

Acinetobacter, Pseudomonas ve Enterobacterales Türlerinde Kolistin Duyarlılığının Belirlenmesinde Kolistin Sıvı Disk Elüsyon, Hızlı Resapolimiksin NP ve Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Comparision of Colistin Broth Disc Elution, Rapid Resapolymyxin NP and Broth Microdilution Methods in Determining Colistin Sensitivity in *Acinetobacter*, *Pseudomonas* and *Enterobacterales* species

Ayşenur SARIKAYA¹(ID), İpek MUMCUOĞLU¹(ID), Irmak BARAN²(ID), Altan AKSOY³(ID), Bedia DİNÇ¹(ID)

¹ Ankara Şehir Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara, Türkiye.

¹ Ankara City Hospital, Laboratory of Medical Microbiology, Ankara, Türkiye.

² Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon, Türkiye.

² Karadeniz Technical University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Trabzon, Türkiye.

³ Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara, Türkiye.

³ Ankara Training and Research Hospital, Laboratory of Medical Microbiology, Ankara, Türkiye.

Makale Atfı: Sarıkaya A, Mumcuoğlu İ, Baran I, Aksoy A, Dinç B. *Acinetobacter*, *Pseudomonas* ve *Enterobacterales* türlerinde kolistin duyarlılığının belirlenmesinde kolistin sıvı disk elüsyon, hızlı resapolimiksin NP ve sıvı mikrodilüsyon yöntemlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2022;56(3):404-415.

ÖZ

Son yıllarda *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacterales* türlerinde karbapenem direncinin artmasıyla birlikte, tedavide kolistin kullanımı giderek artış göstermiştir. Kolistin duyarlılık testlerinde referans yöntem olarak önerilen sıvı mikrodilüsyon yönteminin zahmetli ve pahalı olması, diğer duyarlılık yöntemlerinin de güvenilir sonuçlar vermemesi nedeniyle, laboratuvarlar kolistin duyarlılığının belirlenmesinde yeni yöntem arayışına girmişlerdir. Bu çalışmada; sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyon etkeni olarak sık görülen *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacterales* türlerinin kolistin duyarlılığının belirlenmesinde; referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile kolistin sıvı disk elüsyon ve hızlı resapolimiksin NP testlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ankara Şehir Hastanesinde yatan hastalardan izole edilen toplam 157 izolatın kolistin duyarlılığı [*Klebsiella pneumoniae* (n= 74), *Acinetobacter* spp. (n= 33), *Escherichia coli* (n= 26), *Pseudomonas aeruginosa* (n= 24)] sıvı mikrodilüsyon, kolistin sıvı disk elüsyon ve hızlı resapolimiksin NP yöntemleriyle test edilmiştir. Referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon sonuçları, kolistin sıvı disk elüsyon ve hızlı resapolimiksin NP sonuçlarıyla karşılaştırılarak kategorik ve temel uyumları değerlendirilmiştir. Sıvı mikrodilüsyon ile kıyaslandığında, kolistin sıvı disk elüsyon testinin *Enterobacterales*, *Acinetobacter*,

Pseudomonas türleri için kategorik uyumu sırasıyla: %93, %48, %100 bulunmuştur. Temel uyum değerlendirildiğinde ise sırasıyla; %95, %45, %100 değerleri bulunmuştur. Çok büyük hata oranları sırası ile %10, %70, %0 bulunmuştur. Hızlı resapolimiksin NP testinin *Enterobacteriales*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* türleri için kategorik uyumu sırası ile: %85, %36, %100 iken, çok büyük hata oranları sırası ile %10, %88, %0 bulunmuştur. Referans yöntem ile kıyaslandığında her iki test *Pseudomonas* türleri için yüksek kategorik ve temel uyum göstermiştir. *Enterobacteriales* türleri için kolistin sıvı disk elüsyonda kabul edilir düzeyde kategorik ve temel uyum, hızlı resapolimiksin NP de düşük kategorik uyum bulunmuştur. *Acinetobacter* türleri için her iki test için düşük kategorik uyum ve yüksek oranda çok büyük hata saptanmıştır. Her iki yöntem sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile kıyaslandığında; hem kolistin sıvı disk elüsyon hem de hızlı resapolimiksin NP testlerinin maliyetlerinin daha düşük ve hazırlanmalarının daha kolay olduğu tespit edilmiştir. Hızlı polimiksin NP testinin dört saatte sonuç vermesinin ek bir avantaj olduğu düşünülmüştür. Sonuç olarak çalışmamızda; *P.aeruginosa* ve *Enterobacteriales* türleri için kolistin duyarlılığının belirlenmesinde hem kolistin sıvı disk elüsyon hem de hızlı resapolimiksin NP test yönteminin kullanılabileceği gösterilirken, *Acinetobacter* türleri için her iki yöntemin de başarısız olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Kolistin; sıvı mikrodilüsyon; kolistin sıvı disk elüsyon testi; hızlı resapolimiksin NP testi.

ABSTRACT

In recent years, with the increase of carbapenem resistance in *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriales* species, the use of colistin in treatment has gradually increased. Since the broth microdilution method which is recommended as a reference method in colistin susceptibility tests, is laborious and expensive and other susceptibility tests do not give reliable results, all these cause laboratories to search for new methods for the determination of colistin susceptibility testing. In this study, it was aimed to compare the broth microdilution method which is the reference method with the colistin broth disc elution and rapid resapolymyxin NP tests for the determination of the susceptibility of colistin in *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriales* species which are common healthcare-associated infection agents. Colistin susceptibility of a total of 157 isolates isolated from patients hospitalized in Ankara City Hospital [*Klebsiella pneumoniae* (n= 74), *Acinetobacter* spp. (n= 33), *Escherichia coli* (n= 26), *Pseudomonas aeruginosa* (n= 24)] were tested by broth microdilution, colistin broth disc elution and rapid resapolymyxin NP methods. The categorical and basic agreement was evaluated by comparing the broth microdilution results with the rapid resapolymyxin NP results and the colistin broth disc elution. When compared with broth microdilution, the categorical agreement of colistin broth disc elution test for *Enterobacteriales*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* species was found to be 93%, 48%, 100%, respectively. When the essential agreement was evaluated the values of 95%, 45%, 100% were found, respectively. Very major error rates were found to be 10%, 70% and 0%, respectively. The categorical agreement of the rapid resapolymyxin test for *Enterobacteriales*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* species was 85%, 36%, 100%, while very major error rates were found to be 10%, 88% and 0%, respectively. When compared with the reference method, both tests showed high categorical and essential agreements for *P.aeruginosa*. Accepted level of categorical and essential agreement was found in colistin broth disc elution method for *Enterobacteriales* species, and low categorical agreement was found in rapid resapolymyxin NP test. For *Acinetobacter* species, both tests detected low categorical agreement and high rate of very major error. In addition, compared to the broth microdilution method, both colistin broth disc elution and rapid resapolymyxin NP tests were found to be cost-effective and easy to prepare. It was considered to be an additional advantage to have the results in rapid polymyxin NP test in four hours. In conclusion, in our study, it was shown that both colistin broth disc elution and rapid resapolymyxin NP test methods can be used in determining the susceptibility of colistin for *P.aeruginosa* and *Enterobacteriales* species but both methods were found to be unsuccessful for *Acinetobacter* species.

Keywords: Colistin; broth microdilution; colistin broth disc elution; rapid resapolymyxin NP.

GİRİŞ

Sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyon etkeni olarak, son yıllarda artan sıklıkta gözlenen *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacteriales* üyesi gram-negatif bakterilerde çoklu ilaç direnci hızla artmaktadır^{1,2}. Orta Asya ve Doğu Avrupa'nın Anti-

mikrobiyal Direnç Sürveyansı (CAESAR) verilerine göre, Türkiye'de 2018 yılında kan ve beyin omurilik sıvısından elde edilen *Acinetobacter* türlerinde karbapenem direnci %92, *Pseudomonas* türlerinde bu direnç %38, *K.pneumoniae* de %34 olarak bildirilmiştir³. Günümüzde bu enfeksiyonların tedavisinde, eski bir antibiyotik olan kolistin, tedavide sıklıkla son seçenek olarak kullanılmaktadır. Kolistin kullanımına duyulan ihtiyaç arttıkça kolistin duyarlılık testleri önem kazanmıştır ancak yapılan çalışmalar kolistin duyarlılığının güvenilir olarak belirlenmesinde güçlükler olduğunu ortaya koymuştur¹. Rutin laboratuvarlarda kolayca uygulanan disk difüzyon ve gradient test yöntemleri ile güvenilir sonuçlar alınamamaktadır. Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi [European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)] ve Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü [Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)] tarafından kolistin duyarlılığının belirlenmesinde sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemini tek referans yöntem olarak tanımlanmıştır^{4,5}. SMD, nitelikli iş gücü gerektiren, zaman alıcı, karışık adımlar içeren, rutin laboratuvarlarda uygulaması zor bir yöntemdir⁶. Bu nedenle, laboratuvarlar için kullanımı daha kolay alternatif yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu amaçla Simner ve arkadaşları⁷ tarafından gram-negatif bakterilerde kolistin duyarlılığının belirlenmesinde "kolistin sıvı disk elüsyon" (KSDE) yöntemi geliştirilmiştir. Lescat ve arkadaşları⁸ tarafından da hem non-fermenter hem de enterik bakterilerde çalışılabilen ve kolistin dirençli ya da duyarlı şeklinde yorumlanabilen hızlı resapolimiksin NP (HRPNP) testi geliştirilmiştir.

Bu çalışmada, hastanemizde sık izole edilen dirençli gram-negatif bakterilerin kolistin duyarlılığının belirlenmesinde yeni yöntemler olan KSDE, HRPNP yöntemlerinin sonuçlarının altın standart olan SMD yöntemi ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Ankara Şehir Hastanesi 1 Nolu Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığının onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 16.01.2020 ve Karar No: E1-19-178).

Örneklerin Seçimi

Çalışmaya 15.02.2019 ile 01.03.2020 tarihleri arasında toplam 157 izolat (74 *K.pneumoniae*, 33 *Acinetobacter* spp., 26 *E.coli*, 24 *P.aeruginosa*) dahil edildi. Örneklem büyüklüğü, kolistin duyarlılığı çalışılan gram-negatif bakteriler arasından randomize %95 güven aralığıyla ve %12 standart sapma ile hesaplandı⁹. Elde edilen bakteriler çalışma için yapılan canlandırma işlemine kadar %16 gliserol içeren beyin kalp infüzyon buyyon içerisinde -80°C'de saklandı.

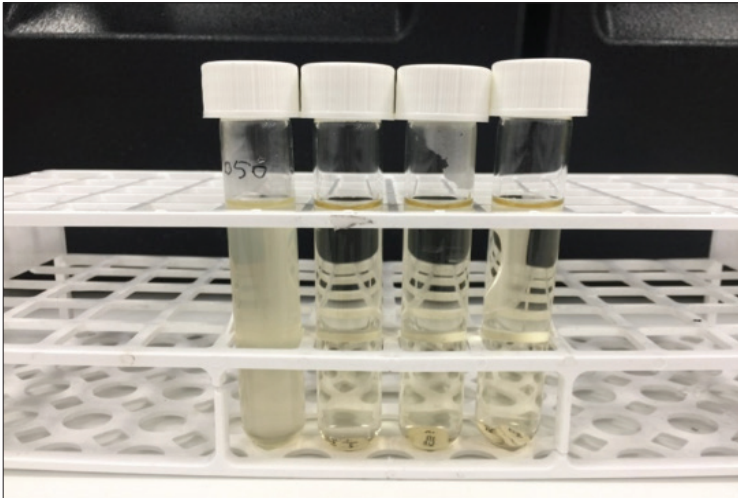
Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Kolistin duyarlılığı, 2016 yılında CLSI¹⁰ ve EUCAST¹¹ tarafından yayımlanan ortak öneriler dikkate alınarak, sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle ISO 20776-1 standardına göre çalışıldı. Buyyon mikrodilüsyon yönteminde aktif madde olarak kolistin sülfat (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ABD) üreticinin önerileri doğrultusunda süspansiyon haline getirilerek 128 µg/ml'lik stok çözeltileri hazırlandı. Stok çözeltisinden alınarak mikrodilüsyon plak-

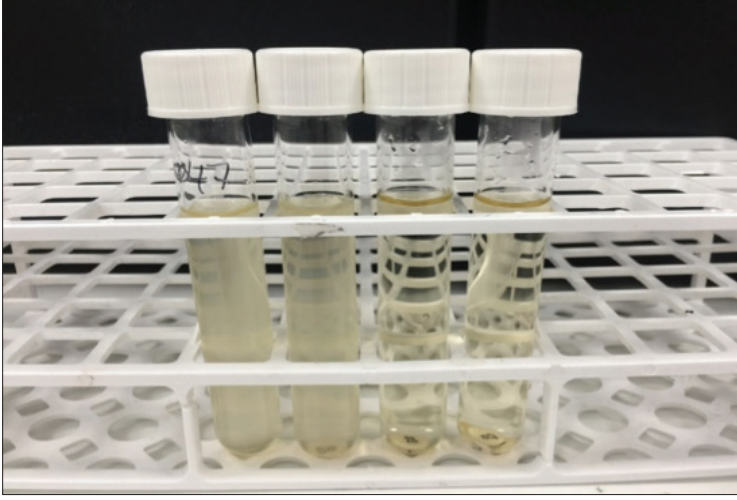
larındaki Mueller-Hinton buyyonunda seri dilüsyonlar (0.06-64 µg/ml) yapıldı. Tüm izolatlardan 0.5 McFarland standardı bulanıklığında süspansiyon hazırlandıktan sonra son bakteri konsantrasyonu 5×10^5 cfu/ml olacak şekilde mikrodilüsyon plaklarına eklendi ve mikrolaklar 16-20 saat 35°C'de inkübe edildi. Üremenin olmadığı en düşük kolistin konsantrasyonu, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri olarak tespit edildi. Tutsuz sonuçların olduğu izolatlarda tüm testler iki kez tekrarlandı. Negatif kontrol olarak *E.coli* ATCC 25922 suşu, pozitif kontrol olarak *E.coli* ATCC 13846 suşu kullanıldı. Kolistin duyarlılık testi sonuçlarının yorumlanmasında CLSI, *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* için MİK ≥ 4 µg/ml üzerinde olması durumunda dirençli, ≤ 2 µg/ml olduğunda duyarlı olarak bildirilmesini, *Enterobacterales* için ise MİK ≥ 4 üzerinde olması durumunda "non-wild type", ≤ 2 µg/ml olduğunda ise "wild type" olarak bildirilmesini önermektedir⁴. EUCAST; *Enterobacterales*, *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* için MİK ≥ 4 µg/ml üzerinde olursa dirençli olarak bildirilmesini, MİK ≤ 2 µg/ml olduğunda ise duyarlı olarak bildirilmesini önermektedir⁵.

Kolistin Sıvı Disk Elüsyon Yöntemi

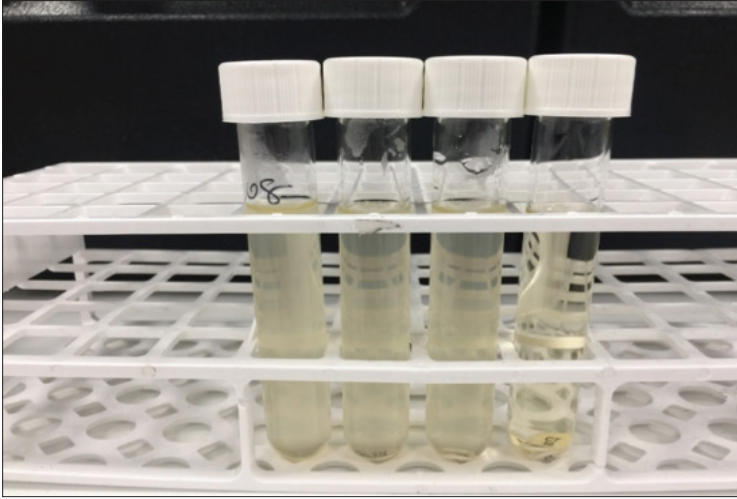
Her bir izolat için 10 mm'lik katyon ayarlı Mueller Hinton buyyon (CA-MHB) ile hazırlanan tüpler içine, sırasıyla 10 µg'lık 0, 1, 2, 4 adet kolistin diski eklendi. Kolistin diskleri eklenen tüpler 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Kanlı agarda üretilmiş taze kolonilerden 0.5 McFarland bulanıklığında serum fizyolojik içerisinde inokulum hazırlandı. Hazırlanan her inokulumdan 50 µl eklendi ve böylece final inokulum 7.5×10^5 CFU/ml olarak ayarlandı. Tüpler vortekslenip 35°C'de 16-20 saatlik inkübasyona kaldırıldı ve inkübasyon sonunda kolistin MİK değerleri görsel olarak okundu⁷. Tüm izolatlar için MİK değerleri EUCAST'e göre yorumlandı (Şekil 1-4).



Şekil 1. KSDE yöntemi ile MİK değeri ≤ 1 olarak yorumlanan izolat. En solda kolistin diski bulunmayan üreme kontrol tüpü ve sırasıyla 1, 2, 4 adet 10 µg kolistin diski bulunan tüpler.



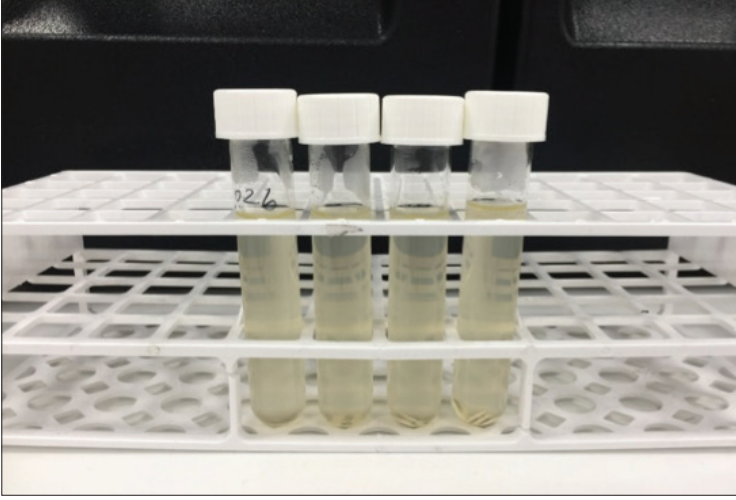
Şekil 2. KSDE yöntemi ile MİK değeri 2 olan izolat.



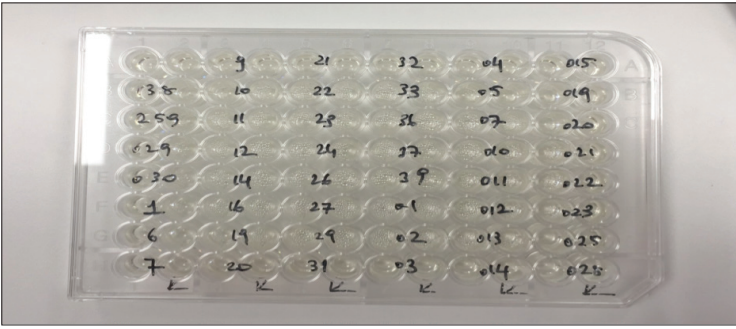
Şekil 3. KSDE yöntemi ile MİK değeri 4 olan izolat.

Hızlı Resapolimiksin NP Yöntemi

Polimiksin stok çözeltisi için; kolistin sülfat, cam tüplerde CA-MHB içinde final konsantrasyon 4.16 mg/ml olacak şekilde seyreltilti. Stok çözeltisi -20°C'de saklandı, kullanmadan önce 4°C'de bekletildi. Kanlı agarda üremiş taze kolonilerden 3.5 McFarland yoğunluğunda inokulum hazırlandı. Çalışma için 96 kuyucuklu polistren plaklar kullanıldı. Her bir izolat için kolistinli ve kolistinsiz olarak iki kuyucuk hazırlandı, 180 µl kolistinsiz MHB-CA; A1, B1, C1, D1 kuyucuklarına transfer edildi, 180 µl kolistin içeren MHB (4.16 mg/L içeren) A2, B2, C2, D2 kuyucuklarına transfer edildi. Daha sonra 20 µl %0.85'lik NaCl A1 ve A2'ye; 20 µl negatif kontrol olarak kullanılan kolistin duyarlı suş B1 ve B2'ye;



Şekil 4. KSDE yöntemi ile MİK değeri > 4 olan izolat.



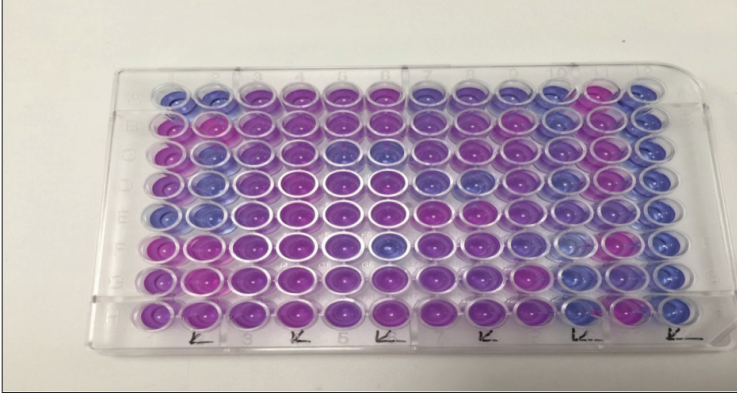
Şekil 5. Resapolimiksin test plağı, 96'lık mikroplak içerisine hazırlandı. Bir plakta 45 izolat çalışıldı. Plak üzerine izolat numaraları yazıldı. En aşağıya kolistin içeren CA-MHB kuyucukları 'K' harfi ile işaretlendi.

20 µl pozitif kontrol olarak kullanılan kolistin dirençli suş C1 ve C2'ye ve 20 µl çalışılacak bakteri süspansiyonu D1 ve D2 kuyucuklarına eklendi⁸. Kolistin final konsantrasyonu 3.75 mg/L olarak hesaplandı. İnkübatörde $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de üç saat inkübasyondan sonra %10'luk resazurin ayırıcı 22 µl her kuyucuğa eklendi. Resazurin ayırıcı eklendikten sonra kuyucuklar her 15 dakikada bir görsel olarak değerlendirildi. Dört saatin sonundaki renk değişimi gözlemlendi. Rengin mora ya da pembeye doğru değişmesi kolistin dirençli; mavi renkte kalması kolistin duyarlı olarak değerlendirildi⁸ (Şekil 5-6).

İstatistiksel Analiz

Sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan parametreler aşağıdaki şekilde belirlenmiştir.

Temel uyum (TU): MİK değerini ± 1 sapma ile bulabilmek (≥ 90 üzeri olması anlamlı kabul edilir).



Şekil 6. Resapolimiksin test plağı Resazurin ayracı eklendikten sonra kuyucuklar her 15 dakikada bir, dört saat boyunca görsel olarak değerlendirildi. Rengin mora ya da pembeye doğru değişmesi kolistin dirençli; mavi renkte kalması kolistin duyarlı olarak değerlendirildi⁸.

Kategorik uyum (KU): Duyarlıyı duyarlı, dirençliyi dirençli olarak tam doğru değerlendirmek ($\geq$ %90 üzeri olması anlamlı kabul edilir).

Çok büyük hata (ÇBH): Referans yöntemle dirençli bulunan izolatu duyarlı olarak değerlendirmek ($\geq$ %95 güven aralığında yapılan çalışmalarda $\leq$ %7.5 olması anlamlı, $<$ %95 güven aralığındaki çalışmalarda $\leq$ %1.5 olması anlamlı kabul edilir).

Büyük hata (BH): Referans yöntemle duyarlı bulunan izolatu dirençli olarak değerlendirmek ($<$ %3 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir)¹².

BULGULAR

Çalışmamıza alınan 157 izolat, kolistin duyarlılığı referans yöntem olan SMD ile değerlendirildiğinde *K.pneumoniae* izolatlarının 54'ü dirençli, 20'si duyarlı; *A.baumannii* izolatlarının 24'ü dirençli, dokuzu duyarlı; *E.coli* izolatlarının ikisi dirençli 24'ü duyarlı; *P.aeruginosa* izolatlarının biri dirençli, 23'ü duyarlı bulunmuştur.

K.pneumoniae'nin KSDE test sonuçları SMD sonuçlarıyla karşılaştırıldığında; KU: %93, TU: %95 olarak anlamlı bulunmuştur. ÇBH oranı %7 (dirençli 54 izolatın dördü duyarlı) ve BH oranı %5 (duyarlı 20 izolattan biri dirençli) bulunmuştur. *K.pneumoniae*'nin HRPNP test sonuçları SMD sonuçlarıyla karşılaştırıldığında; KU: %82 bulunmuştur. ÇBH oranı %9 (dirençli 54 izolatın beşi duyarlı) ve BH oranı %40 (duyarlı 20 izolattan sekizi dirençli) bulunmuştur (bu yöntem MİK sonucu vermediği için temel uyum değeri verilmemiştir).

A.baumannii'nin KSDE test sonuçları SMD ile karşılaştırıldığında; KU: %48, TU: %45, ÇBH: %88 (dirençli 24 izolatın 17'si duyarlı), BH: %0 bulunmuştur. *A.baumannii*'nin HRPNP test sonuçları SMD ile karşılaştırıldığında; KU: %36, ÇBH: %63 (dirençli 24 izolatın 21'i duyarlı), BH: %0 bulunmuştur (bu yöntem MİK sonucu vermediği için temel uyum değeri verilmemiştir).

Tablo I. Referans Yöntem olan Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Kolistin Sıvı Disk Elüsyon ve Hızlı Resapolimiksin NP Testlerinin Karşılaştırılması

Mikroorganizma	SMD R	KSDE R	HRPNP R	SMD S	KSDE S	HRPNP S	Toplam Sayı
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	54	51	57	20	23	17	74
<i>Acinetobacter baumannii</i>	24	7	3	9	26	30	33
<i>Escherichia coli</i>	2	0	2	24	26	24	26
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1	1	23	23	23	24

SMD: Sıvı Mikrodilüsyon, KSDE: Kolistin sıvı disk elüsyon, HRPNP: Hızlı resapolimiksin NP.

E.coli'nin KSDE test sonuçları SMD ile karşılaştırıldığında; KU: %2, TU: %96, ÇBH: %100 (dirençli iki izolatan ikisi de duyarlı) BH: %0 bulunmuştur. *E.coli*'nin HRPNP test sonuçları SMD ile karşılaştırıldığında; KU: %92, ÇBH: %50 (iki dirençli izolatan biri duyarlı), BH: %4 bulunmuştur (bu yöntem MİK sonucu vermediği için temel uyum değeri verilmemiştir).

P.aeruginosa'nın KSDE test sonuçları SMD ile karşılaştırıldığında; KU: %100, TU: %100, ÇBH: 0, BH: 0 bulunmuştur. *P.aeruginosa*'nın, HRPNP test sonuçları SMD ile karşılaştırıldığında aynı sayılarla; KU: %100, ÇBH: %0, BH: %0 bulunmuştur (bu yöntem MİK sonucu vermediği için temel uyum değeri verilmemiştir).

Tüm test sonuçlarının karşılaştırması Tablo I'de özetlenmiştir. İzolatlar ve yöntem bazında MİK değerlerinin değerlendirilmesi Tablo II'de belirtilmiştir.

TARTIŞMA

Kolistin; ilk defa 1940'lı yıllarda gram-negatif bakteriler üzerine geniş spektrumlu etki gösteren antibiyotik olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak sistemik kullanımında yüksek oranda nefrotoksik ve nörotoksik etkilerinin izlenmesi sebebiyle 1970'lerde bu ilacın kullanımı terk edilmiştir. Günümüzde gram-negatif bakterilerde geniş spektrumlu beta laktamazların yanı sıra karbapenemazların varlığının da artmasına bağlı olarak, bu grup dirençli gram-negatif bakterilerde kolistin kullanımı tekrar artmıştır. Çeşitli yayınlar 2006-2012 yılları arasında kolistin kullanımının üç kat arttığını bildirmiştir¹³. EUCAST ve CLSI 2016 yılında ortak bir açıklama yaparak, kolistin duyarlılık testlerinde tek güvenilir yöntem SMD olarak belirtmiştir. Ancak bu yöntemin rutin uygulamasındaki güçlükler nedeniyle alternatif yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Bu alternatif yöntemlerden biri olarak önerilen KSDE yöntemi; ilk olarak 1973'te anaerob bakterilerin antimikrobiyal duyarlılık testlerinde kullanılmıştır. Bu yöntemin kolistin duyarlılığının değerlendirilmesinde kullanılabileceği düşünülmüştür. Sonuç verme süresi SMD yöntemi kadar uzun olmakla birlikte yapımı daha kolay ve maliyet-etkin bir yöntemdir⁷.

Çalışmamızda, KSDE testi SMD yöntemi ile kıyaslandığında; *Enterobacterales*, *Pseudomonas* türleri için kategorik ve temel uyumunun yüksek, *Acinetobacter* türleri için ise düşük olduğu bulunmuştur. Çok büyük hata oranı *Enterobacterales* ve *Pseudomonas* tür-

Tablo II. Sıvı Mikrodilüsyon, Kolistin Sıvı Disk Elüsyon, Hızlı Resapolimiksin NP Minimum İnhibitör Konsantrasyonu Değerleri

Bakteri adı	SMD	KSDE	HRPNP	İzolat sayısı
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	≤ 1	S	4
	1	≤ 1	R	2
	1	2	R	1
	2	> 4	S	1
	2	2	R	1
	2	≤ 1	S	7
	2	≤ 1	R	4
	4	≤ 1	R	2
	4	4	R	4
	4	4	S	2
	4	2	S	1
	4	> 4	S	1
	4	> 4	R	3
	8	2	R	1
	8	> 4	S	1
	8	> 4	R	6
	16	> 4	R	25
	32	> 4	R	5
	> 64	> 4	R	3
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	≤ 1	S	1
	1	2	S	1
	2	≤ 1	S	7
	4	≤ 1	S	14
	4	2	S	1
	4	4	S	1
	4	> 4	S	1
	8	2	S	1
	8	> 4	S	1
	16	≤ 1	S	1
	16	> 4	R	1
	32	> 4	R	1
	64	> 4	S	1
	64	> 4	R	1

Tablo II. Sıvı Mikrodilüsyon, Kolistin Sıvı Disk Elüsyon, Hızlı Resapolimiksin NP Minimum İnhibitör Konsantrasyonu Değerleri (devamı)

Bakteri adı	SMD	KSDE	HRPNP	İzolat sayısı
<i>Escherichia coli</i>	0.5	≤ 1	S	1
	1	≤ 1	S	6
	1	≤ 1	R	1
	2	≤ 1	S	14
	2	2	S	2
	4	≤ 1	S	1
	4	2	R	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.5	≤ 1	S	1
	1	≤ 1	S	6
	2	≤ 1	S	16
	8	> 4	R	1

SMD: Sıvı Mikrodilüsyon, KSDE: Kolistin Sıvı Disk Elüsyon, HRPNP: Hızlı Resapolimiksin NP.

leri için düşük iken *Acinetobacter* türleri için yüksek bulunmuştur. Bu yöntemi ilk olarak 2019'da uygulayan Simner ve arkadaşları⁷, sonuçlarımızdan farklı olarak, *Acinetobacter* türleri dahil çalıştıkları tüm gram-negatif bakteriler için, yönteminin kategorik ve temel uyumunu yüksek, çok büyük hata oranını ise düşük olarak bildirmişlerdir. Bu farklılığın nedeni çalışmalarında sadece 12 adet *Acinetobacter* izolatının kullanmış olmasından kaynaklanmış olabilir. Sayı arttıkça sonuçlarda farklılıklar izlenebileceği düşünülmüştür. Benzer olarak ülkemizde, Koyuncu ve arkadaşları¹⁴ tarafından 2019'da 419 gram-negatif bakteri izolatı KSDE yöntemi, SMD yöntemi ile karşılaştırılmalı çalışılmış ve kategorik uyum tüm izolatlar için yüksek bildirilmiştir. Bu çalışmada da *Acinetobacter* türlerinin ayrıca değerlendirilmediği, çalışmaya alınan total sonuçlar üzerinden yorumlama yapıldığı izlenmiş, kategorik uyumun bakteri düzeyinde değerlendirildiğinde değişebileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda HRPNP testinin *Enterobacterales* ve *Pseudomonas* türleri için kategorik uyumu yüksek, çok büyük hata oranı düşük bulunurken, *Acinetobacter* türleri için kategorik uyumu düşük, çok büyük hata oranı ise yüksek bulunmuştur (bu yöntem MİK sonucu vermediği için temel uyum değeri verilmemiştir). Lescat ve arkadaşları¹⁵ 2019'da *Acinetobacter* ve *Pseudomonas*lar üzerinde Elitech grubun ürettiği MİK değeri de verebilen HRPNP yöntemi ile çalışan kullanıma hazır ticari bir kit ile duyarlılık ve özgüllüğü %100 bulmuşlardır. Bu farkın, bizim çalışmamızda standardize bir ticari kit yerine manuel yöntemin kullanılması ya da *Acinetobacter* suşlarımızın taşıdığı direnç genlerindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. İlginç olarak Simar ve arkadaşları¹⁶ 2017'de *Enterobacter cloacae* ve *Enterobacter aerogenes* izolatlarında bu testin duyarlılık ve özgüllüğünü sırasıyla %25 ve %100 bulmuşlardır. Germ ve arkadaşları¹⁷ 2019'da *A.baumannii* ve *Enterobacterales* izolatlarında HRPNP yöntemi ile kategorik uyumu yüksek bulmuşlardır. Jia ve arkadaşları¹⁸ tarafından 2020'de *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *E.coli*'den oluşan gram-negatif bakteriler üzerinde duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %100 ve

%99 bulunmuştur. Bu örnekler doğrultusunda, farklı bakterilerde ve farklı direnç genleri varlığında HRPNP testi sonuçlarında değişiklikler görülebileceği varsayılmıştır.

Çalışmamızda diğer makalelerden farklı bulunan sonuçlar için moleküler çalışmalara ve direnç genlerinin gösterilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

SMD yöntemi ile kıyaslandığımızda; KSDE, HRPNP yöntemleri, maliyeti düşük, hazırlanması ve çalışılması kolay bulunmuştur. Özellikle HRPNP testinin dört saatte sonuç vermesinin avantaj olduğu düşünülmüştür. KSDE, HRPNP yöntemlerinin; *P.aeruginosa* ve *Enterobacterales* için kategorik ve temel uyumları yüksek bulunurken, *Acinetobacter* türleri için her iki yöntemin de başarısız olduğu gösterilmiştir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Ankara Şehir Hastanesi 1 nolu Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığının onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 16.01.2020 ve Karar No: E1-19-178).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Galani I, Kontopidou F, Souli M, Rekatsina PD, Koratzanis E, Deliolanis J, et al. Colistin Susceptibility Testing by E Test and Disk Diffusion Methods. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31(5): 434-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.01.011>
2. Jayol A, Nordmann P, Lehours P, Poirel L, Dubois V. Comparison of Methods for Detection of Plasmid-Mediated and Chromosomally Encoded Colistin Resistance in Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24(2): 175-9. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.002>
3. World Health Organization (WHO). Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance - Annual Report, 2019. Available from: https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0003/418863/53373-WHO-CAESAR-annual-report-2019.pdf (Accessed date: 18.03.2021).
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, 2019.
5. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0; Jan 2021. Available from: <http://www.eucast.org> (Accessed date: 18.03.2021).
6. Humphries RM, Hindler JA, Epson E, Horwich-Scholefield S, Miller LG, Mendez J, et al. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae Detection Practices in California: What Are We Missing? *Clin Infect Dis* 2018; 66(7): 1061-7. <https://doi.org/10.1093/cid/cix942>
7. Simner PJ, Bergman Y, Trejo M, Roberts AA, Marayan R, Tekle T, et al. Two-site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test to Determine Colistin in vitro Activity Against Gram-negative Bacilli. *J Clin Microbiol* 2019; 57: e01163-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.01163-18>
8. 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*. *J Clin Microbiol* 2019; 57 3): e01563-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.01563-18>
9. Pormohammad A, Mehdinejadiani K, Gholizadeh P, Nasiri MJ, Mohtavinejad N, Dadashi M, et al. Global prevalence of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: A systematic review and meta-analysis. *Microb Pathog* 2020;139: 103887. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103887>

10. International Organization for Standardization. ISO 20776-2:2007. Clinical Laboratory Testing and in vitro Diagnostic Test Systems. Susceptibility Testing of Infectious Agents Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices - Part 2: Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices. Geneva: ISO. Dis Clin North Am 2016; 30(2): 391-414. Available from: <https://www.iso.org/standard/41631.html>
11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the Joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. 2016. Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_f_or_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf
12. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry and FDA. Class II Special Controls Guidance Document: Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems. Document issued on: August 28, 2009. Available from: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm080564.html> (Accessed date: 18.03.2021).
13. Kadri SS, Hohmann SF, Orav EJ, Bonne SL, Moffa MA, Timpone JG, et al. Tracking Colistin-treated Patients to Monitor the Incidence and Outcome of Carbapenem-resistant Gram-negative Infections. Clin Infect Dis 2015; 60(1): 79-87. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu741>
14. Koyuncu Özyurt Ö, Özhak B, Ögünç D, Yıldız E, Çolak D, Günseren F, et al. Evaluation of the BD Phoenix100 System and Colistin Broth Disk Elution Method for Antimicrobial Susceptibility Testing of Colistin Against Gram-negative Bacteria. Mikrobiyol Bul 2019; 53(3): 254-61. <https://doi.org/10.5578/mb.68066>
15. Lescat M, Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Performances of the Rapid Polymyxin *Acinetobacter* and *Pseudomonas* Tests for Colistin Susceptibility Testing. Microb Drug Resist 2019; 25(4): 520-23. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0153>
16. Simar S, Sibley D, Ashcraft D, Pankey G. Evaluation of the Rapid Polymyxin NP Test for Polymyxin B Resistance Detection Using *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes* Isolates. J Clin Microbiol 2017; 55(10): 3016-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00934-17>
17. Germ J, Poirel L, Kisek TC, Spik VC, Seme K, Premru MM, et al. Evaluation of resazurin-based rapid test to detect colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2019; 38(11): 2159-62. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03657-1>
18. Jia H, Fang R, Lin J, Tian X, Zhao Y, Chen L, et al. Evaluation of Resazurin-based Assay for Rapid Detection of Polymyxin-resistant Gram-negative Bacteria. BMC Microbiol 2020; 20(1): 7. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1692-3>