

Klebsiella Pneumoniae ve Acinetobacter Baumannii Suşlarında Kolistin Duyarlılığının Saptanması: Yöntem Karşılaştırması

Detection of Colistin Susceptibility in Klebsiella Pneumoniae and Acinetobacter Baumannii Strains: Method Comparison

İpek KOÇER¹  Hadiye DEMİRBAKAN¹ 

ÖZ

Amaç: Bu çalışma ile çok ilaca dirençli Gram negatif bakterilerde kolistin duyarlılığı için sıvı mikrodilüsyon (SMD) temelli ticari sistem ile kolistin sıvı disk elüsyon (KSDE) yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Araçlar ve Yöntem: Mart 2020 - Haziran 2022 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 112 K. pneumoniae ve 62 A. baumannii izolatu çalışmaya alınmıştır. Suşların kolistin duyarlılıkları SMD temelli ticari sistem ve KSDE yöntemleri ile karşılaştırılmıştır.

Bulgular: K. pneumoniae izolatlarının KSDE test sonuçları ile SMD temelli ticari kit sonuçları arasında çok iyi uyum bulunmuştur ($\kappa=0.88$). A. baumannii izolatlarının KSDE test sonuçları ile SMD temelli ticari kit sonuçları karşılaştırıldığında ise önemsiz düzeyde uyum bulunmuştur ($\kappa=0.11$).

Sonuç: Klebsiella izolatlarında KSDE yönteminin kolistin duyarlılığının belirlenmesinde uyumu yüksektir. Acinetobacter izolatlarında ise uyum düzeyinin düşük olması altın standart SMD yöntemine alternatif, rutin laboratuvarda uygulanabilir yöntemlere ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: antibiyotik duyarlılık; disk elüsyon; kolistin; sıvı mikrodilüsyon

ABSTRACT

Purpose: The aim of this study was to compare the broth microdilution method (BMD)-based commercial system and colistin broth disk elution method (CBDE) for colistin susceptibility in multidrug resistant Gram-negative bacteria.

Materials and methods: 112 K. pneumoniae and 62 A. baumannii isolates which were isolated from various clinical specimens between March 2020 and June 2022 were included in the study. The colistin susceptibilities of the strains were compared with BMD-based commercial system and CBDE methods.

Results: For K. pneumoniae isolates, a very good agreement was found between the results of the KSDE test and those of the commercially available SMD-based kit ($\kappa=0.88$). However, for A. baumannii isolates, there was a negligible level of agreement between the results of the KSDE test and the commercially available SMD-based kit ($\kappa=0.11$).

Conclusions: The CBDE method is highly compatible in determining the colistin susceptibility of Klebsiella species. The low level of agreement in Acinetobacter isolates indicates that new methods that can be applied in the routine laboratory as an alternative to the gold standard BMD method, are needed.

Keywords: antibiotic sensitivity; broth microdilution; colistin; disk elution

Gönderilme tarihi: 26.06.2023; Kabul edilme tarihi: 16.04.2024

¹Sanko Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep, Türkiye.

Sorumlu Yazar: İpek Koçer, Sanko Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep, Türkiye. e-posta: ipekkocer1@gmail.com

Makaleye atf için: Koçer İ, Demirbakan H. Klebsiella pneumoniae ve acinetobacter baumannii suşlarında kolistin duyarlılığının saptanması: yöntem karşılaştırması. Ahi Evran Med J. 2024;8(2):174-178. DOI: 10.46332/aemj.1320170



GİRİŞ

Çok ilaca dirençli *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) ve *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) gibi Gram negatif bakterilerin neden olduğu ciddi enfeksiyonlarda, kolistin tek başına ya da diğer antibiyotiklerle kombine olarak kullanılan tedavi seçeneklerindedir.¹ Kolistin, Gram negatif bakterilerin dış membran yapısında bulunan lipopolisakaritlere bağlanarak bakterisidal etki gösterir. Hayvancılık ve gıda alanında kolistin kullanımının yaygınlaşması ve klinikte kolistine maruziyet, artan kolistin direncine neden olmaktadır.^{2,3} Disk difüzyon, gradiyent test ve otomatize sistemler ilacın yapısından da kaynaklanan nedenlerle dirençli ve duyarlı izolatları doğru ayırt edememekte, yanlış duyarlılık sonuçlarına sebep olarak çok büyük hataya yol açmaktadır. Bu nedenle 2016 yılında, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ile European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kuruluşlarının ortak olarak belirlediği standarda göre kolistin duyarlılığını saptamak için sıvı mikrodilüsyon yöntemi (SMD) referans yöntem olarak belirlenmiştir.⁴ Kolistin direncinin saptanması için, CLSI tarafından sıvı mikrodilüsyona ilaveten, sıvı disk elüsyon ve agar dilüsyon yöntemleri de önerilmektedir.⁵ Kolistin disk elüsyon yöntemi (KSDE), son zamanlarda ucuz olması ve daha kısa sürede sonuç vermesi bakımından iş yükü fazla olan mikrobiyoloji laboratuvarlarının kullanabileceği alternatif bir tarama testi olarak denenmektedir.⁶ Bu çalışmada, kolistin duyarlılığı açısından, çok ilaca dirençli Gram negatif bakterilerde, SMD temelli ticari test ile KSDE yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

ARAÇLAR ve YÖNTEM

Bu çalışma için Sanko Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 07.12.2022 tarih ve 2022/12 karar no ile izin alınmıştır.

Çalışma Grubu

Mart 2020 - Haziran 2022 tarihleri arasında Sanko Üniversitesi Hastanesi'ne yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden (kan, idrar, bronkoalveoler lavaj, beyin omurilik sıvısı, yara, trakeal aspirat) izole edilen 112 *K. pneumoniae* ve 62 *A. baumannii* izolatı çalışmaya alınmıştır.

Laboratuvar Çalışmaları

Sıvı Mikrodilüsyon Temelli Ticari Sistem

Rutin laboratuvarda üreyen mikroorganizmaların otomatize sistem BD Phoenix100 (Becton Dickinson, Maryland, ABD) ile tanımlama ve antibiyotik duyarlılıkları yapıldıktan sonra çok ilaca dirençli tespit edilen *K. pneumoniae* ve *A. baumannii* izolatlarının kolistin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri sıvı mikrodilüsyon temelli ticari sistem (Diagnostics *l.n.c.*, Galanta, Slovakia) ile çalışılmıştır. Önceden liyofilize edilmiş, 0.25 ile 16 µg/ml arasında iki kat azalan konsantrasyonlarda kolistin bulunan 8 kuyucuklu pleytlere, üretici firmanın önerileri doğrultusunda Mueller Hinton broth kullanılarak 18-24 saatlik kültür plaklarından hazırlanan bakteri süspansiyonlarından 100 µl pipetlenmiştir. 35±1°C'de 16-20 saat inkübasyon sonunda pleytlerdeki kuyucuklar üreme varlığı açısından renk değişimine göre incelenerek kolistin MİK değeri belirlenmiştir. EUCAST klinik sınır değerlere göre MİK değeri ≤2 µg/ml olan izolatlar kolistin duyarlı, >2 µg/ml olan izolatlar ise kolistin dirençli olarak değerlendirilmiştir.⁷

Kolistin Sıvı Disk Elüsyon (KSDE) Testi

Kolistin sıvı disk elüsyon yönteminde her izolat için 10 ml katyon eklenmiş Mueller Hinton broth içeren dört adet tüp kullanılmıştır. Tüplere son konsantrasyonları sırasıyla; 0 (üreme kontrol), 1, 2 ve 4 µg/ml olacak şekilde, birinci tüpe 1, ikinci tüpe 2 ve üçüncü tüpe 4 adet kolistin diski (10 µg) (Becton Dickinson) eklenmiştir. Tüpler 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Her birine 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonundan 50 µl eklenerek vortekslenmiştir. 35°C'de 16-20 saat inkübasyon sonrası gözle görünür bir bulanıklığın olmadığı ilk tüp konsantrasyonu kolistin MİK değeri olarak belirlenmiştir.⁶ Kalite kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 ve daha önceki çalışmalarda sekans analizi ile doğrulanan *mcr-1* pozitif *E. coli* kullanılmıştır. Sonuçlar EUCAST klinik sınır değerlere göre değerlendirilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi için SPSS Ver 23.0.0 programı kullanılmıştır. Yöntemler arasındaki uyum Cohen k (kappa) değerlendirmesi ile Landis-Koch dikkate alınarak

belirlenmiştir.⁸ Yöntem karşılaştırılması Cohen's Kappa metodu kullanılarak, pozitif örneklerin karşılaştırılması ve anlamlı fark yorumu da %95 güven aralığı [confidence interval (CI)] kullanılarak yapılmıştır.⁹ Ayrıca p değeri hesaplanmamıştır.

BULGULAR

Çalışmamızda 62 *A. baumannii* ve 112 *K. pneumoniae* izolatı incelenmiştir. Çalışmaya alınan 174 izolatın kolistin duyarlılıkları sıvı mikrodilüsyon temelli ticari kite göre değerlendirildiğinde, *A. baumannii* izolatlarının 40'ı duyarlı, 22'si dirençli; *K. pneumoniae* izolatlarının 40'ı duyarlı 72'si dirençli olarak bulunmuştur. Bu izolatların kolistin duyarlılıkları KSDE yöntemine göre değerlendirildiğinde ise, *A. baumannii* izolatlarının 60'ı duyarlı, ikisi dirençli; *K. pneumoniae* izolatlarının 42'si duyarlı 70'i dirençli olarak bulunmuştur.

A. baumannii izolatlarında kolistin direncinin belirlenmesinde KSDE ile sıvı mikrodilüsyon temelli ticari kit arasında % 67.7 (CI 0.034-0.263) uyum saptanmıştır. *A. baumannii* izolatlarının, KSDE test sonuçları ile sıvı mikrodilüsyon temelli ticari kit sonuçları karşılaştırıldığında Landis-Koch değerlendirmesine göre, "iki test arasında önemsiz derecede uyuma bulunmaktadır" şeklinde yorumlanmıştır ($\kappa=0.11$). *A. baumannii* izolatları için KSDE ve sıvı mikrodilüsyon temelli ticari kit MİK değerlerinin karşılaştırılması Tablo.1'de verilmiştir.

Tablo 1. *A. baumannii* izolatlarının iki yöneme göre MİK değerleri.

		Kolistin sıvı disk elüsyon				
		MİK (g/ml)	1	2	4	>4
		0.5	18			
Kolistin sıvı Mikrodilüsyon temelli ticari sistem	1	16	3			
	2	3				
	4	8				
	8	6			1	
	16	6				1

K. pneumoniae izolatlarında kolistin direncinin belirlenmesinde KSDE ile sıvı mikrodilüsyon temelli ticari kit arasında % 94.6 (CI 0.795-0.974) uyum saptanmıştır. *K. pneumoniae* izolatlarının KSDE test sonuçları SMD ile karşılaştırıldığında Landis-Koch değerlendirmesine göre, "iki test arasında çok iyi derecede uyuma bulunmaktadır"

şeklinde yorumlanmıştır ($\kappa=0.11$). *K. pneumoniae* izolatları için KSDE ve sıvı mikrodilüsyon temelli ticari kit MİK değerlerinin karşılaştırılması Tablo.2'de verilmiştir.

Tablo 2. *K. pneumoniae* izolatlarının iki yöneme göre MİK değerleri.

		Kolistin sıvı disk elüsyon				
		MİK (g/ml)	1	2	4	>4
		0.5	18	5		
Kolistin sıvı mikrodilüsyon temelli ticari sistem	1	15				
	2				2	
	4	3			9	2
	8	1			5	9
	16				7	36

TARTIŞMA

Kolistin dirençli Gram negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar daha yüksek mortalite ile ilişkili olduğundan kolistin duyarlılık testlerinin rutin laboratuvarlarda yapılması önem arz etmektedir.¹⁰ Otomatize sistemler, disk difüzyon ve gradient testler polimiksinlerin duyarlılığında düşük performansları nedeniyle kullanılmamaktadır.¹¹ Kolistin duyarlılığının saptanmasında referans yöntem sıvı mikrodilüsyon olmasına karşın bu yöntemin zaman alıcı, pahalı olması, heterodirenci tespit etmedeki sınırlılıkları ve kolistinin toz formuna erişilebilirlikteki zorluklar nedeniyle alternatif metotların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Kolistin direncinin belirlenmesinde kolistin agar test ve kolistin sıvı disk elüsyon yöntemi, CLSI'nın önerdiği alternatif yöntemlerdendir.⁵ Kolistin direncinin belirlenmesinde KSDE yönteminin avantajı, ek bir tecrübe ve cihaz gerektirmeden herhangi bir klinik mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından kolaylıkla temin edilebilecek kolistin diskleri ile Mueller-Hinton broth kullanarak sonuç alınmasıdır.

İlk olarak Simner ve ark yapmış oldukları çalışmada, KSDE yöntemi ile kolistin SMD sonuçlarını karşılaştırmış, iki test arasında %98'lik kategorik uyum, %99'luk temel uyum tespit edilmiş ve mcr-1 saptanan izolatlarda MİK değeri 2 ug/ml olanların sıvı mikrodilüsyon ile doğrulanması gerektiği belirtilmiştir.⁶ Bell ve ark mcr-1 pozitif olan Enterobacterales izolatlarında KSDE metodunun şüpheli sonuçları nedeniyle modifiye KSDE yöntemini geliştirmiştir. EDTA varlığında KSDE yöntemini modifiye ederek yaptıkları bu çalışmada, moleküler yöntemle karşılaştırıldığında EDTA ilaveli KSDE yönteminin duyarlılığı

ve özgülüğü sırasıyla %100 ve %95.8 olarak belirlenmiştir.¹² Çalışmamızda klasik KSDE yöntemi kullanılarak çok ilaca dirençli Gram negatif bakterilerin kolistin duyarlılıkları değerlendirilmiştir. Test edilen *K. pneumoniae* izolatlarında kolistin direncinin belirlenmesinde iki yöntem arasında uyumun çok iyi, *A. baumannii* izolatları için ise KSDE yönteminin uyumunun düşük olduğu görülmektedir. Ülkemizde Özyurt ve ark'nın çok ilaca dirençli gram negatif bakterilerin kolistin MİK sonuçlarını otomatize sistem, sıvı mikrodilüsyon ve KSDE yöntemleri ile değerlendirdikleri çalışmada, KSDE yöntemi ile kolistin SMD sonuçları karşılaştırılmış KSDE yönteminin performansının iyi olduğu, otomatize sistemin yeterli düzeyde performans göstermediği bulunmuştur.¹³ Humphries ve ark'nın yaptığı çok merkezli çalışmada, gram negatif bakterilerde KSDE yöntemi ile SMD yöntemi arasında %94.4 temel uyum ile %97.9 kategorik uyum tespit edilmiştir.¹⁴ Annamaria ve ark. yaptığı çalışmada *Klebsiella* izolatlarında KSDE yönteminin kolistin direncini tespit etmede iyi derecede performans gösterdiği belirlenmiştir.¹⁵ Butt ve ark'nın KSDE sonuçlarını referans metotlar ile karşılaştırdıkları çalışmalarında, KSDE yönteminin Enterobacterales türleri arasındaki duyarlılığı ve özgülüğü sırasıyla %90.90, %92.07, *P.aeruginosa*'nın %100, %83.3 ve *A.baumannii*'nin %30, %50 olarak saptanmıştır.¹⁶ Ülkemizde 2022 yılında Sarıkaya ve ark'nın yapmış olduğu *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, Enterobacterales türlerinde SMD ile KSDE yöntemlerinin karşılaştırıldığı çalışmada enterik bakterilerde kategorik ve temel uyumun yüksek olduğu tespit edilirken *Acinetobacter* izolatları için uyumun düşük düzeyde olduğu gösterilmiştir.¹⁷ Çalışmamızda da benzer şekilde KSDE yönteminin *K. pneumoniae* izolatları için sonuçları iyi düzeyde uyumlu olmasına rağmen *A. baumannii* izolatlarında uyum düzeyinin düşük olduğu görülmüştür. Çalışmamızın kısıtlılığı ise klasik yöntem sıvı mikrodilüsyon ile karşılaştırmamak ve direnç genleri tespit edilen daha çeşitli bakteri izolatlarının değerlendirilmemiş olmasıdır. Aynı zamanda *Acinetobacter* izolatlarının daha az sayıda olması nedeniyle sonuçlarda farklılıklar çıkabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak KSDE yöntemi, SMD yöntemine göre rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında basit, maliyeti düşük ve güvenilir bir yöntem olarak alternatif seçenektir. Kolistin sıvı disk elüsyon yönteminin *Klebsiella* izolatlarında

uyum düzeyi yüksek olduğundan kullanımının güvenilir olduğu ancak değişken sonuçlar nedeniyle *Acinetobacter* izolatlarında farklı direnç mekanizmalarına sahip daha fazla sayıda ve farklı MİK değerlerinde izolat ile çalışılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Çıkar Beyannamesi

Herhangi bir çıkar çatışmasının olmadığını yazarlar beyan etmektedirler.

Etik Kurul İzni

Bu çalışma için Sanko Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulundan alındı (Tarih: 07.12.2022, Karar No: 2022-12).

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyanı

Ana fikir/Planlama: İK, HD. Veri toplama/İşleme: İK. Veri analizi ve yorumlama: İK, HD. Literatür taraması: İK, HD. Yazım: İK, HD. Gözden geçirme ve düzeltme: HD.

KAYNAKÇA

1. Biswas S, Brunel JM, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Rolain JM. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10(8):917-934.
2. Binsker U, Käsbohrer A, Hammerl JA. Global colistin use: a review of the emergence of resistant Enterobacterales and the impact on their genetic basis. *FEMS Microbiol. Rev.* 2021;46(1):49.
3. Uzairue LI, Rabaan AA, Adewumi FA, et al. Global Prevalence of Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* from Bloodstream Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pathogens.* 2022;11(10):1092.
4. 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. 2016.
5. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.
6. 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;57(2):10-1128.
7. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. (EUCAST) Version 7.1 http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/previous_versions_of_documents. Erişim tarihi 10 Temmuz, 2023.
8. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics.* 1977;33(1):159-174.
9. Akobeng AK. Understanding randomised controlled trials. *Arch Dis Child.* 2005;90(8):840-844.

10. Rojas LJ, Salim M, Cober E, et al. Colistin Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Laboratory Detection and Impact on Mortality. *Clin Infect Dis*. 2017;64(6):711-718.
11. Ezadi F, Ardebili A, Mirnejad R. Antimicrobial Susceptibility Testing for Polymyxins: Challenges, Issues, and Recommendations. *J Clin Microbiol*. 2019;57(4):10-1128.
12. 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; 57(5):10-1128.
13. Koyuncu Özyurt Ö, Özhak B, Öğünç D, 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):254-261.
14. Humphries RM, Green DA, Schuetz AN, et al. Multi-center Evaluation of Colistin Broth Disk Elution and Colistin Agar Test: a Report from the Clinical and Laboratory Standards Institute. *J Clin Microbiol*. 2019;57(11):10-1128.
15. 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*. 2022;11(3):337.
16. Butt T, Butt A, Yasmin S, Taj S, Tariq N, Bano S. Antibiotic Disk Elution Method to Determine the Colistin Susceptibility against Enterobacterales and Non-fermenter Bacteria. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2022;32(6):820-822.
17. Sarıkaya A, Mumcuoğlu İ, Baran I, Aksoy A, Dinç B. Comparison of Colistin Broth Disc Elution, Rapid Resapolymyxin NP and Broth Microdilution Methods in Determining Colistin Sensitivity in *Acinetobacter*, *Pseudomonas* and Enterobacterales species. *Mikrobiyol Bul*. 2022;56(3):404-415.