

Gram Negatif Bakterilerde Modifiye Sıvı Disk Elüsyon Yöntemi ile Kolistin Direncinin Belirlenmesi

Determination of Colistin Resistance in Gram Negative Bacteria by Modified Broth Disk Elution Method

Nazmiye Ülkü Tüzemen[®], Özlem Işık[®], Bekir Akça[®], Cüneyt Özakin[®]

Bursa Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye

Atf/Cite as: Tüzemen NÜ, Işık Ö, Akça B, Özakin C. Gram negatif bakterilerde modifiye sıvı disk elüsyon yöntemi ile kolistin direncinin belirlenmesi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2022;52(3):184-191.

Öz

Amaç: Çalışmamız, kolistin direncini malzeme ve iş yükünden tasarruf ederek sıvı disk elüsyon (SDE) yönteminde kullanılan tüp ve kolistin diski sayısını azaltarak, iş yükü fazla olan tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarının kullanabileceği alternatif bir yöntemi sunmak ve referans yöntem ile performansını karşılaştırmak amacıyla yapılmıştır.

Yöntem: Hastanemizde 2020-2022 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 100 adet otomatize sistem ile kolistin duyarlı, 50 adet kolistin dirençli Gram negatif bakteri çalışmaya alınmıştır. Tek tüp ile yapılan modifiye SDE yönteminin ve otomatize sistemin sonuçları, referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemi ile kategorik uyum (KU), çok büyük hata (ÇBH) ve büyük hata (BH) oranları ile karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Otomatize sistemin tüm izolatlarda KU %86, ÇBH oranı %10.7 ve BH oranı %3.3 olarak bulunmuştur. Modifiye SDE yönteminin ise tüm izolatlarda KU %80, ÇBH oranı %4 ve BH oranı %16 olarak bulunmuştur. Otomatize sistemde ÇBH olarak yorumlanan 16 izolatın 10'u (%62.5) modifiye SDE yönteminde olması gerektiği gibi dirençli, BH olarak yorumlanan beş izolatın üçü (%60) ise modifiye SDE yönteminde olması gerektiği gibi duyarlı olarak saptanmıştır.

Sonuç: Çoğu mikrobiyoloji laboratuvarında antibiyotik duyarlılık testinde kullanılan otomatize sistemin KU'mu ISO standartlarına yakın olmasına rağmen, kolistin duyarlılığı açısından ÇBH oranının çok fazla olduğu, bunların modifiye SDE yöntemi ile çalışıldığında bu oranın azaldığı saptanmıştır. Özellikle günlük antibiyogram sayısı fazla olan mikrobiyoloji laboratuvarlarında kolistin duyarlılık sonuçlarının SMD yöntemi ile çalışılmadığı durumlarda, Enterobacteriaceae ve Pseudomonas spp. izolatlarında otomatize sistemde kolistin duyarlı ise modifiye SDE yöntemi ile çalışılmasının daha güvenilir bir sonuç verdiği görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Kolistin sıvı disk elüsyon yöntemi, BD Phoenix sistemi, kolistin sıvı mikrodilüsyon yöntemi

ABSTRACT

Objective: The aims of this study were to evaluate the performance of the Modified Broth Disk Elution (BDE) test with diminished test tubes and colistin disks, compare it with the reference method and consequently hope to present an alternative method for busy microbiology laboratories.

Method: A total of 100 colistin-susceptible and 50 colistin-resistant gram-negative bacteria, isolated from various clinical samples in our hospital between 2020-2022 with the automated system were included in this study. The results of the modified BDE method and the automated system were compared with the reference method as broth microdilution (BMD), with categorical agreement (CA), very major error (VME) and major error (ME) rates.

Results: Overall, the categorical agreement (CA) rate of the automated system was 86%, VME rate was 10.7%, and ME rate was 3.3%. In the modified BDE method, these rates were 80%, 4% and 16%, respectively. Ten of the 16 (62.5%) isolates which were interpreted as VME in the automated system, were found to be resistant in modified BDE method. Similarly, three of five (60%) isolates which were interpreted as ME, were found to be susceptible in the modified BDE method.

Conclusion: Although the CA of the automated system is close to ISO standards, it was found that the rate of VME was very high in terms of colistin sensitivity, and this rate decreased when these were studied with the modified BDE method. When colistin susceptibility tests could not be studied with the BMD method, and if isolates of Enterobacteriaceae and Pseudomonas spp. are found as susceptible in the automated system, the modified BDE method gives more reliable results.

Keywords: Colistin broth disk elution method, BD Phoenix system, colistin broth microdilution method

Alındığı tarih / Received:

17.05.2022 / 17.May.2022

Kabul tarihi / Accepted:

10.06.2022 / 10.June.2022

Erken çevrimiçi / First Published:

01.09.2022 / 01.September.2022

ORCID Kayıtları

N. Ü. Tüzemen 0000-0003-3544-3509

Ö. Işık 0000-0002-0928-0008

B. Akça 0000-0002-2153-6627

C. Özakin 0000-0001-5428-3630

✉ utuzemen@uludag.edu.tr

GİRİŞ

Antibiyotikler, bakteriyel enfeksiyonlarla savaşmak amacıyla insanlarda olduğu gibi hayvancılık ve su ürünleri yetiştiriciliğinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin gözetimsiz ve sürekli olarak kullanımı, bakteriler üzerinde seçici baskıya ve antibiyotik direnci prevalansında artışa yol açmaktadır. Antibiyotiğe dirençli bakteriler ve ilişkili antibiyotik direnç genleri çevresel kirleticiler olarak kabul edilirler^(1,2). Polimiksinler, ribozomal olmayan siklik oligopeptit yapıda antibiyotikler olup, kimyasal olarak ayırt edilebilen beş bileşiği (polimiksinler A, B, C, D ve E) mevcuttur. Polimiksin B ve kolistin (polimiksin E) şu anda piyasada bulunan iki polimiksindir⁽²⁾. Kolistin *Bacillus polymyxa*'dan üretilmiş olup, ilk olarak 1947 yılında klinik kullanıma girmiş, ancak daha sonra toksisitesi nedeniyle kullanımı azalmıştır⁽³⁾. Çoklu ilaca dirençli (MDR), aşırı artmış direnç (XDR) ve tüm ilaçlara dirençli (PDR) olguların ortaya çıkması, şiddetli bakteriyel enfeksiyonlara karşı son çare bir ilaç olan kolistin yeniden kullanılmasına yol açmıştır^(1,2).

Kolistin katyonik bir peptiddir ve Gram negatif bakterilerin dış membranında bulunan anyonik yapıdaki lipopolisakkaridlere bağlanır. Lipopolisakkarid moleküllerini bir arada stabil hâlde tutan divalent katyonların (Ca^{+2} , Mg^{+2}) yerini değiştirir ve bunun sonucu olarak dış membranda permeabilite artışı ve bakterinin ölümüne neden olur⁽⁴⁾. Polimiksin grubu antibiyotiklere direnç çeşitli mekanizmalarla olmaktadır. Bunlardan bazıları (i) dış membran porinlerinin spesifik modifikasyonu ve lipopolisakkaritlerin toplam negatif yükündeki azalmalar, (ii) dışa akış pompa sistemlerinin aşırı ekspresyonu, (iii) kapsül polisakkaritinin aşırı üretimi ve (iv) şimdye kadar enzimatik direnç mekanizmaları rapor edilmemiş olsa da, *B. polymyxa* suşlarının kolistinaz ürettiği bilinmektedir⁽⁵⁾. Fakat son yıllarda, edinilmiş kolistin direnci olguları bildirilmektedir. Kolistin direncinin kazanılmasına ya bir plazmitin (*mcr-1* ve *mcr-2*) aracılık ettiği ya da iki bileşenli PhoP/PhoQ ve PmrAB düzenleyici sistemlerindeki değişikliklerin veya mgrB dizisinin kesintiye uğramasının neden olduğu bulunmuştur⁽⁶⁾. Plazmit aracılı kolistin direncine yol açan *mcr-1* proteini ilk kez 2015 yılında *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*

izolatlarında tanımlanmış ve bunu takiben 2016 yılında *mcr-2* proteini tanımlanmıştır. Plazmit aracılı direnç mekanizmaları, yatay gen transferi ile hızlı bir şekilde türler arasında yayılım göstermesi ve salgın oluşturma potansiyeli taşımamasından dolayı, klinik ve epidemiyolojik açılarından oldukça önemlidir⁽⁷⁾. Ülkemizde ilk kez 2018 yılında *mcr-1* geni taşıyan *E. coli* suşu izole edilmiş⁽⁸⁾ ve bu tarihten itibaren kolistin direnci ülkemizde giderek artmıştır.

Kolistin büyük ve amfipatik yapısı, agarda difüzyonunu zorlaştırmakta ve bu nedenle duyarlılık testlerinde disk difüzyon ve gradiyen difüzyon metodunun kullanılması önerilmemektedir^(9,10). 2017 yılında "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" ve "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)" Polimiksin Eşik Değer Belirleme Çalışma Grubu çalışma grubu, ISO 20776 standardı gereğince kolistin duyarlılığının belirlenmesi için, sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemini "referans yöntem" olarak belirlemiştir⁽¹¹⁾. Fakat SMD yöntemi pratik bir yöntem olmadığı için rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında sık uygulanmamaktadır. Ekim 2018 yılında Simner ve ark.⁽¹²⁾ kolistin sıvı disk elüsyon (SDE) yöntemini tanımlamışlardır. Çalışmamız iş yükü fazla olan tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarının kullanabileceği alternatif bir yöntemi sunmak amacıyla yapılmıştır. Kolistin direncini, malzeme ve iş yükünden tasarruf ederek modifiye bir SDE yöntemini geliştirmek ve referans yöntem ile performansını karşılaştırmak amacıyla yapılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (11.05.2022 tarih ve 2022-10/38 Karar No.) onaylanmıştır.

Bakteri izolatları: Nisan 2020 ile Nisan 2022 tarihleri arasında hastanemiz Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen, "matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry" (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonik, Bremen, Almanya) ile isimlendirilen, 100 adet Phoenix™ M50 (Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD) otomatize sistemiyle

kolistin duyarlı, 50 adet kolistin dirençli Gram negatif bakteri izolatu randomize olarak seçilmiştir. Yapılan bir çalışmada, Phoenix otomatize sistemiyle dirençli kolistin suşlarının tümünün referans yöntem olan SMD yöntemi ile de dirençli saptanması nedeniyle dirençli suş sayısını daha az tutulmuştur⁽¹³⁾. Farklı zaman dilimlerinde yatan her hastadan yalnızca bir izolat çalışmaya dâhil edilmiştir. *E. coli* ATCC 25922 (kolistin duyarlı) ve *E. coli* NTCC 13846 (kolistin dirençli) kalite kontrol suşu olarak kullanılmıştır. İzolatlar çalışılana kadar -70°C'de gliserollü saklama besiyerlerinde korunmuştur.

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi: Aktif madde olan kolistin sülfat (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ABD) üreticinin önerileri doğrultusunda süspansiyon hâline getirilerek stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Stok solüsyondan Mueller-Hinton sıvı besiyerinde seri dilüsyonlar (0.125-64 µg/ml) hazırlanarak mikrodilüsyon plaklarına aktarılmıştır. Tüm izolatlardan 0.5 McFarland standardı bulanıklığında süspansiyon hazırlandıktan sonra son bakteri konsantrasyonu 5×10⁵ CFU/ml olacak şekilde mikrodilüsyon plaklarına eklenmiştir. Mikroplaklar 18-20 saat 35°C'de inkübe edilmiştir. Üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon kolistin için MİK değeri olarak belirlenmiştir. Her bir mikroplakta *E. coli* ATCC 25922 ve *E. coli* NTCC 13846 kalite kontrol suşu olarak kullanılmıştır.

Modifiye sıvı disk elüsyon testi: Simner'in⁽¹²⁾ SDE yönteminde 10 ml katyon eklenmiş Mueller Hinton sıvı besiyeri içeren dört adet tüp kullanılır. İlk tüp üreme kontrolü olarak kullanılır ve içerisine kolistin diski (10 µg) konmaz. Çalışmadan en az yarım saat önce ikinci, üçüncü ve dördüncü tüplere sırasıyla bir, iki ve dört adet kolistin diski (10 µg) eklenir ve oda ısısında inkübe edilir. Her tüpe 0.5 McFarland standardı bulanıklığına eşdeğer bulanıklıkta hazırlanan bakteri süspansiyonundan 50 µl eklenerek son bakteri konsantrasyonu 7.5×10⁵ CFU/ml olacak şekilde süspansiyon hazırlanır. 35°C'de 16-20 saat inkübasyon sonrası minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri hesaplanır. EUCAST standartlarına göre kolistin MİK değeri Enterobacteriaceae ve *Acinetobacter* spp. için 2 µg/ml, *Pseudomonas* spp. için 4 µg/ml'dir⁽¹⁴⁾.

Çalışmamızda, Simner'in⁽¹²⁾ bu yöntemi modifiye edilmiştir. Beş ml katyon eklenmiş Mueller Hinton sıvı besiyeri içerisine *Enterobacteriaceae* ve *Acinetobacter* spp. için bir adet kolistin diski konularak MİK değeri 2 µg/ml olan kolistin SDE tüpü, *Pseudomonas* spp. için iki adet kolistin diski konularak MİK değeri 4 µg/ml olan kolistin SDE tüpü ile çalışılmıştır. Her tüpe 0.5 McFarland standardı bulanıklığına eşdeğer bulanıklıkta hazırlanan bakteri süspansiyonundan 25 µl eklenerek 35°C'de 16-20 saat inkübasyon sonrası bu tüpte bulanıklık olması durumunda kolistin dirençli, bulanıklık olmaması durumunda duyarlı olarak yorumlanmıştır. Kalite kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 ve *E. coli* NTCC 13846 kullanılmıştır.

Yöntemlerin karşılaştırılması: Kategorik uyum (KU) test suşunun CLSI, EUCAST vb. kriterlerine göre yorumlanan duyarlılık sonuçlarının (duyarlı, yüksek dozda duyarlı, dirençli) uyumu; temel uyum (TU) ise test edilen suşun antibiyotik MİK'inin ±1 çift kat dilüsyon içindeki uyumu olarak tanımlanır. Küçük hata (KH) bir antibiyotik duyarlılık testinde yüksek dozda duyarlı sonuç bulunurken, referans testinde duyarlı veya dirençli sonuç alınması anlamına gelmektedir. Çok büyük hata (ÇBH) referans test yöntemiyle dirençli bulunan bir suşun, test edilecek antibiyotik duyarlılık testiyle duyarlı sonuç vermesi anlamına gelmektedir. Büyük hata (BH) ise referans test yöntemiyle duyarlı bulunan bir suşun, test edilecek antibiyotik duyarlılık testiyle dirençli sonuç vermesi demektir⁽¹⁵⁾. Referans test olan SMD sonuçlarıyla, Phoenix™ M50 ve modifiye SDE yöntemi sonuçları karşılaştırılmış ve KU, ÇBH ve BH oranları hesaplanmıştır. ISO⁽¹⁶⁾ tarafından belirlenen kriterlere göre kabul edilebilir performans, KU için ≥%90; ÇBH ve BH'ler için ≤%3 olarak belirlenmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızda, 80 *Acinetobacter* spp. (79 *Acinetobacter baumannii*, 1 *Acinetobacter nosocomialis*), 54 *Enterobacteriaceae* (45 *Klebsiella pneumoniae*, 5 *E. coli*, 1 *Enterobacter asburiae*, 1 *Enterobacter cloacae*, 1 *Klebsiella oxytoca*, 1 *Klebsiella variicola*) ve 16 *Pseudomonas* spp. (15 *Pseudomonas aeruginosa*, 1 *Pseudomonas putida*) olmak üzere

150 suş kullanılmıştır. Çalışma izolatlarının klinik dağılımı; %60.6 (n=91) erişkin yoğun bakım klinikleri, %16.7 (n=25) erişkin cerrahi branş klinikleri, %12 (n=18) erişkin dâhili branş klinikleri, %10.7 (n=16) çocuk sağlığı klinikleri şeklindedir. İzolatların %53.3'ü (n=80) solunum yolu örneği, %23.3'ü (n=35) steril vücut sıvısı örneği, %22.7'si (n=34) yara yeri ve ameliyat materyali örneği, %0.7'si (n=1) idrar örneğidir. Tüm izolatların referans yöntem olan SMD yöntemi ile MİK değerlerinin dağılımı Tablo 1'de verilmiştir.

Referans yöntem ile kıyaslandığında, Phoenix Sisteminin tüm izolatlarda KU %86 ile ÇBH oranı %10.7, BH oranı %3.3 olarak bulunmuştur (Tablo 2). Phoenix Sisteminde ÇBH olarak yorumlanan 16 izolatın

14'ü *Acinetobacter baumannii*, ikisi *K. pneumoniae* izolatıdır. Bu 14 *A. baumannii* izolatının modifiye SDE yönteminde sekizi (%57.1) dirençli, altısı (%42.9) duyarlı olarak saptanmıştır. Phoenix Sisteminde ÇBH olarak yorumlanan iki *K. pneumoniae* izolatı modifiye SDE yönteminde referans yöntemde olduğu gibi dirençli olarak belirlenmiştir. Phoenix Sisteminde BH olarak yorumlanan beş izolatın dağılımı ise bir *K. oxytoca*, bir *K. pneumoniae*, iki *A. baumannii* ve bir *P. aeruginosa* şeklindedir. *A. baumannii* izolatlarından biri modifiye SDE yöntemi ile duyarlı, biri dirençli saptanmıştır. *Enterobacteriaceae* ailesinden olan *Klebsiella* spp. suşlarından da biri modifiye SDE yöntemi ile duyarlı, biri dirençli saptanmıştır. *P. aeruginosa* suşu ise modifiye SDE yöntemi ile referans yöntemde olduğu gibi duyarlı olarak saptanmıştır.

Tablo 1. İzolatların sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK değerlerine göre dağılımı

Mikroorganizma	İzolatların MİK değerlerine göre dağılımı (µg/ml)											
	<0.5	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
<i>Acinetobacter spp.</i>	19	0	25	8	7	3	2	2	2	2	2	8
<i>Enterobacteriaceae</i>	19	0	2	0	2	3	4	9	9	5	1	0
<i>Pseudomonas spp.</i>	3	0	10	1	2	0	0	0	0	0	0	0
Total	41	0	37	9	11	6	6	11	11	7	3	8

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu.

Tablo 2. İzolatların kolistin duyarlılığının sıvı mikrodilüsyon yöntemi, Phoenix sistemi ve modifiye sıvı disk elüsyon yöntemi ile karşılaştırılması

Yöntem	İzolat Grupları	Duyarlı	Dirençli	KU	ÇBH	BH
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
SMD	Tüm izolatlar	89 (59.3)	61 (40.7)			
	<i>Acinetobacter spp.</i>	52 (65)	28 (35)			
	<i>Enterobacteriaceae</i>	21 (38.9)	33 (61.1)			
	<i>Pseudomonas spp.</i>	16 (100)	0			
Phoenix Sistemi	Tüm izolatlar	100 (66.7)	50 (33.3)	129 (86)	16 (10.7)	5 (3.3)
	<i>Acinetobacter spp.</i>	64 (80)	16 (20)	64 (80)	14 (17.5)	2 (2.5)
	<i>Enterobacteriaceae</i>	21 (38.9)	33 (61.1)	50 (92.6)	2 (3.7)	2 (3.7)
	<i>Pseudomonas spp.</i>	15 (93.7)	1 (6.2)	15 (93.7)	0	1 (6.2)
Modifiye SDE	Tüm izolatlar	71 (47.3)	79 (52.7)	120 (80)	6 (4)	24 (16)
	<i>Acinetobacter spp.</i>	42 (52.5)	38 (47.5)	58 (72.5)	6 (7.5)	16 (20)
	<i>Enterobacteriaceae</i>	13 (24.1)	41 (75.9)	46 (85.2)	0	8 (14.8)
	<i>Pseudomonas spp.</i>	16 (100)	0	16 (100)	0	0

TARTIŞMA

Geniş spektrumlu beta-laktamaz ve karbapenemaz direnci, *Enterobacteriaceae*'lerde MDR ortaya çıkmasına neden olurken, bu durum uygun antibiyoterapi seçiminde zorluk yaratmış ve kolistin kullanımında artışa neden olmuştur. Fakat günümüzde kolistin direncinin de giderek yaygınlaşmasıyla tedavi seçenekleri giderek azalmıştır. Plazmit aracılı *mcr-1* geninin yayılması ile kolistin direnci hayvanlar, gıda ürünleri ve insanlar gibi çok çeşitli konakçılar arasında kısa sürede yayılmıştır^(17,18). Amerika'da 2017 yılında çok merkezli yapılan iki çalışmada, karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında kolistin direnci oranı %13 ve %16 olarak bildirilirken, İtalya'da 2014 yılında yapılan çok merkezli çalışmada aynı oran %43 olarak bildirilmiştir⁽¹⁹⁾. Ülkemizde 2018 yılında karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae*'larda (CRE) yapılan bir çalışmada, referans yöntem olan SMD ile kolistin direncinin %76.19 olduğu ve MDR ve XDR suşları için düzenli bir izleme sistemine gereksinim duyulduğu bildirilmiştir⁽²⁰⁾. Ülkemizde 2017 yılında yapılan çok merkezli bir çalışmada, *mcr-1* veya *mcr-2* gen bölgesi saptanmamış olmasına rağmen, ilk kez 2018 yılında *mcr-1* geni taşıyan *E. coli* suşu izole edilmiş^(7,8) ve bu tarihten itibaren kolistin direnci ülkemizde giderek artmıştır. Ülkemizdeki bu yüksek direnç oranı⁽²⁰⁾, *mcr-1* geninin yayılması ile kolistin direncinin artışını dramatik olarak göstermesi açısından anlamlıdır.

Sıvı disk elüsyon yöntemi ilk defa yaklaşık 45 yıl önce tanımlanmış olup, anaeroplara için CLSI tarafından onaylanmıştır⁽¹⁹⁾. Kolistin için ise ilk defa Ekim 2018'de Simner ve ark.⁽¹²⁾ klinik laboratuvarların kullanımına uygun olarak SDE metodunu geliştirmiş ve referans yöntem ile karşılaştırıldığında, KU'un %98, TU'un %99 olduğunu bildirmişlerdir. CLSI ise bu yöntemi 2019 yılında, yaptığı bir çalışmanın verilerini yayınlarken *Enterobacteriaceae* ve *P. aeruginosa* için onayladığını ve KU'un %97.9, ÇBH oranının %3.2 ve BH oranının %0.9 olduğunu bildirmiştir⁽²¹⁾. Bell ve ark.⁽²²⁾ ise bu yöntemi biraz daha geliştirmiş, plazmit aracılı kolistin direncini tespit etmek amacıyla EDTA varlığında kolistin MİK'deki azalmayı araştırmış ve EDTA'lı SDE MİK değeri ile EDTA'sız SDE MİK değerini karşılaştırmışlardır. EDTA'lı SDE yönteminin moleküler genotip sonuçlarının duyarlılığının %100,

özgüllüğünün ise %95.8 olduğunu bildirmişlerdir. Fenwick ve ark.⁽²³⁾ EDTA'lı kolistin SDE yöntemi ile plazmid aracılı kolistin direncini araştırmış, moleküler yöntemlerle doğruladıkları Gram negatif basillerdeki *mcr* geni pozitifliği ile karşılaştırmış ve pozitif prediktif değerin %100, negatif prediktif değerin ise %94.3 olduğunu bildirmişlerdir. Cielo ve ark.⁽²⁴⁾ ise polimiksin B için SDE yöntemini referans metot ile karşılaştırmış ve KU'un %99.5, BH'nın %0, ÇBH'nın %1.11 olduğunu bildirmişlerdir. Fransa'da yapılan bir çalışmada, CRE izolatlarında kolistin direncini belirlemek için altı fenotipik yöntem ile SMD yöntemi karşılaştırılmış ve kolistin SDE yönteminin kategorik uyumunun %100 olduğu bildirilmiştir⁽²⁵⁾. Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise, kolistin SDE testi SMD yöntemi ile karşılaştırılmış ve KU %99.3, ÇBH oranı, %0.2 ve BH oranı %0.5 olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada, BD Phoenix yönteminin KU %95, ÇBH oranı %5 olarak bildirilmiştir⁽⁹⁾.

Brezilya'da yapılan bir çalışmada, kolistin direncini tespit etmek için yöntemimize benzer bir yöntem uygulanmış, kolistin elüsyon duyarlılık tarama test tüpü yöntemi ile SMD yöntemi karşılaştırılmış⁽²⁶⁾. Beş ml katyon eklenmiş Mueller Hinton sıvı besiyeri içerisine tüm Gram negatif bakteriler için (*Pseudomonas* spp. dâhil) bir adet kolistin diski konularak, ek olarak üreme kontrolü için kolistin diski olmayan 5 ml katyon eklenmiş Mueller Hinton sıvı besiyeri ile birlikte çalışılmışlar. *Enterobacteriaceae* için KU'un %91.18, ÇBH oranının %6.98 ve BH oranının %12 olduğunu bildirmişlerdir. Non-fermentatif Gram negatif bakteriler için KU'un 82.35, ÇBH oranının %37.5 ve BH oranının %0 olduğunu açıklamışlardır⁽²⁶⁾.

Laboratuvarımızda Phoenix™ M50 otomatize sistemi kullanılmaktadır. Daha önce laboratuvarımızda otomatize sistem ile kolistin dirençli Gram negatif bakteriler ile yaptığımız çalışmada, otomatize sistemin KU'u tüm izolatlar için %92, *K. pneumoniae* için %100, *A. baumannii* için %77.8 ve *P. aeruginosa* için %60 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada, kolistin direnci yeni artmaya başladığı için otomatize sistemde kolistin duyarlı örnekler çalışılmamıştır⁽²⁷⁾. Şimdiki çalışmamızda ise hem kolistin dirençli hem de kolistin duyarlı örnekler birlikte çalışılmıştır. Otomatize sistemin KU'u tüm izolatlar için %86,

Enterobacteriaceae için %92.6, *Acinetobacter* spp. için %80 ve *Pseudomonas* spp. için %93.7 olduğu ve ISO standartlarına göre *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas* spp. için yapılan kolistin duyarlılık sonucunun kabul edilebilir düzeyde olduğu saptanmıştır. Modifiye SDE yönteminin KU ise tüm izolatlardan için %80, *Enterobacteriaceae* için %85.2, *Acinetobacter* spp. için %72.5 ve *Pseudomonas* spp. için %100 olarak saptanmıştır. Bu yöntemle ise yalnızca *Pseudomonas* spp. izolatlarda kabul edilebilir düzeyde bulunmuştur.

Çokbüyük hata otomatize sistemin duyarlı sonuç verip referans yöntem ile sonucun aslında dirençli olması demektir. Phoenix™ M50 otomatize sisteminde tüm izolatlardan için ÇBH oranı %10.7, *Acinetobacter* spp. için %17.5, *Enterobacteriaceae* için %3.7 ve *Pseudomonas* spp. için %0 olarak bulunmuştur. En fazla ÇBH oranının *Acinetobacter* spp. izolatlarda olduğu ve ISO standartlarına uygun olmadığı saptanmıştır. Bu izolatlardan modifiye SDE yöntemi ile çalıştığımızda, sekizinin (%57.1) referans yöntemde olması gerektiği gibi dirençli, altısının (%42.9) ise yine duyarlı olduğu bulunmuştur. ÇBH sonucu veren iki *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*) modifiye SDE yönteminde de olması gerektiği gibi dirençli olarak saptanmıştır. Modifiye SDE yönteminde ise tüm izolatlarda ÇBH oranı %4 olup, *Acinetobacter* spp. izolatlarda %6, diğer izolatlarda ise ÇBH oranının gözlemlenmediği saptanmıştır. CLSI'nin SDE yöntemini yalnızca *Enterobacteriaceae* ve *P. aeruginosa* için onayladığı göz önünde bulundurulduğunda modifiye SDE yönteminin de kabul edilebilir sınırlarda olduğu saptanmıştır. BH otomatize sistemin dirençli sonuç verip referans yöntem ile sonucun aslında duyarlı olması durumudur. Tüm izolatlardan içinde otomatize sistemde BH sonucu veren beş örneğin ise üçünün (%60) modifiye SDE yöntemi ile olması gerektiği gibi duyarlı sonuç verdiği saptanmıştır. Modifiye SDE yönteminde ise BH oranı *Acinetobacter* spp. ve *Enterobacteriaceae* için ISO standartlarını karşılamamaktadır.

Sonuç olarak, çoğu mikrobiyoloji laboratuvarında antibiyotik duyarlılık testinde kullanılan otomatize sistemin KU'mu ISO standartlarına yakın olmasına rağmen, kolistin duyarlılığı açısından ÇBH oranının çok fazla olduğu, aynı zamanda BH oranına kıyasla

daha fazla olduğu ve bunların modifiye SDE yöntemi ile çalışıldığında bu oranın azaldığı saptanmıştır. Bu nedenle otomatize sistemde Gram negatif bakterilerde özellikle *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas* spp. izolatlarda, kolistin duyarlı ise modifiye SDE yöntemi ile çalışılmasının daha güvenilir bir sonuç verdiği görülmüştür. Ayrıca modifiye SDE yöntemi, *Acinetobacter* spp. izolatlarda gerek BH gerekse ÇBH oranlarının yüksek olması nedeniyle kullanılmamalıdır. Özellikle günlük antibiyogram sayısı fazla olan mikrobiyoloji laboratuvarlarında kolistin duyarlılık sonuçlarının SMD yöntemi ile çalışılmadığı durumlarda *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas* spp. izolatlarda bu yöntemin kullanılması düşünülebilir.

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma, Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (11.05.2022 tarih ve 2022-10/38 Karar No.) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Yoktur/bildirilmemiştir.

Ethics Committee Approval: This study was conducted with the approval of Uludağ University, Clinical Research Ethics Committee (05.11.2022; 2022-10/38).

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Funding: None/not declared.

KAYNAKLAR

1. Gogry FA, Siddiqui MT, Sultan I, Haq QMR. Current update on intrinsic and acquired colistin resistance mechanisms in bacteria. *Front Med (Lausanne)*. 2021;12;8:677720. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.677720>
2. El-Sayed Ahmed MAE, Zhong LL, Shen C, Yang Y, Doi Y, Tian GB. Colistin and its role in the era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):868-85. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1754133>
3. Boinett CJ, Cain AK, Hawkey J, et al. Clinical and laboratory-induced colistin-resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii*. *Microb Genom.* 2019;5(2):e000246. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000246>

4. Matzneller P, Strommer S, Österreicher Z, Mitteregger D, Zeitlinger M. Target site antimicrobial activity of colistin might be misestimated if tested in conventional growth media. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(10):1989-94.
<https://doi.org/10.1007/s10096-015-2441-7>
5. Bialvaei AZ, Samadi Kafil H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Curr Med Res Opin*. 2015;31(4):707-21.
<https://doi.org/10.1185/03007995.2015.1018989>
6. Ben-Chetrit E, Mc Gann P, Maybank R, Stam J, Assous MV, Katz DE. Colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: Old drug, bad bug. *Arch Microbiol*. 2021;203(6):2999-3006.
<https://doi.org/10.1007/s00203-021-02289-4>
7. Sarı AN, Süzük S, Karatuna O, ve ark. Ülkemizde klinik *Enterobacteriaceae* izolatlarında plazmit aracılı kolistin direnç genlerini (*mcr-1* ve *mcr-2*) araştıran çok merkezli çalışmaya ait sonuçlar. *Mikrobiyol Bul*. 2017;51(3):299-303.
<https://doi.org/10.5578/mb.57515>
8. Kurekci C, Aydın M, Nalbantoglu OU, Gundogdu A. First report of *Escherichia coli* carrying the mobile colistin resistance gene *mcr-1* in Turkey. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018;15:169-170.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.09.013>
9. Koyuncu Özyurt Ö, Özhak B, Öğünç D, ve ark. Kolistin gram-negatif bakterilere in vitro etkinliğinin belirlenmesinde BD Phoenix100 sistemi ve kolistin sıvı disk elüsyon yöntemlerinin değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*. 2019;53(3):254-261.
<https://doi.org/10.5578/mb.68066>
10. Lo-Ten-Foe JR, de Smet AM, Diederer BM, Kluytmans JA, van Keulen PH. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, Etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(10):3726-30.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01406-06>
11. EUCAST. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E). As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Basel, 2016. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf] (Erişim tarihi: 1 Mart 2018).
12. Simner PJ, Bergman Y, Trejo M, et al. Two-site evaluation of the colistin broth disk elution test to determine colistin in vitro activity against Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol*. 2019;30;57(2):e01163-18.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01163-18>
13. Pfennigwerth N, Kaminski A, Korte-Berwanger M, et al. Evaluation of six commercial products for colistin susceptibility testing in *Enterobacterales*. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(11):1385-9.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.017>
14. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, 2022. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. [<http://www.eucast.org>] (Erişim tarihi: 1 Mart 2018).
15. CLSI. Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters. Approved Guideline. 3rd ed. CLSI Document M23-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA: 2008.
16. ISO 20776-2:2007. 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 Organization for Standardization. Geneva: ISO [<https://www.iso.org/standard/41631.html>] (Erişim tarihi: 1 Nisan 2022).
17. Lin YC, Kuroda M, Suzuki S, Mu JJ. Emergence of the *mcr-1* colistin resistance gene in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *J Glob Antimicrob Resist*. 2021;24:278-84.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.12.024>
18. Zhang S, Abbas M, Rehman MU, et al. Updates on the global dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli*: An emerging threat to public health. *Sci Total Environ*. 2021;10;799:149280.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149280>
19. Satlin MJ. The search for a practical method for colistin susceptibility testing: Have we found it by going back to the future? *J Clin Microbiol*. 2019;0;57(2):e01608-18.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01608-18>
20. Süzük Yıldız S, Kaşkatepe B, Şimşek H, Sarıgüzel FM. High rate of colistin and fosfomycin resistance among carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2019;1;66(1):103-12.
<https://doi.org/10.1556/030.65.2018.042>
21. Humphries RM, Green DA, Schuetz AN, et al. Multicenter evaluation of colistin broth disk elution and colistin agar test: a report from the Clinical and Laboratory Standards Institute. *J Clin Microbiol*. 2019;23;57(11):e01269-19.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01269-19>

22. Bell DT, Bergman Y, Kazmi AQ, Lewis S, Tamma PD, Simner PJ. A novel phenotypic method to screen for plasmid-mediated colistin resistance among *Enterobacteriales*. *J Clin Microbiol*. 2019;26;57(5):e00040-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.00040-19>
23. Fenwick AJ, Bergman Y, Lewis S, et al. Evaluation of the NG-Test MCR-1 Lateral flow assay and EDTA-colistin broth disk elution methods to detect plasmid-mediated colistin resistance among Gram-negative bacterial isolates. *J Clin Microbiol*. 2020;25;58(4):e01823-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01823-19>
24. Cielo NC, Belmonte T, Raro OHF, et al. Polymyxin B broth disk elution: a feasible and accurate methodology to determine polymyxin B susceptibility in *Enterobacteriales*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020;98(2):115099. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115099>
25. Földes A, Székely E, Voidăzan ST, Dobreanu M. Comparison of six phenotypic assays with reference methods for assessing colistin resistance in clinical isolates of carbapenemase-producing *Enterobacteriales*: Challenges and opportunities. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(3):377. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030377>
26. Dalmolin TV, Mazzetti A, Ávila H, et al. Elution methods to evaluate colistin susceptibility of Gram-negative rods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020;96(1):114910. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114910>
27. Tüzemen NÜ, Efe K, Akalın H, Özakın C. Retrospective evaluation of colistin-resistant isolates in automated system by gradient diffusion method and broth microdilution method. *Klimik Derg*. 2019;32(1):57-61. <https://doi.org/10.5152/kd.2019.13>