

T.C.
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
ACINETOBACTER BAUMANNII SUŞLARINDA
KOLİSTİN DUYARLILIĞININ
DEĞERLENDİRİLMESİNDE STANDART
MİKRODİLÜSYON YÖNTEMİNİN İKİ FARKLI
TİCARİ MİK YÖNTEMİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Yavuz ALPER

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Halil YAZGI

ERZURUM-2019

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

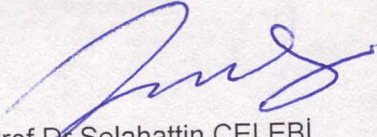
İLGİ: 28.08.2019 tarih ve 42190979-204.01.02-E.1900245075 sayılı yazınız.

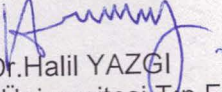
TIPTA UZMANLIK TEZ SAVUNMA TUTANAĞI

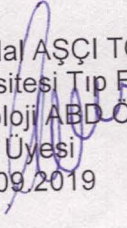
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı tıpta uzmanlık öğrencisi Arş.Gör.Dr.Yavuz ALPER'in "Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Kolistin Duyarlılığının Değerlendirilmesinde Standart Mikrodilüsyon Yönteminin İki Farklı Ticari MİK Yöntemi İle Karşılaştırılması" konulu tezini incelemek üzere oluşturulan tez jürisine üye olarak seçildiğimiz ilgi yazınızla bildirilmesi üzerine jüri üyeleri, 05.09.2019 tarihinde toplanmış ve ilgili öğrenci tez savunmasına alınmıştır.

Tıpta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Eğitimi Yönetmeliğinin 19. maddesi gereğince yapılan tez savunmasının tamamlanması sonucunda adı geçen tezi jüri üyelerince oy birliği ile kabul edilmiştir.

Bilgilerinize arz ederiz.


Prof.Dr.Selahattin ÇELEBİ
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji ABD Başkanı
Jüri Başkanı
05.09.2019


Prof.Dr.Halil YAZGI
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji ABD Öğretim Üyesi
Jüri Üyesi
05.09.2019


Prof.Dr. Zülal AŞÇI TORAMAN
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji ABD Öğretim Üyesi
Jüri Üyesi
05.09.2019

İÇİNDEKİLER

TABLolar LİSTESİ	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	v
TEŞEKKÜR	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. <i>Acinetobacter</i> Cinsi Bakteriler	2
2.1.1. Tarihçe ve Sınıflandırma	2
2.1.2. Mikrobiyolojik Özellikler.....	3
2.1.3. <i>A.baumannii</i> 'nin Tanımlanması.....	4
2.1.4. Patogenez ve Virulans	4
2.2. Epidemiyoloji	9
2.2.1. Dünya’da Kolistin Direnç Epidemiyolojisi ve Türkiye.....	10
2.3. <i>Acinetobacter</i> Enfeksiyonları	12
2.4. Tedavi ve Direnç	14
2.4.1. Güncel Tedavi Seçenekleri.....	14
2.4.2. Direnç Mekanizmaları	16
2.4.3. <i>A.baumannii</i> ’de Antibiyotik Sınıflarına Direnç	18
2.5. Polimiksinler ve Kolistin.....	20
2.5.1. Kolistin Kimyasal Yapısı	21
2.5.2. Etki Mekanizması.....	23
2.5.3. Kolistine Direnç Mekanizmaları	25
2.6. Kolistin Direncini Saptamada Kullanılan Duyarlılık Metodları	26
2.6.1. Dilüsyon Metodları.....	27
2.6.2. Otomatize Olmayan Sistemler.....	29
2.6.3. Otomatize Sistemler	31
2.6.4. Hızlı Yöntemler	32
2.6.5. Seçici besiyeri.....	33

2.7. MİK Sonucunu Etkileyen Parametreler	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. İzolatların Toplanması ve Saklanması	36
3.2. Kullanılan Malzemeler	36
3.3. Kültür ve İdentifikasyon.....	38
3.4. Ticari Kitlerle İzolatların Kolistin Direncinin Belirlenmesi	41
3.5. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi (BMD).....	42
3.6. MİK Değerlerinin Belirlenmesi.....	45
4. BULGULAR	47
4.1. İzolatların Vücut Bölgesine Göre Dağılımı.....	47
4.2. İzolatların Kliniklere Göre Dağılımı	47
4.3. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları	48
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	55
7. KAYNAKLAR	56

TABLULAR LİSTESİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. <i>Acinetobacter</i> Taksonomi	2
Tablo 2.2. <i>Acinetobacter</i> Türlerinin Biyokimyasal Reaksiyonları ve Üreme Özellikleri.....	3
Tablo 2.3. <i>A.baumannii</i> 'nin Bilinen Virülans Faktörlerinin Özeti.....	5
Tablo 2.4. <i>A.baumannii</i> Siderofor Proteinleri	6
Tablo 2.5. Kolistin Dirençlerini Gösteren Bazı Çalışmalar	10
Tablo 2.6. UHESA 2016 Antimikrobiyal Dirençleri Özet Raporu	11
Tablo 2.7. Ülkemizde 2016 Yılı ve Sonrasında <i>A.baumannii</i> Kolistin Direnci Gösteren Bazı Çalışmalar.....	11
Tablo 2.8. <i>A.baumannii</i> İçin Duyarlılık Çalışılabilir Antibiyotikler	15
Tablo 2.9. <i>A.baumannii</i> 'deki Efluks Pompa Çeşitleri ve Antibiyotikler	17
Tablo 2.10. <i>A.baumannii</i> direnç mekanizmaları	20
Tablo 3.1. Laboratuvarımızda Gram-negatiflere Uygulanan Antibiyotikler.....	39
Tablo 4.1. İzolatların Kliniklere Göre Dağılımı.....	47
Tablo 4.2. Elde Edilen MİK Sonuçları.....	48
Tablo 4.3. Karşılaştırmalı Çalışma Sonuçları	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. <i>A.baumannii</i> 'de Antibiyotik Sınıflarına Direnç Mekanizmaları	18
Şekil 2.2. Kolistin ve Kolistimetat Sodyumun Kimyasal Yapısı. Dab, diaminobütirik asit; Leu, lösin; Thr, treonin	22
Şekil 2.3. Kolistinin Antimikrobiyal Etki Mekanizması	23
Şekil 2.4. <i>E.coli</i> 'ye Polimiksin B Etkisi (2a) İşlem yapılmamış bakteri x63.000, (2b) 25 µg ile 30 dk muamele edilmiş bakteri. Hücre duvarında kabarcık benzeri yapılar görülmekte X95.000, (2c) Bir önceki resmin büyütülmüş hali x190.000. Bu kabarcık benzeri yapılar dış membranın hasarlanmış parçalarından oluşur.....	24
Şekil 2.5. <i>A.baumannii</i> Pmrab İkili Sistemi.....	25
Şekil 2.6. UMIC™ sistemi.....	31
Şekil 3.1. -20°C'de Saklanan İzolatlar.....	36
Şekil 3.2. Phoenix™ cihazı ID ve AST şişeleri, NID tanımlama, NMIC duyarlılık kiti	40
Şekil 3.3 Phoenix™ 100 cihazı.....	40
Şekil 3.4. Phoenix™ Cihazının NMIC Duyarlılık Kiti. Solda bakteri süspansiyonunun inkubasyonu sonrası kuyucuklarda bakteri üremesi görülmektedir. Sağda inokulum yapılmamış kit görülmektedir.	41
Şekil 3.5. Sensititre™ Çalışma Şeması ve Dilüsyonlar	42
Şekil 3.6. Hazırlanan 2560 µg/mL Konsantrasyonda Kolistin Stokları	43
Şekil 3.7. P-80 İçermeyen Steril Mikroplaklar	44
Şekil 3.8. Kolistinin Mikrodilüsyon Yöntemiyle Çalışılması.....	45
Şekil 4.1. İzolatların Elde Edildiği Örneklerin Dağılımı	47
Şekil 4.2. Serpilme Diyagramı. Test Edilen Metodla Referans Broth Mikrodilüsyon Uyumunun Serpilme Diyagramı Üzerinden Gösterilmesi. Referans MİK ile birebir uyum gösteren MİK değerleri kutu içlerinde, esansiyel uyum gösterenler ise (referans MİK ile ±1 dilüsyon farkı) gri zeminle gösterilmiştir.....	50

KISALTMALAR DİZİNİ

<i>A.baumannii</i>	: <i>Acinetobacter baumannii</i>
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ATCC	: American Type Culture Collection
Bap	: Biyofilm ilişkili protein
BfmRS	: Biofilm formation Regulator System
BH	: Büyük hata
BMD	: Broth mikrodilüsyon
Ca ⁺²	: Kalsiyum
CA	: Categorical agreement
CDC	: Centers For Disease Control And Prevention
CFU	: Koloni Oluşturan Ünite
CLSI	: Clinical And Laboratory Standarts Institute
CsuA/BABCDE	: Chaperone–usher pili assembly system
ÇBH	: Çok büyük hata
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EA	: Essential agreement
EU	: Esansiyel uyum
EMB	: Eozin Metilen Blue Agar
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
MDR	: Çoklu ilaca dirençli
ME	: Major error
KAMHB	: Katyon Ayarlı Mueller Hinton-Buyyon
KOAH	: Kronik obstruktif akciğer hastalığı
KU	: Kategorik uyum
LPS	: Lipopolisakkarit
µg	: Mikrogram
MATE	: Multidrug and Toxic Compound Extrusion
MFS	: Major Facilitator Super Family
Mg ⁺²	: Magnezyum
MHB	: Mueller-Hinton Broth

MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
NCTC	: National Collection of Type Cultures
OMP	: Outer Membran Protein
OmpA	: Outer Membrane Protein A
P-80	: Polysorbate-80
PBP	: Penisilin Bağlayan Protein
PDR	: Pandrug Resistant
pEtN	: Fosfoetanolamin
Pmr	: Polymyxin resistant
PNAG	: Poly- β -1-6-N-Acetylglucosamine
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
RND	: Resistance Nodulation Cell Division
SB	: Sağlık Bakanlığı
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopu
SMR	: Small Multidrug Resistance
TSI	: Triple Sugar Iron
UHESA	: Ulusal Hastane Enfeksiyonları Surveyans Ağı
VME	: Very major error
XDR	: Extensively Drug Resistant
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimine başladığım ilk günden beri desteğini hep hissettiğim Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı saygıdeğer hocam Prof. Dr. Selahattin ÇELEBİ'ye,

Tezimle ilgili her aşamada bilgi, hoşgörü ve emeklerini esirgemeyen, çalışmalarımın büyük bir titizlikle yürütülmesine özen gösteren değerli danışman hocam Prof. Dr. Halil YAZGI'ya,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini aynı zamanda desteklerini esirgemeyen tüm hocalarıma,

Bugünlere gelmemi sağlayan babama ve anneme,

Sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürler...

Dr. Yavuz ALPER

ÖZET

Klinik Örneklerden İzole Edilen *A.baumannii* Suşlarında Kolistin Duyarlılığının Değerlendirilmesinde Standart Mikrodilüsyon Yönteminin İki Farklı Ticari MİK Yöntemi ile Karşılaştırılması

Amaç: *A.baumannii* son yıllarda hastane enfeksiyonlarından sıklıkla izole edilmektedir. Giderek artan direnç *A.baumannii* tedavisinde kullanılan bir çok antibiyotiği kullanılamaz hale getirmiştir. Dolayısıyla, dirençli suşların tedavisinde kullanılan kolistin duyarlılığını doğru bir şekilde bildirilmesi büyük önem arz etmektedir. Kolistin duyarlılığını tespit etmek için şu ana kadar kabul edilmiş tek referans yöntem “broth mikrodilüsyon” yöntemidir. Yoğun emek isteyen ve zaman alıcı olan bu yöntem alternatif olarak çeşitli ticari sistemler kullanılmaktadır. Çalışmamızda “broth mikrodilüsyon” ile iki farklı ticari duyarlılık yönteminin rutin kullanımdaki etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: 01 Temmuz 2018 - 30 Eylül 2018 tarihleri arasında Atatürk Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerden izole edilen 44 Çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* suşu çalışmaya dahil edildi. İzolatların kolistin duyarlılıkları Sensititre™ (Thermo Fischer Scientific®, ABD), Phoenix™ (BD®-Becton Dickinson, ABD) ve referans “broth mikrodilüsyon” yöntemleriyle çalışıldı ve sonuçlar karşılaştırıldı.

Bulgular: Çalışmaya alınan tüm izolatlar her üç yöntemle de kolistine duyarlı bulunmuştur. Sensititre™ yönteminde “esansiyel uyum” %61, “kategorik uyum” %100, “büyük hata” %0, “çok büyük hata” %0 bulunmuştur. Tüm izolatların MİK değerleri Phoenix™ sisteminde 1 µg/mL'in altında çıkmıştır. Phoenix™ için “kategorik uyum” %100, “büyük hata” %0, “çok büyük hata” %0 bulunmuştur.

Sonuç: Çalışmamızda iki ticari yöntemle elde edilen sonuçlar, referans “broth mikrodilüsyonla” uyumludur. “Broth mikrodilüsyon” ile duyarlı bulunan suşların tamamı çalışmamıza dahil ettiğimiz ticari yöntemlerde de duyarlı bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *A.baumannii*, Kolistin, Sensititre, Phoenix

ABSTRACT

Comparison of Standard Microdilution Method with Two Different Commercial MIC Methods for Evaluating Colistin Sensitivity in *A.baumannii* Strains Isolated from Clinical Specimens

Aim: *A.baumannii* has been frequently isolated from hospital infections in recent years. Increasing resistance has rendered many antibiotics unavailable for the treatment of *A.baumannii*. Therefore, it is important to accurately report the sensitivity of colistin used in the treatment of resistant strains. The only reference method that has been accepted so far to determine the sensitivity of colistin is the “broth microdilution” method. As an alternative to this labor-intensive, time-consuming method, various commercial systems are used. In this study, we aimed to evaluate the effectiveness of two different commercial sensitivity methods in routine use with “broth microdilution”.

Method: 44 multi-drug resistant *A. baumannii* strains isolated from clinical samples sent to the Medical Microbiology Laboratory of Ataturk University Health Application and Research Hospital between 01 July 2018 and 30 September 2018 were included in the study. The colistin sensitivities of the isolates were studied by Sensititre™ (Thermo Fischer Scientific®, USA), Phoenix™ (BD®-Becton Dickinson, USA) and reference broth microdilution method, and the results were compared.

Results: All isolates were susceptible to colistin by all three methods. In the Sensititre™ method, “essential agreement” was 61%, “categorical agreement” was 100%, “major error” was 0%, “very major error” was 0%. MICs of all isolates were less than 1 µg/mL in the Phoenix™ system. For Phoenix™, “categorical agreement” was 100 %, “major error” was 0%, “very major error” was 0%.

Conclusions: In our study, the results obtained by two commercial methods are compatible with the reference “broth microdilution”. All strains found to be susceptible to “Broth microdilution” were also susceptible to the commercial methods included in our study.

Keywords : *A.baumannii*, Colistin, Sensititre, Phoenix

1. GİRİŞ VE AMAÇ

A.baumannii tüm dünyada ve ülkemizde giderek artan oranda çeşitli enfeksiyonlarda etken olarak karşımıza çıkmaktadır. Çeşitli mekanizmalarla gelişen direnç, tedavide yeni seçenek ilaç gruplarının geliştirilmesini; kombinasyon tedavilerinin plânlanmasını gerektirmiştir. Çoklu ilaç dirençli (Multi Drug Resistance = MDR) *A.baumannii* tedavisinde günümüzde çeşitli kombinasyonlarıyla birlikte polimiksin grubu antibiyotiklerin özellikle de kolistin farklı formları kullanılmaktadır. Polimiksin grubu antibiyotiklere karşı duyarlılığın doğru olarak tanımlanması, bu son çare ilaçların kullanımı için son derece önemlidir (1, 2).

Polimiksin grubu antibiyotiklerden kolistin duyarlılığını tespit etmek için şu ana kadar kabul edilmiş referans yöntem broth mikrodilüsyon yöntemidir. Ancak bu yöntem yoğun emek gerektirir ve zaman alıcıdır. Bu yöneme alternatif olarak çeşitli ticari yöntemler kullanıma sunulmuştur. Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda mevcut yöntemler kıyaslanmış ve rutin duyarlılık tespitinde uygulanabilirlikleri gösterilmeye çalışılmıştır (2-4). Çalışmamızda ise standart mikrodilüsyon yöntemi ile Phoenix™ (BD®-Becton Dickinson, ABD) ve Sensititre™ (Thermo Fischer Scientific®, ABD) ticari kitlerinin *A.baumannii*'de kolistin duyarlılık tespiti açısından karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Acinetobacter Cinsi Bakteriler

2.1.1. Tarihçe ve Sınıflandırma

Acinetobacter cinsi bakteriler ilk keşfedildikleri 1800'lü yıllardan itibaren birçok farklı şekilde isimlendirilmişlerdir (5). 19.yüzyılın sonlarında bakterinin mikroskopik özelliklerini tanımlayan bilim insanlarının adına ithafen "Morax-Axenfeld basilleri" olarak adlandırılmışlardır. 1911'de Beijerinck topraktan elde ettiği bakteriyeye *Micrococcus calcoaceticus* adını vermiş, sonraki yıllarda *Diplococcus mucosus*, *Neisseria winogradskyi*, *Alcaligenes haemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Bacterium anitratum*, *Achromobacter anitratum* gibi farklı isimlendirmeler kullanılmıştır. Brisou ve Pre'vot 1954 yılında Yunanca hareketsiz anlamında "Akinetos" kelimesini seçerek "*Acinetobacter*" olarak isimlendirmişlerdir (6).

Acinetobacter cinsi Baumann ve ark; (7) tarafından 1968'de bakterinin morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre 1971'de *Moraxellaceae* ailesi içine yerleştirilmiştir. Bugünkü taksonomi Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. *Acinetobacter* Taksonomi (7)

Alem	<i>Bacteria</i>
Şube	<i>Proteobacteria</i>
Sınıf	<i>Gamma proteobacteria</i>
Takım	<i>Pseudomonadales</i>
Familiya	<i>Moraxellaceae</i>
Cins	<i>Acinetobacter</i>

İlk olarak adlandırılan *Acinetobacter* türü *Acinetobacter calcoaceticus* olmuştur. Bouvet ve Grimont (8), DNA-DNA hibridizasyon yöntemiyle 1986'da 12 genomik tür sınıflandırmış, *A.baumannii* de bu çalışmada tanımlanmıştır. Tjenberg ve Ursing (9) 1989'da, 13'den 15'e kadar üç tane daha yeni DNA grubu tanımlamışlardır. Aynı yıllarda Bouvet ve Jeanjean (10), *Acinetobacter* türlerinin beş DNA grubunu

daha tanımlamış ve 13-17 arası numaralar vermiştir. *A.baumannii*, *A.calcoaceticus*, *A.pittii*, *A.nosocomialis* fenotipik özellikleri ve genotipleri benzer olduğu için *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii kompleks* olarak da isimlendirilmektedir (11).

2.1.2. Mikrobiyolojik Özellikler

Acinetobacter cinsindeki bakteriler, Gram-negatif, zorunlu aerob, hareketsiz, katalaz pozitif, nonfermentatif, indol negatif, oksidaz negatif, nitratı redükte etmeyen, TSI agarda asit oluşturmayan bakterilerdir. Koyun kanlı agar, EMB ve McConkey agar gibi rutin kullanılan besiyerlerinde, 35-37 °C’de iyi ürerler (12). Kolonileri genellikle pigmentsizdir, kapsüllü suşların oluşturduğu koloniler ise mukoid görülür ve spor oluşturmazlar (13). Gram boyanma özellikleri klinik örneklerde ve besiyerinde farklılık gösterebilmektedir. 24 saatlik pasajlarda Gram-negatif basil şeklinde görülürken, vücut sıvılarında Gram-negatif diplokok olarak boyanabilirler. Fimbriaları olup, flajellaları yoktur. Logaritmik üreme esnasında 1-1.5x1.5-2.5 µm boyutlarında basil olarak boyanırlar. Diğer üreme fazlarında kok, kokobasil şeklinde görülürler. Bu nedenle *Neisseria*, *Kingella*, *Eikenella*, *Moraxella* gibi Gram-negatif bakterilerin ayırımında mikroskopik incelemede güçlük yaşanabilmektedir (14).

İnsandan sıklıkla izole edilen *Acinetobacter* türlerinin kendi içinde ayırımı geleneksel olarak Tablo 2.2’deki gibi yapılmaktadır.

Tablo 2.2. *Acinetobacter* Türlerinin Biyokimyasal Reaksiyonları ve Üreme Özellikleri (15).

Organizma	Genomik tür	37°C’de üreme	44°C’de üreme	Hemoliz	OF Dekstroz	Malonat
<i>A.baumannii</i>	2	+	+	-	+	+
<i>A.haemolyticus</i>	4	+	-	+	D (52)	-
<i>A.calcoaceticus</i>	1	+	-	-	+	+
<i>A.pittii</i>	3	+	-	-	+	D
<i>A.lwoffii</i>	8/9	+	-	-	-	-

+: suşların %90 veya fazlası pozitif,

- :suşların %90 veya fazlası negatif

D: Değişken , OF: Oksidatif fermentatif test

2.1.3. *A.baumannii* 'nin Tanımlanması

Bakteri tür adını Amerikalı bakteriyolog çift Paul ve Linda Baumann'dan almıştır. Bakteriye bu iki akademisyenin soyadlarının verilmesi yıllarca yaptıkları faydalı çalışmalara ithafen Bouvetve Grimont (8) tarafından 1986 yılında yayınlanan geniş çaplı bir çalışmada gerçekleştirilmiştir. Sonraki yıllarda bu iki araştırmacının soyadı kendi buldukları Gram-negatif bakteri *Oceanimonas baumannii*'ye de verilmiştir (16). Son olarak 2003'te *Candidatus baumannia cicadellincola* adında yeni bir bakteri türüne daha adları verilmiştir (17).

A.baumannii'nin mikrobiyolojik özellikleri, cinsinin genel karakterini yansıtır. Yapılan genotipik sınıflandırmada Genomik tür 2 olarak sınıflandırılmıştır (13). Trypticase Soy Agar'daki kolonileri, yuvarlak, konveks, düz ve hafifçe opaktır. Koloni çapı 30°C'de 24 saatlik inkubasyonu takiben 1.5-2.0 mm, 48 saat sonra ise 3.0-4.0 mm olmaktadır. En iyi üreme sıcaklık aralığı 15-44°C'dir. Bazı nadir suşlar üreme için besiyerinde metiyonine ihtiyaç duyabilir. Nitratları nitrite indirgemezler. Birçok suş D-glukoz'dan asit oluşturur. Bu suşlar ayrıca β -ksilosidaz oluştururlar. Aynı şekilde DL-laktat, DL-4-aminobutirat, L-aspartat, L-trozin, etanol, 2,3-butanediol ve glutarat da bu bakteri tarafından kullanılmaktadır (13).

2.1.4. Patogenez ve Virulans

Tıbbi ekipmanlara ve çevredeki yüzeylere tutunma ve yapışma *A.baumannii*'nin patogenezinde en önemli basamaktır. Dehidrate koşullarda cam lamellerin yüzeyinde canlı kalma süresi 27 gün, hastane yatak raylarında ise dokuz güne kadar canlı kalabilmektedir (18). Tutunma ve biyofilm oluşturmada etkili bazı virülans faktörleri Tablo 2.3'te özetlenmiştir (19).

Tablo 2.3. *A.baumannii*'nin Bilinen Virülans Faktörlerinin Özeti

Mekanizma

CsuA/BABCDE şaperon ilişkili pili montaj sistemi
Siderofor ilişkili demir bağlama sistemi
Dış membran protein A (OmpA)
Aba1 oto indükleyici sentaz
Biyofilm ilişkili protein (Bap)
İkili regulator sistem (BfmRS)
Penicillin bağlayıcı protein 7/8 (PBP-7/8)
PNAG- biofilm oluşturucu
Kapsül
Lipopolisakkarit (LPS)
Fosfolipaz D
Fosfolipaz C

Csua/BABCDE Şaperon İlişkili Pili Montaj Sistemi

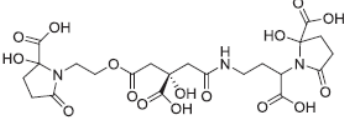
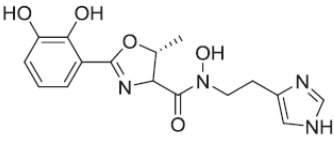
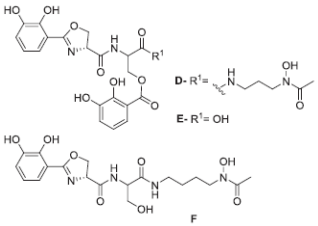
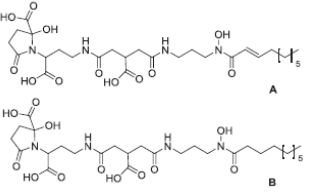
Yapılan invitro çalışmalarda *A.baumannii* plastik veya cam yüzeylere inoküle edildiğinde CsuA/BABCDE şaperon ilişkili montaj sistemi aktive olarak bakterinin biyofilm oluşturmasını sağlar. Sistemi keşfeden Tomaras ve ark. (20) yaptığı çalışmada, kare biçimindeki cam petrilere *A.baumannii* suşlarını ekmişler, ekilen suşları bir gecelik inkubasyondan sonra yıkayarak kontrol bakterisi olarak kullanılan *Escherichia coli* ile karşılaştırılmışlardır. Kristal viyole, floresan boyalar ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak yapılan bu çalışmada *CsuA* geni içermeyen suşlar yüzeylerde biyofilm oluşturamamış, içerenler ise pilileri yardımıyla biyofilm oluşturarak yüzeyde kalmayı başarmışlardır.

Siderofor İlişkili Demir Bağlama Sistemi

Demir biyolojik sistemlerde aslında bolca bulunmasına rağmen, biyolojik olarak aktif demir görece olarak daha az bulunmaktadır. Aerobik ortamda az çözünmesi, hemoglobin ve demir bağlayan transferrin gibi proteinlerle bağlanması onun serbestçe bulunmasını engeller (21). *A.baumannii* transferrin ve laktoferrinden demiri alamaz ancak siderofor denilen proteinler salarak hem molekülündeki demiri

bağlar ve sideroforu sitoplazmasına geri alarak kullanır. Son çalışmalarda tespit edilen bazı sideroforlar Tablo 2.4'te gösterilmiştir (22).

Tablo 2.4. *A.baumannii* Siderofor Proteinleri

Adı	Kimyasalyapısı
Achromobactin	
Acinetobactin	
Fimsbactins A-F	
Baumannoferrin A-B	

Dış Membran Protein A (OmpA)

Dış membran protein A (OmpA) adhezyonu artırmayla ilişkilidir, özellikle de solunum yolundaki epitel hücrelerine daha iyi yapışmayı sağlar. Enfeksiyon boyunca konak hücrenin mitokondri, çekirdek ve hücre yüzeyine göç eder ve hücre ölümüyle sonuçlanacak olan proapoptotik molekül sitokrom C'nin ekspresyonunu indükler (23).

A.baumannii OmpA yardımıyla, alternatif kompleman yoluyla ilişkili öldürme mekanizmasından bir alternatif yol regülatörü olan nötralizan faktör H ile kaçır. Bu fenomen *A.baumannii*'nin serum direnci olarak bilinir (24).

Yukarıdaki bilgilere ek olarak OmpA; CD4+ lenfositlerin farklılaşmasını, dentritik hücrelerin aktivasyon, maturasyonunu ve prematür apoptozlarını da indüklemektedir (25).

Aba1 Oto İndükleyici Sentaz

Aba1 oto indükleyici sentaz, normal biyofilm oluşumu için gereklidir. *Aba1* geninden sentezlenen bu protein quorum sensing ilişkili biyofilm oluşumunun son safhaları için maturasyonda görev yapmaktadır (26).

Biyofilm İlişkili Protein (Bap)

Biyofilm ilişkili proteinler ilk defa *Staphylococcus aureus*'ta keşfedilmiştir. Prototip Bap proteini *S.aureus*'un biyofilm oluşum aşamasında ilk tutunmayı sağlamaktadır. Loehfelm ve ark. (27) yaptıkları çalışmada benzer bir proteinin varlığını *A.baumannii*'de keşfetmişlerdir. Bu protein *S.aureus*'taki gibi ilk tutunmayı değil biyofilm oluşumunun ileri aşamalarında görev almaktadır.

İkili Regulator Sistem (Bfmrs)

Biyofilm formasyonu çok geniş bir çevresel sinyal çeşitliliğinden etkilenir. Bu sinyaller karmaşık ve çok basamaklı bir süreç olan biyofilm oluşumu için gerekli proteinlerin ekspresyonunu düzenler. Bakterilerde ikili regulator sistem denilen yapıda bir adet membran sensör kinaz ve ona bağlı yanıt düzenleyici (response regulator) bulunur. Diğer bakterilerde bu sistemi düzenleyen *crc*, *envZ/ompR*, *vspR*, *cpx* gibi bazı gen bölgeleri tespit edilmiştir. *A.baumannii*'de ise Tomaras ve ark. (28) tarafından 2008'de böyle bir sistemin varlığı ortaya konmuş ve ilgili gen bölgesinin *BfmRS* olduğu keşfedilmiştir.

Penisilin Bağlayıcı Protein 7/8 (PBP-7/8)

PBP-7/8 proteini *A.baumannii*'nin patogeneğine direkt veya dolaylı olarak katkı sağlamaktadır. Bu katkıyı kompleman bağımlı bakterisidal aktiviteyi inhibe

ederek göstermektedir. Mekanizma tam olarak anlaşılammakla birlikte bu protein bir hidrolaz olduğu için az eksprese edilmesi hücre duvar dayanıklılığını artırıp kompleman bağımlı öldürmeden kaçışı sağlamaktadır diye düşünölmektedir (29).

PNAG- Biofilm Oluşturucu

pgaABCD olarak adlandırılan dört adet gen kümesi içeren lokus *A.baumannii*'nin Poly-β-1-6-N-Acetylglucosamine (PNAG) adı verilen bir maddeyi sentezlemesini sağlamaktadır. PNAG biyofilmin bütönlüğü için esansiyel bir yapıtaşıdır. Bu gen bölgesi çıkarılmış suşların biyofilm oluşturamadıkları ve patojenitelerinin azaldığı gösterilmiştir. Bu proteine karşı aşı çalışmaları da yapılmaktadır (30).

Kapsül

Kapsül diğer bakterilerde olduğu gibi *A.baumannii*'de de önemli bir virölans faktörüdür. Russo ve ark. (31) yaptığı çalışmada K1 kapsüler polisakkarit üreten suşların insan asit sıvısı ve serumda canlı kalma süresinin arttığını gözlemişlerdir.

Lipopolisakkarit (LPS)

A.baumannii lipopolisakkaritleri O antijeni, karbonhidrat gövde ve bir lipid A parçasından oluşur. LPS inflamatuvar hücrelerin toplanması ve sitotoksik materyallerinin ortama salınımını uyaran bir virölans faktörüdür (32).

Fosfolipaz D

Fosfolipaz D'nin bakterinin serumda gelişmesini, epitel hücre invazyonu ve fare modellerinde pnomoni patogenezinde aktif rol aldığı görölmüştür (33).

Fosfolipaz C

Plc1 gen bölgesinden eksprese edilen Fosfolipaz C, epitel hücrelerde sitotoksik etkiden sorumludur. Bu gen bölgesi çıkarılan suşların virölansı önemli ölçüde azalmıştır (34).

2.2. Epidemiyoloji

A.baumannii primer olarak hastane ilişkili bir patojendir ve sepsisemi, bakteremi, yara sepsisi, endokardit, ventilatör ilişkili pnomoni, menenjit ve idrar yolu enfeksiyonu gibi birçok nozokomiyal enfeksiyondan sorumludur (35).

A.baumannii hastane ortamlarına ilaveten toprak ve suda da sıklıkla bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada yoğun bakım üniteleri, ameliyathaneler ve dahili servislerin havasında, yüzeylerinde antibiyotik dirençli *A.baumannii*'ye rastlanmıştır (36). Birçok epidemiyolojik çalışma MDR *A.baumannii* enfeksiyonunun Avrupa, Kuzey Amerika, Arjantin, Brezilya, Çin, Tayvan, Hong Kong, Japonya ve Kore gibi dünyanın farklı ülkelerinde ortaya çıktığını göstermektedir. Bu enfeksiyonların büyük bir kısmı hastane ilişkilidir (37).

Toplum kaynaklı pnomoni özellikle tropikal bölgelerden nemli ve sıcak aylarda rapor edilmiştir (38). Irak ve Afganistan işgali sırasında Birleşik Krallık ve ABD ordusundaki yaralanan çok sayıda askeri personelde dirençli *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii kompleks* ile enfekte vaka gözlenmiştir (12).

A.baumannii enfeksiyonları Avrupa'nın birçok bölgesini etkileyen bir sorundur. 1980'lerin başından itibaren, hastane kaynaklı *A.baumannii* salgınları moleküler epidemiyolojik metodlar kullanılarak İngiltere, Almanya, Fransa, İtalya, İspanya ve İsviçre gibi çeşitli Avrupa ülkelerinden bildirilmiştir (39).

Üç uluslar arası *A.baumannii* klonu (Avrupa klonları I, II ve III olarak da bilinir) Kuzey Avrupa (Belçika, Çek Cumhuriyeti, Danimarka, Fransa, İspanya, İsviçre ve Birleşik Krallık) ve Güney Avrupa (İtalya İspanya, Yunanistan ve Türkiye)'dan da raporlanmıştır (12).

MDR *A.baumannii*'nin sebep olduğu bir çok vaka Birleşik Arap Emirlikleri, Bahreyn, Suudi Arabistan, Filistin ve Lübnan'daki hastanelerden de bildirilmiştir (40). Riyad askeri hastanesinde yapılan bir çalışmada, yoğun bakımda enfeksiyon etkenleri

araştırılmış, kültürü yapılan örneklerin %40.9' unda *A.baumannii* ürediği gösterilmiştir (41).

2.2.1. Dünya'da Kolistin Direnç Epidemiyolojisi ve Türkiye

Kolistin dirençli *A.baumannii* ilk olarak 1999 yılında Çek Cumhuriyeti'nden bildirilmiştir (42). O günden bugüne kadar artan oranda dünyanın birçok yerinden raporlanmaktadır. Avrupa'da %7-11 oranında direnç bildirilirken ABD'de bu oran %2.1-7.1 arasındadır (43, 44).

Tablo 2.5. Kolistin Dirençlerini Gösteren Bazı Çalışmalar

Yazar	Yıl	% Kolistin direnci (Dirençli izolat/total)	Ülke	Kaynak
Al-Sweih ve ark.	2011	12 (30/250)	Kuveyt	(44)
Chang ve ark.	2012	10.4 (14/134)	Tayvan	(44)
Daadani ve ark.	2013	1.8 (24/1307)	Sudi Arabistan	(44)
Castanheira ve ark.	2014	1.2 (65/5477)	ABD	(44)
Bashir ve ark.	2014	1 (1/100)	Pakistan	(44)
El-Shazly ve ark.	2015	4.7 (1/21)	ABD	(44)
Batarseh ve ark.	2015	1.8 (2/116)	Ürdün	(44)
Qureshi ve ark.	2015	20 vaka	ABD	(44)
Tojo ve ark.	2015	1 vaka	Japonya	(44)
Cikman ve ark.	2015	2.5 (1/40)	Türkiye	(44)
Qadeer ve ark.	2016	3 vaka	Pakistan	(44)
Gupta ve ark.	2016	53.1 (17/32)	Hindistan	(44)
Pawar ve ark.	2016	11.9 (42/359)	Hindistan	(44)
Am ve ark.	2016	4.2 (2/47)	Hindistan	(44)
Samawi ve ark.	2016	1.4 (2/137)	Katar	(44)
Maraki ve ark.	2016	7.9 (15/189)	Yunanistan	(44)
Al-Samareeve ark.	2016	20 (10/50)	Irak	(44)
Alaei ve ark.	2016	16 (14/85)	İran	(44)
Maspi ve ark.	2016	48.8 (42/86)	İran	(44)
Ambrosi ve ark.	2016	3.2 (1/31)	İtalya	(44)
Rossi ve ark.	2016	1.4 (102/7446)	Brezilya	(44)
Ghasemian ve ark.	2016	8 (4/50)	İran	(44)
Nowak ve ark.	2017	28.6	İspanya	(45)
Vourli ve ark.	2017	24.8 (29/117)	Yunanistan	(46)
Dickstein ve ark.	2018	10.5 (20/190)	İsrail	(47)
Dickstein ve ark.	2018	7 (3/42)	İtalya	(47)
Leung ve ark.	2019	6.3 (18/284)	ABD	(48)
Lai ve ark.	2019	10 (14/138)	Tayvan	(49)

Ülkemizde Ulusal Sürveyans Ağı kapsamında toplanan verilerden hazırlanan “Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı (UHESA) Özet Raporu (2016)”na göre kolistin dirençli *A.baumannii* güncel resmi verileri Tablo 2.6’da özetlenmiştir. Bu rapora göre ülkemizde kolistin direnç oranları %2.56 -5.73 olarak görülmektedir.

Tablo 2.6. UHESA 2016 Antimikrobiyal Dirençleri Özet Raporu

<i>A.baumannii</i>	Birim Sayısı	Toplam Etken Sayısı	Dirençli Etken Sayısı	Ağırlıklı Genel Ortalama
Türkiye geneli	388	9934	300	3.02
SB Devlet Hastaneleri	135	1815	62	3.42
SB Eğitim Araştırma Hastaneleri	72	3835	98	2.56
Üniversiteler	51	3412	90	2.64
Özel hastaneler	130	872	50	5.73

Tablo 2.7. Ülkemizde 2016 Yılı ve Sonrasında *A.baumannii* Kolistin Direnci Gösteren Bazı Çalışmalar

Yazar	Yıl	% Kolistin direnci (Dirençli izolat/total)	İl	Kaynak
Beriş ve ark.	2016	0.6 (3/519)	Çok merkezli	(50)
Çetinkol ve ark.	2016	0 (0/50)	Ordu	(51)
Cesur ve ark.	2016	0 (0/70)	Ankara	(52)
Taşçı ve ark.	2016	0 (0/10)	Çorum	(53)
Balin ve ark.	2016	0 (0/15)	Elazığ	(54)
Aydemir ve ark.	2016	0 (0/30)	Sakarya	(55)
Tartar ve ark.	2017	2.9 (9/307)	Elazığ	(56)
Çağlan E.	2017	29 (58/200)	Ankara	(57)
Tombak Ö.	2017	23 (23/100)	Hatay	(58)
Cesur ve ark.	2017	0 (0/80)	Ankara, Antalya ve Van	(59)
Ergül ve ark.	2017	0 (0/10)	Kayseri	(60)
Şirin ve ark.	2017	0 (0/109)	İzmir	(61)
Naldan ve ark.	2017	0 (0/165)	Erzurum	(62)
Özcelik ve ark.	2018	2 (21/922)	Amasya	(63)
Paköz ve ark.	2018	0 (0/100)	Kahramanmaraş	(64)
Şahin ve ark.	2019	2.9 (20/717)	Kahramanmaraş	(65)
Yayla ve ark.	2019	0 (0/113)	İzmit	(66)
Atay ve ark.	2019	10.7 (3/28)	İstanbul	(67)

2.3. *Acinetobacter* Enfeksiyonları

A.baumannii 'nin yaptığı enfeksiyonlar, bakterinin ilk bulaşma yerine ve tuttuğu sisteme göre farklı şekillerde sınıflandırılabilir.

Hastane Kaynaklı Pnomoni

A.baumannii'ye bağlı en sık görülen iki klinik durum nozokomiyal pnomoni ve bakteremidir. Nozokomiyal pnomoni aspirasyona bağlı oluşur. Özellikle endotrakeal tüp kullanımı bakteri için çok elverişli bir ortam sağlar. *Acinetobacter* içeren damlacıkların mekanik ventilatör aracılığıyla hasta tarafından aspirasyonu, bakterinin konak direnç mekanizmalarını geçmesini sağlayarak dokuda enfeksiyon oluşturmaya zemin hazırlar (68). Birçok sağlık kurumunda, izole edilen *A.baumannii* suşlarının çoğu yatan hastaların solunum yollarından soyutlanır. Bu hastalarda gerçek pnomoniye üst hava yolu kolonizasyonundan ayırmak oldukça zordur (69).

Toplum Kaynaklı Pnomoni

A.baumannii nadiren toplum kaynaklı pnomoni ve sepsis yapar. *A.baumannii*'nin etken olarak izole edildiği toplum kaynaklı pnomoniler genellikle tropikal bölgelerde yaşayan alkol bağımlısı kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOA) olan kişilerde görülmektedir (70). Toplumdan kazanılan pnomoninin fulminan bir klinik tabloyla karakterize olduğu; enfeksiyon esnasında sekonder septiseminin ortaya çıkabileceği ve mortalite oranının da %40-60 dolaylarında olduğu bildirilmiştir (71).

Bakteremi

Bakteremi sıklıkla intravasküler veya solunum yolu kataterlerinden kaynaklanır. Cerrahi yaralar, yanıklar ve idrar yolu kaynaklı bakteremi daha azdır, endokardite bağlı bakteremi sıklığı ise çok daha azdır (72). Bakteremi oranları yoğun bakımlarda diğer kliniklere göre daha yüksektir. Bir çalışmada *A.baumannii* sepsisine

bağlı ölüm oranları yoğun bakım ünitelerinde % 34.0-43.4 diğer kliniklerde %16.3 olarak gözlenmiştir (73).

Muharebe Alanında Ortaya Çıkan Travmatik Yaralanmalara Bağlı Gelişen Yara Enfeksiyonları

A.baumannii Irak ve Afganistan'da savaş travmalarına bağlı yaralardan sıklıkla izole edilmiştir. Irak ve Afganistan'ta savaşan askerlerin açık tibia kırıklarından en sık izole edilen mikroorganizma olmuştur. Ancak yapılan başka bir çalışmada ilginç bir şekilde bu vücut bölgesinden izole edilen *A.baumannii* suşlarının patojenitesinin düşük olduğu, tedavi sonrası aynı bölgeden alınan kültürlerde üreme olmadığı ve amputasyona götüreceği bir tablo gelişmediği rapor edilmiştir (74). *A.baumannii* bazen askeri popülasyon dışında da deri-yumuşak doku enfeksiyonlarına sebep olabilir. Ayrıca yanık tedavi ünitelerinde iyi bilinen bir patojendir ve bazı hastalardan eradike etmek çok güç olmaktadır (75).

İdrar Yolu Enfeksiyonu

A.baumannii idrar yolu enfeksiyonunun nadir etkenidir, yapılan bir çalışmaya göre yoğun bakım ünitelerinde kazanılmış idrar yolu enfeksiyonlarının sadece %1.6'sından sorumludur. Üriner sistemde kolonizasyonu, kalıcı sondalı hastalar başta olmak üzere sıklıkla görülmekte ancak nadiren enfeksiyon etkeni olarak kabul edilmektedir. Ayaktan başvuran hastalarda komplike idrar yolu enfeksiyonuna sebep olması beklenen bir durum değildir (76).

Menenjit

Nöroşirurjik operasyonlar sonrası nozokomiyal menenjitler, artarak devam eden bir sorun olmaktadır (38). Tipik hasta profilinöroşirurjik operasyon geçirmiş ve eksternal şanti bulunan kişilerdir (77). Yetişkinlerde bakteriyel menenjit sebebi olan Gram-negatif basillerin yaklaşık %10'u *Acinetobacter spp.*'dir ve tüm nozokomiyal menenjitlerin %4'ünden sorumludur (78).

Diğer Klinik Durumlar

Acinetobacter suşlarına bağlı endokardit vakaları literatürde çok az bildirilmiştir. Bu vakaların çoğu prostetik kalp kapağı bulunan hastalardır (78). Çeşitli çalışmalarda endoftalmit, keratit ve peritonite de sebep olduğu belirtilmiştir (39).

2.4. Tedavi ve Direnç

2.4.1. Güncel Tedavi Seçenekleri

A.baumannii genetik yapısı itibariyle antibiyotiklere hızlı bir şekilde direnç geliştirdiği için, bilimsel literatür onun ne kadar zorlu bir bakteri olduğunu ortaya koymaktadır. Bu sebeple de yıllar içinde kullanılacak antibiyotik seçenekleri daralmıştır (79). Günümüzde tüm antibiyotiklere dirençli *A.baumannii* suşlarının varlığı artık bilinmektedir. Çok zor bilimsel araştırmalar sonucu keşfedilen antibiyotiklere, yanlış kullanım sonucu artık yüksek düzeyde direnç gelişmiştir (80).

1970'lerin başına kadar, *A.baumannii* enfeksiyonları ampisilin, karbenisilin, gentamisin ve nalidiksik asit ile monoterapi veya kombine tedavi edilebilmekteydi. Ancak bu antibiyotiklere karşı 1975 yılından sonra yüksek düzey dirençler bildirilmiştir (81).

Günümüzde ise birçok antibiyotik örneğin; aminopenisilinler, üreidopenisilinler, sefalosporinler, tetrasiklin, kloramfenikol, sefamisinler (sefoksitin) ve çoğu aminoglikozidler *A.baumannii*'ye olan etkisini artık yitirmiş durumdadır (82).

Karbapenemler (imipenem ve meropenem), amikasin ve tobramisin, florokinolonlar (siprofloksasin ve levofloksasin), tigesiklin ve beta-laktamaz inhibitörlü kombinasyonlar (ampisin/sulbaktam) duyarlı tespit edilen *A.baumannii* ile oluşan enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri hızla artmaktadır (83).

Sulbaktam, ticari olarak bulunan üç beta-laktamaz inhibitöründen biridir. Klavulonik asit ve tazobaktam'dan farklı olarak *Acinetobacterspp.* 'ye karşı tek başına bakterisidal etki gösterir. Bu etkisini penisilin bağlayan protein 2'ye bağlanarak yapmaktadır (84).

EUCAST (European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing) ve CLSI (Clinical And Laboratory Standarts Institute) klavuzlarına göre günümüzde *A.baumannii* için duyarlılık çalışılabilecek antibiyotikler Tablo 2.7 'de görülebilir.

Tablo 2.8. *A.baumannii* İçin Duyarlılık Çalışılabilecek Antibiyotikler

EUCAST v.8.1	CLSI M100 S28
Doripenem	Doripenem
İmipenem	İmipenem
Meropenem	Meropenem
Siprofloksasin	Siprofloksasin
Levofloksasin	Levofloksasin
Amikasin	Amikasin
Gentamisin	Gentamisin
Netilmisin	Netilmisin
Tobramisin	Tobramisin
Kolistin	Kolistin
Trimetoprim-sulfametoksazol	Trimetoprim-sulfametoksazol
	Piperasilin*
	Ampisin-sulbaktam*
	Piperasilin-tazobaktam*
	Tikarsilin-klavulonat*
	Seftazidim*
	Sefepim*
	Sefotaksim*
	Seftriakson*
	Doksisiklin*
	Minosiklin*
	Tetrasiklin*
	Gatifloksasin*

(*): Sadece CLSI klavuzunda önerilen antibiyotikler

2.4.2. Direnç Mekanizmaları

Acinetobacterspp. antibiyotiklerin yıkıcı etkisinden kaçmak için çok farklı adaptasyon mekanizmaları bulundurmaktadır. Bunlardan bazıları; enzim bağımlı yıkım (beta-laktamazlar), genetik değişiklikler (mutasyonlar, gen kazanımı veya kaybedimi, gen ekspresyonunun artırılması veya azaltılması) ve effluks pompalarıdır (85).

Antibiyotik direnci için literatürde üç tanımlama yapılmaktadır fakat bazı araştırmacılar farklı tanımlamalar da kullanabilmektedir.

1. Çoklu ilaca dirençli (MDR) terimi üç veya daha fazla antibiyotik grubunda en az birer ilaca dirençli olan suşlar için kullanılır (örneğin; aminoglikozidler, sefalosporinler, florokinolonlar vs.) (86). Tıbbi literatürde de daha çok kabul gören yaklaşım bu tanımlamadır. Diğer bir tanımlamada ise aşağıdaki beş sınıf antibiyotikten en az ikisine dirençli olanlar MDR olarak isimlendirilir (37):

- 1-Antipseudomonal sefalosporinler (seftazidim ve sefepim)
- 2-Aminoglikozidler (gentamisin, tobramisin veya amikasin)
- 3-Antipseudomonal karbapenemler (meropenem ve imipenem)
- 4-Florokinolonlar (siprofloksasin veya levofloksasin)
- 5-Ampisilin-sulbaktam

2. XDR: “Extensive-drug resistance-Aşırı artmış direnç” terimi MDR’ye ek olarak karbapenemlere de dirençli olan suşlar için kullanılır (81). Diğer bir tanımlama ise bir veya iki antibiyotik hariç diğer tüm antibiyotiklere dirençliyse bu terim kullanılır (87).

3. PDR: “Pan-drug resistance-Tüm ilaçlara direnç” terimi ise mevcut tüm antibiyotiklere (polimiksinler ve tigesiklin dahil) direnci tanımlamak için kullanılmaktadır (81).

Direnç Mekanizmaları

Hücre Duvar Değişiklikleri

Beta-laktamlara direncin oluşmasında dış membran proteinleri (OMP), porinler ve penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) modifikasyonu etkin rol alır. Birçok çalışmada OMP ve PBP2'nin azalmış ekspresyonunun karbapenem direncine yol açtığı gösterilmiştir. OMP'lerin yanısıra 43 kDa'luk bir protein olan oprD ve 29 kDa'luk protein olan CarO bu ekspresyon azalması hipotezini destekleyen birçok kez çalışılmış porinlerdir. Muhtemelen porinler ve beta-laktamazlar direnç oluşumunda birlikte etkili olmaktadır (88).

Efluks Pompa Sistemi

Efluks pompaların varlığı birçok antibiyotik sınıfına karşı direnç kazandırır. Günümüzde altı sınıf efluks pompa çeşidi tanımlanmıştır: (1) "ATP Binding Cassette (ABC)"; (2) "Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE)"; (3) "Resistance Nodulation Cell Division (RND)"; (4) "Small Multidrug Resistance (SMR)"; (5) "Major Facilitator Super Family (MFS)" ve yeni tanımlanan (6) "Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux (PACE)" ailesidir (89).

A.baumannii 'de tanımlanan efluks pompaları Tablo 2.8'de görülmektedir (90). RND ailesine ait AdeABC efluks pompasının *A.baumannii* 'nin birçok antibiyotik sınıfına (sefotaksim, kloramfenikol, eritromisin, aminoglikozidler ve florokinolonlara) karşı direnç geliştirmesinde rol aldığı gösterilmiştir. Ayrıca AdeABC'nin fazla eksprese edilmesi karbapenem direncinden de sorumludur (91).

Tablo 2.9. *A.baumannii* 'deki Efluks Pompa Çeşitleri ve Antibiyotikler

Efluks pompası	Çeşidi	Yıktığı ilaç
Tet(A)*	MFS ¹	Tetrasiklin
Tet(B)*	MFS	Tetrasiklin, Minosiklin
Cm1A*	MFS	Kloramfenikol
AdeABC**	RND ²	Aminoglikozidler, beta-laktamlar, kloramfenikol, eritromisin, tetrasiklinler, florokinolonlar
AdeM**	MATE ³	Florokinolonlar, gentamisin, davnorubisin, doxorubisin

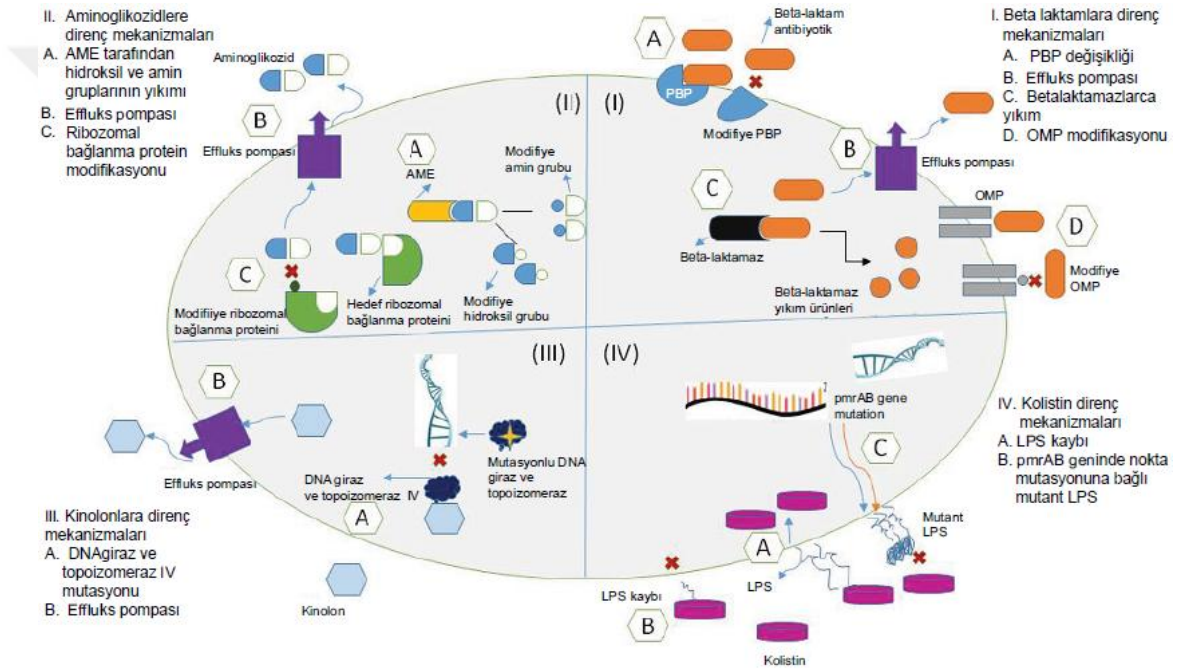
*: İlaça spesifik pompa proteinleri

** : Çoklu ilaç direncinden sorumlu pompa proteinleri

2.4.3. *A.baumannii* 'de Antibiyotik Sınıflarına Direnç

Beta-laktamlara Direnç

Beta-laktamlara direnç; beta-laktamazlarca enzimatik yıkım, penisilin bağlayan proteinlerde değişiklik, OMP'lerin porin değişikliğiyle azalmış geçirgenlik ve efluks pompasıyla hücrenin dışına atım gibi mekanizmalarla gerçekteşir (şekil 2.1) (44, 92).



şekil 2.1. *A.baumannii* 'de Antibiyotik Sınıflarına Direnç Mekanizmaları

Beta-laktamazların içinde, ampC sefalosporinazlar (moleküler sınıf C beta-laktamazlar) *A.baumannii* ile daha çok ilişkilidir (93). Bu enzim grubu *bla* geni tarafından kodlanır, penisilinlere ve genişlemiş spektrumda sefalosporinlere direnci sağlar. *A.baumannii* 'de sık görülen diğer beta-laktamazlar ile şöyle özetlenebilir : Sınıf A beta-laktamazlar grubundan Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (PER-1, Veb-1, CTX-M, TEM, SHV), Sınıf B betalaktamazlar grubundan metallobeta-laktamazlar (BMLs; IMP, SIM, VIM) ve Sınıf D beta-laktamazlardan OXA grubu enzimleri (94).

Kazanılmış Oxa tipi karbapenemazlar, metallobeta-laktamazlardan sonra karbapenem direncinin ana sorumlularındandır (95). OXA23, OXA24 ve OXA58 plazmidleri karbapenemazları yıkan enzimleri kodlayan esas plazmidlerdir (96).

Aminoglikozidlere Direnç

Aminoglikozidlere direncin en sık görülen mekanizması; aminoglikozid modifiye edici enzimlerce amino ve hidroksil grublarının modifikasyonudur. *Acinetobacter baumannii*'de tüm aminoglikozid adenilazlar, asetilazlar, metiltransferazlar ve fosfotransferazlar gibi modifiye edici enzimler tanımlanmıştır. Azalmış ilaç girişi ve hedef ribozomal protein değişiklikleri aminoglikozidlere direncin diğer mekanizmaları arasında yer almaktadır (97) (Şekil 2.1).

Florokinolonlara Direnç

Florokinolonlara karşı direnç *gyrA* ve *parC* genlerinde mutasyona bağlı DNA giraz ve topoizomeras IV enzimlerinde fenotipik değişiklik sonucu azalmış ilaç afinitesine bağlı oluşur (98). Kromozomal DNA tarafından kodlanan ilaç içeri alım ve dışa atım sistemleri OMP ekspresyonunu azaltarak ilaç girişini ve efluks proteinlerinin üretimini artırarak ilacın aktif dışarı atılımını sağlar (99). Plazmidde kodlanan *qnrA*, *qnrB* ve *qnrS* bölgeleri kinolonların DNA giraz ve topoizomeras IV'e bağlanmasını engelleyerek *A.baumannii*'nin DNA'sını korumasını sağlamaktadır (100) (Şekil 2.1).

Tablo 2.10. *A.baumannii* direnç mekanizmaları (101)

Antibiyotik sınıfı ve direnç mekanizması	Enzim
BETALAKTAMLAR	
Betalaktamazlar	TEM,VEB,SHV,IMP,PER,ADCs,CTX-M,OXA
OMPlar	SIM,VIM,CarO (29kDa),22- ve 33-kDa OMPlar,43-kDa OMP,HMP-AB,47-,44- ve 37-kDa OMPlar,33-,34-,35-,36-kDa OMPlar,OmpW,AdeABC
Efluks vePBP değişikliği	
AMINOGLIKOZİDLER	
Aminoglikozid modifiyeedicienzimler	Asetiltransferazlar,nükleotidtransferazlar,fosfotransferazlar
Efluks pompaları	AdeABC, AdeM
KINOLONLAR	
Hedef bağlanma bölgesi değişikliği	GyrA,ParC
Efluks	AdeABC, AdeM
TETRASIKLINLER VE GLISIKLINLER	
Tetrasiklin spesifik efluks	Tet(A),Tet(B),Tet(M)
Çoklu ilaç efluks	AdeABC

2.5. Polimiksinler ve Kolistin

Polimiksinler beş farklı kimyasal formülasyona sahip (polimiksin A-E), 1947 yılında keşfedilen polipeptid antibiyotik grubudur (102). Günümüzde hastane kliniklerinde kullanımda olan polimiksinler; Polimiksin E (kolistin) ve polimiksin B'dir.

Kolistin 1949 yılında keşfedilmiştir. Bir toprak bakterisi olan "*Bacillus polymyxa* subspecies *colistinus* Koyama" bakterisi tarafından doğal olarak sentezlenir (103). Kolistin keşfedildiği ilk yıllarda 1950'ler boyunca Japonya ve Avrupa'da, 1959 yılında ise kolistimetat sodyum formunda ABD'de tedavi amaçlı kullanılmıştır (104). Ülkemizde ise 1962 yılında klinik kullanıma girmiştir. Ancak 1980'lerin başında kolistin ve polimiksin B'nin intravenöz formlarının ciddi nefrotoksisite yaptığı kanıtlanınca dünyanın birçok yerinde olduğu gibi ülkemizde de kullanımından vazgeçilmiş, sadece topikal ve oral formları kullanımda kalmıştır (105, 106). Sonraki

yaklaşık yirmi yıl boyunca kolistinin intravenöz kullanımı sadece kistik fibrozisli hastalarda çoklu ilaca dirençli Gram-negatif bakterilerin sebep olduğu akciğer enfeksiyonlarıyla kısıtlı kalmıştır (107). Birçok antibiyotik sınıfına karşı dirençli bakteriler ortaya çıkınca ve Gram-negatif bakterilere karşı yeni ilaçların az oluşu, polimiksinleri tekrar gündeme getirmiş ve son çare olarak kullanmak durumunda kalmıştır (108).

Kolistin ve polimiksin B moleküler yapı olarak birbirine çok benzer olmalarına rağmen 15377 Gram-negatif bakteriyle yapılan bir çalışmada MİK değerleri arasında anlamlı farklar bulunmuştur. Sensititre™ sistemi ile yapılan bu çalışmada *Klebsiella spp* izolatları için %55, *E.coli* izolatları için %53 oranında polimiksin B MİK değerleri kolistininkinden iki kat yüksek bulunmuştur. Aynı çalışmada *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* için ise iki antibiyotik MİK değerleri arasında yüksek uyum görülmüştür (109).

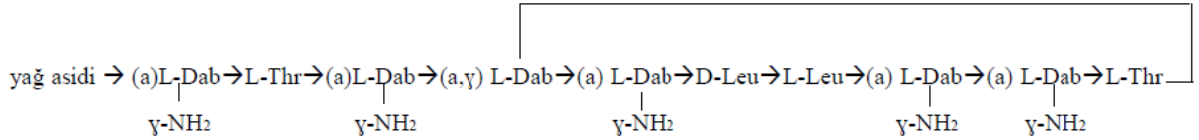
2.5.1. Kolistin Kimyasal Yapısı

Kolistin bir yağ asidine α -amid bağıyla bağlı katyonik siklik dekapeptitleri içeren bir moleküldür (110). Kolistin ve kolistimetat sodyumun kimyasal yapısı Şekil 2.2 görülmektedir. Kolistinin moleküler ağırlığı 1750 Da'dır. Kolistin molekülünün içerdiği aminoasitler; L-treonin, D-lösin ve L- α - γ -diaminobütirikasittir. Yağ asidinin türüne göre 6-methyl-octanoic acid (Kolistin A) veya 6-methyl-eptanoic acid (Kolistin B) olarak isimlendirilir. Farklı farmasötik müstahzarlar bu iki kolistin formunu farklı oranlarda barındırabilir (Kolistin A ve B) (111).

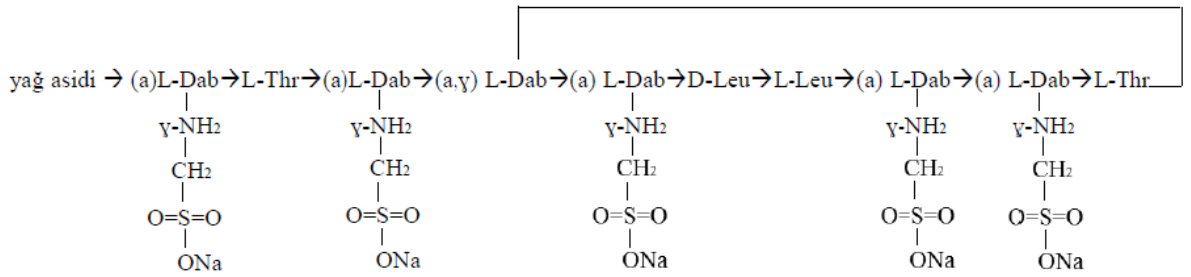
Kolistinin iki ticari formu bulunmaktadır, kolistin sülfat ve kolistimetat sodyum (diğer isimleri pentasodium colistimethanesulfate, colistin methanesulfate ve colistin sulfonil methate). Kolistimetat sodyum, kolistin sülfata göre daha az potent ve daha az toksiktir. Kolistinin formaldehit ve sodyum bisulfit ile reaksiyonu sonucu üretilir (112). Kimyasal yapısı Şekil 2.2'de görülmektedir. Yağ asidi molekülü kolistin için 6-metiloktanoik asit, kolistimetat sodyum için 6-metilheptanoik asittir. α ve γ peptit bağında yer alan ilgili -NH₂'yi göstermektedir. Kolistin sülfat oral olarak mesane dekontaminasyonu için, topikal olarak bakteriyel deri enfeksiyonları için kullanılır.

Kolistimetat sodyum'un parenteral formları mevcuttur ve intravenöz, intramuskuler veya nebulizasyon yoluyla verilebilir (108).

Kolistin



Kolistimetat sodyum



Şekil 2.2. Kolistin ve Kolistimetat Sodyumun Kimyasal Yapısı. Dab, diaminobütirik asit; Leu, lösin; Thr, treonin

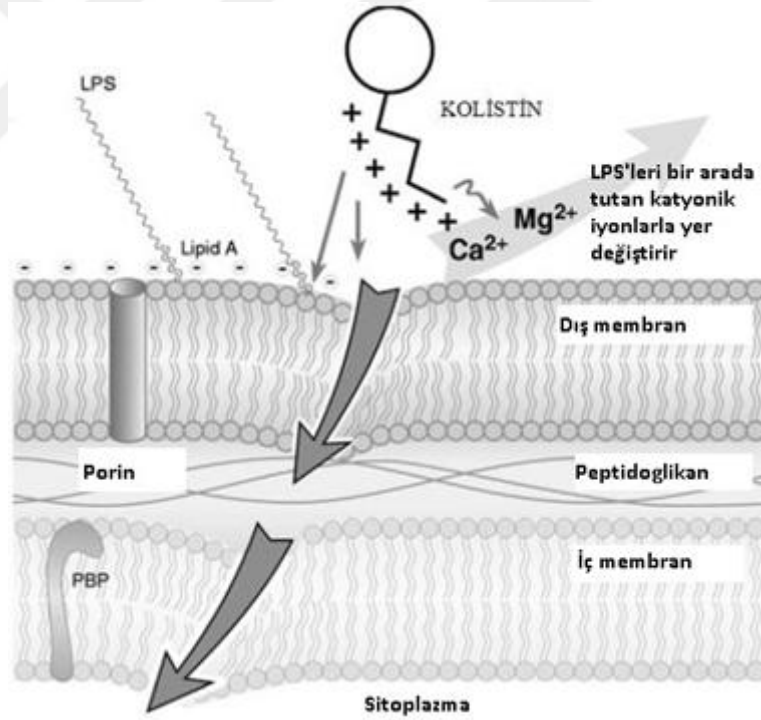
Farmakokinetik/Farmakodinamik özellikleri

Kolistin sülfat ve kolistimetat sodyum oral alımda gastrointestinal sistemden emilmezler. Sıvı ortamlarda kolistimetat sodyum sulfometil gruplarına ve kolistine hidrolize olur (113). Kolistimetat sodyum aktif formu kolistine dönüşür ve kolistin plazma proteinlerine %50 oranında bağlanır (114). Kolistin molekül ağırlığının büyük olması ve polaritesinin yüksekliğinden dolayı iyi bir doku dağılımı göstermez. Markantonis ve ark. (115) yaptığı çalışmada kolistinin sağlıklı bireylerde beyin omurilik sıvısına geçiş oranını %5 bulmuş iken, inflamasyonlu bireylerde bu oranın %25'e kadar çıktığını rapor etmişlerdir. Kolistimetat sodyum ve kolistinin her ikisinin de bakterisidal aktiviteleri doz bağımlıdır (116). Kolistimetat sodyum'un %60'ı glomeruler filtrasyonla ıtrah edilir, %40'ı kolistine dönüşür. Kolistin böbrek

tübüllerinden geri emilir ve ekstra renal yollarla ıtrah edilir. Ancak ekstra renal ıtrahın mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (116).

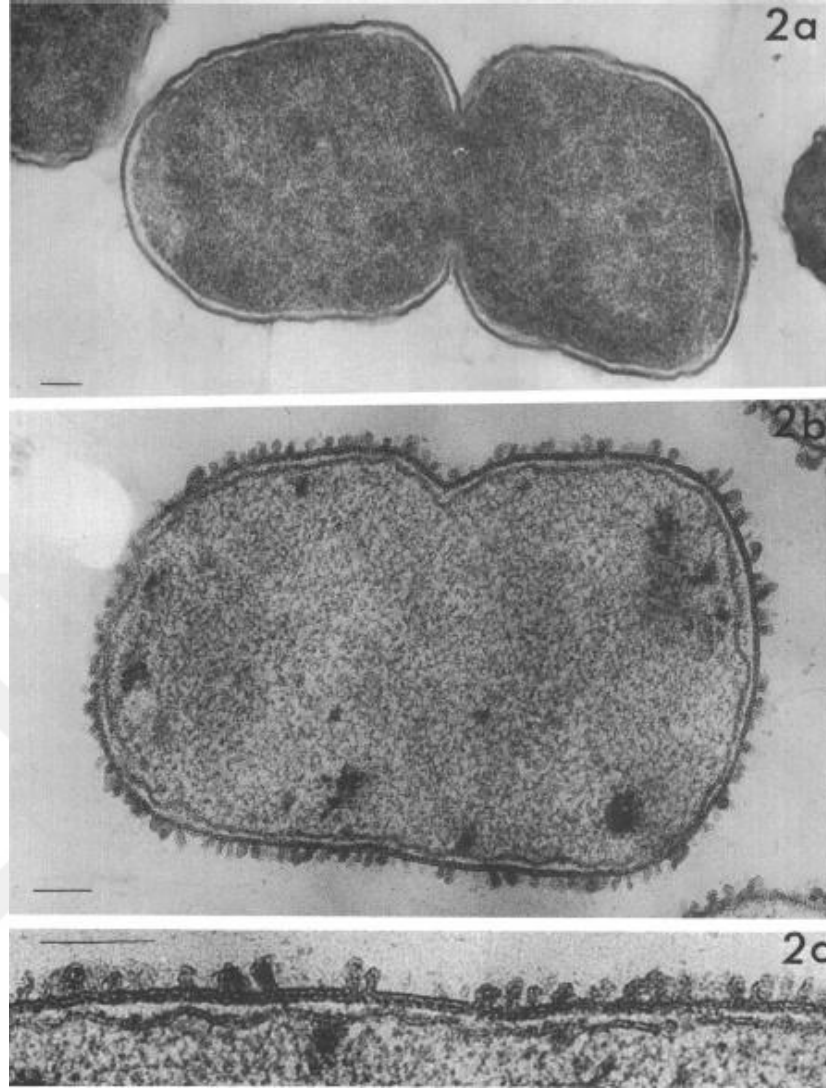
2.5.2. Etki Mekanizması

Kolistinin antimikrobiyal aktivitesinin hedef bölgesi hücre membranıdır. Kolistin bakteri membranına ilk bağlandığında, anyonik LPS molekülleri ile katyonik bir polipeptit olan kolistin arasında elektrostatik bir etkileşim gerçekleşir ve bu da hücre membranında bir elektriksel dengesizlikle (imbalsans) sonuçlanır. Kolistin, LPS'leri stabil halde tutan katyonlar Magnezyum (Mg^{+2}) ve Kalsiyum (Ca^{+2}) ile yer değiştirerek dış membranın lokal hasarına sebebiyet verir. Hasar sonucu membran geçirgenliği bozularak sitoplazmanın dışa kaçıışı ve ardından bakterinin ölümü gerçekleşir (117, 118) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Kolistinin Antimikrobiyal Etki Mekanizması

Aşağıdaki Şekil 2.4'te görüleceği üzere, polimiksin B'ye maruz bırakılan *E.coli*'nin membranı hasarlanmış, dış membran fibröz formda uzantılar şeklinde dışarıya uzanmış, sitoplazmik materyal çatlaklardan dışarıya salınmıştır (119).



Şekil 2.4. *E.coli*'ye Polimiksin B Etkisi (2a) İşlem yapılmamış bakteri x63.000, (2b) 25 µg ile 30 dk muamele edilmiş bakteri. Hücre duvarında kabarcık benzeri yapılar görülmekte X95.000, (2c) Bir önceki resmin büyütülmüş hali x190.000. Bu kabarcık benzeri yapılar dış membranın hasarlanmış parçalarından oluşur (119)

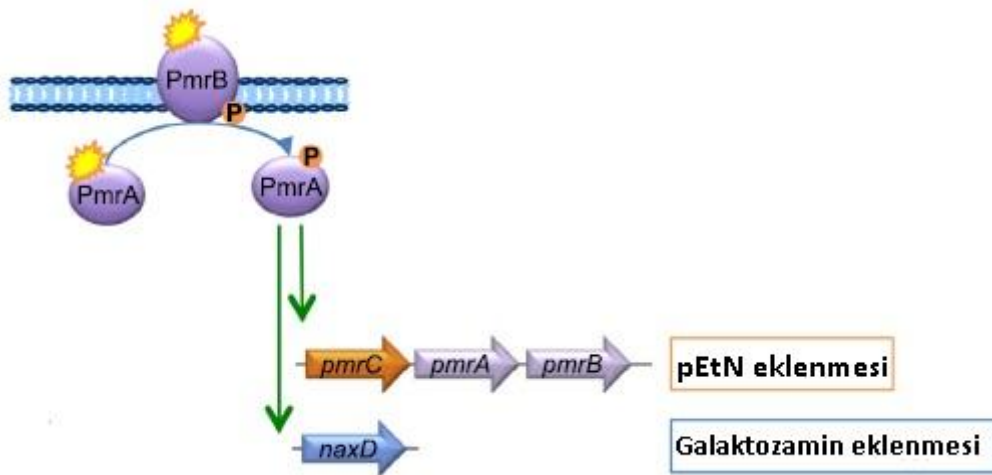
Kolistinin doğrudan antibakteriyel aktivitesinin yanında, anti endotoksin aktivite potansiyeli de bulunmaktadır. Bilindiği üzere endotoksin aktivitesinden sorumlu olan bölge Gram-negatif bakteri hücre dış membranında bulunan LPS molekülünün lipid A kısmıdır. Kolistin lipid A'ya bağlanır ve LPS'yi nötralize eder. Ancak bu mekanizmanın in vivo önemi henüz net değildir. Yani sitokinlerin salınımına engel olarak şoku önleyebildiği kesin değildir. Çünkü endotoksin plazmada hızlıca LPS-bağlayan proteine bağlanmaktadır ve bu kompleks hemen hücre yüzeyindeki CD14'e tutunmaktadır ve bu suretle sitokin salınımı başlamaktadır (120).

2.5.3. Kolistine Direnç Mekanizmaları

Kolistine direnç *A.baumannii*'nin kromozomal DNA'sı tarafından kodlanır. *A.baumannii*'de kolistine yönelik iki etkin direnç mekanizması vardır. Birincisi lipid A'yı kodlayan genlerde (*lpxA*, *lpxC* ve *lpxD*) mutasyona bağlı kolistinin ilk hedefi olan LPS kaybıdır (121). İn vitro çalışmalarda MİK değeri çok yüksek (≥ 128 $\mu\text{g/mL}$) olan suşların bu mekanizma ile direnç geliştirdiği gözlenmiştir (122).

İkinci mekanizma ise PmrAB ikili sistemidir (Polymyxin-resistant AB two-component system). Bu sistemde *PmrA* ve/veya *pmrB* genlerindeki mutasyona bağlı LPS modifikasyonu gerçekleşir. Bu modifikasyon sayesinde LPS'ye katyonik grup eklenmiş olur ve kolistinin yaptığı katyon değişimine direnç gelişir. Mutasyonlar PmrAB regülör sistemini aktive eder, bu sistem de kendi operonu olan *pmrCAB*'nin ekspresyonunu artırır. *pmrC* geni EptA - benzeri fosfoetanolamin transferazı kodlar, bu enzim Şekil 2.5'te de görüldüğü gibi lipid A'nın 1'- veya 4'-fosfat grubuna pEtN (fosfoetanolamin) eklenmesini katalize eder (123, 124).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda *naxD* geni tarafından kodlanan PmrB'ye bağımlı asetilazın, N-asetilgalaktozamin'i galaktozamine dönüştürüp lipid A'ya ekleyerek lipid A'da modifikasyon oluşturduğu ve polimiksin direncine katkıda bulunduğu gözlenmiştir (125).



Şekil 2.5. *A.baumannii* Pmrab İkili Sistemi

***A.baumannii*'de kolistine karşı heterodirenç gelişimi**

Heterodirenç; görünüşte izogenik bakterilerin belirli bir antibiyotiğe karşı farklı direnç profilleri gösteren subpopulasyonları olması olarak tanımlanan bir fenomendir. Antibiyotik tedavisi esnasında bu dirençli subpopulasyonlar seçilebileceğinden ciddi klinik sonuçlar doğurabileceği düşünülmektedir. Ancak heterodirenci belirlemek rutinde uygulanan yöntemlerle mümkün değildir. Bu direncin saptanması amacıyla “Populasyon analiz profili”, Polimeraz Zincir Reaksiyonu gibi özel tekniklerin kullanılmasına gerek vardır (11). Bu yöntemlerin maliyetli ve zahmetli olması bu fenomenin klinik büyüklüğünün anlaşılmasına engel teşkil etmektedir (126). Heterodirençte rol oynayan mekanizmanın son yıllarda yapılan çalışmalarda efluks sistemi (127) veya *pmrA*,*pmrB* gen mutasyonları olduğu düşünülmektedir (128).

***Mcr-1* Plazmid Aracılı Direnç**

Mcr-1 ilk defa 2015 yılında Çin’de yapılan bir çalışmada gıda hayvanlarında plazmid aracılı taşınan bir kolistin direnç geni olarak tanımlanmıştır (129). Daha sonra yapılan çalışmalarda insan izolatlarında da bu gen saptanmıştır. Ancak sadece *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* ve *Shigella*’nın bazı türlerinin bu geni taşıdıkları tespit edilmiştir. Ayrıca *mcr-1* geni Çin, Birleşik Krallık, Tayland, Vietnam, Danimarka, İsviçre ve İsveç’te görülmüştür (130). Ülkemizde ise şimdye dek *mcr-1* geni bildirim yapılmamıştır.

Acinetobacter spp. izolatlarında henüz bu gen gösterilmemiştir. Fakat *mcr-1* plazmid aracılığı ile aktarıldığından bu genin *Acinetobacter* suşlarında da gösterilmesinin kaçınılmaz olacağı düşünülmektedir (131).

2.6. Kolistin Direncini Saptamada Kullanılan Duyarlılık Metodları

Onlarca yıldır klinikte kullanılmasına rağmen polimiksinler için optimal bir duyarlılık metodu tanımlanamamıştır. Ancak son yıllarda MDR Gram-negatif

bakterilerin ortaya çıkması ve bunu müteakiben artan kolistin kullanımının klinik laboratuvarlarda acil bir ihtiyaç doğurması bilim insanlarını izolatların polimiksinlere duyarlılığını tespit etmede hızlı ve güvenilir yöntemler geliştirmeye itmiştir. Kolistin dirençli Gram-negatif bakterilerin neden olduğu insan enfeksiyonlarında mortalite daha yüksek olduğundan, polimiksin duyarlılık testinin uygun şekilde saptanması günümüzde büyük bir önem arz etmektedir (132).

Polimiksinlere duyarlılık testlerindeki zorluklar çeşitlidir. Polimiksinlerin agar içinde yetersiz difüzyonu, doğal katyonik özellikleri ve birçok bakteri türünde heterodirencin bulunabilmesi bu zorluklardandır (133, 134).

2.6.1. Dilüsyon Metodları

Dilüsyon metodlarının amacı MİK'i belirlemektir. MİK 35 ± 2 °C'de 16-24 saatlik inkubasyonu takiben değerlendirilir. Üç farklı dilüsyon yöntemi vardır. Bunlar; "broth mikrodilüsyon", "broth makrodilüsyon" ve "agar dilüsyon" yöntemleridir. Bunlar hakkında kısa bilgiler vermemiz gerekirse ;

1-Broth mikrodilüsyon metodu (BMD): BMD mikroplaklarda uygulanan; sıvı besiyerinin küçük hacimlerinin (0.05-0.1 ml) kullanıldığı bir yöntemdir. BMD kolistin duyarlılığının saptanmasında kullanılan referans test yöntemidir. Günümüzde polimiksin duyarlılığı için CLSI ve EUCAST tarafından önerilen tek yöntemdir (135, 136).

CLSI ve EUCAST polimiksin sınır değerleri çalışma grubu tarafından 22 Mart 2016'da yayınlanan ortak bildiri *Acinetobacter spp.* için referans test uygulanırken ISO-standard broth microdilution method (20776-1) nolu kalite standardının baz alınacağı belirtilmiştir (137).

Ortak çalışma grubu tarafından yapılan bildiriye ayrıca aşağıdaki notlar da bulunmaktadır (137):

a-Test süresince hiçbir ek madde kullanılmamalıdır (özellikle polisorbat-80 ve diğer surfaktanlar)

b-Test düz polistren kuyucuklarda yapılmalı ve mikroplak daha önce kullanılmamış olmalıdır.

c-Polimiksinlerin sulfat tozları kullanılmalıdır (kolistin metanosulfat kullanılmamalı çünkü ön ilaç olup çok yavaş çözünmektedir)

d-Agar dilüsyon, disk difüzyon ve gradiyent difüzyon yeni çalışma verileri gelene kadar önerilmemektedir. Sadece broth mikrodilüsyonla çalışılması gerekmektedir.

Ancak BMD yöntemi oldukça zahmetlidir ve antibiyotiğin elle hazırlanması ciddi hatalara sebebiyet verebilmektedir. Birçok klinik laboratuvar için rutine adaptasyonu zor olmaktadır. Ek olarak atlayan kuyucukların varlığı sebebiyle tekrarlanabilirliğinde ve MİK yorumlanmasında sorunlarla karşılaşmaktadır. Atlayan kuyucuk fenomeni ilk kuyucuklarda inhibisyon varken yüksek konsantrasyonlarda üreme gözlenmesi şeklinde olmakta, özellikle *Enterobacter* türleri, *Pseudomonas aeruginosa* ve *A.baumannii*'de rastlanılmaktadır (133). Bu fenomenin *Acinetobacter* ve *Enterobacter* türlerinde heterodirençli subpopülasyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir (133, 138). *P.aeruginosa*'da atlayan kuyucuk fenomenine sebep veren durum *pmrAB*, *arnB* ve *phoQ* genlerinde artan ekspresyona bağlı LPS yapısındaki değişikliklerden dolayı polimiksinlerin bağlanma bölgelerinin azalmasıdır (139).

Tüm bunlara rağmen yine de BMD tekrarlanabilirliği, güvenilirliği ve otomasyona uygulanabilirliğinden dolayı MİK belirlemede halen referans metod kalmaya devam etmektedir.

2-Broth makrodilüsyon metodu: Besiyeri, bakterinin inokulum miktarı, polimiksinlerin iki kat sulandırımı, inkubasyon koşulları ve yorumlama BMD ile aynıdır. Aradaki farklılık testin tüplerde daha fazla hacimde gerçekleşmesidir. BMD ile karşılaştırıldığında diğer yöntemlere göre en yüksek uyumu göstermiştir (%83) ve yanlış duyarlı hiç sonuç vermemiştir (134).

3-Agar dilüsyon metodu: Agar dilüsyonda polimiksin moleküllerinin iki kat artan konsantrasyonları Mueller-Hinton agar eriyik haldeyken katılarak hazırlanır ve katılması beklenir. Daha sonra yaklaşık 0.5 McFarland bakteri inokulumu hazırlanır ve 10 kat sulandırılır. Bu sulandırmadan agarlara ekimler yapılarak test gerçekleştirilir (135).

Agar dilüsyonda teorik olarak kolistinin molekül büyüklüğünden dolayı eşit şekilde yayılamayacağı düşünülür. Ancak birçok çalışma BMD ile agar dilüsyon arasında güçlü bir uyum olduğunu göstermektedir (138, 140). Bu yöntemin avantajı aynı plakta birçok suşun birlikte çalışılabilmesidir. Hazırlanmasının zahmetli oluşu ve dökülen plakların bir hafta içinde kullanılması gerekmesi ise dezavantajlarındandır. Birçok çalışma agar dilüsyon metodunun da standart olabileceğini göstermesine rağmen daha önce belirtildiği gibi CLSI ve EUCAST polimiksin çalışma grubu sadece BMD'yi referans kabul etmektedir. Dolayısıyla BMD halen birincil referans yöntem olarak kalmaktadır (141).

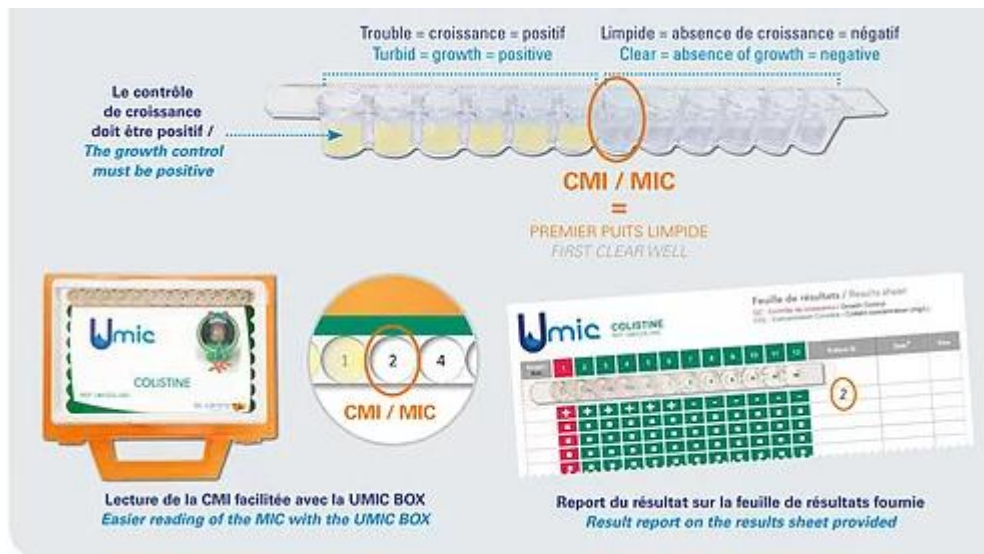
2.6.2. Otomatize Olmayan Sistemler

1- Disk difüzyon yöntemi (Kirby-Bauer): Bu yöntemde önceden antibiyotik emdirilmiş diskler, 0.5 McFarland standardında bakterinin Mueller-Hinton agar yüzeyine ekilmesinden sonra besiyeri üzerine yerleştirilir ve polimiksinlerin agara difüze olması sağlanır. $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 16-24 saatlik inkubasyonu takiben zon çapları değerlendirilir. Disk difüzyon yöntemi özel ekipman gerektirmez, ucuz ve kolaydır. Ancak polimiksinlerin agara difüzyonu zayıf ve yavaş olduğundan küçük inhibisyon çapları oluşur ve bu da testin doğruluğuna gölge düşürür. Birçok çalışmada kolistinin duyarlılığı için kullanılmasının uygun olmadığı gösterilmiş olup yaklaşık %35 oranında yanlış sonuçlara sebebiyet vermektedir (142, 143). Bu metod artık terkedilmiştir ve EUCAST ve CLSI kolistin diski için zon referans aralığı yayınlamamaktadır (135, 136).

2- E-test yöntemi: Antibiyotiğin artan konsantrasyonları emdirilmiş plastik şeritlerin kullanıldığı bir yöntemdir. Mueller-Hinton agara 0.5 McFarland standardında bakteri inokulumundan sürülür ve şerit yerleştirilir. $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 16-24

saatlik inkubasyonu takiben oluşan elipsoid açıklığın alt tarafta en dar kısmından okuma yapılır. Yüksek sayıda dirençli izolatın da bulunduğu farklı bakteri türleriyle yapılan çalışmalarda E-test yöntemi %32 oranında yanlış sonuç vermiştir (133, 142, 144). E-test yöntemi, dilüsyon ile yüksek MİK tespit edilen izolatları yakalayamamaktadır (134). Ayrıca E-test MİK değerleriyle, dilüsyon MİK değerleri arasında uyumsuzluklar vardır (134, 145). Bu metodun uygulaması kolaydır, görece olarak biraz daha pahalıdır ve bu yöntem de disk difüzyon gibi CLSI ve EUCAST polimiksin çalışma grubu tarafından artık önerilmemektedir (137).

3- UMIC™ sistemi (Biocentric®,Fransa): UMIC™ sisteminde toz halinde kolistin 0.06µg/mL'den başlayarak 64 µg/mL'ye kadar 11 tane kuyucuğa liyofilize halde önceden konulmuştur (Şekil 2.6). Bakteri kolonilerinden 0.5 McFarland yoğunluğunda hazırlanır ve Mueller-Hinton broth'a 1/200 dilüsyona uğrayacak şekilde dilüe edilir. Sonra bu buyyon 12 kuyucuğa da 100µL pipetlenir ve 18-24 saat 35±1°C'de inkube edilir. İlk kuyucuk pozitif kontroldür. Bu kuyucuğa antibiyotik konulmamıştır. İkinci kuyucuğa 0.06 µg/mL, son kuyucuğa ise 64 µg/mL kolistin konulmuştur. Bulanıklığın gözlenmediği ilk kuyucuk MİK değerini vermektedir (146). Matuschek ve ark. (2) yaptığı ve EUCAST resmi web sitesinde de yayınlanan çalışmada 22 *Acinetobacter spp.* izolatında iki tane dirençli suş duyarlı bulunarak çok büyük hata olarak değerlendirilmiş, EU %77 ve KU %91 bulunmuştur.



Şekil 2.6. UMIC™ sistemi

2.6.3. Otomatize Sistemler

1- Vitek 2™ (Biomerieux®, Fransa): Vitek 2™ sistemi, içinde besiyeri ve antibiyotiğin farklı miktarları bulunan plastik kartları kullanır. Kolistin konsantrasyonunu 0,5-16 µg/mL aralığında değerlendirir. Cihaz 4 ila 10 saat inkubasyon sonunda turbidimetrik okuma yapar (147). Dilüsyon metodlarıyla karşılaştırıldığında Vitek 2™ sistemi kolistin dirençli izolatları yakalamada düşük duyarlılık sergilemektedir. Heterorezistan subpopulasyonlar için de uygun değildir (148). Lai ve ark. (49) yaptığı çalışmada Vitek 2™ 138 adet *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii kompleks* suşunun hepsine duyarlı sonuç vermiş, ancak yapılan BMD ile on suş kolistin dirençli bulunmuştur.

2- Phoenix™ (BD®-Becton Dickinson, ABD): Phoenix™ sisteminde 85 adet kuyucuk bulunmaktadır. Bu kuyucuklarda kuru toz halinde antibiyotikler ve bir tane de üreme kontrol kuyucuğu vardır. Test sıvı bazlı mikrodilüsyon prensibiyle çalışmaktadır. Sistemde redoks potansiyeline sahip bir indikatör bulunmaktadır ve üreme bununla kontrol edilmektedir.

3- DxM MicroscanWalkaway™ (Beckman Coulter Diagnostics®, ABD): DxM MicroScan Walkaway sistemi mikrodilüsyonun yarı otomatize edilmiş halidir. Kuyucuklarda kolistinin 2 ve 4µg/mL konsantrasyonları bulunmaktadır. Bakteri inokulumu hazırlanıp 96 kuyucuklu mikropklara aktarılır ve ardından cihaza inkubasyon ve okuma için yerleştirilir. Yapılan bir çalışmada dilüsyon metodlarıyla karşılaştırıldığında *Acinetobacter* suşlarında KU %87 olarak bulunmuştur (149).

4- Sensititre™ (Thermo Fischer Scientific®, ABD): Sensititre™ sistemi kullanıcının seçimine göre otomatize veya manuel olarak kullanılabilir. Sistemde mikropkların kuyucuklarında liyofilize halde kolistinin daha önce dilüe edilmiş konsantrasyonları (0.125-128 µg/mL) bulunmaktadır. Bakteri inokulumu 0.5 McFarland'a ayarlanıp 10 µl alınarak Katyon ayarlı Mueller-Hinton broth (KAMHB)'a (11 ml) aktarılır. Daha sonra bu brothtan 50 µl tüm kuyucuklara dağıtılır.

20-24 saat inkubasyonu takiben değerlendirilir. Otomatize sistemde değerlendirme floresans metoduyla yapılırken manuel sistemde gözle yapılır.

5- MICRONAUT-S™ ve MICRONAUT MIC-Strip™ (Merlin Diagnostika GmbH®, Bornheim, Germany): MICRONAUT™ sistemi Sensititre™'ye benzer şekilde ticari bir sıvı mikrodilüsyon yöntemidir. Liyofilize halde önceden hazırlanmış antibiyotiklerin üzerine KAMHB'den rehidrasyon yapılarak inkubasyon yapılır ve değerlendirilir. MICRONAUT-S™ 96 kuyucuklu mikroplaklarda yapılırken, MICRONAUT MIC-Strip™ 12 kuyucuklu tek bir stripte çalışır. Bu stripte ilk kuyucuk pozitif kontrol, sonraki kuyucuklar kolistin artan oranda dozlarından (0,0625-64 µg/mL) oluşur.

6- ComASPT™ Colistin (Liofilchem®, İtalya): Önceki ismi SensiTest™ olan bu testte yedi kuyucukta iki kat artan kolistin konsantrasyonları (0,25-16 µg/mL) liyofilize halde bulunmaktadır. İlk kuyucuk pozitif kontroldür. Bir stripte dört hasta çalışılabilmektedir. Sensititre™ ve MICRONAUT™ sistemine benzemektedir.

2.6.4. Hızlı Yöntemler

1- Micromax assay™ (Halotech DNA SL®, Madrid, Spain): Bu yöntem kolistine maruz bırakılan *A.baumannii* bakterilerinin hücre duvar hasarı sonucunda ortama salınan nükleotidleri tespit etmeye dayanmaktadır. 0.5 µg/mL kolistin ile inkubasyonu takiben eğer bakterilerin %11 ve daha azının hücre duvarı hasarlanmışsa kolistin dirençli kabul edilmiştir. Bu yöntem rutindeki otomatize mikrodilüsyon yöntemlerinden daha hızlı sonuç vermektedir (3 saat 30 dakikaya karşı 6-8 saat). Ek olarak *A.baumannii*'de kolistin direncini tespit etmede daha iyi sonuçlar alınmaktadır (%100 duyarlılık, %96 özgüllük). Diğer bir avantajı ise otomatize sisteme uyarlanabilme potansiyeli bulunmasıdır. Ancak kullanılan malzemelerin (florokrom boyası, epifloresans mikroskobu vs.) pahalı olması rutine uygulanmasını zorlaştırmaktadır (150).

2- Rapid Polymyxin NP™ test (ELITech Group®, Fransa): Bu testte kolistin içeren kuyucuklarda üreyen bakterilerin glukoz metabolizması ürünleri tespit edilerek

indirekt olarak yorumlanır. Kuyucuklarda 2 ve 4 µg/mL kolistin bulunmaktadır. Üreme olduğu zaman glukoz metabolizması sonucu asit ürün oluşur, ortamın pH'sı değişir ve fenol red indikatörü renk değiştirir. Testin süresi iki saatten kısadır ve uygulanışı kolaydır. İnsan, hayvan ve çevreden toplanan farklı 200 enterik bakteriyle yapılan karşılaştırma çalışmasında test BMD ile kıyaslanmış, %99.3 duyarlılık, %95.4 özgüllük göstermiştir (151).

3- MALDIxin test: *A.baumannii* 'nin kolistin direncine neden olan Lipid A'sını MALDI-TOF tabanlı kütle spektrofotometre yöntemiyle tespit etmeye çalışan bir yöntemdir. 15 dakikadan az bir sürede kolistin direnci saptanabilmektedir. Ancak bu yöntemde cihazın negatif iyon modunda çalıştırılması gerekmektedir, bu mod ise kullanımda olan cihazlarda kapalı olarak bulunmaktadır. Araştırmacılar; yöntem optimize edilirse tüm gram negatif bakterilere uygulanabileceğini savunmaktadır (152).

4- The Rapid ResaPolymyxin Acinetobacter/Pseudomonas NP test: Bu test, kolistin içeren bir besiyerinde bakterinin üremesi durumunda rezasurin indikatörünün renk değiştirmesi prensibine dayanmaktadır. Lescat ve ark. (153) 92 adet kolistin duyarlı ve dirençli *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* kullanarak bu yöntemi BMD ile karşılaştırmış; duyarlılık %100, özgüllük %95 bulmuşlardır. Uygulamasının kolay oluşu dört saat içinde sonuç alınması yöntemin avantajlarıdır. Yazarlar kolistin dirençli nonfermenter bakterilerin endemik olduğu ülkelerde bu yöntemin kullanışlı olacağını belirtmektedirler.

2.6.5. Seçici besiyeri

1- SuperPolymyxin™ besiyeri (ELITech Group®,Fransa): SuperPolymyxin™ besiyeri 3,5 µg/mL kolistin içerir. İçinde daptomisin ve amfoterisin B de bulunmaktadır. Böylece gram pozitif bakteriler ve mantarların üremesinin engellenmesi amaçlanmıştır. Besiyeri temelde EMB agara benzemektedir ve onun bir modifikasyonudur. Gram-negatifler için seçicidir ve laktoz fermente edenler siyah, etmeyenler renksiz koloniler oluşturur. Besiyerini tasarlayan araştırmacılar yaptıkları karşılaştırmalı çalışmada duyarlılık ve özgüllüğü %100 bulmuşlardır (154). Ancak

fekal örneklerde kolistin dirençli Gram-negatif bakterileri tarama amaçlı bu besiyerinin kullanıldığı yeni bir çalışmada besiyerinde kolistin duyarlı izolatların da yüksek oranda ürediği görülmüş ve iş yükünü çok artırdığı için eleştirilmiştir. Yazarlar bu durumun inokulum miktarına bağlı olabileceğini düşünmektedir (155).

2- COL-APSE™ (CHROMagar®, Fransa): Kolistin dirençli *Pseudomonas spp.*, *Stenotrophomonas spp.* ve *Enterobacteriaceae spp.* için tasarlanmış kromojenik bir besiyeridir. SuperPolymyxin™ besiyerine alternatif olarak tasarlanan bu besiyerinde de daptomisin, amfoterisin B ve ek olarak oxazolidonon bulunmaktadır. SuperPolymyxin™ besiyeri ile karşılaştırıldığında sonuçların benzer olduğu, ancak kolistin dirençli nonfermenter bakterilerin (*Pseudomonas spp.*, *Stenotrophomonas spp.* gibi) daha iyi ürediği gözlenmiştir. Ayrıca COL-APSE™ *mcr-1* pozitif izolatlarda daha duyarlı bulunmuştur (156).

2.7. MİK Sonucunu Etkileyen Parametreler

Besiyeri etkisi : Polimiksin direncine sebep olan esas mekanizma PmrAB ikili sistemidir. Bu sistem ortamdaki katyonlarla direkt olarak ilişkili olup, LPS modifikasyonunda görev alır (123). Dolayısıyla Mueller-Hinton besiyeri içeriklerindeki katyon konsantrasyonları çok farklı olduğu için, test uygulanırken EUCAST ve CLSI, KAMHB besiyeri kullanılmasını önermiştir (135, 136).

Antibiyotik etkisi : MİK belirlenirken ticari olarak temin edilebilen polimiksin B ve kolistin sulfat tozları kullanılır. Kolistin metasulfat, bir ön ilaç olduğu için duyarlılık testlerinde kullanılmaz. Kullanılırsa yanlış yüksek MİK değerleri bulunur (157).

Polysorbate-80 (P-80)'in etkisi: Bir diğer adı da “Tween 80” olan P-80; kullanılmış BMD panellerinin yeniden teste hazırlanması için kullanılan bir surfaktandır. Bu surfaktan lipoglikopeptidlerin plastik kuyucuk duvarlarına yapışmasını engellemektedir. P-80'inin %0.002 konsantrasyonları kolistin polistren kuyucuk duvarlarına adsorbsiyonunu önler. Ancak %0.002 son konsantrasyonda kuyucuğa eklenmesi Sader ve ark. (158) yaptığı çalışmada, P-80 eklenmeyen

kuyucuklara göre 4 -8 kat arası MİK düşüklüğüne neden olduğu tespit edilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada ise P-80'nin *Enterobacteriaceae* üyeleri için üç kat ve *P.Aeruginosa* için iki kat MİK değerlerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (159).

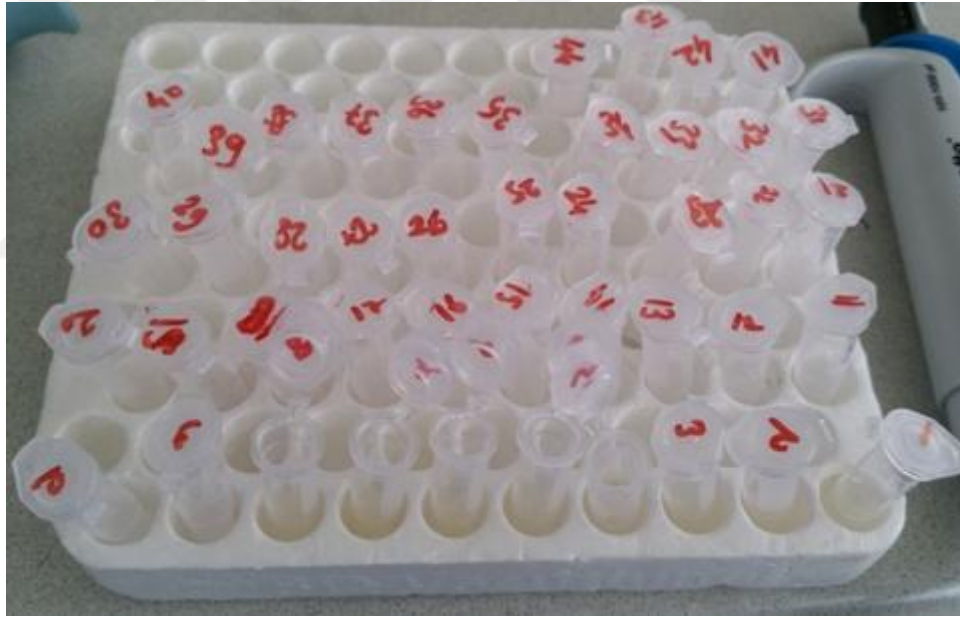
Ayrıca P-80 polimiksinlerle sinerjistik etkileşime girip düşük MİK değerleri alınmasına sebebiyet verebilir. Polimiksinler dış membranı destabilize ederek P-80'nin iç membrana ulaşım hücreyi parçalamasını sağlar. Bu sinerjistik mekanizmadan kolistin dirençli izolatlar etkilenmez fakat kolistin duyarlı izolatları etkiler ve çok düşük MİK değerleri alınmasına neden olur (160). Dolayısıyla CLSI ve EUCAST polimiksin sınır değerlerini araştıran çalışma grubu (CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group) tarafından 22 Mart 2016'da yayınlanan ortak bildiride artık P-80'nin kullanılmaması gerektiğini bildirmişlerdir (137).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. İzolatların Toplanması ve Saklanması

Çalışmaya 01 Temmuz 2018- 30 Eylül 2018 tarihleri arasında Atatürk Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 44 MDR *A.baumannii* suşu dahil edilmiştir. Her hastadan sadece bir örnek kabul edilmiş olup, aynı hastadan gelen örnek farklı tarihlerde de olsa çalışmaya dahil edilmemiştir.

Toplanan suşlar “broth mikrodilüsyon” çalışması için -20 °C’de çalışma gününe kadar saklanmıştır.



Şekil 3.1. -20°C’de Saklanan İzolatlar

3.2. Kullanılan Malzemeler

Besiyerleri ve ayraçlar

- %5 Koyun kanlı agar (GBL®,Türkiye)
- Eozin Metilen Blue agar (EMB) (Oxoid®, İngiltere)
- Hareket besiyeri (Motility medium) (Oxoid®, İngiltere)

- Mueller-Hinton Agar (Pronadisa®, Spain)
- Kan kültürü şişeleri (BD BactecFX) (BD®, ABD)
- Triple Sugar Iron Agar (Üç Şekerli Demirli Besiyeri) (Oxoid®, İngiltere)
- İndol broth (Oxoid®, İngiltere)
- Oksidaz ayıracı (BD®, ABD)

Antibiyotik diskleri *

- Seftazidim 30 µg
- Seftazidim+ Clavulanic acid 30/10 µg
- Sefotaksim+Clavulonic acid 30/10 µg
- Ampisilin–Sulbaktam 10/10 µg
- Piperasilin-Tazobaktam 30/6 µg
- Sefiksim 5 µg
- Sefuroksim 30 µg
- Sefotaksim 5 µg
- Seftazidim 10 µg
- Sefoksitin 30 µg
- Seftriakson 30 µg
- Sefepim 30 µg
- İmipenem 10 µg
- Meropenem 10 µg
- Ertapenem 10 µg
- Amikasin 30 µg
- Gentamisin 10 µg
- Siprofloksasin 5 µg
- Trimetoprim – Sulfometaksazol 1,25/23,75 µg

* Kullanılan tüm antibiyotik diskleri Bioanalyse® firmasına aittir.

Cihaz ve kitler

- Phoenix™ 100 cihazı (BD®)

- Phoenix™ NMIC-400 kiti (BD®)
- Phoenix™ NID kiti (BD®)
- Phoenix™ ID ve AST broth (BD®)
- Dansitometre (BD®)
- Sensititre™ FRCOL micropleyt (Thermo Fischer Scientific®)
- Sensititre™ ID ve Mueller-Hinton Broth (Thermo Fischer Scientific®)
- Polistren mikropalaklar (CITOTEST®,Çin)
- Colistine sulfat (Sigma-Aldrich®,Almanya)
- Katyon ayarlı Mueller-Hinton Broth (BD®)
- Etüv (Thermal®)

3.3. Kültür ve İdentifikasyon

Kliniklerden laboratuvarımıza gönderilen trakeal aspirat, yara örnekleri %5 KKA ve EMB agara ekilerek uygun koşullarda inkube edildi. Kan örnekleri ise BD® BactecFX şişelerine kliniklerde alınıp laboratuvarımıza pnömotik sistemle gönderildi. Şişeler bekletilmeden BD® BactecFX sistemine yüklendi. Pozitif sinyal veren şişeler %5 KKA, EMB ve Çikolatamsı agar besiyerine ekilerek 18-24 saat 35 °C' lik etüvde inkube edildi.

İnkubasyon sonunda yapılan besiyerlerinin değerlendirilmesinde kanlı ve/veya çikolata agarla birlikte EMB agarda üreme gözlenen örnekler Gram-negatif bakteri olarak kabul edildi. Bu tür üreme saptanan bakteriler ileri tanımlama amaçlı TSİ agar, hareket ve indol besiyerlerine pasajlandı. Aynı esnada Mueller-Hinton agara 0.5 McFarland yoğunluğunda inokule edilerek EUCAST önerileri doğrultusunda laboratuvarımızda rutin uygulanan Gram-negatiflere etkili antibiyotik diskleriyle duyarlılık çalışıldı. Tablo 3.1'de laboratuvarımızda Gram-negatiflere disk difüzyon yöntemiyle rutin çalışılan antibiyotik diskleri ve dozları görülmektedir. TSİ agarda 18-24 saat 35°C'lik etüvde inkubasyonu takiben nonfermentatif ve hareketsiz olanlar oksidaz testine alındı, oksidaz testi negatif çıkanlara gram boyama uygulandı. Gram boyamada Gram-negatif kok-kokobasil görülenler *Acinetobacter spp.* ön tanımlamasıyla ileri tanımlama testine alındı. İleri tanımlama sonucu *A.baumannii*

ıkanlardan disk difüzyon yöntemine göre MDR bulunan suşlar kolistin duyarlılığı yönünden teste tabi tutuldu.

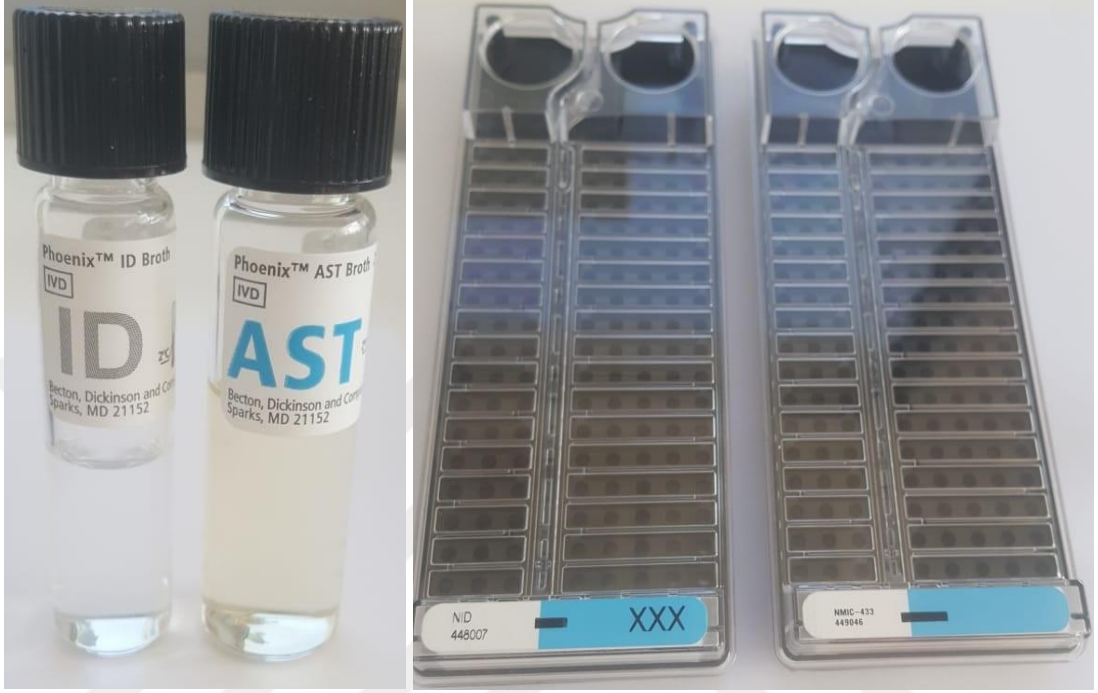
Tablo 3.1. Laboratuvarımızda Gram-negatiflere Uygulanan Antibiyotikler

Antibiyotik	Disk İçeriği (µg)
Seftazidim	30
Seftazidim+ Clavulanic acid	30/10
Sefotaksim+Clavulonic acid	30/10
Ampisilin–Sulbaktam	10/10
Piperasilin-Tazobaktam	30/6
Sefiksim	5
Sefuroksim	30
Sefotaksim	5
Seftazidim	10
Sefoksitin	30
Seftriakson	30
Sefepim	30
İmipenem	10
Meropenem	10
Ertapenem	10
Amikasin	30
Gentamisin	10
Siprofloksasin	5
Trimetoprim – Sulfometaksazol	1,25/23,75

Otomatize Tanımlama

İzolatlara ileri tanımlama için BD® firmasının önerileri doğrultusunda Phoenix™ 100 cihazına yükleme prosedürü uygulandı. Firma tarafından sağlanan ID şişede bakteri yoğunluğu 0.5 McFarland eşeline dansitometre kullanılarak ayarlandı. Daha sonra firmanın AST broth şişesine, redoks ayırıcından bir damla damlatılarak alt üst edildi ve homojenize olması sağlandı. Ardından hazırlanan bakteri inokulumundan 25 µl alınarak AST broth'a aktarıldı ve böylece son inokulum yaklaşık 5x10⁵ CFU/ml oldu. ID şişesi Phoenix™ NID kitine ve AST broth şişesi kolistinin liyofilize toz halinde bulunduğu NMIC-400 kitlerine aktarıldı. AST şişesinden NMIC-400 kitinin kuyucuklarına sıvı doldurulduğunda son konsantrasyonu üç farklı değerde

(1, 2 ve 4 µg/mL) olmaktadır. Son olarak örnekler hasta barkodu ve kit barkoduyla cihaza tanıtılarak yerleştirildi. Cihaz tarafından yapılan biyokimyasal tanımlamada *A.baumannii* olarak belirlenen suşlar çalışma kapsamına alındı.



Şekil 3.2. Phoenix™ cihazı ID ve AST şişeleri, NID tanımlama, NMIC duyarlılık kit



Şekil 3.3 Phoenix™ 100 cihazı



Şekil 3.4. Phoenix™ Cihazının NMIC Duyarlılık Kiti. Solda bakteri süspansiyonunun inkubasyonu sonrası kuyucuklarda bakteri üremesi görülmektedir. Sağda inokulum yapılmamış kit görülmektedir.

3.4. Ticari Kitlerle İzolatların Kolistin Direncinin Belirlenmesi

Phoenix™ yöntemi

İleri tanımlama için Phoenix™ sistemine yüklenen bakterilere aynı esnada duyarlılık paneli de çalışıldı. Sonuçlar Phoenix™ cihazının kendi yazılımıyla EUCAST v.8.1 baz alınarak değerlendirildi.

Sensititre™ yöntemi

Phoenix™ sisteminde kolistin duyarlı (MİK ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$) *A.baumannii* suşları doğrulama amaçlı Sensititre™ yöntemiyle çalışıldı. Firmanın uygulama prospektüsü doğrultusunda ID şişesinde 0.5 McFarlanda ayarlanan bakteri inokulumundan 10 μl alınarak 11 ml'lik firmanın ticari olarak sağladığı KAMHB'ye aktarıldı. Alt üst edilerek iyice karışması sağlandı. Daha sonra mikroplak kuyucuklarına bu brothtan 50'şer μl dağıtıldı. Mikroplağın üzeri şeffaf bir plastikle kapatıldı ve 34-36°C'de 24 saat inkube edildi. Ertesi gün değerlendirildi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
B	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
C	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
D	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
E	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
F	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
G	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
H	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON

COL Colistin POS Positive Control

Şekil 3.5. Sensititre™ Çalışma Şeması ve Dilüsyonlar

3.5. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi (BMD)

Çalışma gününe kadar $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan izolatlar oda sıcaklığında çözüldü ve kanlı agara pasajlandı. Ekimi yapılan besiyerleri $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 18 saat inkube edildi.

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi EUCAST önerileri doğrultusunda ISO standart 20776-1'e göre aşağıda belirtilen aşamalar ile dizayn edildi (161).

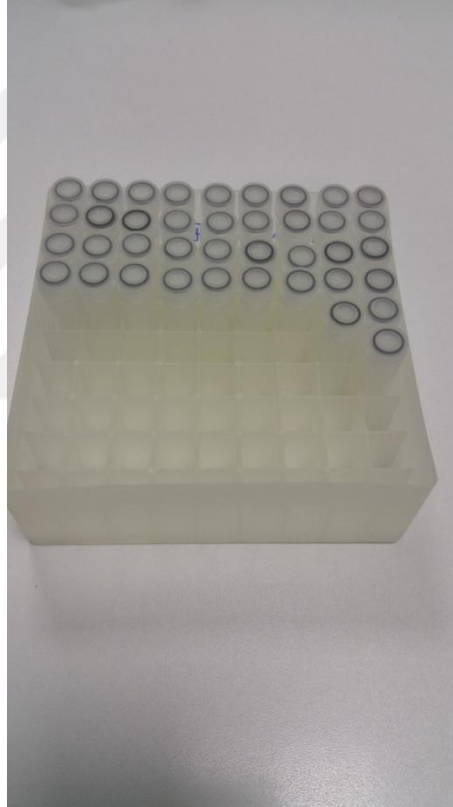
Besiyeri hazırlanması

Toz halinde bulunan KAMHB'den 22 g tartılarak 1000 mL distile su bulunan balon jopenin içinde çözündürüldü ve ardından otoklavda $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dk steril edilerek kullanıma hazır hale getirildi.

Antibiyotik hazırlanması

- 1- Çalışmada potensi 15000 U/mg olan kolistin sulfat kullanıldı.

- 2- Kolistin 100 mg tartılarak $w=V \times C/P$ formülüne göre 2560 $\mu\text{g/mL}$ stok hazırlandı. (V: Çözücü hacmi, w: Antibiyotik kütlesi, P:Potens, C: Antibiyotik konsantrasyonu)
- 3- 100 mg kolistin 39 ml suda çözülerek 2560 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda stok elde edildi ve 1 mL'lik ependorf tüplerde alikotlar halinde sonraki kullanımlar için $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı.
- 4- Çalışma gününde bu alikotlardan bir tanesi oda sıcaklığında çözülerek 1 ml antibiyotik 9 mL KAMHB ile 15x150mm'lik bir tüpte 1/10 oranında dilüe edildi ve bu şekilde son konsantrasyon 256 $\mu\text{g/mL}$ oldu.



Şekil 3.6. Hazırlanan 2560 $\mu\text{g/mL}$ Konsantrasyonda Kolistin Stokları

Bakteri inokulum hazırlanışı

- 1- 0.5 McFarland yoğunlukta bakteri süspansiyonu KAMHB kullanılarak hazırlandı.
- 2- 50 μl 0.5 McFarland ayarlı bu süspansiyon, 700 μl KAMHB ile dilüe edildi.

Mikroplak uygulaması

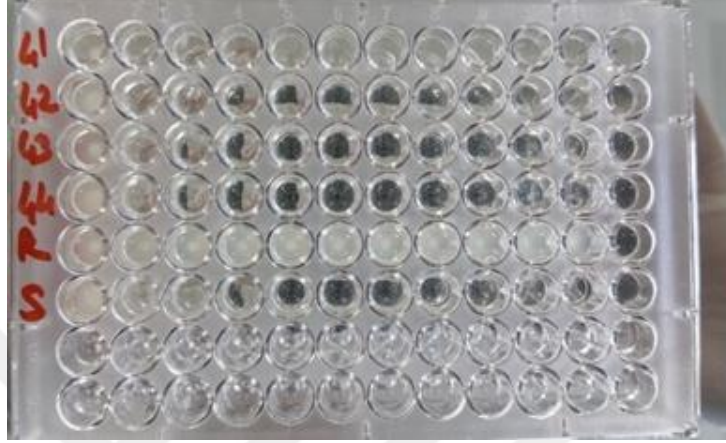
- 1- Hazırlanan KAMHB besiyerinden tüm kuyucuklara 100 µl dağıtıldı.
- 2- Hazırlanan 256 µg/mL yoğunluğundaki kolistin süspansiyonundan 100 µl alınıp, ikinci sütuna konuldu ve kuyucuktaki son antibiyotik konsantrasyonu 128 µg/mL olarak elde edildi (Birinci sütun pozitif kontrol).
- 3- İkinci kuyucuktan 100 µl alınıp, 11. kuyucuğa kadar seri dilüsyon yapıldı. 11.kuyucuktaki konsantrasyon 0,25 µg/mL oldu. (12. Sütun negatif kontrol).
- 4- En son pipete çekilen 100 µl sıvı dışarı atıldı.
- 5- Bakteri inokulumundan 5 µl alınarak ilgili satırdaki 12.kuyucuk hariç tüm kuyucuklara dağıtıldı. Böylece son bakteri inokulumu EUCAST önerilerine uygun olarak yaklaşık 5×10^5 CFU/mL oldu.
- 6- Mikroplak üzeri şeffaf bir plastikle kapatıldı ve 35 ± 1 °C'de 18-20 saat inkubasyona bırakıldı.



Şekil 3.7. P-80 İçermeyen Steril Mikroplaklar

3.6. MİK Değerlerinin Belirlenmesi

İnkubasyonu takiben yapılan değerlendirmede, üreme gözlenmeyen ilk kuyucuklar MİK değeri olarak kabul edildi..



Şekil 3.8. Kolistinin Mikrodilüsyon Yöntemiyle Çalışılması

Kalite kontrol

EUCAST *Acinetobacterspp.* mikrodilüsyon çalışılırken duyarlı suş olarak *E. coli* ATCC 25922 veya *P. aeruginosa* ATCC 27853, dirençli suş olarak ise *E. coli* NCTC 13846 (*mcr-1* pozitif) kullanılmasını önermektedir (135). Çalışmamızda *E. coli* ATCC 25922 ve *E. coli* NCTC 13846 kullanıldı.

Tanımlar

Esansiyel uyum (EU): Test sonucunun referans MİK ile ± 1 dilüsyon farkı olmasıdır.

Kategorik uyum (KU): Test sonucunun referans yöntemle elde edilen kategoriyle (duyarlı, orta duyarlı, dirençli) uyumlu olmasıdır.

Büyük hata (BH) : Referans metotla duyarlı, test edilen metotla dirençli çıkmasıdır.

Çok büyük hata (ÇBH): Referans metotla dirençli, test edilen metotla duyarlı çıkmasıdır.

Sonuçların değerlendirilmesi

Duyarlılık kategorileri belirlenirken EUCAST sınır değerler tablosu versiyon v8.1 baz alındı (duyarlı ≤ 2 , dirençli >2 $\mu\text{g/mL}$). Uyum ve hata oranları hesaplanırken ISO tarafından önerilen 20776-2 nolu standart baz alındı (46, 161). Phoenix™ ile BMD arasındaki esansiyel uyum Phoenix™ cihazında sadece üç dilüsyon çalışıldığı için (1, 2 ve 4 $\mu\text{g/mL}$) hesaplanmadı.

Bulgular grafiğe yansıtılırken serpilme diyagramları (scattergram) kullanıldı. Serpilme diyagramı, bir tür kalite diyagramıdır. İki farklı değişken arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanılır. Aralarındaki ilişkinin sebebi görülemese de, ilgili iki değişkenin arasında direkt olarak bir ilişki bulunup bulunmadığı ve bu ilişkinin ne derece güçlü olduğu görülebilir.

4. BULGULAR

4.1. İzolatların Vücut Bölgesine Göre Dağılımı

Çalışmaya alınan 44 izolatın 23'ü (%52) kan, 15'i (%34) yara ve 6'sı (%14) trakeal aspirattı. Laboratuvarımıza gönderilen örneklerin dağılımı Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. İzolatların Elde Edildiği Örneklerin Dağılımı

4.2. İzolatların Kliniklere Göre Dağılımı

Çalışmaya alınan örneklerin kliniklere göre dağılımı Tablo 4.1'de gösterilmiş olup, %27.2 ile en fazla suş Dahiliye Yoğun Bakım servisinde izole edilmiştir.

Tablo 4.1. İzolatların Kliniklere Göre Dağılımı

Servis	Sayı	Yüzde
Dahiliye yoğun bakım	12	27.2
Anestezi yoğun bakım	4	9.09
Nöroloji Yoğun Bakım	3	6.81
Nöroloji Kliniği	1	2.27
Ortopedi Yoğun Bakım	4	9.09
Ortopedi Kliniği	2	4.54
Beyin cerrahi Kliniği	4	9.09
Göğüs Hastalıkları Kliniği	1	2.27

Tablo 4.1. (Devamı)

Genel Cerrahi Yoğun Bakım	3	6.81
Genel Cerrahi Kliniği	3	6.81
Medikal Onkoloji Kliniği	1	2.27
Yanık tedavi ünitesi	1	2.27
Plastik Cerrahi Kliniği	2	4.54
Kalp Damar Cerrahisi Yoğun Bakım	1	2.27
Organ Nakli Kliniği	1	2.27
Yenidoğan Yoğun Bakım	1	2.27
TOPLAM	44	100

4.3. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları

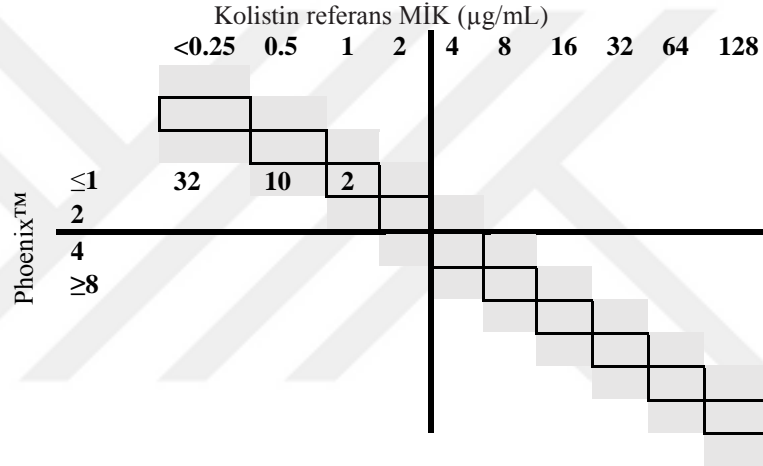
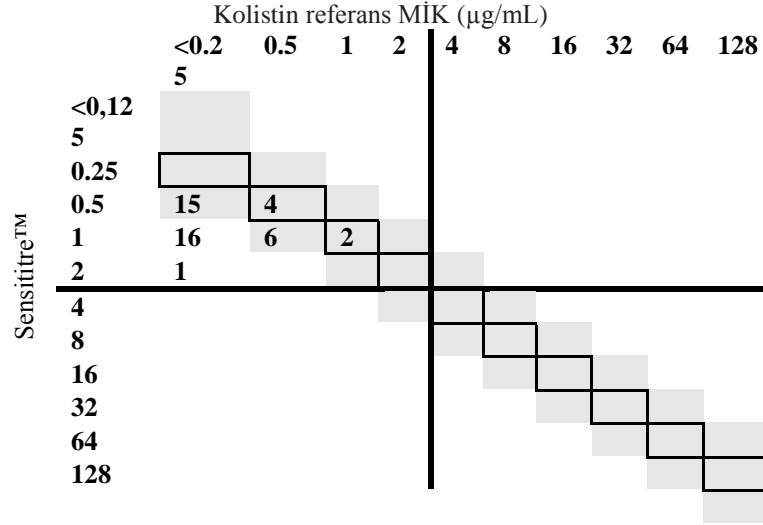
Çalışma dönemi boyunca elde edilen veriler Tablo 4.2’de özetlenmiştir.

Tablo 4.2. Elde Edilen MİK Sonuçları

Suş numarası	Phoenix™ µg/mL	Sensititre™ µg/mL	BMD µg/mL
1	≤1	0,5	0,5
2	≤1	0,5	<0,25
3	≤1	0,5	<0,25
4	≤1	0,5	<0,25
5	≤1	1	<0,25
6	≤1	1	0,5
7	≤1	0,5	0,5
8	≤1	1	0,5
9	≤1	1	<0,25
10	≤1	2	<0,25
11	≤1	1	<0,25
12	≤1	1	<0,25
13	≤1	1	0,5
14	≤1	1	<0,25
15	≤1	1	<0,25
16	≤1	1	1
17	≤1	1	<0,25
18	≤1	0,5	<0,25
19	≤1	1	<0,25

Tablo 4.2. (Devamı)

20	≤ 1	1	<0,25
21	≤ 1	0,5	<0,25
22	≤ 1	0,5	<0,25
23	≤ 1	1	<0,25
24	≤ 1	1	1
25	≤ 1	0,5	<0,25
26	≤ 1	0,5	0,5
27	≤ 1	1	0,5
28	≤ 1	0,5	<0,25
29	≤ 1	0,5	<0,25
30	≤ 1	0,5	<0,25
31	≤ 1	0,5	<0,25
32	≤ 1	0,5	<0,25
33	≤ 1	0,5	0,5
34	≤ 1	1	0,5
35	≤ 1	0,5	<0,25
36	≤ 1	0,5	<0,25
37	≤ 1	1	<0,25
38	≤ 1	1	<0,25
39	≤ 1	1	0,5
40	≤ 1	0,5	<0,25
41	≤ 1	1	<0,25
42	≤ 1	1	<0,25
43	≤ 1	1	<0,25
44	≤ 1	1	<0,25
R-<i>E.coli</i> NCTC 13846	>4	>128	>128
S-<i>E.coli</i> ATCC 25922	≤ 1	<0,125	<0,25



Şekil 4.2. Serpilme Diyagramı. Test Edilen Metoda Referans Broth Mikrodilüsyon Uyumunun Serpilme Diyagramı Üzerinden Gösterilmesi. Referans MİK ile birebir uyum gösteren MİK değerleri kutu içlerinde, esansiyel uyum gösterenler ise (referans MİK ile ± 1 dilüsyon farkı) gri zeminle gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Karşılaştırmalı Çalışma Sonuçları

Metod	Toplam	MİK değerleri sayısı			%EU	%KU	BH	ÇBH
		Aynı	± 1 dilüsyon					
Sensititre™	44	6	21	61	100	0	0	
Phoenix™	44	- ^a	- ^a	- ^a	100	0	0	

EU: Esansiyel uyum, KU: Kategorik uyum, BH: Büyük hata, ÇBH: Çok büyük hata

^a: Phoenix™ ile BMD arasındaki esansiyel uyum Phoenix™ cihazında sadece üç dilüsyon olduğu için (1-2-4 µg/mL) hesaplanmamıştır

5. TARTIŞMA

Acinetobacter türlerinin en önemli temsilcisi *A.baumannii*, dünya genelinde sağlık kurumları için en sorunlu patojenlerden biri olarak insanlığı tehdit etmektedir. *A.baumannii*'nin hızlı bir şekilde yeni direnç mekanizmaları geliştirebilmesi veya var olan direnç mekanizmasını hızlıca uygulamaya geçirme kabiliyeti günümüzdeki mevcut antibiyotiklerin neredeyse tümüne dirençli olmasını sağlamıştır (12). Kolistin, *A.baumannii* enfeksiyonları tedavisinde elimizde kalan son seçenek antibiyotiklerdendir. Dolayısıyla kolistin duyarlılığının doğru tespiti son derece önem kazanmaktadır.

Bu tez çalışmasında laboratuvarımıza gelen örneklerden izole edilen MDR *A.baumannii* suşlarının kolistin duyarlılığının tespitinde günümüzde yaygın olarak kullanılan Sensititre™ ve Phoenix™ ticari sistemlerinin etkinliğinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

1999'da ilk defa Çek Cumhuriyeti'nde kolistine dirençli *A.baumannii* bildirildiğinden bu yana direnç yayılarak devam etmiş, dünya genelinden kolistin dirençli suşlar bildirilmiştir (42). ABD'de %2.1-7.1, Avrupa'da %7-11 oranında direnç raporlanmaktadır (44). ABD'de yüksek sayıda izolatin dâhil edildiği bir çalışmada ise suşların %1.2'si kolistine dirençli bulunmuştur (162). Maraki ve ark. (163) Yunanistan'da üçüncü basamak bir hastanede *A.baumannii* direnç profillerini incelemişler ve kolistine direnci %7.9 olarak bulmuşlardır. Pawar ve ark. (164) Hindistan'da yaptığı çalışmada %11.9 oranında kolistin direnci bildirmişlerdir. Ülkemizde 2016 yılında yayınlanan "Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı (Uhesa) Özet Raporunda" ülke genelinde izole edilen 9934 *A.baumannii* suşunun %3.02'si kolistine dirençli bulunmuştur. Çıkman ve ark. (165) Erzincan'da yaptığı kolistinle tigesiklin kombinasyon çalışmasında 40 *A.baumannii* suşunun biri (%2.5) kolistin dirençli çıkmıştır. Hastanemizde yapılan bir uzmanlık tezi çalışmasında 2011-2012 yıllarına ait çeşitli klinik örneklerden izole edilen MDR *A.baumannii* suşlarında invitro antibiyotik duyarlılık E-test yöntemiyle araştırılmış ve 40 izolatin ikisi kolistin dirençli bulunmuştur (166). Çalışmamızda ise *A.baumannii* suşlarının tümü her üç yöntemle de (Sensititre™, Phoenix™, BMD) kolistine duyarlı bulunmuştur.

A.baumannii'nin izole edildiği örnek türlerine bakıldığında literatürde birbirine benzer bir dağılım göze çarpmaktadır. Japonya'da yapılan bir araştırmada izole edilen suşların %77'si solunum yollarına aittir (167). Reyes ve ark. (168) Meksika'da yaptığı çalışmada suşların %50'si solunum yollarından, %23.2'si yaralardan, %14.2'si kan kültürlerinden elde edilmiştir. Liu ve ark. (169) suşların %71.6'sını balgam örneğinden, %13.6'sını trakeal aspirat örneğinden izole etmişlerdir. Şahin ve ark. (65) yoğun bakım ünitelerinden *A.baumannii*'yi trakeal aspiratlardan %42.3, balgamdan %20.8 ve kan kültüründen de %18 oranlarında izole etmişlerdir. Cesur ve ark. (59) çalışmasında Ankara, Antalya ve Van illerindeki hastalardan soyutlanan *A.baumannii* suşlarının %43'ü trakeal aspirat, %20'si yara, %18'i idrar örneklerinden izole edilmişti. Anabilim dalımızda yapılan bir başka çalışmada 78 *A.baumannii* suşundan 39'u kan (%50), 16'sı yara (%20.5), 15'i trakeal aspirat (%19.2) örneklerinden izole edilmiştir (170). Bizim çalışmamızda da 44 izolatin 23'ü (%52) kan, 15'i (%34) yara ve 6'sı (%14) trakeal aspirat'tan elde edilmiştir. Bahsedilen son iki çalışmada, çalışma dönemi boyunca aynı hastanın farklı örneklerinden sadece birisi alındığı ve çalışmaya klinisyenler tarafından kolistin çalışılması istenen kan kültürleri yoğun olarak işleme alındığı için *A.baumannii* izolasyon oranı kan kültürü örneklerinde yüksek çıkmıştır.

A.baumannii suşlarının kliniklere göre dağılımı incelendiğinde, Chen ve ark. (171) yaptığı çalışmada izolatların %48'i Yoğun bakım ünitesinden izole edilmiştir. Correa ve ark. (172) Kolombiya'da yedi şehirdeki 14 hastanede gerçekleştirdiği çok merkezli bir çalışmada *A.baumannii*'nin en sık izole edilen yer Yoğun bakım üniteleri olmuştur (%72). Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde, Engin A. (173) tarafından hastane enfeksiyonları için üç yıllık bir izlem yapılmış, *Acinetobacter* ilişkili enfeksiyon tespit edilen hastaların en sık %30.86 Anestezi yoğun bakım ünitesinde yattığı tespit edilmiştir. Eroğlu ve ark. (174) Samsun'da yaptığı beş yıllık bir izlem çalışmasına göre en sık *Acinetobacter spp.* izole edilen servisler Yoğun bakım ünitesi %21.9, Beyin cerrahi kliniği %13.8 olmuştur. Bizim çalışmamızda ise literatürle uyumlu olarak suşların en sık izole edildiği bölümler Dahiliye yoğun bakım %27.2, Anestezi yoğun bakım %9.09 ve Nöroloji yoğun bakım %6.81 olarak bulunmuştur.

Yöremizde *A.baumannii*'de kolistin direncine yönelik geniş kapsamlı bir çalışma olmamasından dolayı bu çalışma tasarlandı. Kolistin duyarlılığı saptamada 22 Mart 2016'ya kadar birçok yöntem kullanılmaktaydı. Ancak CLSI-EUCAST ortak katılımlı Polimiksin sınır değer çalışma grubu tarafından bu tarihte yayınlanan duyuruyla sıvı mikrodilüsyon harici diğer bütün yöntemler (agar dilüsyon, disk difüzyon ve gradiyent difüzyon) geçersiz kabul edildi (137). Bu duyurunun ardından Biomerieux® 19.06.2017 tarihinde "Saha düzeltici faaliyet" adı altında iş ortaklarına bir duyuru maili göndererek VITEK 2™ otomatize sistemlerinde Gram-negatifler için kullanılan AST-GN kartlarında çalışılan kolistin duyarlılığında birçok major hata olduğunu belirtmiştir. Biomerieux® 290 izolatın kolistin direncini VITEK 2™, sıvı mikrodilüsyon ve agar dilüsyonu yöntemleriyle karşılaştırmalı olarak gerçekleştirmiş ve çalışma sonucuna göre yanlış duyarlı sonuçlar bildirilebileceğinin öngörüldüğünü, bir suşun kolistine duyarlı olduğunu raporlamadan önce alternatif başka bir yöntemle çalışılmasını tavsiye etmiştir. 15 Ocak 2018'te ise BD® firması iş ortaklarına acil koduyla bir mail göndererek firma bünyesinde yaptığı çalışma sonucuna göre Phoenix™ otomatize sisteminde kolistin duyarlılığı çalışılan AST kitlerinde çok büyük hata ile karşılaştıklarını bildirmiştir. Çözüm olarak cihaz yazılımında sınır değer değişiklikleri yaparak duyarlı sonuçların bildirilmemesi gerektiğini önermiştir. Dirençli suşların ise bildirilebileceğini belirtmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız Sensititre™ ticari bir sıvı mikrodilüsyon yöntemidir. Matuschek ve ark. (1) yaptığı karşılaştırma çalışmasında Sensititre™ ve referans yöntem olarak kabul edilen BMD'yi karşılaştırmış ve *A.baumannii* için EU %91, KU %91, BH %9, ÇBH %0 bulmuşlardır. Chew ve ark. (1) Sensititre™'de EU %89.5, KU %90.1, BH %11.8, ÇBH %4 bulmuşlardır. Jayol ve ark. (175) üç sıvı mikrodilüsyon yöntemini karşılaştırdığı çalışmada, Sensititre™ 133 dirençli suşun 129 tanesini yakalamış, KU %97.8, BH %0, ÇBH %3 olarak bulmuştur. Karbapenemaz üreten enterik bakterilerle Pfennigwerth ve ark. (4) tarafından 2019 yılında yapılan bir çalışmada kolistin duyarlılık tespitinde Sensititre™, referans BMD ile karşılaştırıldığında EU %81.7, KU %92.9, BH %5 ve ÇBH %2 olmuştur. Ülkemizdeki literatür gözden geçirildiğinde çalışmamızın verileri konuyla ilgili ilk

verilerden olmaktadır. Bizim çalışmamızda Sensititre™ referans BMD ile karşılaştırıldığında EU %61, KU %100, BH %0, ÇBH %0 bulunmuştur.

Phoenix™ ile referans BMD karşılaştırılması yapılırken literatürde farklı metodlar takip edilmiştir. Vourli ve ark. (46) yaptığı çalışmada Phoenix™, Vitek 2™ ve BMD karşılaştırılmış, yazarlar Phoenix™'i karşılaştırabilmek için normalde ≤ 1 ve >4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olan MİK sınır değerlerini sırasıyla 1 ve 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kabul ederek istatistik hesaplamışlar ve EU %91.5, KU %88.9, BH %1.1 ve ÇBH %41.4 bulmuşlardır. Pfennigwerth ve ark. (4) ise esansiyel uyumu hesaplayabilmek için çalışma sonuçlarını Phoenix™'in sınır değerlerine uyarlayarak $\leq 1 - \geq 8$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak daraltmışlar, bu sınırlar dışındaki izolat sonuçlarını hesaplamaya katmamışlardır. Toplam 325 suşun kullanıldığı çalışmada Phoenix™ için EU %76.1, KU %92, BH %0, ÇBH %8 bulmuşlardır. Carretto ve ark. (176) yaptığı çalışmada ise Phoenix™ MİK aralığı çok dar olduğundan BMD ile EU hesaplanmamış, KU %96.8, BH %0.5 ve ÇBH %3 bulunmuştur. Tüzemen ve ark. (177) Phoenix™ ile kolistin direnci saptanan izolatları BMD ile karşılaştırmışlar KU tüm izolatlar için %92, *A.baumannii* için %77.8, tüm izolatlar için %8 BH ve %0 ÇBH oranı hesaplamışlardır. Bizim çalışmamızda da Phoenix™ alt sınır MİK değeri ≤ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olduğundan ve suşlarımızın MİK değerleri de düşük çıktığından dolayı esansiyel uyum hesaplanmamış, KU %100, BH %0, ÇBH %0 olarak bulunmuştur.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

EUCAST ve CLSI polimiksin ortak çalışma grubunun yaptığı duyuruyu takiben ticari firmalardan da uyarı mesajları gelmesi üzerine, tüm dünyada bu konuya ilgi gösterilmiş ve literatürde farklı yöntemlerin karşılaştırıldığı birçok yayın yer almıştır.

Yaptığımız çalışmada Sensititre™, Phoenix™ ve BMD yöntemleriyle bütün suşlar kolistine duyarlı bulunmuştur. Çalışmamızda değerlendirme yaptığımız her iki ticari yöntem de referans yöntem olarak kabul edilen BMD ile büyük oranda uyum göstermiştir. Ancak Phoenix™ sisteminde MİK dilüsyon aralıkları dar olduğundan gerçek MİK değerleri görülememiştir.

Halen ülkemizde günümüz itibariyle birçok laboratuvar Phoenix™ sistemiyle sonuç bildirdiğinden dolayı çalışma sonuçları önem arz etmektedir. EUCAST, CLSI, Biomerieux® ve BD® tarafından yapılan duyurulardan sonra alternatif bir yöntem olarak sıvı mikrodilüsyon tabanlı ticari bir sistem olan Sensititre™'nin rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. Bu çalışmada biz de *A.baumannii*'nin kolistin direncini tespit etmek amacıyla Sensititre™ yöntemini de kullandık.

Yapılacak benzer bir çalışma dizayn edilirken kolistin dirençli olduğu bilinen suşlar çalışma kapsamına alınabilir. Ayrıca karşılaştırma yapacak araştırmacılara suş sayısını artırmaları ve BMD'yi farklı duyarlılık yöntemleriyle de karşılaştırmaları önerilir. Bu şekilde maliyet etkin çalışma yöntemlerinin ortaya konulması sağlanabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Chew KL, La M-V, Lin RT, Teo JW. Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and mcr-positive Enterobacteriaceae: comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution. *Journal of clinical microbiology*. 2017;55(9):2609-16.
2. Matuschek E, Ahman J, Webster C, Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2018;24(8):865-70.
3. Bakthavatchalam YD, Veeraraghavan B, Shankar A, Thukaram B, Krishnan DN. Evaluation of colistin and polymyxin B susceptibility testing methods in *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii*. *Journal Of Infection In Developing Countries*. 2018;12(6):504-7.
4. Pfennigwerth N, Kaminski A, Korte-Berwanger M, Pfeifer Y, Simon M, Werner G, et al. Evaluation of six commercial products for colistin susceptibility testing in Enterobacterales. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019.
5. Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* infection. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(12):1271-81.
6. Seifert H, Dijkshoorn L. Overview of the microbial characteristics, taxonomy, and epidemiology of *Acinetobacter*. *Acinetobacter Biology and Pathogenesis*: Springer; 2008. p. 19-45.
7. Baumann P, Doudoroff M, Stanier R. A study of the Moraxella group II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *Journal of bacteriology*. 1968;95(5):1520-41.
8. Bouvet PJM, Grimont PAD. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter*

- lwoffii*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1986;36(2):228-40.
9. Tjernberg I, Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 1989;97(7):595-605.
 10. Bouvet PJ, Jeanjean S. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. *Research in microbiology*. 1989;140(4-5):291-9.
 11. Fitzpatrick MA, Ozer E, Bolon MK, Hauser AR. Influence of ACB complex genospecies on clinical outcomes in a U.S. hospital with high rates of multidrug resistance. *J Infect*. 2015;70(2):144-52.
 12. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology reviews*. 2008;21(3):538-82.
 13. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 2015; *Acinetobacter*.
 14. Winn JW, Koneman E, Procop G, et al. The Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, Philadelphia; 2006:303-91.
 15. Procop GW, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL. Gram-negatif non-fermentatif basiller. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology* 7th ed. 2017. p. 385-400.
 16. Brown GR, Sutcliffe IC, Cummings SP. Reclassification of *Pseudomonas doudoroffii* (Baumann et al. 1983) into the genus *Oceanomonas gen. nov.* as *Oceanomonas doudoroffii comb. nov.*, and description of a phenol-degrading bacterium from estuarine water as *Oceanomonas baumannii sp. nov.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001;51(1):67-72.
 17. Moran NA, Dale C, Dunbar H, Smith WA, Ochman H. Intracellular symbionts of sharpshooters (Insecta: Hemiptera: Cicadellinae) form a distinct clade with a small genome. *Environmental Microbiology*. 2003;5(2):116-26.
 18. Wang X, Chen Y, Zhao W, Wang Y, Song Q, Liu H, et al. A data-driven mathematical model of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* transmission in an intensive care unit. *Scientific reports*. 2015;5:9478.

19. Cerqueira GM, Peleg AY. Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *IUBMB Life*. 2011;63(12):1055-60.
20. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology*. 2003;149(12):3473-84.
21. Antunes LC, Imperi F, Towner KJ, Visca P. Genome-assisted identification of putative iron-utilization genes in *Acinetobacter baumannii* and their distribution among a genotypically diverse collection of clinical isolates. *Research in microbiology*. 2011;162(3):279-84.
22. Ferreira D, Seca AM, C GAD, Silva AM. Targeting human pathogenic bacteria by siderophores: A proteomics review. *Journal of proteomics*. 2016;145:153-66.
23. Schweppe DK, Harding C, Chavez JD, Wu X, Ramage E, Singh PK, et al. Host-Microbe Protein Interactions during Bacterial Infection. *Chemistry & biology*. 2015;22(11):1521-30.
24. Kim SW, Oh MH, Jun SH, Jeon H, Kim SI, Kim K, et al. Outer membrane Protein A plays a role in pathogenesis of *Acinetobacter nosocomialis*. *Virulence*. 2016;7(4):413-26.
25. Lee JS, Choi CH, Kim JW, Lee JC. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A induces dendritic cell death through mitochondrial targeting. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*. 2010;48(3):387-92.
26. Niu C, Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii*. *Journal of bacteriology*. 2008;190(9):3386-92.
27. Loehfelm TW, Luke NR, Campagnari AA. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *Journal of bacteriology*. 2008;190(3):1036-44.
28. Tomaras AP, Flagler MJ, Dorsey CW, Gaddy JA, Actis LA. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology*. 2008;154(Pt 11):3398-409.

29. Russo TA, MacDonald U, Beanan JM, Olson R, MacDonald IJ, Sauberman SL, et al. Penicillin-binding protein 7/8 contributes to the survival of *Acinetobacter baumannii* in vitro and in vivo. *The Journal of infectious diseases*. 2009;199(4):513-21.
30. Choi AH, Slamti L, Avci FY, Pier GB, Maira-Litran T. The pgaABCD locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *Journal of bacteriology*. 2009;191(19):5953-63.
31. Russo TA, Luke NR, Beanan JM, Olson R, Sauberman SL, MacDonald U, et al. The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infection and immunity*. 2010;78(9):3993-4000.
32. Rossi E, Longo F, Barbagallo M, Peano C, Consolandi C, Pietrelli A, et al. Glucose availability enhances lipopolysaccharide production and immunogenicity in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Future microbiology*. 2016;11(3):335-49.
33. Jacobs AC, Hood I, Boyd KL, Olson PD, Morrison JM, Carson S, et al. Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infection and immunity*. 2010;78(5):1952-62.
34. Camarena L, Bruno V, Euskirchen G, Poggio S, Snyder M. Molecular Mechanisms of Ethanol-Induced Pathogenesis Revealed by RNA-Sequencing. *PLOS Pathogens*. 2010;6(4):e1000834.
35. Vashist J, Tiwari V, Das R, Kapil A, Rajeswari MR. Analysis of penicillin-binding proteins (PBPs) in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. *The Indian journal of medical research*. 2011;133:332-8.
36. Shamsizadeh Z, Nikaen M, Nasr Esfahani B, Mirhoseini SH, Hatamzadeh M, Hassanzadeh A. Detection of antibiotic resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospital environments: potential sources for transmission of *Acinetobacter* infections. *Environ Health Prev Med*. 2017;22(1):44-.
37. Kanafani AZ, Kanj, S.S. *Acinetobacter* infection: Treatment and prevention 2014. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/acinetobacter-infection-treatment-and-prevention>.

38. Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An Overview. *Microbes and Environments*. 2011;26(2):101-12.
39. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev*. 1996;9(2):148-65.
40. Mugnier P, Poirel L, Pitout M, Nordmann P. Carbapenem-resistant and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in the United Arab Emirates. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008;14(9):879-82.
41. Saeed NK, Kambal AM, El-Khizzi NA. Antimicrobial-resistant bacteria in a general intensive care unit in Saudi Arabia. *Saudi Med J*. 2010;31(12):1341-9.
42. Hejnar P, Kolar M, Hajek V. Characteristics of *Acinetobacter* strains (phenotype classification, antibiotic susceptibility and production of beta-lactamases) isolated from haemocultures from patients at the Teaching Hospital in Olomouc. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultatis Medicae*. 1999;142:73-7.
43. Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(7):1607-15.
44. Asif M, Alvi IA, Rehman SU. Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. *Infection and drug resistance*. 2018;11:1249-60.
45. Nowak J, Zander E, Stefanik D, Higgins PG, Roca I, Vila J, et al. High incidence of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2017;72(12):3277-82.
46. Vourli S, Dafopoulou K, Vrioni G, Tsakris A, Pournaras S. Evaluation of two automated systems for colistin susceptibility testing of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2017;72(9):2528-30.

47. Dickstein Y, Lellouche J, Ben Dalak Amar M, Schwartz D, Nutman A, Daitch V, et al. Treatment Outcomes of Colistin- and Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* Infections: An Exploratory Subgroup Analysis of a Randomized Clinical Trial. *Clinical Infectious Diseases*. 2018.
48. Leung LM, McElheny CL, Gardner FM, Chandler CE, Bowler SL, Mettus RT, et al. A Prospective Study of *Acinetobacter baumannii* Complex Isolates and Colistin Susceptibility Monitoring by Mass Spectrometry of Microbial Membrane Glycolipids. *Journal of Clinical Microbiology*. 2019;57(3):e01100-18.
49. Lai C-C, Chen Y-S, Lee N-Y, Tang H-J, Lee SS-J, Lin C-F, et al. Susceptibility rates of clinically important bacteria collected from intensive care units against colistin, carbapenems, and other comparative agents: results from Surveillance of Multicenter Antimicrobial Resistance in Taiwan (SMART). *Infection and drug resistance*. 2019;12:627-40.
50. Beriş FŞ, Budak EE, Gülek D, Uzun A, Çizmeci Z, Mengeloğlu FZ, et al. Türkiye'nin Farklı Bölgelerinden Toplanan Klinik *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Beta-Laktamaz Gen Sıklığı ve Dağılımının Araştırılması: Çok Merkezli Bir Çalışma. *Mikrobiyol Bul*. 2016;50(4):511-21.
51. Çetinkol Y, Telli M, AltunÇEKİÇ Yildirim A, Kerem ÇAlgin M. Evaluation of the Efficiency of Colistin/Sulbactam Combination on Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains. *Mikrobiyoloji Bulteni*. 2016;50:460-5.
52. Cesur S, Toros GY, Altın N, Koldaş K, Solgun G, Şencan İ. Bir Eğitim ve Araştırma Hastanesinin Yoğun Bakım Ünitelerinde Yatan Hastalardan İzole Edilen Çoklu İlaça Dirençli *Acinetobacter baumannii* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıkları. *Ortadoğu Medical Journal/Ortadoğu Tıp Dergisi*. 2016;8(2).
53. Taşçı L, Güreser AS, Boyacıoğlu Zİ, Karasartova D, Taylan Özkan HA. Hitit Üniversitesi Çorum Eğitim ve Araştırma Hastanesinde kan kültürlerinden üreyen mikroorganizmalar ve antimikrobiyal duyarlılıkları. 2016.
54. Balın ŞÖ, Denk A. Harput Devlet Hastanesi Yoğun Bakım Ünitesinde 2013-2014 Yılı İnvaziv Alet İlişkili Hastane Enfeksiyonlarının Değerlendirilmesi. *Firat Tıp Dergisi*. 2016;21(1).

55. Aydemir Ö, Demiray T, Köroğlu M, Aydemir Y, Karabay O, Altındış M. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların endotrakeal aspirat örneklerinden izole edilen bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıkları. Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi. 2016;1(4):1-8.
56. Sağmak-Tartar A, Özer AB, Ulu R, Akbulut A. Endotrakeal aspirat örneklerinden izole edilen bakteriler ve antibiyotik duyarlılıkları: Bir yıllık retrospektif analiz. Klimik Derg. 2018;31(1):56-60.
57. Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarından Ardışık Olarak İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Klinik İzolatlarında Kolistine Direnç ve Heterodirencin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Yüksek Lisans Tezi, 2017, Ankara (Danışman : Prof. Dr. Deniz Gür)
58. Tombak Ö. *Acinetobacter baumannii* izolatlarında kurkuminin farklı antibiyotiklerle sinerjistik etkisinin araştırılması: Namık Kemal Üniversitesi; 2017.
59. Cesur S, Irmak H, Yalçın AN, Berktaş M, Baysan BÖ, Kınıklı S, et al. Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların çeşitli kültür örneklerinden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. Ortadoğu Tıp Dergisi. 2017;9(2):51-5.
60. Ergül AB, Işık H, Altıntop YA, Torun YA. Bir çocuk yoğun bakım biriminde kan kültürlerinin geriye dönük değerlendirilmesi: üç yıllık sonuçlar. Turkish Pediatrics Archive/Turk Pediatri Arsivi. 2017;52(3).
61. Şirin MC, Ağuş N, Yılmaz N, Bayram A, Yılmaz Hancı S, Şamlıoğlu P, et al. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. 2017.
62. Naldan ME, Coşkun MV, Ünal O, Karaşahin Ö, Vural MK. Evaluation of Gram-negative bacilli isolated from patients in intensive care units. 2017.
63. Ozcelik HB, Idil O. Development of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* strains. Journal of Molecular Biology and Biotechnology (MOLBIOTECH) E-ISSN: 2667-4572. 2018;2(1):23-7.
64. Paköz NİE, Kaya E, Orhan Z, Kayış A, Aral M. Farklı klinik örneklerden izole edilen çoğul dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarında tigesiklin, kolistin

- direncinin disk difüzyon, E-test ve otomatize sistem yöntemleri ile karşılaştırılması. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi.75(2):109-16.
65. Şahin AR, Doğruer D, Nazik S, Aktemur A, Öksüz H, Murat A, et al. Hastane Kökenli Patojenlerde Artan Antimikrobiyal Direnç Sorunu: *Acinetobacter baumannii*. Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi. 2019;4(2):156-69.
 66. Yayla BD, Azak E, Mutlu B, Dunder D. Distribution and Antimicrobial Sensitivity of Microorganisms Isolated From Febrile Neutropenic Patients: Results of A Six-Year Observation/Febril Notropenik Hastalardan İzole Edilen Mikroorganizmaların Dağılımı ve Antimikrobiyal Duyarlılıkları: Altı Yıllık Bir Gözlemin Sonuçları. KLİMİK Journal. 2019;32(1):71-8.
 67. Atay G, Kara M, Sütçü M, Aydın YŞ, Hançerli Torun S, Akgün Karapınar B, et al. Bir Üniversite Hastanesi Çocuk Yoğun Bakım Ünitesinde Dirençli Gram-negatif Enfeksiyonların Değerlendirilmesi. Türk Pediatri Arşivi.
 68. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. Clinical microbiology reviews. 2017;30(1):409-47.
 69. Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2005;41(6):848-54.
 70. Whitman TJ, Qasba SS, Timpone JG, Babel BS, Kasper MR, English JF, et al. Occupational Transmission of *Acinetobacter baumannii* from a United States Serviceman Wounded in Iraq to a Health Care Worker. Clinical Infectious Diseases. 2008;47(4):439-43.
 71. Leung WS, Chu CM, Tsang KY, Lo FH, Lo KF, Ho PL. Fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia as a distinct clinical syndrome. Chest. 2006;129(1):102-9.
 72. Cisneros JM, Rodríguez-Baño J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. Clinical Microbiology and Infection. 2002;8(11):687-93.
 73. Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R, Ferrándiz-Millón C, Díaz-Martín A, López-Sánchez JM, Gutiérrez-Pizarra A. Optimum treatment strategies for

- carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2015;13(6):769-77.
74. Johnson EN, Burns TC, Hayda RA, Hospenthal DR, Murray CK. Infectious complications of open type III tibial fractures among combat casualties. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;45(4):409-15.
 75. Trottier V, Segura PG, Namias N, King D, Pizano LR, Schulman CI. Outcomes of *Acinetobacter baumannii* infection in critically ill burned patients. *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association*. 2007;28(2):248-54.
 76. Falagas ME, Vardakas KZ, Kapaskelis A, Triarides NA, Roussos NS. Tetracyclines for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2015;45(5):455-60.
 77. Metan G, Alp E, Aygen B, Sumerkan B. *Acinetobacter baumannii* meningitis in post-neurosurgical patients: clinical outcome and impact of carbapenem resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007;60(1):197-9.
 78. Basri R, Zueter AR, Mohamed Z, Alam MK, Norsal'adah B, Hasan SA, et al. Burden of bacterial meningitis: a retrospective review on laboratory parameters and factors associated with death in meningitis, Kelantan Malaysia. *Nagoya journal of medical science*. 2015;77(1-2):59-68.
 79. Al-Hassan L, El Mehallawy H, Amyes SG. Diversity in *Acinetobacter baumannii* isolates from paediatric cancer patients in Egypt. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2013;19(11):1082-8.
 80. Bathoorn E, Tsioutis C, da Silva Voorham JM, Scoulica EV, Ioannidou E, Zhou K, et al. Emergence of pan-resistance in KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Crete, Greece: a close call. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2016;71(5):1207-12.
 81. Manchanda V, Sanchaita S, Singh N. Multidrug resistant *Acinetobacter*. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2010;2(3):291-304.
 82. Valencia R, Arroyo LA, Conde M, Aldana JM, Torres MJ, Fernandez-Cuenca F, et al. Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant *Acinetobacter*

- baumannii* in a tertiary care university hospital. Infection control and hospital epidemiology. 2009;30(3):257-63.
83. Pourhajibagher M, Hashemi FB, Pourakbari B, Aziemzadeh M, Bahador A. Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter baumannii* to Imipenem in Iran: A Systematic Review and Meta-Analysis. The open microbiology journal. 2016;10:32-42.
 84. Brauers J, Frank U, Kresken M, Rodloff AC, Seifert H. Activities of various beta-lactams and beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations against *Acinetobacter baumannii* and Acinetobacter DNA group 3 strains. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2005;11(1):24-30.
 85. Martinez-Guitian M, Vazquez-Ucha JC, Odingo J, Parish T, Poza M, Waite RD, et al. Synergy between Colistin and the Signal Peptidase Inhibitor MD3 Is Dependent on the Mechanism of Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2016;60(7):4375-9.
 86. Jung J, Park W. Acinetobacter species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. Applied microbiology and biotechnology. 2015;99(6):2533-48.
 87. Tünay H, Demirdağ T, Demirtürk N. Acinetobacter enfeksiyonlarında dirençle ilgili değişen tanımlamalar ve dirençte güncel durum. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2012;42:123-6.
 88. Moran-Barrio J, Cameranesi MM, Relling V, Limansky AS, Brambilla L, Viale AM. The Acinetobacter Outer Membrane Contains Multiple Specific Channels for Carbapenem beta-Lactams as Revealed by Kinetic Characterization Analyses of Imipenem Permeation into *Acinetobacter baylyi* Cells. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2017;61(3).
 89. Buckner MMC, Blair JMA, La Ragione RM, Newcombe J, Dwyer DJ, Ivens A, et al. Beyond Antimicrobial Resistance: Evidence for a Distinct Role of the AcrD Efflux Pump in Salmonella Biology. mBio. 2016;7(6):e01916-16.
 90. Dal T, Dal MS, Ağır İ. The antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* and AdeABC efflux pumps: a review of the literature. Van Med J. 2012;19(3):137-48.

91. Yoon EJ, Balloy V, Fiette L, Chignard M, Courvalin P, Grillot-Courvalin C. Contribution of the Ade Resistance-Nodulation-Cell Division-Type Efflux Pumps to Fitness and Pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. *MBio*. 2016;7(3).
92. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2010;74(3):417-33.
93. Maragakis LL, Perl TM. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;46(8):1254-63.
94. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(10):3471-84.
95. Thomson JM, Bonomo RA. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: beta-lactams in peril! *Current opinion in microbiology*. 2005;8(5):518-24.
96. Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(10):2253-4.
97. Shrestha S, Tada T, Shrestha B, Kirikae T, Ohara H, Rijal BP, et al. Emergence of Aminoglycoside Resistance Due to armA methylase in Multi-drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates in a University Hospital in Nepal. *Journal of Nepal Health Research Council*. 2016;14(33):72-6.
98. Ugolotti E, Di Marco E, Bandettini R, Tripodi G, Biassoni R. The whole genome sequencing of *Acinetobacter-calcoaceticus-baumannii complex* strains involved in suspected outbreak in an Intensive Care Unit of a pediatric hospital. *Journal of Hospital Administration*. 2016;5(6):81.
99. Charrier C, Salisbury AM, Savage VJ, Moyo E, Forward H, Ooi N, et al. In vitro biological evaluation of novel broad-spectrum isothiazolone inhibitors of bacterial type II topoisomerases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2016;71(10):2831-9.

100. Yang H, Hu L, Liu Y, Ye Y, Li J. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinants in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in China. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*. 2016;28(5):443-5.
101. Vila J, Marti S, Sanchez-Cespedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007;59(6):1210-5.
102. Storm DR, Rosenthal KS, Swanson PE. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annual review of biochemistry*. 1977;46:723-63.
103. Koyama Y KA, Tsuchiya A, Takakuta K. A new antibiotic "colistin" produced by spore-forming soil bacteria. *J Antibiot (Tokyo)*. 1950;3:457-8.
104. Reed MD, Stern RC, O'Riordan MA, Blumer JL. The pharmacokinetics of colistin in patients with cystic fibrosis. *Journal of clinical pharmacology*. 2001;41(6):645-54.
105. Brown JM, Dorman DC, Roy LP. Acute renal failure due to overdosage of colistin. *The Medical journal of Australia*. 1970;2(20):923-4.
106. Ryan KJ, Schainuck LI, Hickman RO, Striker GE. Colistimethate toxicity. Report of a fatal case in a previously healthy child. *Jama*. 1969;207(11):2099-101.
107. Conway SP, Pond MN, Watson A, Etherington C, Robey HL, Goldman MH. Intravenous colistin sulphomethate in acute respiratory exacerbations in adult patients with cystic fibrosis. *Thorax*. 1997;52(11):987-93.
108. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005;40(9):1333-41.
109. Sader HS, Rhomberg PR, Farrell DJ, Jones RN. Differences in potency and categorical agreement between colistin and polymyxin B when testing 15,377 clinical strains collected worldwide. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2015;83(4):379-81.
110. Katz E, Demain AL. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriological reviews*. 1977;41(2):449-74.

111. Orwa JA, Govaerts C, Busson R, Roets E, Van Schepdael A, Hoogmartens J. Isolation and structural characterization of colistin components. *The Journal of antibiotics*. 2001;54(7):595-9.
112. Beveridge EG, Martin AJ. Sodium sulphomethyl derivatives of polymyxins. *British journal of pharmacology and chemotherapy*. 1967;29(2):125-35.
113. McMillan FH, Pattison IC. Sodium colistimethate. I. Dissociations of aminomethanesulfonates in aqueous solution. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1969;58(6):730-7.
114. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *The Lancet Infectious diseases*. 2006;6(9):589-601.
115. Markantonis SL, Markou N, Fousteri M, Sakellaridis N, Karatzas S, Alamanos I, et al. Penetration of Colistin into Cerebrospinal Fluid. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(11):4907-10.
116. Li J, Turnidge J, Milne R, Nation RL, Coulthard K. In vitro pharmacodynamic properties of colistin and colistin methanesulfonate against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(3):781-5.
117. Newton BA. The properties and mode of action of the polymyxins. *Bacteriological reviews*. 1956;20(1):14-27.
118. Bialvaei AZ, Samadi Kafil H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Current medical research and opinion*. 2015;31(4):707-21.
119. Koike M, Iida K, Matsuo T. Electron microscopic studies on mode of action of polymyxin. *Journal of bacteriology*. 1969;97(1):448-52.
120. Gough M, Hancock RE, Kelly NM. Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. *Infection and immunity*. 1996;64(12):4922-7.
121. Bojkovic J, Richie DL, Six DA, Rath CM, Sawyer WS, Hu Q, et al. Characterization of an *Acinetobacter baumannii* lptD Deletion Strain: Permeability Defects and Response to Inhibition of Lipopolysaccharide and Fatty Acid Biosynthesis. *Journal of bacteriology*. 2016;198(4):731-41.
122. Durante-Mangoni E, Del Franco M, Andini R, Bernardo M, Giannouli M, Zarrilli R. Emergence of colistin resistance without loss of fitness and virulence

- after prolonged colistin administration in a patient with extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2015;82(3):222-6.
123. Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, Lavender H, Murthy AR, Jacobs MR, et al. Resistance to Colistin in *Acinetobacter baumannii* Associated with Mutations in the PmrAB Two-Component System. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(9):3628-34.
 124. Jeannot K, Bolard A, Plesiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;49(5):526-35.
 125. Chin C-Y, Gregg KA, Napier BA, Ernst RK, Weiss DS. A PmrB-Regulated Deacetylase Required for Lipid A Modification and Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(12):7911-4.
 126. El-Halfawy OM, Valvano MA. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. *Clinical microbiology reviews*. 2015;28(1):191-207.
 127. Machado D, Antunes J, Simões A, Perdigão J, Couto I, McCusker M, et al. Contribution of efflux to colistin heteroresistance in a multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolate. *Journal of medical microbiology*. 2018;67(6):740-9.
 128. Charretier Y, Diene SM, Baud D, Chatellier S, Santiago-Allexant E, van Belkum A, et al. Colistin Heteroresistance and Involvement of the PmrAB Regulatory System in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018;62(9):e00788-18.
 129. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious diseases*. 2016;16(2):161-8.
 130. Skov RL, Monnet DL. Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, the story unfolds. *Eurosurveillance*. 2016;21(9):30155.
 131. Ahmed SS AE, Hopman J, Voss A. Global Epidemiology on Colistin Resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Dis Ther*. 2016;4(287).

132. Capone A, Giannella M, Fortini D, Giordano A, Meledandri M, Ballardini M, et al. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2013;19(1):E23-e30.
133. Landman D, Salamera J, Quale J. Irreproducible and uninterpretable polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(12):4106-11.
134. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC Variability by Method for Contemporary Clinical Isolates of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(6):1678-84.
135. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).
2018. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 8.1. 2018.
136. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 28th informational supplement. CLSI document M100-S28. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2018.
137. CLSI-EUCAST. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf.
138. Turlej-Rogacka A, Xavier BB, Janssens L, Lammens C, Zarkotou O, Pournaras S, et al. Evaluation of colistin stability in agar and comparison of four methods for MIC testing of colistin. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2018;37(2):345-53.
139. Schurek KN, Sampaio JLM, Kiffer CRV, Sinto S, Mendes CMF, Hancock REW. Involvement of pmrAB and phoPQ in Polymyxin B Adaptation and

- Inducible Resistance in Non-Cystic Fibrosis Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(10):4345-51.
140. Behera B, Mathur P, Das A, Kapil A, Gupta B, Bhoi S, et al. Evaluation of susceptibility testing methods for polymyxin. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010;14(7):e596-e601.
 141. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(2):557-96.
 142. Moskowitz SM, Garber E, Chen Y, Clock SA, Tabibi S, Miller AK, et al. Colistin susceptibility testing: evaluation of reliability for cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010;65(7):1416-23.
 143. Maalej SM, Meziou MR, Rhimi FM, Hammami A. Comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution for susceptibility testing of colistin against Enterobacteriaceae. *Letters in Applied Microbiology*. 2011;53(5):546-51.
 144. Tan TY, Ng SY. Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. *Clinical Microbiology and Infection*. 2007;13(5):541-4.
 145. Arroyo LA, García-Curiel A, Pachón-Ibañez ME, Llanos AC, Ruiz M, Pachón J, et al. Reliability of the E-Test Method for Detection of Colistin Resistance in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(2):903-5.
 146. Biocentric. Umic 2018. Available from: <https://www.biocentric.com/umic>
 147. Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*. 2009;49(11):1749-55.
 148. 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. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(10):3726-30.

149. Lee SY, Shin JH, Lee K, Joo MY, Park KH, Shin MG, et al. 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(6):1924-6.
150. Tamayo M, Santiso R, Otero F, Bou G, Lepe JA, McConnell MJ, et al. Rapid Determination of Colistin Resistance in Clinical Strains of *Acinetobacter baumannii* by Use of the Micromax Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(11):3675-82.
151. Nordmann P JA, Poirel L. . Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2016;22(6):1038-43.
152. Dortet L, Potron A, Bonnin RA, Plesiat P, Naas T, Filloux A, et al. Rapid detection of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* using MALDI-TOF-based lipidomics on intact bacteria. *Scientific reports*. 2018;8(1):16910.
153. Lescat M, Poirel L, Tinguely C, Nordmann P. A Resazurin Reduction-Based Assay for Rapid Detection of Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2019;57(3):e01563-18.
154. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. A Universal Culture Medium for Screening Polymyxin-Resistant Gram-Negative Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016;54(5):1395-9.
155. M. Przybysz S, Correa-Martinez C, Köck R, Becker K, Schaumburg F. SuperPolymyxin™ Medium for the Screening of Colistin-Resistant Gram-Negative Bacteria in Stool Samples 2018. 2809 p.
156. 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. *Journal of medical microbiology*. 2017;66(11):1554-61.
157. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins Revisited. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008;21(3):449-65.

158. 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. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012;74(4):412-4.
159. Sutherland CA, Nicolau DP. To add or not to add polysorbate 80: impact on colistin MICs for clinical strains of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* and quality controls. *J Clin Microbiol*. 2014;52(10):3810.
160. Humphries RM. Susceptibility Testing of the Polymyxins: Where Are We Now? *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2015;35(1):22-7.
161. International Organization for Standardization (ISO). Clinical Laboratory Testing and In Vitro Diagnostic Test Systems. Susceptibility Testing of Infectious Agents and Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices. Part 2: Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices. International Standard 20776-2. Geneva, Switzerland: ISO, 2007.
162. Castanheira M, Mendes RE, Jones RN. Update on Acinetobacter species: mechanisms of antimicrobial resistance and contemporary in vitro activity of minocycline and other treatment options. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2014;59 Suppl 6:S367-73.
163. Maraki S, Mantadakis E, Mavromanolaki VE, Kofteridis DP, Samonis G. A 5-year Surveillance Study on Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from a Tertiary Greek Hospital. *Infect Chemother*. 2016;48(3):190-8.
164. Pawar SK, Karande GS, Shinde RV, Pawar VS. Emergence of Colistin Resistant Gram Negative Bacilli, in a Tertiary Care Rural Hospital from Western India. *Indian Journal of Microbiology Research*. 2016;3(3):308-13.
165. Cikman A, Gulhan B, Aydin M, Ceylan MR, Parlak M, Karakecili F, et al. In vitro Activity of Colistin in Combination with Tigecycline against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Patients with Ventilator-Associated Pneumonia. *Int J Med Sci*. 2015;12(9):695-700.

166. Alada M. Çeşitli Antibiyotik Kombinasyonlarının *Acinetobacter* Suşları Üzerine İn Vitro Etkinliğinin Araştırılması. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, 2013, Erzurum (Danışman: Prof. Dr.Ülkü ALTOPARLAK).
167. Matsui M, Suzuki M, Suzuki M, Yatsuyanagi J, Watahiki M, Hiraki Y, et al. Distribution and Molecular Characterization of *Acinetobacter baumannii* International Clone II Lineage in Japan. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018;62(2):e02190-17.
168. Rosales-Reyes R, Gayosso-Vázquez C, Fernández-Vázquez JL, Jarillo-Quijada MD, Rivera-Benítez C, Santos-Preciado JI, et al. Virulence profiles and innate immune responses against highly lethal, multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* from a tertiary care hospital in Mexico. *PLoS One*. 2017;12(8):e0182899-e.
169. Liu C, Chang Y, Xu Y, Luo Y, Wu L, Mei Z, et al. Distribution of virulence-associated genes and antimicrobial susceptibility in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *Oncotarget*. 2018;9(31):21663-73.
170. Ağan İ. Karbapenem Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Sınıf D Beta Laktamaz Varlığının Genotipik Yöntemle Araştırılması. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, 2019, Erzurum (Danışman: Prof. Dr. Ülkü ALTOPARLAK).
171. Chen Y, Yang Y, Liu L, Qiu G, Han X, Tian S, et al. High prevalence and clonal dissemination of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in a Chinese hospital: a cross sectional study. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):491-.
172. Adriana C, Rosa dC, Kevin E-V, Marcela P, Mercedes R-B, Cristhian H-G, et al. Distinct Genetic Diversity of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* from Colombian Hospitals. *Microbial Drug Resistance*. 2018;24(1):48-54.
173. Engin A. *Acinetobacter*-Associated nosocomial infections in Cumhuriyet University Medical Faculty Research Hospital; Three years' experience. *Cumhuriyet Medical Journal*. 2017;39(3):555-63.
174. Eroğlu C, Ünal N, Karadağ A, Yılmaz H, Acuner İÇ, Günaydın M. Çeşitli klinik örneklerden 2006-2011 yılları arasında izole edilen *Acinetobacter* türleri ve

antibiyotik duyarlılıkları. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi. 2016;73(1):25-32.

175. 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*. 2018;73(5):1272-8.
176. Carretto E, Brovarone F, Russello G, Nardini P, El-Bouseary MM, Aboklaish AF, et al. Clinical Validation of SensiTest Colistin, a Broth Microdilution-Based Method To Evaluate Colistin MICs. *J Clin Microbiol*. 2018;56(4).
177. Tüzemen NÜ, Efe K, Akalın H, Özakın C, editors. Otomatize Sistemde Kolistin Direnci Saptanan İzolatların Gradyan Difüzyon Yöntemi ve Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemiyle Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi. Presented at the 4th National Congress of Clinical Microbiology; 2017.