisure (Keynote lecture)",
Clinical Microbiology and Infection, 4/2001

Yayın

<% 1

44

Alireza Rastgoo Haghi, Amir Kasraianfard,
Alireza Monsef, Amin Shoa Kazemi, Siavash
Rahimi, Seyed Mohammad Reza Javadi. "The
diagnostic values of procalcitonin and

<% 1

interleukin 6 in acute appendicitis", Turkish
Journal of Surgery, 2018

Yayın

45

KAYA¹, Mehmet Salih, BADEMKIRAN², Servet,
KÖSE², Mehmet, UÇAR, Eyyüp Hakan, MUTLU,
Hasan and ATLI, Mehmet Osman. "Sığırlarda
Gebelikle İlişkili Glikoproteinlerin Tespitinde
Kullanılan İki Test Kitinin Karşılaştırılması",
Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2017.

Yayın

<% 1

