

Otomatize Sistemde Kolistin Direnci Saptanan İzolatların Gradyan Difüzyon Yöntemi ve Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemiyle Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi

Retrospective Evaluation of Colistin-Resistant Isolates in Automated System by Gradient Diffusion Method and Broth Microdilution Method

Nazmiye Ülkü Tüzemen¹ , Kadir Efe² , Halis Akalın³ , Cüneyt Özakin¹ 

¹Bursa Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye

²Dörtçelik Çocuk Hastalıkları Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Bursa, Türkiye

³Bursa Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye

Özet

Amaç: Antibiyotik duyarlılık testlerinde sık olarak kullanılan polistrene bağlanma kapasitesinin yüksek ve molekül ağırlığının büyük olması, kolistinin duyarlılık testlerinin optimizasyonunu güçleştirmektedir. Çalışmamızın amacı otomatize sistemde kolistin direnci saptanan etkenlerde gradyan difüzyon yöntemi (GDY) ile altın standard olan sıvı mikrodilüsyon (BMD) yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçları karşılaştırmaktır.

Yöntemler: Ağustos 2016-Nisan 2017 arasında Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen, Phoenix™ 100 (Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD) otomatize sistemiyle isimlendirilen ve kolistine direnç saptanan 36 *Klebsiella pneumoniae*, 9 *Acinetobacter baumannii* ve 5 *Pseudomonas aeruginosa* izolatı çalışmaya alındı. İzolatların kolistin duyarlılığı GDY ve BMD yöntemiyle de test edildi.

Bulgular: Otomatize sistemle ve altın standard yöntem olan BMD yöntemiyle elde edilen kolistine direnç oranları karşılaştırıldığında, otomatize sistemin kategorik uyum (KU) oranı tüm izolatlar için %92, *K. pneumoniae* için %100, *A. baumannii* için %77.8 ve *P. aeruginosa* için %60 olarak bulundu. Tüm izolatlar için çok büyük hata (ÇBH) oranı %0, büyük hata (BH) oranı %8 olarak saptandı. Tüm izolatlar için GDY kullanıldığında ise KU %20, *K. pneumoniae* için %16.7, *A. baumannii* için %22.2 ve *P. aeruginosa* için %40 olarak bulundu. Tüm izolatlar için ÇBH oranı %80 olup BH oranı %0 olarak bulundu.

Sonuçlar: Phoenix™ 100 otomatize sisteminin, kolistin duyarlılığının belirlenmesi için KU, ÇBH ve BH oranları, ISO 20776

Abstract

Objective: Optimizing colistin susceptibility testing has difficulties because of its high molecular weight and high binding capacity to polystyrene which is frequently used in antibiotic susceptibility testing. We aimed to compare the results of isolates, which were detected as colistin-resistant in the automated system, obtained by using broth microdilution (BMD) method which is the gold standard, with gradient diffusion method (GDM).

Methods: We investigated 36 *Klebsiella pneumoniae*, 9 *Acinetobacter baumannii* and 5 *Pseudomonas aeruginosa* isolates, identified by the Phoenix™ 100 (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) automated system, isolated from various clinical specimens sent to the Central Microbiology Laboratory between August 2016 and April 2017. The susceptibility of the isolates was also tested by GDM and BMD method.

Results: When the colistin resistance rates obtained from the gold standard BMD method were compared with the automated method, the categorical agreement (CA) rate of the automated system was 92% for all isolates, 100% for *K. pneumoniae*, 77.8% for *A. baumannii*, and 60% for *P. aeruginosa*. The very major error (VME) rate was 0%, and the major error (ME) rate was 8% for all isolates. When GDM was used for all isolates, CA was found to be 20% for all isolates, 16.7% for *K. pneumoniae*, 22.2% for *P. aeruginosa* and 40% for *A. baumannii*. VME was found to be 80%, and ME was %0 for all isolates.

Conclusions: CA, VME and ME rates of Phoenix™ 100 for detecting colistin resistance is within acceptable limits according

ORCID iDs of the authors: N.Ü.T. 0000-0003-3544-3509; K.E. 0000-0002-4544-9325; H.A. 0000-0001-7530-1279; C.Ö. 0000-0001-5428-3630

Cite this article as: Tüzemen NÜ, Efe K, Akalın H, Özakin C. [Retrospective evaluation of colistin-resistant isolates in automated system by gradient diffusion method and broth microdilution method]. *Klinik Derg.* 2019; 32(1): 57-61. Turkish.

4. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (8-12 Kasım 2017, Antalya)'nde bildirilmiştir. Presented at the 4th National Congress of Clinical Microbiology (8-12 November 2017, Antalya).

Yazışma Adresi / Address for Correspondence:

Nazmiye Ülkü Tüzemen, Bursa Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Görükle, Bursa, Türkiye

E-posta/E-mail: ulku_kocman@hotmail.com

(Geliş / Received: 2 Mart / March 2018; Kabul / Accepted: 14 Aralık / December 2018)

DOI: 10.5152/kd.2019.13

standardına göre kabul edilebilir sınırlarda iken, GDY'nin oranları bu standarda uymamaktadır. *Klimik Dergisi* 2019; 32(1): 57-61.

Anahtar Sözcükler: Kolistin, antibiyotik duyarlılık testi, ilaç direnci.

to ISO 20776 standard, but the rates of GDM is not suitable for this purpose. *Klimik Dergisi* 2019; 32(1): 57-61.

Key Words: Colistin, antibiotic susceptibility testing, drug resistance.

Giriş

Polimiksinler ilk defa 1947 yılında *Bacillus polymyxa*'dan üretilen polipeptid yapısında antibiyotiklerdir (1,2). Bunlar, A'dan E'ye kadar gruplara ayrılmış beş farklı yapısal ana- loğa sahip olup, klinik kullanımda olanlar polimiksin B ve E (kolistin)'dir (2). Katyonik bir peptid olan kolistin, Gram-negatif bakterilerin dış membranında bulunan anyonik yapıdaki lipopolisakaridlere bağlanır. Lipopolisakarid molekül- lerini bir arada stabil halde tutan divalen katyonların (Ca^{+2} , Mg^{+2}) yerini değiştirerek, dış membranda permeabilite artı- şına neden olur ve bu olay bakterinin ölümüyle sonuçlanır (1). *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi çok ilaca dirençli Gram-negatif bakterilerin son yıllarda artması sebebiyle bu ilaca olan ge- rekşim de giderek artmaktadır. Kolistin kullanımının art- ması, dünya çapında kolistin direncinin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Direnç oranları genellikle %10'un altında olsa da bir artış eğilimi gözlenmektedir (1,3,4). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) - European Committee on Anti- microbial Susceptibility Testing (EUCAST) (5), *Enterobacte- riaceae*, *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp.'de kolistin için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK)'un belirlenmesinde referans yöntem olarak standard sıvı mikrodilüsyon (BMD) yöntemini önermektedir. EUCAST (6)'a göre *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. ve *Enterobacteriaceae* için kolistin MİK değeri $>2 \mu\text{g/ml}$ ise, o bakteriler kolistine dirençli olarak kabul edilmektedir.

Disk difüzyon metodu, kolistinin agara zayıf şekilde da- ğılmasından dolayı yanlış sonuçlar vermekte ve bu nedenle kullanılması önerilmemektedir (7). BMD yöntemiyle karşıla- ştırıldığında, %50'sinin yanlış sonuç vermesi nedeniyle, gra- dyan difüzyon yöntemi (GDY)'nin sonuçları da dikkatli yorum- lanmalıdır (4,8). Bazı çalışmalarda GDY ve BMD yönteminin sonuçları uyumlu bulunurken, bazı çalışmaların sonuçları GDY'nin güvenilirliğinin sorgulanmasına yol açmıştır (4,7-9). Çalışmamızın amacı, otomatize sistemde kolistin direnci sap- tanan etkenlerde GDY ve altın standard olan BMD yöntemini kullanarak, elde edilen sonuçları karşılaştırmaktır.

Yöntemler

Bakteri izolatları: Ağustos 2016-Nisan 2017 tarihleri ara- sında hastanemizin Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen, Phoenix™ 100 (Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD) otomatize sistemi- ye isimlendirilen ve kolistine direnç saptanan (MİK $>4 \mu\text{g/ml}$) 36 *K. pneumoniae*, 9 *A. baumannii* ve 5 *P. aeruginosa* izolatı olmak üzere toplamda 50 izolat çalışmaya alındı. Otomatize sistemde *P. aeruginosa* ATCC® 27853 kalite kontrol suşu ola- rak kullanıldı. İzolatlar çalışılana kadar -70°C 'de gliserollü sak- lama besiyerlerinde muhafaza edildi. Olası salgın suşlarının dışlanması amacıyla moleküler yöntemlerle bir çalışma ya- pılmadı. Farklı zaman dilimlerinde yatan her hastadan sadece bir izolat çalışmaya dahil edildi.

Gradyan difüzyon yöntemi: Otomatize sistemde kolistine direnç saptanan ($>4 \mu\text{g/ml}$) tüm izolatlardan 0.5 McFarland standardı bulanıklığında süspansiyon hazırlandı. Hazırlanan süspansiyondan Mueller-Hinton agarı içeren plak yüzeyine yaygın ekim yapıldı. Plaklar kuruduktan sonra kolistin em- dirilmiş ticari şeritler (Liofilchem s.r.l, Roseto degli Abruzzi, İtalya) yerleştirildi ve 18-20 saat 35°C 'de etüvde inkübe edildi. Kolistin için elde edilen MİK değerleri EUCAST (7)'in önerileri doğrultusunda değerlendirildi. Buna göre GDY şeritlerinin in- hibisyon elipsleriyle kesiştiği noktalardaki MİK değeri $>2 \mu\text{g/ ml}$ olarak bulunduğu, o izolat kolistine dirençli; $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunduğu ise duyarlı olarak kabul edildi.

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi: Aktif madde olarak kolistin sülfat (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ABD) üreticinin önerileri doğrultusunda süspansiyon haline getirilerek stok solüsyon- ları hazırlandı. Stok solüsyonundan alınarak mikrodilüsyon plaklarındaki Mueller-Hinton buyyonunda seri dilüsyonlar ($0.125-64 \mu\text{g/ml}$) yapıldı. Tüm izolatlardan 0.5 McFarland standardı bulanıklığında süspansiyon hazırlandıktan son- ra son bakteri konsantrasyonu 5×10^5 cfu/ml olacak şekilde mikrodilüsyon plaklarına eklendi ve mikroplaklar 18-20 saat 35°C 'de inkübe edildi. Üremenin olmadığı en düşük kolistin konsantrasyonu MİK değeri olarak tespit edildi. Her bir mik- roplakta *P. aeruginosa* ATCC® 27853 kullanılarak testin çalışır- lığı kontrol edildi.

Karbapenem duyarlılığının yorumlanması: İzolatların karbapenemlere duyarlılıkları, Phoenix™ 100 otomatize sis- teminde araştırılarak EUCAST (6) önerilerine göre analiz edil- di. *Enterobacteriaceae* için imipenem (IMP) ve meropenem (MEM) MİK değeri $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunduğu duyarlı, $>8 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunduğu dirençli, ara değerler orta duyarlı olarak kabul edildi. *P. aeruginosa* için, IMP MİK değeri $\leq 4 \mu\text{g/ ml}$ olarak bulunduğu duyarlı, $>8 \mu\text{g/ml}$ olarak bulundu- ğunda dirençli, ara değerler orta duyarlı; MEM MİK değeri $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunduğu duyarlı, $>8 \mu\text{g/ml}$ olarak bulun- duğunda dirençli, ara değerler orta duyarlı olarak kabul edil- di. *Acinetobacter* spp. için IMP ve MEM MİK değeri $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunduğu duyarlı, $>8 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunduğu dirençli, ara değerler orta duyarlı olarak kabul edildi.

Yöntemlerin karşılaştırılması: Temel uyum (TU), test edilen suşun antibiyotik MİK'inin ± 1 çift kat dilüsyon içindeki uyumu; kategorik uyum (KU) ise test suşunun CLSI vb. kri- terlerine göre yorumlanan duyarlılık sonuçlarının (duyarlı, orta duyarlı, dirençli) uyumu olarak tanımlandı. Küçük hata (KH) bir antibiyotik duyarlılık testinde orta duyarlıyken, refe- rans testinde duyarlı veya dirençli sonuç vermesi; büyük hata (BH) bir antibiyotik duyarlılık testinde duyarlıyken, referans testinin dirençli sonuç vermesi; çok büyük hata (ÇBH) ise bir antibiyotik duyarlılık testinde dirençli iken referans testinin duyarlı sonuç vermesi olarak tanımlandı (10). Referans tes- ti olan BMD sonuçlarıyla, Phoenix™ 100 ve GDY sonuçları karşılaştırıldı ve KU, ÇBH ve BH oranları hesaplandı. ISO (11) tarafından belirlenen kriterlere göre kabul edilebilir perfor- mans, KU için $\geq 90\%$; ÇBH ve BH'ler için $\leq 3\%$ olarak belirlendi.

Bulgular

Otomatize sistemle isimlendirilen ve kolistine direnç saptanan 36 *K. pneumoniae* izolatının %97.2'si imipeneme, %94.4'ü meropeneme; 9 *A. baumannii* izolatının %77.8'i imipeneme ve meropeneme, 5 *P. aeruginosa* izolatının %60'ı imipeneme, %40'ı meropeneme dirençli olarak bulundu. İzolatların %46'sının Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi'nden, %30'unun Genel Cerrahi Kliniği'nden ve %24'ünün diğer kliniklerden gönderildiği saptandı. İzolatların %36'sı yara akıntısı veya pü, %26'sı solunum yolu, %22'si idrar ve %16'sı kandan izole edildi (Tablo 1).

Otomatize sistemden ve altın standard yöntem olan BMD yönteminden elde edilen kolistine direnç oranları karşılaştırıldığında, Phoenix™ 100 otomatize sisteminin KU oranı tüm izolatlar için %92, *K. pneumoniae* için %100, *A. baumannii* için %77.8 ve *P. aeruginosa* için %60 olarak bulundu. Tüm izolatlar için ÇBH oranı %0, BH oranı %8 olarak saptandı. BH oranı *K. pneumoniae* için %0, *A. baumannii* için %22.2 ve *P. aeruginosa* için %40 olarak bulundu. Tüm izolatlar için GDY kullanıldığında ise KU oranı %20, *K. pneumoniae* için %16.7, *A. baumannii* için %22.2 ve *P. aeruginosa* için %40 olarak bulundu. Tüm izolatlar için ÇBH oranı %80 olup, *K. pneumoniae* için %83.3, *A. baumannii* için %77.8 ve *P. aeruginosa* için %60 olarak saptandı. BH oranı ise tüm izolatlar için %0 olarak bulundu (Tablo 2).

İrdeleme

Antibiyotik direnci günümüzde küresel bir problem haline gelmiştir. Kolistin, özellikle karbapeneme dirençli Gram-negatif bakterilerin infeksiyonlarının tedavisinde nefrotoksikite gibi yan etkilerine rağmen kullanımı giderek artan antibiyotiklerdendir. Fakat günümüzde kolistin direncinin de giderek yaygınlaşmasıyla klinisyenlerin tedavi seçenekleri giderek azalmaktadır (1,3,4,12).

Kolistine duyarlılık testlerinde en önemli güçlük duyarlılığın belirlenmesindeki sorunlardır (13,14). Polimiksinler büyük katyonik peptid moleküllerdir. Agar yüzeyine dağılımı iyi olmadığı için duyarlılık testinde disk difüzyon yöntemi önerilmez (3,4,9,15). Yapılan bir çalışmada disk difüzyon metodu, agarda dilüsyon metoduyla karşılaştırıldığında ÇBH oranı farklı kriterlere göre %0.5 ile %3.5 arasında bulunmuş, başka bir çalışmada ise bu oranlar %5-44 arasında saptanmıştır (16,17). Bir başka çalışmada disk difüzyonla GDY karşılaştırıldığında ÇBH oranı %1.4 olarak bildirilmiştir (18). Farklı bir çalışmada disk difüzyon ve BMD yöntemleri arasındaki KU oranı %58 olarak bildirilmiştir (8).

Duyarlılık testi yapılırken bir diğer seçenek olan GDY'nin bazı çalışmalarda uyumlu, bazı çalışmalarda uyumsuz sonuçlar verdiği görülmektedir. Kolistin için GDY ve agarda dilüsyon yöntemlerini karşılaştırılan çalışmalarda TU oranı %87 ve %96.7 olarak bildirilmiştir (19,20). Arroyo ve arkadaşları (21) tarafından GDY ve altın standard yöntem olan BMD karşılaştırıl-

Tablo 1. Otomatize Sistemde Kolistin Direnci Saptanan İzolatların Klinik Örneklerle Göre Dağılımı

Klinik Örnek	<i>K. pneumoniae</i> (%)	<i>A. baumannii</i> (%)	<i>P. aeruginosa</i> (%)	Toplam (%)
Kan	14	0	2	16
İdrar	18	4	0	22
Alt solunum yolu	14	8	4	26
Yara akıntısı veya pü	26	6	4	36

Tablo 2. Kolistin Duyarlılığı İçin Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemiyle Otomatize Sistem ve Gradyan Difüzyon Yönteminin Karşılaştırılması

Yöntem	İzolat Grupları	Duyarlı	Dirençli	MİK ₅₀	MİK ₉₀	KU	ÇBH	BH
		Sayı (%)	Sayı (%)	(µg/ml)	(µg/ml)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)
Sıvı mikrodilüsyon yöntemi	Tüm izolatlar	4 (8)	46 (92)	32	≥64	Altın standard yöntem	Altın standard yöntem	Altın standard yöntem
	<i>K. pneumoniae</i>	0 (0)	36 (100)	32	≥64			
	<i>A. baumannii</i>	2 (22.2)	7 (77.8)	≥64	≥64			
	<i>P. aeruginosa</i>	2 (40)	3 (60)	4	≥64			
Phoenix™ 100	Tüm izolatlar	0 (0)	50 (100)	>4	>4	46 (92)	0 (0)	4 (8)
	<i>K. pneumoniae</i>	0 (0)	36 (100)	>4	>4	36 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>A. baumannii</i>	0 (0)	9 (100)	>4	>4	7 (77.8)	0 (0)	2 (22.2)
	<i>P. aeruginosa</i>	0 (0)	5 (100)	>4	>4	3 (60)	0 (0)	2 (40)
Gradyan difüzyon yöntemi	Tüm izolatlar	44 (88)	6 (12)	1.5	3	10 (20)	40 (80)	0 (0)
	<i>K. pneumoniae</i>	30 (83.3)	6 (16.7)	1.5	3	6 (16.7)	30 (83.3)	0 (0)
	<i>A. baumannii</i>	9 (100)	0 (0)	1.5	2	2 (22.2)	7 (77.8)	0 (0)
	<i>P. aeruginosa</i>	5 (100)	0 (0)	1.5	2	2 (40)	3 (60)	0 (0)

MİK: minimum inhibitör konsantrasyon, KU: kategorik uyum, ÇBH: çok büyük hata, BH: büyük hata.

duğunda ise aynı oran %16.5 olarak bildirilmiştir. Bununla birlikte GDY ve BMD yöntemini karşılaştıran bir başka çalışmada ise KU oranı %100 olarak bildirilmiştir (22). Nhung ve arkadaşları (9) tarafından GDY ve BMD yöntemi arasındaki TU oranları, *A. baumannii* izolatları için %76, *P. aeruginosa* izolatları için %90 ve *Enterobacteriaceae* izolatları için %84 olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada KU oranları hem *A. baumannii* hem de *Enterobacteriaceae* izolatları için %100, *P. aeruginosa* izolatları için %98 olarak bildirilmiştir. Kurumumuzda 2004-2005 arasında 100 *A. baumannii* suşu kolistin duyarlılığı açısından disk difüzyon yöntemi, GDY ve BMD yöntemiyle test edilmiş olup suşlar her üç yöntemle de %100 duyarlı bulunmuştur (23). Çalışmamızda tüm izolatlar için GDY ve BMD yöntemi karşılaştırıldığında KU oranı %20, *K. pneumoniae* için %16.7, *A. baumannii* için %22.2 ve *P. aeruginosa* için %40 olarak saptanmıştır. Tüm izolatlar için ÇBH oranı %80 olup, *K. pneumoniae* için %83.3, *A. baumannii* için %77.8 ve *P. aeruginosa* için %60 olarak saptanmış, BH oranı ise tüm izolatlar için %0 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla çalışmamızda GDY'nin performansı, ISO 20776 standardına göre kabul edilebilir sınırlar içinde değildir.

Klinik örneklerden izole edilen mikroorganizmaların isimlendirilmesinde ve antibiyotik duyarlılığını saptamada otomatize sistemler çoğu laboratuvarında önemli bir role sahiptir. Kolistin duyarlılığını test etmek için yapılan çalışmalar genellikle VITEK® 2 (bioMérieux, Hazelwood, MO, ABD) ile yapılmış olup çalışmamızda kullandığımız Phoenix™ 100 otomatize sistemiyle karşılaştırma çalışmaları daha azdır. Bir çalışmada VITEK® 2 ve BMD yöntemi arasında TU oranı %93.4 olarak bildirilmiş, başka bir çalışmada ise TU oranı %44.8, KU oranı %94.1, ÇBH oranı %0.7 ve BH oranı %0 olarak bildirilmiştir (22,24). Dafopoulou ve arkadaşları (4) tarafından yapılan bir çalışmada ise BMD yöntemiyle karşılaştırıldığında VITEK® 2'nin tüm izolatlar için TU oranı %78.6, KU oranı %96.7, ÇBH oranı %0 ve BH oranı %3.3 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada *K. pneumoniae*'nin TU oranı %75.6, KU oranı %100, ÇBH oranı %0 ve BH oranı %0, *A. baumannii*'nin TU oranı %85, KU oranı %90, ÇBH oranı %0 ve BH oranı %10 olarak bildirilmiştir. *Acinetobacter* spp. izolatlarıyla ağarda dilüsyon yöntemi altın standard kabul ederek üç farklı kolistine duyarlılık yöntemini karşılaştıran bir çalışmada ise GDY, VITEK® 2 ve MicroScan WalkAway 96 Plus (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, ABD) otomatize sistemlerinin KU oranları sırasıyla %99.1, %99.1 ve %87.3 olarak bildirilmiştir (25). Phoenix™ 100 otomatize sistemiyle yapılan bir çalışmada BMD yöntemi altın standard olarak kabul edildiğinde; *Pseudomonas* spp. izolatlarında kolistine duyarlılık sonuçlarının KU oranı %100 olarak bildirilmiş olmakla birlikte, bu çalışmadaki izolatların hiçbirinin dirençli izolat olmadığı belirtilmiştir (26). Çalışmamızda ise altın standard yöntem olan BMD yönteminden elde edilen kolistine direnç oranlarıyla karşılaştırıldığında, Phoenix™ 100 otomatize sisteminin KU oranı tüm izolatlar için %92, *K. pneumoniae* için %100, *A. baumannii* için %77.78 ve *P. aeruginosa* için %60 olarak bulunmuştur. Tüm izolatlar için ÇBH oranı %0, BH oranı tüm izolatlar için %8 olarak saptanmış, BH oranı *K. pneumoniae* için %0, *A. baumannii* için %22.22 ve *P. aeruginosa* için %40 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlarla ISO 20766 standardı tarafından belirtilen kurallar çerçevesinde Phoenix™ 100 otoma-

tize sisteminin kabul edilebilir sınırlarda olduğunu görmekteyiz. Çalışmamızda otomatize sistemde çıkan kolistine dirençli izolatlar kullanılmış olup duyarlı izolatların BMD yöntemiyle doğrulanmaması çalışmamızın kısıtlılıkları arasındadır.

Son yapılan çalışmalar kolistin direncini saptamak için GDY veya otomatize sistemlerin kullanılmaması, BMD yönteminin kullanılması gerektiğini vurgulamaktadır. EUCAST da BMD yönteminin kullanılması konusunda laboratuvarları uyarmaktadır (27).

CLSI-EUCAST Polimiksin Eşik Değer Belirleme Çalışma Grubu, ISO 20776 standardı gereğince kolistin duyarlılığının belirlenmesi için, BMD yöntemini "referans yöntem" olarak belirlemiştir (5). Çalışmamızın sonuçları, rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan Phoenix™ 100 otomatize sisteminin kolistin için KU, ÇBH ve BH oranlarının, kabul edilebilir sınırlarda olduğunu; GDY'nin oranlarının ise standardı karşılamadığını göstermektedir. Buna göre, kolistin direnci BMD yöntemiyle doğrulanamayacaksa, sonucun Phoenix™ 100 otomatize sisteminde elde edilen MİK değerine göre bildirilmesi uygun olacaktır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Kaynaklar

1. 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. [CrossRef]
2. Osei Sekyere J, Govinden U, Bester LA, Essack SY. Colistin and tigecycline resistance in carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: emerging resistance mechanisms and detection methods. *J Appl Microbiol*. 2016; 121(3):601-17. [CrossRef]
3. Grégoire N, Aranzana-Climent V, Magréault S, Marchand S, Couet W. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of colistin. *Clin Pharmacokinet*. 2017; 56(12): 1441-60. [CrossRef]
4. Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, et al. Comparative evaluation of colistin susceptibility testing methods among carbapenem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59(8): 4625-30. [CrossRef]
5. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E). As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group [Internet]. Basel: EUCAST [erişim 1 Mart 2018]. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf.
6. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, valid from 2017-03-10 [Internet]. Basel: EUCAST [erişim 1 Mart 2018]. http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/previous_versions_of_documents/.
7. 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. [CrossRef]
8. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol*. 2013; 51(6): 1678-84. [CrossRef]

9. Nhung PH, Miyoshi-Akiyama T, Phuong DM, *et al.* Evaluation of the Etest method for detecting colistin susceptibility of multidrug-resistant Gram-negative isolates in Vietnam. *J Infect Chemother.* 2015; 21(8): 617-9. [\[CrossRef\]](#)
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters. Approved Guideline.* 3rd ed. CLSI document M23-A3. Wayne, PA: CLSI, 2008.
11. International Organization for Standardization. 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 [Internet]. Geneva: ISO [erişim 1 Mart 2018]. <https://www.iso.org/standard/41631.html>.
12. Pragasam AK, Shankar C, Veeraraghavan B, *et al.* Molecular mechanisms of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* causing bacteremia from India—a first report. *Front Microbiol.* 2017; 7: 2135. [\[CrossRef\]](#)
13. Balaji V, Jeremiah SS, Baliga PR. Polymyxins: antimicrobial susceptibility concerns and therapeutic options. *Indian J Med Microbiol.* 2011; 29(3): 230-42. [\[CrossRef\]](#)
14. Vasoo S. Susceptibility testing for the polymyxins: two steps back, three steps forward? *J Clin Microbiol.* 2017; 55(9): 2573-82. [\[CrossRef\]](#)
15. Humphries RM. Susceptibility testing of the polymyxins: where are we now? *Pharmacotherapy.* 2015; 35(1): 22-7. [\[CrossRef\]](#)
16. Maalej SM, Meziou MR, Rhimi FM, Hammami A. Comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution for susceptibility testing of colistin against Enterobacteriaceae. *Lett Appl Microbiol.* 2011; 53(5): 546-51. [\[CrossRef\]](#)
17. Tan TY, Ng LS. Comparison of three standardized disc susceptibility testing methods for colistin. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58(4): 864-7. [\[CrossRef\]](#)
18. Somily AM. Comparison of E-test and disc diffusion methods for the in vitro evaluation of the antimicrobial activity of colistin in multi-drug resistant Gram-negative bacilli. *Saudi Med J.* 2010; 31(5): 507-11.
19. Nicodemo AC, Araujo MR, Ruiz AS, Gales AC. In vitro susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates: comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution methods. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 53(4): 604-8. [\[CrossRef\]](#)
20. Tan TY, Ng SY. Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13(5): 541-4. [\[CrossRef\]](#)
21. Arroyo LA, García-Curiel A, Pachón-Ibañez ME, *et al.* Reliability of the E-test method for detection of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(2): 903-5. [\[CrossRef\]](#)
22. Piewngam P, Kiratisin P. Comparative assessment of antimicrobial susceptibility testing for tigecycline and colistin against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates, including multidrug-resistant isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 2014; 44(5): 396-401. [\[CrossRef\]](#)
23. Sınırtaş M, Akalın H, Gedikoğlu S. Investigation of colistin sensitivity via three different methods in *Acinetobacter baumannii* isolates with multiple antibiotic resistance. *Int J Infect Dis.* 2009; 13(5): e217-20. [\[CrossRef\]](#)
24. Chew KL, La MV, 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. *J Clin Microbiol.* 2017; 55(9): 2609-16. [\[CrossRef\]](#)
25. Lee SY, Shin JH, Lee K, *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. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(6): 1924-6. [\[CrossRef\]](#)
26. Giani T, Morosini MI, D'Andrea MM, García-Castillo M, Rossolini GM, Cantón R. Assessment of the Phoenix™ automated system and EUCAST breakpoints for antimicrobial susceptibility testing against isolates expressing clinically relevant resistance mechanisms. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18(11): E452-8. [\[CrossRef\]](#)
27. Giske CG, Kahlmeter G. Colistin antimicrobial susceptibility testing can the slow and challenging be replaced by the rapid and convenient? *Clin Microbiol Infect.* 2018; 24(2): 93-4. [\[CrossRef\]](#)