

Cilt 35

Sayı 1

Antibiyotik ve Kemoterapi
(ANKEM) Derneği

2021

Bulletin of Antimicrobial
Chemotherapy

ANKEM

DERGİSİ

İçindekiler

Contents

ARAŞTIRMALAR / RESEARCH ARTICLES

Sahibi / Owner

Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği adına
Dernek Başkanı Prof. Dr. Bülent GÜRLER
(On behalf of the Society of
Antimicrobial Chemotherapy)

Editör / Editor

Prof. Dr. Derya AYDIN
derya.aydin@ankemderneği.org.tr
Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi
0000-0002-5812-4861

Yardımcı Editörler / Associate Editors

Prof. Dr. Dolunay GÜLMEZ KIVANÇ
dolunay.gulmez@ankemderneği.org.tr
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
0000-0001-9021-0439

Uzm. Dr. D. Bahar AKGÜN KARAPINAR
bahar.karapinar@ankemderneği.org.tr
İ. Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
0000-0002-3470-5346

Yazışma Adresi / Correspondence Address

Prof. Dr. Derya AYDIN
ANKEM Derneği
Topkapı Mahallesi Turgut Özal Millet
Caddesi No: 176 Daire 16 Kat: 5
Fatih / İSTANBUL
Tel: (0212) 219 93 39 / 40
Faks: (0212) 219 93 41
e-posta: ankem@ankemderneği.org.tr
www.ankemderneği.org.tr

- **Klebsiella pneumoniae** suşlarında OXA-48 ve alt türevlerinin araştırılması ve fenotipik yansıma 1
The investigation of OXA-48 and sub-derivatives in Klebsiella pneumoniae strains and phenotypic reflection
Uzm Dr Arzu UYANIK PARLAK, Prof Dr Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU,
Doç Dr Mehmet PARLAK, Prof Dr Yasemin BAYRAM, Prof Dr Barış OTLU
- **Kolistin duyarlılık testi için Diagnostics Colistin MIC-Strip testinin değerlendirilmesi** 9
Evaluation of Diagnostics Colistin MIC-Strip test for colistin susceptibility testing
Arş Gör Dr Gülşen ALTINKANAT GELMEZ, Uzm Dr Elvan SAYIN,
Prof Dr Ufuk HASDEMİR, Prof Dr Güner SÖYLETİR
- **Yara yeri örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik direnç oranları** 14
Microorganisms isolated from wound samples and their antibiotic resistance rates
Arş Gör Dr Ezgi KÖSE, Doç Dr Emel ÇALIŞKAN, Arş Gör Dr Nagihan MEMİŞ,
Arş Gör Dr Betül DÖNMEZ, Arş Gör Dr Pelin DURAN
- **Klinik Pseudomonas aeruginosa izolatlarında siprofloksasin direnci ve direnç mekanizmalarının araştırılması** 22
Investigation of ciprofloxacin resistance and its mechanisms in clinical Pseudomonas aeruginosa isolates
Dr Nilüfer UZUNBAYIR AKEL, Dr Yamaç TEKİNTAŞ, Doç Dr Fethiye Ferda YILMAZ,
Dr Öğr Üyesi İsmail ÖZTÜRK, Arş Gör Mustafa ÖKEER,
Prof Dr Sabire Şöhret AYDEMİR, Prof Dr Fatma Feriha ÇİLLİ,
Prof Dr Mine HOŞGÖR-LİMONCU



Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği
Society of Antimicrobial
Chemotherapy

Hazırlık ve Baskı:



LOGOS YAYINCILIK TİC. A. Ş.
Yıldız Posta Cad. Sinan Apt. No. 36
D.63/64 34349 Gayrettepe-Istanbul
Tel: (0212) 288 05 41-(0212) 288 50 22
Faks: (0212) 211 61 85
e-mail: logos@logos.com.tr
http://www.logos.com.tr

Nisan, Ağustos ve Aralık aylarında
olmak üzere yılda üç kez yayınlanır.

Yayın türü: Yerel süreli

ANKEM Dergisi TÜBİTAK/ULAKBİM ve
Türkiye Atıf Dizini (Türkiye Citation Index)
veri tabanlarında yer almaktadır.

ANKEM Dergisi Serbest Erişimli
(Open Access) bir dergidir.

OLGU SUNUMU / CASE REPORT

- **Türkiye’de ilk defa saptanan gıda kaynaklı *Vibrio parahaemolyticus* olguları** 28






First Food-borne cases of Vibrio parahaemolyticus in Turkey

Uzm Dr Nilgün KANSAK, Doç Dr Rıza ADALETİ, Uzm Dr Belkis LEVENT,
Prof Dr Sebahat AKSARAY

-
- **Düzeltilme** III
 - **36.ANKEM Akılcı Antibiyotik Kullanımı Kongresi Duyurusu** IV
 - **ANKEM Dergisi Yazım Kuralları** V-VI
Editorial Rules of Bulletin of ANKEM
-

Klebsiella pneumoniae Suşlarında OXA-48 ve Alt Türevlerinin Araştırılması ve Fenotipik Yansıma

The Investigation of OXA-48 and Sub-Derivatives in Klebsiella pneumoniae Strains and Phenotypic Reflection

Arzu Uyanık Parlak 
Hüseyin Güdücüoğlu 
Mehmet Parlak 
Yasemin Bayram 
Barış Otlu 

öz

Hastane enfeksiyonları içinde karbapenem dirençli Gram negatif bakterilerin etken olduğu enfeksiyonların sayısı giderek artmaktadır. Bu bakteriler genellikle diğer grup antibiyotiklere de dirençli olduklarından dolayı sağlık için ciddi bir tehdit oluşturmaktadırlar. Çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen Klebsiella pneumoniae izolatlarında OXA-48 ve alt türevlerinde karbapenemaz direncinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmesi ve direnç gözlenmeyen izolatlarda genotipik olarak OXA-48 gen bölgesinin var olup olmadığının araştırılması hedeflenmiştir.

Çalışmaya Mart 2015-Mart 2016 yılları arasında polikliniklere başvuran veya çeşitli servis ve yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören hastalardan izole edilen 127 K.pneumoniae izolatı dâhil edilmiştir. BD Phoenix otomatize sistemiyle identifikasyonu ve antibiyogramı yapılan izolatların antibiyotiklere duyarlılıklarını Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle de tespit edilmiştir. OXA-48 tipi enzimlerin varlığını gösterdiği kabul edilen temosilin diski ile fenotipik olarak direnç varlığına bakılmıştır. Tüm izolatlarda "in-house" polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile OXA-48 tipi enzimin varlığı araştırılmış ve pozitif saptanan izolatlarla DNA dizi analizi yapılarak OXA-48 varyant varlığına bakılmıştır.

Karbapenem direnç oranı % 35 ve GSBL pozitifliği ise % 46 olarak tespit edilmiştir. Temosilin disk yönteminin K.pneumoniae suşlarında OXA-48 gen varlığını saptamadaki duyarlılığı % 88; özgüllüğü % 89 olarak bulunmuştur. OXA-48 varlığına bağlı gelişen karbapenem direncini saptamada duyarlılık ve özgüllük dengesi için en iyi karbapenemin ertapenem olduğu gözlenmiştir. Otomatize sistemle karbapenemlere dirençli olarak tespit edilen K.pneumoniae izolatlarında bla_{OXA-48} gen bölgesi varlığı % 80 bulunmuştur. OXA-48 pozitif olarak saptadığımız 42 izolatla yapılan DNA dizi analizi ile elde edilen tüm dizilerin OXA-48 olduğu ve diziler içinde varyant OXA-48 geni bulunmadığı tespit edilmiştir. Genotipik olarak OXA-48 gen bölgesine sahip üç izolatla direnç fenotipik olarak yansımasının doğrudan doğruya ortaya çıkmadığı gözlenmiştir.

Karbapenemlere dirençli K.pneumoniae izolatlarındaki bla_{OXA-48} gen bölgesi varlığı yaygındır. Bunun yanında OXA-48 gen bölgesine sahip bazı izolatlarda direnç fenotipik olarak yansımasının hemen ortaya çıkmaması nedeniyle tedaviye rağmen iyileşmeyen hastalarda bu tip izolatların olabileceği akılda tutulmalıdır.

Anahtar kelimeler: fenotipik yansıma, karbapenem, K.pneumoniae, OXA-48

ABSTRACT

The number of infections caused by carbapenem-resistant Gram negative bacteria is increasing among nosocomial infections. These bacteria are a serious threat to health because they are usually resistant to other antibiotics. This study was aimed to determine the carbapenemase resistance of OXA-48 and its sub-derivatives in Klebsiella pneumoniae isolates isolated from various clinical samples by phenotypic and genotypic methods and to investigate the presence of OXA-48 gene region genotypically in isolates without resistance.

A total of 127 K.pneumoniae strains isolated from patients treated in various clinics and intensive care units were included in this study from March 2015 to March 2016. The isolates were identified and susceptibilities were tested using BD Phoenix automated system and also with Kirby-Bauer disk diffusion method. The presence of resistance was examined phenotypically with the disk of temosillin, which is considered to indicate the presence of OXA-48 type enzymes. The presence of OXA-48 type enzyme was investigated by "in-house" polymerase chain reaction (PCR) in all isolates and the presence of OXA-48 variant was investigated by DNA sequencing analysis on positive isolates.

Karbapenem resistance rate was 35 % and ESBL positivity was determined as 46 %. The sensitivity of temocillin disk method in the identification of OXA-48 gene presence in K. pneumoniae strains was found to be 88 %, and specificity 89 %. Ertapenem was the best carbapenem with sensitivity and specificity balance to detect carbapenem resistance caused by OXA-48. The presence of bla_{OXA-48} gene region was 80 % in K. pneumoniae isolates detected as resistant to carbapenems by an automated system. All sequences obtained by DNA sequence analysis of 42 OXA-48 positive isolates were OXA-48 and there was no variant OXA-48 gene among the sequences. It was observed that the phenotypic reflection of resistance did not occur immediately in three isolates genotypically having OXA-48 gene region.

The presence of bla_{OXA-48} gene region in carbapenem-resistant K.pneumoniae isolates is common. In addition, in some isolates having OXA-48 gene region, should be kept in mind in patients who do not recover despite treatment, due to phenotypic reflection of resistance does not occur immediately.

Keywords: carbapenem, K.pneumoniae, OXA-48, phenotypic reflection

Received/Geliş: 07.10.2020

Accepted/Kabul: 22.02.2021

Published Online/Online Yayın: 29.04.2021

Atf/Cite as: Uyanık Parlak A, Güdücüoğlu H, Parlak M, Bayram Y, Otlu B. Klebsiella pneumoniae suşlarında OXA-48 ve alt türevlerinin araştırılması ve fenotipik yansıma. ANKEM Derg. 2021;35(1):1-8.

Mehmet Parlak

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Tıp Fakültesi,

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,

Van, Türkiye

✉ mehmetparlak65@hotmail.com

ORCID: 0000-0001-6030-2244

A. Uyanık Parlak 0000-0003-1048-8268

Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları ve

Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma

Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı,

Ankara, Türkiye

H. Güdücüoğlu 0000-0003-1048-8268

Y. Bayram 0000-0001-6083-5550

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji

Anabilim Dalı,

Van, Türkiye

B. Otlu 0000-0002-6220-0521

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi,

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,

Malatya Türkiye

GİRİŞ

Klebsiella cinsi bakteriler, tedavi edilmediğinde yüksek ölüm oranlarına sahip toplum kaynaklı bakteriyel pnömoni etkeni olabilmektedir. Nozokomiyal enfeksiyonlardan sorumlu esas bakteri *Klebsiella pneumoniae* olup, bu cinsin medikal olarak en önemli türüdür. İnsanların nazofarinksinde ve intestinal sisteminde saprofit olarak bulunmaktadır. Dışkı örneklerinde tespit oranı % 5 ile % 38 arasında değişirken, nazofarenkste oranlar % 1 ile % 6 arasında değişmektedir. Bu taşıyıcılık oranları, kolonizasyon oranlarının kalış süresiyle doğru orantılı olarak arttığı hastane ortamında büyük ölçüde değişir.

Hastanede yatan hastalarda bildirilen taşıyıcı oranları dışkıda % 77, farinkste % 19 ve hastaların ellerinde % 42'dir⁽¹⁹⁾.

Bu yüzyılın başlarından itibaren genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL), *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında hızla yayılmıştır. Son yıllarda bu yayılım kontrolden çıkmış ve toplum kaynaklı enfeksiyonlar olarak karşımıza çıkmaya başlamıştır. GSBL üreten *K.pneumoniae* enfeksiyonlarında kullanılacak az sayıdaki etkili ajanlar arasında en güvenilir olanı ise karbapenemlerdir. Karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatlarının ortaya çıkışı hem tedavi seçeneklerini kısıtlamakta hem de morbidite ve mortaliteyi artırmaktadır. Ayrıca karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* üyeleri, tigesiklin ve polimiksin dışındaki ajanlara karşı dirence sahip olduklarından ciddi bir tehdit oluşturmakta ve dikkatle takip edilmeleri gerekmektedir^(2,16).

Karbapenemazlar, fonksiyonel sınıflamada grup 2d, 2f ve 3'te, Ambler moleküler sınıflamada ise A, B ve D sınıfı içerisinde bulunmaktadır. Sınıf D içerisinde OXA enzimleri bulunmaktadır⁽¹⁾. Bu gruptan OXA-48 ilk olarak ülkemizde, İstanbul'da karbapenem dirençli bir *K.pneumoniae* izolatında tanımlanmıştır. Bu izolat ayrıca sınıf A GSBL olan SHV-2a, dar spektrumlu beta-laktamaz TEM-1 ve OXA-47'yi bulundurmaktadır. OXA-48 beta-laktamazı penisilinleri ve penisilinlerden daha düşük düzeyde imipenemi hidrolize etmektedir fakat geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı aktif değildir. Bu enzim, imipenem için bilinen en yüksek katalitik aktiviteye sahip sınıf D beta-laktamazdır. Diğer sınıf D beta-laktamazları ile olan aminoasit benzerliği % 46'dan daha azdır ve OXA-23 ve OXA-40 ile zayıf benzerliğe sahiptir (sırasıyla % 36 ve % 32)⁽²⁰⁾.

Çalışmamızda; çeşitli klinik örneklerden izole edilen *K.pneumoniae* izolatlarında OXA-48 tipi (OXA-48 ve varyantların) karbapenemaz direncinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmesi fenotipik olarak karbapenem direnci göstermeyen izolatların direnç genlerine sahip olup olmadığının tespit edilmesi ve ülkemize ait epidemiyolojik verilere katkı sağlamak amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Örneklerin Toplanması:

Çalışma, Mart 2015-Haziran 2016 tarihleri arasında Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Çalışmaya çeşitli klinik örneklerden enfeksiyon etkeni olarak izole edilmiş ve Phoenix100 (Becton Dickinson, ABD) otomatize sistemi ile karbapenemlere duyarlı, orta dirençli veya dirençli olarak belirlenen 127 *K.pneumoniae* izolatı dahil edilmiştir. Bir hastadan birden fazla izolat çalışmaya dahil edilmiştir.

Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örnekler % 5 koyun kanlı agar (RTA, Türkiye) ve Eozin Metilen Mavisı agar (Oxoid, İngiltere) besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Gram boyama ile Gram negatif basil morfolojisinde olan tüm izolatların tür tanımlanması otomatize Phoenix 100 bakteri tanımlama sistemi ile yapılmıştır. *K.pneumoniae* olarak tanımlanan izolatlar -80°C'de derin dondurucuda (Sanyo, Japonya) saklanmıştır.

Tüm izolatlar için antibiyotik duyarlılık testleri ve GSBL tespiti Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ve Phoenix100 (Becton Dickinson, ABD) otomatize sistemi panelleri kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar 2015 yılında Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ve 2016 yılında ise European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kriterlerine göre değerlendirilmiştir^(8,24).

Temosilin disk difüzyon testi için plaklara 30 µg temosilin (Mast Diagnostics, Merseyside, Birleşik Krallık) içeren antibiyotik diski yerleştirilip 35-37°C'de 18-24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnhibisyon zon çapı ≤10 mm ise yüksek temosilin direnci olarak değerlendirilmiştir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR):

Bu yöntemle *K.pneumoniae* izolatlarında OXA-48 ve varyantı olan (OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-204, OXA-232) karbapenemaz direnç geni varlığı araştırılmıştır. DNA izolasyonunda Exgene™ Clinic SV Mini kit (GeneAll, Güney Kore) kullanılmıştır. Kullanılan primerler Monteiro ve ark.'nın⁽¹⁵⁾ çalışmasından alınmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Karbapenemaz genlerinin saptanması amacıyla kullanılan primer dizileri.

Gen	Primer	Sekans(5'-3')	Kaynak
bla _{OXA-48}	OXA-48-F	TGTTTTTGGTGGCATCGAT	10
	OXA-48-R	GTAAMRATGCTTGGTTCGC	
OXA-48A		TTGGTGGCATCGATTATCGG	13
OXA-48B		GAGCACTTCTTTGTGATGGC	

Amplifikasyon için SensoQuest Labcycler (SensoQuest Biomedizinische, Almanya) cihazı kullanılmıştır. İzole edilen DNA ile Taq DNA polimeraz (Geneall, Güney Kore) kitinin önerisi doğrultusunda reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

OXA-48 ve Diğer Varyantların Tespiti:

Bakteriyel DNA izolasyonu, QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen-Hilden, Almanya) ile yapılmıştır. PCR ile OXA-48-like gen bölgesinin çoğaltılması aşamasında bilinen tüm bla OXA-48-like genlerinin amplifikasyonu için kullanılan primerler Tablo 1'de verilmiştir. PCR sonrasında ürünlerin % 1,5'lük agaroz jelde, 1X TBE tamponunda 1 saat elektroforez yapılmıştır. Elektroforez işlemi sonrası oluşan bantlar jel görüntüleme sisteminde (Gel logic 2200 imaging system, Kodak Company, NY, ABD) görüntülenmiştir. 743bp büyüklüğündeki bantlar OXA-48-like geni pozitif olarak değerlendirilmiştir.

PCR ürünlerinin dizileme için saflaştırılması:

PCR sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünleri, DNA saflaştırma işlemine alınmıştır. Bu amaçla ticari bir saflaştırma kiti (Qiaquick PCR purification Kit, Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulanan protokol uygulanmıştır. İşlem sonunda elde edilen ürünlerin saflığı % 1,5'lük agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiş ve yeterli miktarda DNA içeren saflaştırılma ürünleri sekans reaksiyonunda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

DNA dizi analizi için sekans reaksiyonu; çift yönlü olarak her iki primerle yapılmıştır. Döngüsel dizileme için amplifikasyon koşulları 45 döngü boyunca 96°C'de 10 saniye, 50°C'de 5 saniye ve 60°C'de 4 dakika olarak uygulanmıştır (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems, ABD).

Sonuçların Analizi:

Dizileme sonuçlarını içeren kromatogram dosyaları FinchTV v1.3.1 yazılımına (GeoSpiza Inc., ABD) aktarılarak, diziler görsel olarak incelenmiş ve gerekli

görülen düzeltmeler yapılmıştır. Suşların elde edilen OXA-48-like gen dizileri Ugene yazılımı kullanılarak (<http://ugene.unipro.ru>), tüm diziler hizalanmıştır. Bunun yanında OXA-48 tipini (varyantını) belirlemek için National Centre for Biotechnology Information (NCBI) içinde yer alan GenBank ve Nucleotide ve Protein BLAST (Basic Local Alignment Tool) sunucuları kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışmaya, her biri ayrı hastalardan izole edilen 47 adet karbapenem dirençli ve 80 adet karbapenem duyarlı olmak üzere 127 *K.pneumoniae* izolatu dahil edilmiştir. Çalışmaya alınan izolatların 77'si (% 60,6) erkek, 50'si (% 39,4) kadın hastalardan izole edilmiştir. Hastaların 58'i polikliniklere başvuru yapan hastalardan, 69'u ise farklı servis ve yoğun bakım ünitelerinde takip edilen hastalardan oluşmaktadır. İzolatlar en fazla sırasıyla pediatri (% 47), anestezi (% 16), üroloji (% 10) ve dahiliyeden (% 9) elde edilmiştir. Örneklerin çoğunluğunu idrar örnekleri oluştururken (% 66), bunu sırasıyla kan (% 17), yara (% 5) ve solunum yolu örnekleri (% 3) takip etmiştir. İzolatların antibiyotiklere duyarlılık sonuçları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının karbapenemlere duyarlılık test sonuçları.

Antibiyotik	Phoenix (MİK)				Disk Difüzyon			
	n	S	I	R (%)	n	S	I	R (%)
Ertapenem	122	76		44 (36,1)	127	86	6	35 (27,6)
İmipenem	121	90	12	19 (15,7)	127	87	7	33 (26,0)
Meropenem	122	97	5	20 (16,4)	127	90	6	31 (24,4)

S: Duyarlı

I: Duyarlı, yüksek doz

R: Dirençli

K.pneumoniae izolatlarının % 35'inde karbapenemlerden en az birine karşı direnç olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 127 *K.pneumoniae* izolatının 58'i (% 46) GSBL pozitif olarak saptanmıştır. Fenotipik olarak temosilin disk difüzyon testi sonucuna göre 46 (% 36) izolatta temosilin direnci saptanmıştır. İzolatların 42'sinde (% 33) bla_{OXA-48} gen bölgesi varlığı tespit edilmiş (Şekil 1), bunların 38'inde otomatize sistemle yapılan MİK sonuçlarına göre ertapenem,

imipenem veya meropenemden birine direnç saptanmıştır. Diğer üç izolatta ise herhangi bir karbapeneme direnç belirlenmemiştir (Tablo 3). bla_{OXA-48} gen bölgesi varlığı tespit edilen 38 izolatin 35'inde (% 92) sefalosporin direnci (sefotaksim, seftazidim, sefepim) tespit edilmiştir.

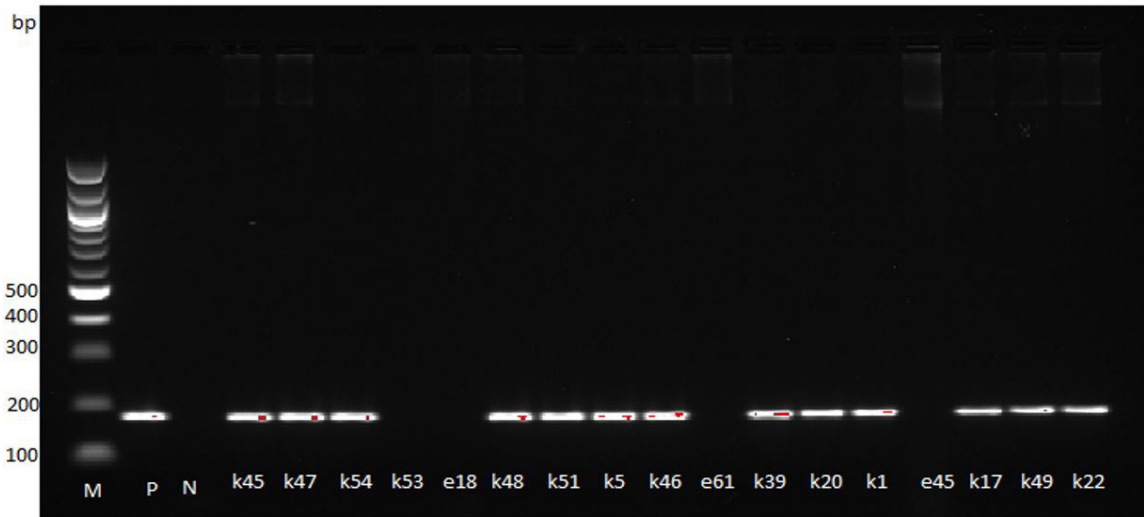
Tablo 3. Çalışmaya alınan izolatlarda OXA-48 geni varlığı ile izolatların; ertapenem, imipenem, meropenem ve temosilin duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması.

Değer		OXA-48		Toplam
		Pozitif	Negatif	
Karbapenemlerden herhangi birine (Ertapenem İmipenem Meropenem)	R	38	10	48
	S/I	4	75	79
	Toplam	42	85	127
Ertapenem	R	34	10	44
	S/I	4	74	78
	Toplam	38	84	122
İmipenem	R	15	3	18
	S/I	23	80	103
	Toplam	38	83	121
Meropenem	R	16	4	20
	S/I	22	80	102
	Toplam	38	84	122
Temosilin	R	37	9	46
	S/I	5	76	81
	Toplam	42	85	127

S: Duyarlı

I: Duyarlı, yüksek doz

R: Dirençli



M, marker; P, pozitif kontrol; N, negatif kontrol; bp, base pair; k52, k42....., suş kodları

Şekil 1. *K.pneumoniae* izolatlarında OXA-48 pozitif gen bölgeleri.

Karbapenemler ve temosilin diski sonuçlarına göre OXA-48 saptanması için duyarlılık ve özgüllük Tablo 4'te özetlenmiştir.

Tablo 4. Ertapenem, imipenem, meropenem ve temosilin için duyarlılık ve özgüllük sonuçları.

Antibiyotik	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD	Doğruluk
Ertapenem	89	88	77	95	89
İmipenem	39	96	83	78	79
Meropenem	42	95	80	78	78
Temosilin	88	89	80	94	89

Çalışılan 127 örnekten 42'sinde OXA-48-like geni pozitif bulunmuştur. PZR ürünlerinin dizi analizi, yüksek oranda benzerlik olduğunu ortaya çıkarmıştır. Farklıklar dizilemenin stabil olmadığı ilk ve son okumalarda gözlenmiştir. Dizilerin global hizalamaları değerlendirildiğinde tümünün OXA-48 olduğu (E value: 0.0, Ident. \geq 99) ve diziler içinde varyant OXA-48 geni bulunmadığı tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

Klebsiella izolatlarının izole edildiği klinik örneklerin dağılımı çeşitli çalışmalarda değişiklik göstermektedir. Temiz ve ark.'nın⁽²³⁾ yaptıkları çalışmada *Klebsiella* spp. izolatlarını sıklık sırasıyla % 41 idrar, % 24 kan, % 16 trakeal aspirat, % 15 yara ve % 4 diğer klinik örneklerinden izole etmişlerdir. Çalışmamızda da izolatların literatürle benzer klinik örneklerden

izole edildiği belirlenmiştir.

Enterobacteriaceae ailesinde karbapenem dirençli 2000 yılından önce ihmal edilebilir bir olgu olarak görülmekteydi. Bu durum 1990'ların sonlarında *K.pneumoniae*'nin KPC-tipi karbapenemaz üretmesinin görülmesi ile değişmiştir ve 2000'li yıllarda tüm dünyaya yayılmıştır. Bunu NDM-tipi karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* ve OXA-48-tipi karbapenemaz üreten *K.pneumoniae*'lerin ortaya çıkması izlemiştir⁽⁵⁾.

CLSI ve EUCAST karbapenemaz üretiminin saptanması için farklı tarama önerileri sunmaktadır. CLSI tarama için ertapenemi önermektedir. Ancak, EUCAST ertapenemi duyarlılığının yüksek olmasına karşın özgüllüğünün düşük olmasından dolayı tercih etmemektedir. Bunun yerine, karbapenemaz taramasında duyarlılık ve özgüllük dengesinin uyumlu olması nedeniyle meropenemi önermektedir^(8,24). Ortega ve ark.⁽¹⁸⁾ çalışmalarında ertapenemin, OXA-48 üreten *E.coli* taraması için imipenem veya meropenemden daha duyarlı olduğunu bulmuşlardır. Çakar ve ark.⁽⁴⁾'nin yaptıkları çalışmada OXA-48 enzimi içeren izolatların birçoğunu meropeneme duyarlı, ancak tamamı ertapeneme dirençli bulunmuş ve karbapenemaz taramasında ertapenemin en uygun antibiyotik olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda imipenem ve meropenemin özgüllüklerinin birbirine yakın olduğu (sırasıyla % 96 ve % 95) saptanmıştır. Ancak, her iki karbapenemin de duyarlılıkları düşük (sırasıyla % 39 ve % 42) bulunmuştur. Çalışmamızda OXA-48 varlığına bağlı gelişen karbapenem direncini saptamada duyarlılık ve özgüllük dengesi en iyi karbapenemin ertapenem olduğu gözlenmiştir.

Zarakolu ve ark.⁽²⁵⁾ 2016'da yayınlanan çalışmalarında 279 karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatının 270'inde OXA-48 benzeri karbapenemaz tespit etmiş olup tüm izolatlarda temosiline direnç tespit etmişlerdir. Teethaisong ve ark.⁽²²⁾'nin temosilin disk difüzyon yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada; temosilin diskinin meropenemin PBA veya EDTA ile yapılan sinerji testleri de negatif olduğu durumlarda OXA-48 varlığını saptamadaki duyarlılık ve özgüllüğünü % 100 olarak bulmuşlardır. Florian ve ark.⁽⁹⁾ çalışmalarında OXA-48 benzeri karbapenemaz üreten tüm izolatlarında temosilin duyarlılığını % 100 özgüllüğünü ise % 43,9 olarak bulmuşlardır. Omnia ve ark.⁽¹⁷⁾ 2017'de yaptıkları çalışmalarında temosilin diskinin OXA-48 varlığını saptamada duyarlılığını % 97,9 özgüllüğünü % 50 olarak saptamışlardır.

Çalışmamızda temosilin diskinin duyarlılığı % 88 özgüllüğü ise % 89 olarak bulunmuş olup OXA-48'in varlığını tespit etmek ve dışlamak için tek başına yeterli olmayacağı düşünülmektedir. (Tablo 4).

Haciseyitoglu ve ark.⁽¹¹⁾ çalışmalarında karbapenem dirençli 44 *K.pneumoniae* izolatın 33'ünde OXA-48 pozitifliği saptamışlardır. Ece ve ark.⁽⁶⁾ karbapenem dirençli 14 *K.pneumoniae* izolatı ile yaptıkları çalışmalarında tüm izolatlarda OXA-48 pozitifliği saptamışlardır. Yapılan çalışmalar ülkemizde OXA-48 üreticilerinin yaygın olduğunu göstermektedir^(12,13). Çalışmamızda otomatize sistemle karbapenemlerden en az birine dirençli olan 47 *K.pneumoniae* izolatının 38'inde (% 80) in-house PCR ile bla_{OXA-48} gen bölgesi tespit edilmiştir ve çalışmamız sonucunda bulduğumuz sonuç literatürle uyum göstermektedir. Karbapenemlere dirençli olan bu 38 izolatın genişlemiş spektrumlu sefalosporinlere karşı direnç olması bu izolatlarda OXA-48 tipi enzimlerin yanısıra bir GSBL enziminin de olabileceğini düşündürmektedir. Karbapenem dirençli 38 izolatın 14'ünün tüm karbapenemlere (ertapenem, imipenem ve meropenem) dirençli olması bu izolatların ek olarak başka bir karbapenemaz geni taşınması veya dış membran porin defekti durumunu akla getirmektedir.⁽¹⁰⁾

Messaoudi ve ark.⁽¹⁴⁾ 2020'de yayınlanan çalışmalarında 240 karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatının 196'ında OXA-48 benzeri gen bulunmuştur ve içlerinden seçilen alt gruba ileri analiz yapılmış olup 27 *K.pneumoniae* izolatı arasında 10 ve 17 izolat, sırasıyla bla_{OXA-48} ve bla_{OXA-204} genlerini barındırmıştır. Erdem ve ark.⁽⁷⁾ 2020'de yayınlanan 10 MDR *K.pneumoniae* izolatı ile yaptıkları çalışmalarında bir izolatlarında bla_{OXA-181} geni tespit etmişlerdir. Çalışmamızda OXA-48 pozitif olarak saptadığımız 42 izolatta yapılan DNA dizi analizi ile elde edilen tüm dizilerin OXA-48 olduğu ve diziler içinde varyant OXA-48 geni bulunmadığı tespit edilmiştir.

Carrer ve ark.⁽²⁾ çeşitli ülkelerden 18 OXA-48 pozitif klinik izolat (13 *K.pneumoniae*, 2 *Enterobacter cloacae*, 1 *Providencia rettgeri* ve 1 *Citrobacter freundii*) toplayarak yaptıkları çalışmada izolatların disk difüzyon ve gradient testi ile antibiyotiklere duyarlılıklarını incelemişlerdir. OXA-48 pozitif olan 18 izolatın 14'ü karbapenemlere dirençli iken dört tanesi orta duyarlı veya duyarlı olarak saptanmıştır. Cuzon ve ark.⁽³⁾ 2008'de Türkiye dışındaki ilk OXA-48 vakasını yayınlamışlardır. Phoenix (Becton-Dickinson, Erembodegem, Belçika) ve VITEK (bioMérieux,

Fransa) ile izolat amoksisilin ve AMC'ye dirençli, geniş spektrumlu sefalosporinlere ve meropeneme duyarlı olarak bulunmuştur. Disk difüzyon ile imipenem ve meropenemin zon çaplarında azalma bulunurken ertapenem ise orta duyarlı olarak saptanmıştır. Gradient testi ile CLSI kriterlerine göre imipenem ve meropeneme duyarlı; aralığında ertapeneme ise orta duyarlı bulunmuştur. PCR ve sekans analizi ile bla_{OXA-48} geni gösterilmiştir. Otomatize sistemlerin (Phoenix ve VITEK) karbapenem duyarlılığındaki azalmayı saptayamadığı ve bu yeni direnç mekanizmasının görüldüğünden daha yaygın olabileceği belirtilmiştir.

Çalışmamızda bla_{OXA-48} gen bölgesini pozitif olarak saptadığımız üç izolatın otomatize sistemle belirlenen karbapenem MİK değerleri duyarlı sınırdadır bulunmuştur. Bu üç izolatın gradient test yöntemiyle de confirmasyonu yapılmış ve yine duyarlı aralıkta olduğu tespit edilmiştir. İzolatların elde edildiği üç hastanın da geçmişinde hastanede yatış öyküsü bulunmaktadır. İki hastanın bakteriler izole edilmeden öncesinde ve sonrasında karbapenem tedavisi alıp almadıkları tespit edilememiştir. Son hasta ise izolat tespit edildikten sonra imipenem tedavisi almıştır ve tedaviye cevap vermiştir. OXA-48 pozitif olarak saptadığımız bir izolat ise otomatize sistemle ertapeneme dirençli tespit edilmiştir ancak gradient test yöntemiyle duyarlı olarak saptanmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ve literatürdeki bilgiler ışığında OXA-48 tipi direncin genotipik olarak varlığının fenotipik yansımasının doğrudan doğruya ortaya çıkmadığıdır ve böyle bir izolatla enfekte hastaların karbapenem tedavisine verdikleri cevap hakkındaki bilgilerimiz yetersiz kalmaktadır. OXA-48 tipi enzim üretiminin yaygın olduğu ülkemizde tedaviye rağmen iyileşmeyen hastalarda bu tip izolatların olabileceği akılda tutulmalıdır.

Sonuç olarak; hastanemizde izole edilen *K.pneumoniae* izolatları arasında karbapenem direnç oranı % 35 ve GSBL pozitifliği ise % 46 olarak tespit edilmiştir. Temosilin disk yönteminin *K.pneumoniae* suşlarında OXA-48 gen varlığını saptamadaki duyarlılığı % 88, özgüllüğü % 89 bulunmuştur ve literatürde bazı yayınlarda bahsedildiği kadar (% 100) yüksek olmadığı görülmüştür. OXA-48 varlığına bağlı gelişen karbapenem direncini saptamada duyarlılık ve özgüllük dengesi en iyi karbapenemin ertapenem olduğu gözlenmiştir. Otomatize sistemle karbapenemlere dirençli olarak tespit edilen *K.pneumoniae* izolatla-

rındaki bla_{OXA-48} gen bölgesi varlığı % 80 olarak bulunmuştur ve bu durum ülkemizde OXA-48 üreticilerinin yaygın olduğunu göstermektedir. Fenotipik testlerle sınıf D β-laktamazların fenotipik testlerle kolayca belirlenememesi⁽²⁰⁾ genotipik olarak OXA-48 gen bölgesine sahip bazı izolatlarda direncin fenotipik olarak yansımasının doğrudan doğruya ortaya çıkmamasına neden olup tedaviye rağmen iyileşmeyen hastalarda bu tip izolatların olabileceği akılda tutulması gerekmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Başkanlığı Araştırma Fonu tarafından 2015-TF-B295 proje olarak desteklenmiştir. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Başkanlığı'na teşekkür ederiz.

Moleküler testler, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler laboratuvarında yürütülmüş olup yakın zamanda aramızdan ayrılan Dr. Öğr. Üy. Nafia Canan GÜRSOY'u rahmetle anıyoruz.

Etik Kurul Onayı: Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Klinik Araştırma Etik Kurulu'nun 26.02.2015 tarih 06 no.lu etik kurul onayı alınmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Ethics Committee Approval: The approval of the Medicine Clinical Research Ethics Committee of Van Yüzüncü Yıl University dated 26.02.2015 and number 06 was obtained

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

KAYNAKLAR




1. Bush K and Jacoby GA. Updated functional classification of β-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):969-76. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
2. Carrer A, Poirel L, Yilmaz M, et al. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):1369-73. <https://doi.org/10.1128/AAC.01312-09>
3. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Huang TD, Nordmann P. Plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing β-lactamase OXA-48 in an imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* strain from

- Belgium. Antimicrob Agents Chemother 2008;52(9):3463-4.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00543-08>
4. Çakar A, Akyön Y, Gür D ve ark. Türkiye’de 2014 yılı içinde izole edilen karbapenem dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz varlığının araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2016;50(1):21-33.
<https://doi.org/10.5578/mb.10695>
 5. Doi Y, Paterson DL. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Semin Respir Crit Care Med. 2015;36(01):74-84.
<https://doi.org/10.1055/s-0035-1544208>
 6. Ece G, Tunc E, Otlu B, et al. Detection of bla OXA-48 and clonal relationship in carbapenem resistant *K. pneumoniae* isolates at a tertiary care center in Western Turkey. J Infect Public Health. 2018;11(5):640-2.
<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.04.003>
 7. Erdem F, Abulaila A, Aktas Z, et al. In vitro evaluation of double carbapenem and colistin combinations against OXA-48, NDM carbapenemase-producing colistin resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. Antimicrob Resist Infect Control. 2020;9:70.
<https://doi.org/10.1186/s13756-020-00727-4>
 8. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0. 2015. Erişim adresi:[<http://www.eucast.org>] Erişim tarihi:01/06/2016.
 9. Florian K, Stephan G, Martin K, et al. Comparison of Phenotypic Tests and an Immunochromatographic Assay and Development of a New Algorithm for Detection of OXA-48-like Carbapenemases. J Clin Microbiol. 2017;55(3):877-83.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01929-16>
 10. Gülmez D, Woodford N, Palepou MF, et al. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. Int J Antimicrob Agents. 2008;31(6):523-6.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.01.017>
 11. Haciseyitoglu D, Dokutan A, Abulaila A, et al. The First Enterobacter cloacae Co-Producing NDM and OXA-48 Carbapenemases and Interhospital Spread of OXA-48 and NDM-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. Clin Lab. 2017;63(7):1213-22.
<https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2017.170120>
 12. Kahraman EP, Toptan H, Otlu B ve ark. Karbapenemaz üreten *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında bla OXA-48 benzeri genlerin araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2019;53(2):134-43.
<https://doi.org/10.5578/mb.67914>
 13. Kutlu HH, Us E, Tekeli A. Bir Üniversite Hastanesinde 2010-2014 yılları arasında izole edilen Enterobacteriaceae türlerinin karbapenemaz genlerinin araştırılması ve moleküler epidemiyolojisinin belirlenmesi. Mikrobiyol Bul. 2018;52(1):1-12.
<https://doi.org/10.5578/mb.66156>
 14. Messaoudi A, Haenni M, Bouallègue O, et al. Dynamics and molecular features of OXA-48-like-producing *Klebsiella pneumoniae* lineages in a Tunisian hospital. J Glob Antimicrob Resist. 2020;20:87-93.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.07.005>
 15. Monteiro J, Widen RH, Pignatari ACC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. J Antimicrob Chemother. 2012;67(4):906-9.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkr563>
 16. Nordmann P and Cornaglia G. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a call for action! Clin Microbiol Infect. 2012;18(5):411-2.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03795.x>
 17. Omnia A, Shaker, Howayda E, Gomaa, Shereen A, ElMasry, et al. Evaluation of Combined Use of Temocillin Disk and Mastdisks Inhibitor Combination Set Against Polymerase Chain Reaction for Detection of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. Open Access Maced J Med Sci. 2018;6(2):242-7.
<https://doi.org/10.3889/oamjms.2018.090>
 18. Ortega A, Sáez D, Bautista V, et al. Carbapenemase-producing *Escherichia coli* is becoming more prevalent in Spain mainly because of the polyclonal dissemination of OXA-48. J Antimicrob Chemother. 2016;71(8):2131-8.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkw148>
 19. Podschun R and Ullmann U. *Klebsiella* spp. As nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. 1998;11(4):589-603.
<https://doi.org/10.1128/CMR.11.4.589>
 20. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(1):24-38.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01512-08>
 21. Potron A, Nordmann P, Poirel L. Characterization of OXA-204, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(1):633-6.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01034-12>
 22. Teethaisong Y, Eumkeb G, Nakouti I, et al. A combined disc method with resazurin agar plate assay for early phenotypic screening of KPC, MBL and OXA-48 carbapenemases among Enterobacteriaceae. J Appl Microbiol. 2016;121(2):408-14.
<https://doi.org/10.1111/jam.13196>
 23. Temiz H, Özbek E, Vural DG, Özekinci T. *Klebsiella* izolatlarının antimikrobiyal direnç oranlarının değerlendirilmesi. J Appl Microbiol. 2016;121(2):408-14.

24. Wayne PA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute:CLSI Document M100-S25, (2015).
25. Zarakolu P, Eser OK, Aladag E, et al. Epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

colonization:a surveillance study at a Turkish university hospital from 2009 to 2013. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016;85(4):466-70.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.012>

Kolistin Duyarlılık Testi İçin Diagnostics Colistin MIC-Strip Testinin Değerlendirilmesi*

Gülşen Altınkanat Gelmez 
Elvan Sayın 
Ufuk Hasdemir 
Güner Söyletir 

Evaluation of Diagnostics Colistin MIC-Strip Test for Colistin Susceptibility Testing

öz

Günümüzde çoklu ilaç direncine sahip Gram negatif mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılacak antimikrobiyallerin kısıtlı olması nedeniyle kolistin gibi eski antibiyotikler sıklıkla tercih edilmeye başlanmıştır. Ancak, kolistinin katyonik yapısı nedeniyle rutin laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan antibiyotik duyarlılık testlerinde (disk difüzyon, gradient test, otomatize sistemler) birtakım sorunlar yaşanmaktadır. Bu nedenle European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ve Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından kolistin duyarlılığını saptamak için sadece sıvı mikrodilüsyon testi önerilmektedir. Ancak sıvı mikrodilüsyon testlerinin zaman alıcı ve zahmetli olması nedeniyle rutin laboratuvarlarında hızlı ve güvenilir kolistin duyarlılığı sonucunu sağlayabilen testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, *Klebsiella pneumoniae* ve *Acinetobacter baumannii* kökenlerinde kolistin duyarlılığının saptanmasında ticari olarak hazır olarak üretilen Diagnostics MIC-COL (Diagnostics I.n.c., Galanta, Slovakia) testinin performansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Rutin laboratuvarımızda 2016-2019 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen *K.pneumoniae* (n=22) ve *A.baumannii* (n=28) kökenleri çalışmaya dahil edilmiştir. Kökenlerin kolistin minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) hem referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile hem de ticari olarak üretilen Diagnostics MIC-COL testi ile çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak testin temel uyum, kategorik uyum, büyük hata ve çok büyük hata oranları hesaplanmıştır. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile karşılaştırıldığında Diagnostics MIC-COL testinin temel uyumu % 84, kategorik uyumu % 98, büyük hata oranı % 3,8 olarak tespit edilirken çok büyük hata tespit edilmemiştir. Rutin laboratuvarlarda hızlı ve güvenilir kolistin duyarlılığının tespit edilerek tedavinin yönlendirilmesi oldukça önemlidir. Çalışmamızda kullanılan ticari test kullanımı kolay ve zaman alıcı olmayan bir testtir. Ayrıca strip şeklinde olması sayesinde her izolat ayrı çalışılabilmektedir. Büyük hata oranının beklenen değerlerin üzerinde olması nedeniyle daha fazla sayıda ve farklı direnç düzeylerine sahip kökenlerle yapılacak ileri çalışmalarla bu oranların yeniden değerlendirilmesi faydalı olacaktır.

Anahtar kelimeler: *A.baumannii*, diagnostics MIC-COL-strip, kolistin duyarlılığı, *K.pneumoniae*

ABSTRACT

Due to the limited number of antimicrobials to be used in the treatment of infections caused by Gram-negative microorganisms with multi-drug resistance recently, old antibiotics such as colistin have started to be preferred frequently. However, some problems are encountered in antibiotic susceptibility tests (disk diffusion, gradient test, automated systems) which are frequently used in the routine laboratory due to the cationic nature of colistin. For this reason, only the broth microdilution test is recommended by European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) for the detection of colistin susceptibility. Since broth microdilution tests are time consuming and inconvenient, tests that can provide fast and reliable colistin susceptibility result is needed in routine laboratories. In this study, it was aimed to evaluate the performance of the commercially produced Diagnostics MIC-COL test (Diagnostics I.n.c, Galanta, Slovakia) for the detection of colistin susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* strains. The strains of *K.pneumoniae* (n = 22) and *A.baumannii* (n = 28) isolated from various clinical specimens between 2016 and 2019 in our routine laboratory were included in the study. Colistin minimum inhibitory concentrations (MIC) of the strains were studied with both the reference broth microdilution method and the commercially produced Diagnostics Colistin MIC-COL test. The essential agreement, categorical agreement, major error, and very major error rates of the test were calculated by comparing the obtained results. The essential agreement of the Diagnostics Colistin MIC-Strip test was determined as 84 %, categorical agreement as 98 %, and major error rate as 3.8 %, while no very major error was detected. It is very important to guide antimicrobial treatment with rapid and reliable detection of colistin susceptibility. The commercial test used in our study is easy to use and not time-consuming. Also, due to its strip form, each isolate can be studied separately. Because of the major error rate being above the expected values, it will be useful to re-evaluate these rates with further studies to be conducted with a larger number of strains with different resistance levels.

Keywords: *A.baumannii*, colistin susceptibility, diagnostics MIC-COL-strip, *K.pneumoniae*

Received/Geliş: 04.11.2020
Accepted/Kabul: 11.03.2021
Published Online/Online Yayın: 29.04.2021

Atf/Cite as: Altınkanat Gelmez G, Sayın E., Hasdemir U, Söyletir G. Kolistin duyarlılık testi için diagnostics colistin mic-strip testinin değerlendirilmesi. ANKEM Derg. 2021;35(1):9-13.

Gülşen Altınkanat Gelmez
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye
✉ gulsenaltinkanat@yahoo.com
ORCID: 0000-0003-0274-628X

E. Sayın 0000-0002-1320-1704
U. Hasdemir 0000-0002-1606-0804
G. Söyletir 000-0001-5695731X
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye

*5. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji
Kongresi'nde poster olarak sunulmuş-
tur. Poster No: 44
(28 Ekim-1 Kasım 2019, İzmir)

GİRİŞ

Son yılda *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. ve karbapenemaz üreten *Enterobacterales* gibi çok ilaca dirençli Gram negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar tüm dünyada endişe verici düzeyde artmaktadır. Bu enfeksiyonlarda kullanılacak tedavi seçenekleri de oldukça sınırlıdır. İlk olarak 1949'da *Paenibacillus polymyxa*'dan izole edilen kolistin, bir heptapeptid halkası, bir ekzosiklik zincir ve Gram negatif lipopolisakkarit membranı ile etkileşime giren pozitif yüklü bir yağ asiti kuyruğundan oluşan katyonik bir polipeptittir. Klinik kullanıma 1959'da girmiş ancak nefrotoksik ve nörotoksik etkileri ve doz optimizasyonundaki problemler nedeniyle 1980'lerde kullanımları sınırlandırılmıştır. Yapılan bazı çalışmalarda kolistin sülfatın intravenöz formunun daha güvenilir olduğu gösterildikten sonra çok ilaca dirençli Gram negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda kullanımı tekrar gündeme gelmiştir. Kolistin hızlı bakterisidal etkisi, geniş spektrumlu aktiviteye sahip olması ve yeni geliştirilen antibiyotiklerin sayısının azalması gibi nedenlerden ötürü 1990'lardan itibaren klinisyenler tarafından tekrar tercih edilmeye başlanmıştır⁽⁸⁾.

Son yıllarda kolistin kullanımındaki artış beraberinde direnç oranlarının da artışına sebep olmuştur. Uygun tedavi protokolünün belirlenmesi için hızlı, doğru ve güvenilir in vitro antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması oldukça önemlidir. Kolistin katyonik yapısı, büyük molekül ağırlığı nedeniyle agarda zayıf difüzyonu, ilaç kompozisyonlarındaki değişimler ve heterodirenç gibi özellikleri nedeniyle rutin laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan antibiyotik duyarlılık testlerinde (disk difüzyon, gradient test, otomatize sistemler) birtakım sorunlar yaşanmaktadır⁽¹⁹⁾. Yapılan birçok çalışmada bu yöntemler ile elde edilen sonuçlarda kabul edilemeyecek düzeyde çok büyük hata tespit edilmiştir^(9,17). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Polimiksin Çalışma Grubu tarafından 2016 yılında kolistin duyarlılığını saptamak için polisorb-80 gibi katkı maddeleri olmaksızın polistren plaklarda yapılan sıvı mikrodilüsyon yöntemi referans yöntem olarak belirlenmiştir⁽⁶⁾. Ancak sıvı mikrodilüsyon testlerinin zaman alıcı ve zahmetli olması nedeniyle günlük iş akışı içerisinde rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanması oldukça zordur. Bu nedenle hızlı, güvenilir, tekrarlanabilirliği yüksek ve kullanıcı dostu antibiyotik duyarlılık testlerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu amaçla geliştirilen Diagnostics MIC-COL (Diagnostics I.n.c, Galanta, Slovakya) testi, liyofili-

lize 7 farklı konsantrasyonda (0,25-16 mg/L) kolistin içeren tekli polistren stripler halinde kullanıma hazır bir sıvı mikrodilüsyon kitidir.

Çalışmamızda, *Klebsiella pneumoniae* ve *Acinetobacter baumannii* kökenlerinde kolistin duyarlılığının saptanmasında ticari olarak hazır olarak üretilen Diagnostics MIC-COL (Diagnostics I.n.c, Galanta, Slovakya) testinin performansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bakterilerin seçimi: 2016-2019 yılları arasında Marmara Üniversitesi Hastanesinde servis ve yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan hastalardan alınıp laboratuvarımıza gönderilen çeşitli klinik örneklerden (apse, bronkoalveolar lavaj, balgam, kan, derin trakeal aspirat, idrar, yara) etken olarak izole edilen *Klebsiella pneumoniae* ve *Acinetobacter baumannii* kökenleri incelenmiştir. Kökenlerin tür düzeyinde tanımlamaları matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon-uçuş zamanlı-kütle spektrometresi (MALDITOF-MS) VITEK-MS (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Fransa) kullanılarak yapılmıştır. Rutin antibiyotik duyarlılıkları *K.pneumoniae* kökenleri için VITEK Compact (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Fransa) otomatize sistemi ile, *A.baumannii* kökenlerinin ise disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır. Rutin antibiyotik duyarlılık profillerine bakılarak çok ilaca dirençli olduğu tespit edilen 22 *K.pneumoniae* ve 28 *A.baumannii* kökeni kolistin duyarlılığının belirlenmesi için çalışma kapsamına alınmıştır.

Antibiyotik duyarlılık testi: Tüm kökenlerin kolistin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri EUCAST önerileri doğrultusunda International Organisation for Standardization (ISO) Standart 20776-1'e uygun olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir⁽⁷⁾. Mikrodilüsyon plaklarında aktif madde olan kolistin sülfatın (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, A.B.D) seri dilüsyonları (0,25- 16 mg/L) katyon eklenmiş Müeller Hinton sıvı besiyeri (Becton Dickinson, A.B.D) kullanılarak hazırlanmıştır. Tüm kökenlerden hazırlanan 0,5 Mc Farland standart bulanıklığı son bakteri konsantrasyonu 5×10^5 cfu/ml olacak şekilde mikrodilüsyon plaklarına eklenmiş ve 18-20 saat 35°C'de inkübe edilmiştir. Ayrıca, aynı bakteri inokülümü kullanılarak eş zamanlı olarak 0,25-16 mg/L liyofilize kolistin sülfat konsantrasyonları içeren ticari Diagnostics MIC-COL (Diagnostics I.n.c, Galanta, Slovakya) üreticinin önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. Sonuçlar EUCAST'ın kolistin sınır

değerlerine (≤ 2 mg/L duyarlı; > 2 mg/L dirençli) göre yorumlanmıştır. Her iki yöntem için de kontrol köken olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *mcr-1* pozitif *E.coli* NCTC 13846 kullanılmıştır.

Sonuçların değerlendirilmesi: Temel uyum (TU) referans sıvı mikrodilüsyon testi ile ticari yöntem ile elde edilen antibiyotik MİK değerlerinde ± 1 dilüsyon fark olması, kategorik uyum (KU) ise test edilen kökenin EUCAST kriterlerine göre yorumlanan duyarlılık sonuçlarının (duyarlı, dirençli) her iki yöntem arasındaki uyumu olarak tanımlanmıştır. Büyük hata (BH) referans sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile duyarlı bulunan bir kökenin ticari yöntem ile dirençli bulunması, çok büyük hata (ÇBH) ise referans sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile dirençli olan bir kökenin ticari yöntem ile duyarlı bulunması olarak tanımlanmıştır. ISO tarafından belirlenen kriterlere göre kabul edilebilir performans TU ve KU için ≥ 90 , ÇBH ve BH'ler için ≤ 3 olarak belirlenmiştir⁽¹¹⁾. Kohen'in kapa (κ) katsayısı, yöntemler arasındaki uyum derecesini göstermek için hesaplanmıştır. $\kappa > 0,75$ ise çok iyi uyum; $\kappa = 0,4-0,75$ ise orta-iyi uyum ve $\kappa < 0,4$, zayıf uyum şeklinde yorumlanmıştır.

BULGULAR

Referans sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile çalışmaya alınan *K.pneumoniae* kökenlerinin 9'u (% 40,9), *A.baumannii* kökenlerinin 17'si (% 67) kolistine duyarlı bulunmuştur.

A.baumannii kökenlerinde referans sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile Diagnostics MIC-COL testi arasındaki temel uyum % 82,1, kategorik uyum ise % 100 iken *K.pneumoniae* kökenlerinde temel uyum % 86,3, kategorik uyum ise % 95,4 olarak saptanmıştır. Bir *K.pneumoniae* kökeninin kolistin MİK değeri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile 2 mg/L (duyarlı) iken Diagnostics MIC-COL testi ile 8 mg/L (dirençli) olarak belirlenmiştir. *A.baumannii* kökenlerinde büyük hata ve çok büyük hata gözlemlenmemiştir. Tüm kökenler birlikte değerlendirildiğinde sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile Diagnostics MIC-COL testi arasındaki temel uyum, kategorik uyum, büyük hata ve çok büyük hata oranları sırasıyla % 84, % 98, % 3,8 ve % 0'dır (Tablo). Kappa istatistiği ile yöntemler arasında çok iyi düzeyde uyum bulunmuştur ($\kappa = 0.96$).

TARTIŞMA

Antibiyotik direnci, halk sağlığını tehdit eden önemli bir sorundur. Tüm dünyada çok ilaca dirençli

(MDR) bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlardaki artış endişe verici düzeydedir. Tedavide kullanılacak antimikrobialler her geçen gün azalmakta ve yeni ilaç üretimi neredeyse yok denecek kadar azdır.

Tablo. *Klebsiella pneumoniae* (n = 22) ve *Acinetobacter baumannii* (n = 28) için Diagnostics MIC-COL testi ve referans sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen kolistin MİK değerlerinin karşılaştırılması.

	Kolistin Referans Yöntem MİK (mg/L)							
	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16
0,25		1	2					
0,5		3	9	1				
1		2	2					
2		1	2	2				
4					1			
8				1		2	3	1
16						4	5	3
>16						2	1	2

Kolistin, karbapenem dirençli Gram negatif bakterilere karşı sınırlı tedavi seçenekleri nedeniyle son zamanlarda önemli bir antibiyotik olarak yeniden gündeme gelmiştir. Yakın zamana kadar kolistin direncinin kromozomal olarak kodlandığı bilinirken, 2015 yılında ilk plazmid aracılı direnç geni olan *mcr-1* tanımlanmıştır. Son yıllarda da diğer direnç genleri (*mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7* ve *mcr-8*) tespit edilmiştir. Plazmid aracılığıyla transfer edilen bu direnç genlerinin 4-8 mg/L gibi düşük düzey kolistin direncine neden olduğu belirlenmiştir^(1,8,13). European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Haziran 2016'da plazmid aracılı kolistin direncinin yayılmasını kontrol etmek için bir rapor hazırlamıştır⁽⁵⁾. Bu raporda süreyans ve antimikrobiyal yönetim uygulamalarına yönelik yapılması gereken eylem planları ele alınmıştır. Bu planlar arasında kolistin MİK değerini doğru tespit edebilecek laboratuvar yöntemlerinin belirlenmesi ve direnç genlerinin moleküler olarak tespit edilmesi yer almaktadır. Hem başarılı antibakteriyel tedavi sağlamak hem de kolistinin olası toksik etkilerinden korunmak için güvenilir bir yöntem ile MİK değerinin belirlenmesi enfeksiyonun doğru yönetimi için oldukça önemlidir⁽²⁾. Ancak, kolistin klinik uygulamalarda sıklıkla tercih edilmeye devam ederken rutin laboratuvarlarda kolistin duyarlılığını belirlemek için hangi yöntemlerin kullanılabilirliği belirsizliğini korumaktadır.

Birçok laboratuvarında sıklıkla kullanılan antibiyotik duyarlılık yöntemleri disk difüzyon, gradient test ve otomatize sistemlerdir. Disk difüzyon ve gradient test

yöntemleri özel ekipman gerektirmeyen, düşük maliyetli ve kullanımı kolay testlerdir. Ancak polimiksinler büyük ve katyonik yapılarından dolayı agar yüzeyine yeterli miktarda difüze olamazlar. Bu nedenle disk difüzyon ve gradient test yöntemleri kolistin için güvenilir antibiyotik duyarlılık test kategorisinde yer almamaktadırlar. Kolistin disk difüzyon ve gradient difüzyon testleriyle yapılan çalışmalarda kabul edilemeyecek düzeylerde büyük hata veya çok büyük hata oranları tespit edilmiştir. Duyarlı ve dirençli izolatlar arasında ayırım yapılamamakta ve özellikle düşük düzey direncin saptanmasında yetersiz kalmaktadır^(4,12,14,15,17).

Otomatize sistemler ise klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında iş yükünü azaltmaları, tekrarlanabilirliklerinin yüksek olması, uzman sistem analizi ile veri yönetimi yapılabilmesi ve daha kısa sürede sonuca ulaşılabilmesi nedeniyle sık kullanılan yöntemlerdir. Ancak her antibiyotik için test edilen konsantrasyon sayısı sınırlıdır ve gerçek bir MİK değeri vermezler. Chew ve ark.'nın⁽³⁾ yaptıkları çalışmada VITEK 2 ile referans yöntem arasında temel uyum oranı % 93,4 ve kategorik uyum oranı % 88,2 olmasına rağmen çok büyük hata oranı % 36 olarak tespit edilmiştir. Vourli ve ark.⁽¹⁹⁾ tarafından yapılan çalışmada kolistin duyarlılığının belirlenmesinde kullanılan Phoenix 100 ve VITEK 2 otomatize sistemlerinin çok büyük hata oranları sırasıyla % 41,4 ve % 37,9 olarak tespit edilmiştir. Çok büyük hatalar genellikle MİK değeri 1-2 mg/L olan izolatlarda tespit edilmiştir. Bu nedenle otomatize sistemde duyarlı olarak saptanan kökenlerin referans yöntem ile doğrulanması gerektiğini vurgulamışlardır⁽¹⁸⁾. Girardello ve ark.⁽¹⁰⁾ yaptıkları çalışmada VITEK 2 ile en iyi performansın MİK değeri $\leq 0,5$ ve ≥ 16 mg/L olan *K.pneumoniae* ve *E.coli* kökenlerinde elde edildiğini ve MİK değeri 1-8 mg/L olarak belirlenen tüm kökenlerin referans yöntem ile doğrulanması gerektiğini belirtmişlerdir.

Birçok laboratuvarın bu yöntemleri sıklıkla laboratuvarında kullandığı göz önüne alındığında, kolistin için bu yöntemlerle hatalı sonuç verme ihtimali oldukça yüksektir. Bu da klinisyenlerin uygunsuz kolistin kullanımına yol açacak bir durumdur. Bu nedenle CLSI-EUCAST Polimiksin Çalışma Grubu tarafından kolistin duyarlılığının belirlenmesi için sadece sıvı mikrodilüsyon yöntemi önerilmektedir⁽⁶⁾. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi zahmetli, zaman alıcı ve özellikle dilüsyonların hazırlanması açısından deneyim gerektiren bir yöntemdir. Bu nedenle rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında yapılması oldukça zordur. Bu açıdan klinik mikrobiyoloji laboratuvarları için yeni yöntemlerin geliştirilmesi zorunludur. Ticari antibiyotik

duyarlılık test panelleri (Sensititre, Micronaut, UMIC vb) ümit vadeden alternatif yöntemler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu yöntemlerin performansını değerlendiren çalışmaların mevcut verileri ışığında rutin laboratuvarında kolistin duyarlılığını saptamada kullanılabilecek güvenilir yöntemler olarak gözükmemektedirler. Matuschek ve ark.⁽¹⁶⁾ çalışmalarında beş ticari ürünün (Sensititre, Micronaut-S, Micronaut MIC-Strip, SensiTest ve UMIC) referans sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile temel uyum oranını % 82-% 99, kategorik uyum oranını % 89-% 95, büyük hata oranını % 3-% 7 ve çok büyük hata oranını %3 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda kullanılan Diagnostics MIC-COL testinin hazırlık prosedürü kolaydır ve ek bir ekipman gerektirmemektedir. Değerlendirilmesi basit ve hızlı bir testtir. Testin strip şeklinde olması her hasta örneğinin ayrı ayrı çalışmasına imkan sağlaması açısından oldukça önemlidir. Testin referans yöntem ile kategorik uyum oranı yüksek olup, çok büyük hata gözlemlenmemiştir. Büyük hata yüzdesi (% 3,8) tavsiye edilen değerlerin (BH<% 3) üzerinde kalmaktadır. Bu durum çalışmamızda kullanılan izolat sayısının az olması ile ilişkili olabilir. Bu nedenle daha fazla sayıda ve farklı direnç düzeylerine sahip kökenlerle yapılacak ileri çalışmalarla bu oranların yeniden değerlendirilmesi faydalı olacaktır.

Ticari dilüsyon panelleri yoğun örnek kapasitesi ve direnç oranlarına sahip rutin laboratuvarlar için kullanışlı olabilir. Uygun tedavi kararının verilebilmesi için rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarına bu ürünlerin entegre olmaları oldukça önemlidir. Bu sayede uygunsuz kolistin kullanımının önüne geçilerek direnç gelişimi sınırlandırılabilir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

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

KAYNAKLAR

1. Baron S, Hadjadj L, Rolain JM, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *Int J Antimicrob Ag.* 2016;48(6):583-91. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.06.023>
2. Caniaux I, van Belkum A, Zambardi G, Poirel L, Gros MF. MCR: modern colistin resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36(3):415-20. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2846-y>
3. Chew KL, La MV, Lin RTP, Teo JWP. Colistin and polymyxin b susceptibility testing for carbapenem-resistant and mcr-positive Enterobacteriaceae: comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution. *Journal of Clinical*

- Microbiology. 2017;55(9):2609-16.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00268-17>
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.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00868-15>
 5. ECDC. Plasmid-mediated colistin resistance in Enterobacteriaceae. 2016. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/enterobacteriaceae-risk-assessment-diseases-caused-by-antimicrobial-resistant-microorganisms-europe-june-2016.pdf>.
 6. 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).
 7. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2019. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 9.0.(2019).
 8. Ezadi F, Ardebili A, Mirnejad R. Antimicrobial susceptibility testing for polymyxins: challenges, issues, and recommendations. *J Clin Microbiol*. 2019;57(4).
<https://doi.org/10.1128/JCM.01390-18>
 9. Galani I, Kontopidou F, Souli M, et al. Colistin susceptibility testing by Etest and disk diffusion methods. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31(5):434-9.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.01.011>
 10. Girardello R, Cury AP, Franco MRG, et al. Colistin susceptibility testing and Vitek-2 (TM): is it really useless? *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018;91(4):309-11.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.03.019>
 11. International Organization for Standardization (ISO). Clinical Laboratory Testing and In Vitro Diagnostic Test Systems. Susceptibility Testing of Infectious Agents and Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices. Part 2: Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices. International Standard ISO 20776-2:2007. Geneva, Switzerland. (2007).
 12. 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.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00427-13>
 13. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):161-8.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
 14. Lo-Ten-Foe JR, de Smet AMGA, Diederens BMW, Kluytmans JAJW, van Keulen PHJ. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(10):3726-30.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01406-06>
 15. 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.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03145.x>
 16. Matuschek E, Ahman J, Webster C, Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(8):865-70.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.020>
 17. Tan TY, Lily SYN. Comparison of three standardized disc susceptibility testing methods for colistin. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58(4):864-7.
<https://doi.org/10.1093/jac/dk1330>
 18. Vasoo S. Susceptibility Testing for the polymyxins: two steps back, three steps forward? *J Clin Microbiol*. 2017;55(9):2573-82.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00888-17>
 19. Vourli S, Dafopoulou K, Vrioni G, Tsakris A, Pournaras S. Evaluation of two automated systems for colistin susceptibility testing of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(9):2528-30.

Yara Yeri Örneklerinden İzole Edilen Mikroorganizmalar ve Antibiyotik Direnç Oranları

Ezgi Köse 
Emel Çalışkan 
Nagihan Memiş 
Betül Dönmez 
Pelın Duran 

Microorganisms Isolated from Wound Samples and Their Antibiotic Resistance Rates

Öz

Bu çalışmada, hastanemizin mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen yara yeri örneklerinden izole edilen patojen mikroorganizmaların dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları belirlenerek, epidemiyolojik verilere katkı sağlanması ve ampirik tedavide yol gösterici olunması amaçlanmıştır.

Laboratuvarımıza 02.01.2017-20.07.2020 tarihleri arasında gönderilen yara yeri enfeksiyonu etkenleri retrospektif olarak incelenmiştir. Üreyen mikroorganizmalar konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemler ve otomatize sistem ile tanımlanmıştır. Antibiyotik duyarlılık testleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi veya otomatize sistem ile yapılmış ve EUCAST kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda 722 örnekten izole edilen toplam 956 etkenin 370'i (% 39) Enterobacterales takımı, 286'sı (% 30) Gram pozitif kok, 134'ü (% 14) Pseudomonas spp., 83'ü (% 9) Acinetobacter baumannii, 27'si (% 3) Candida spp. olarak tanımlanmıştır. Stafilokok ve enterokoklarda vankomisin, teikoplanin ve linezolid direncine rastlanmamıştır. Staphylococcus aureus'a karşı en etkili antibiyotiğin trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SXT) (% 11), koagülaz negatif stafilokoklara ise gentamisin (% 30) ve TMP-SXT (% 28) olduğu saptanmıştır. Enterokoklarda siprofloksasin (% 48) ve levofloksasin (% 58) direncinin diğer antibiyotiklerden yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, Klebsiella spp. suşlarının diğer Enterobacterales cinsi suşlardan daha yüksek direnç oranlarına sahip olduğu ve A.baumannii ve Pseudomonas spp. suşlarında en düşük direnç oranının kolistine (% 1) karşı olduğu belirlenmiştir. Yoğun bakım ünitelerinde ise enterokoklar dışındaki etkenlerde antibiyotik direncinin diğer kliniklerden yüksek olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda birçok bakteri türü ve mantarların yara yeri enfeksiyonunda etken olabildiği ve antibiyotiklere oldukça yüksek oranlarda direnç geliştiği görülmüştür. Bu nedenle tüm yara yeri enfeksiyonu düşünülen örnekler kültür ve antibiyogram işlemlerinin yapılarak tedavilerin düzenlenmesi gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: antibiyotik direnci, yara yeri enfeksiyonları, yoğun bakım ünitesi

ABSTRACT

In this study, it was aimed to contribute to available epidemiological data and guide empirical treatment by determining the distribution and antibiotic susceptibility of pathogenic microorganisms isolated from wound samples sent to the microbiology laboratory of our hospital.

The agents of wound infection sent to our laboratory between 02.01.2017 and 20.07.2020 were retrospectively analyzed. The microorganisms grown were identified by conventional microbiological methods together with automated system. Antibiotic susceptibility testing was done by Kirby-Bauer disk diffusion method and an automated system and evaluated according to EUCAST criteria.

Of the 956 bacteria isolated from 722 samples, 370 (39 %) were order Enterobacterales, 286 (30 %) were Gram positive cocci, 134 (14 %) were Pseudomonas spp., 83 (9 %) were Acinetobacter baumannii and 27 (3 %) were Candida spp. Vancomycin, teicoplanin and linezolid resistance were not found in staphylococci and enterococci. The most effective antibiotic against Staphylococcus aureus was trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SXT) (11 %), and gentamicin (30 %) and TMP-SXT (28 %) for coagulase negative staphylococci (CNS). Ciprofloxacin (48 %) and levofloxacin (58 %) resistance was higher in enterococci compared to other antibiotics. In addition, Klebsiella spp. strains have higher resistance rates than other Enterobacterales genus strains while A. baumannii and Pseudomonas spp. strains had the lowest resistance rate against colistin (1 %). Antibiotic resistance was higher in intensive care units than in other clinics, except for enterococci.

In our study, it was observed that many species of bacteria and fungi could be an agent in wound infection, and high rates of resistance developed against antibiotics. Therefore, it was thought that the treatments should be regulated by performing culture and antibiogram procedures on all samples for which wound infection is suspected.

Keywords: antibiotic resistance, intensive care unit, wound infections

Received/Geliş: 23.02.2021

Accepted/Kabul: 08.04.2021

Published Online/Online Yayın: 29.04.2021

Atf/Cite as: Köse E, Çalışkan E, Memiş N, Dönmez B, Duran P. Yara yeri örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik direnç oranları. ANKEM Derg. 2021;35(1):14-21

Ezgi Köse

Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Düzce - Türkiye

✉ ezgi.kose93@gmail.com

ORCID: 0000-0001-5602-0551

E. Çalışkan 0000-0002-9451-7865

N. Memiş 0000-0001-6980-9244

B. Dönmez 0000-0003-1790-7621

P. Duran 0000-0002-7838-2067

Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi,

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Düzce - Türkiye

GİRİŞ

Deri, insan vücudu ile dış çevresi arasında koruyucu bir bariyer görevi gören hayati bir organdır. Derideki ülserler veya travmatik yaralar, deri altı dokuyu açığa çıkararak mikrobiyal kolonizasyon için uygun nem, sıcaklık ve besleyici koşullar sağlamaktadır^(7,21). Bu yaralar kronik yara olarak tanımlanan, üç ay boyunca boyutunda küçülme olmayan veya artış gösteren ülserler olabileceği gibi üç ay içinde normal iyileşme sürecinden geçen akut yaralar da olabilmektedir⁽¹⁷⁾. Yara yeri enfeksiyonları travma, cerrahi kesi, dekübit ülseri, yabancı cisim gibi ekzojen nedenlerle ya da apse, osteomyelit, septik artrit ve diş enfeksiyonları gibi endojen kaynaklardan oluşabilmektedir⁽¹⁸⁾. Hastane kaynaklı enfeksiyonlarda ilk üç sıraya giren yara yeri enfeksiyonları, olduğu takdirde hastayı psikolojik olarak da etkileyebilmekte, hastanede yatış süresini uzatmakta, morbidite ve mortaliteyi arttırabilmektedir⁽²⁶⁾. Dekübit yara enfeksiyonları gibi kronik yaralarda enfeksiyon çoğunlukla polimikrobiyal olarak gelişmekte, etken olarak ise birçok ajan suçlanmakla birlikte en sık enterik bakteriler, nonfermentatif bakteriler ve Gram pozitif bakteriler saptanmaktadır. Bu enfeksiyonlar; sellülit, osteomyelit ve sepsis gibi daha ciddi ve hayatı tehdit eden durumlara neden olabilmektedir^(8,10,12,13).

Bakterilerde artan antimikrobiyal direnç ise bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir sağlık sorunu olma özelliğini sürdürmektedir⁽¹⁹⁾. Yara enfeksiyonu etkenlerinin antimikrobiyal duyarlılıklarının değerlendirilmesi, klinisyene tedavi başarısında destek olacak ve antimikrobiallerin bilinçli kullanımını sağlayarak dirençli bakterilerin ortaya çıkmasını ve yayılmasını engelleyecektir. Bu çalışmada da, hastanemizin mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen yara yeri örneklerinden izole edilen patojen mikroorganizmaların dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları belirlenerek ampirik tedavide yol gösterici olunması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Laboratuvarımıza 02.01.2017-20.07.2020 tarihleri arasında gönderilen ve Gram boyaması Q skoruna göre değerlendirilerek enfeksiyon varlığı belirlenen yara yeri kültürleri retrospektif olarak incelenmiştir. Örneklerin ekimi % 5 koyun kanlı agar ve "eosin methylene blue" agara (EMB) (Oxoid, İngiltere) yapılarak 35°C'de 18-24 saat aerobik ortamda inkübe edilmiştir. Üreyen mikroorganizmalar konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemler veya otomatize sistem (VITEK 2, bioMérieux, Fransa) ile tanımlanmıştır. Gram pozitif koklar, *Enterobacterales* takımına ait türler, *Pseudomonas* spp. ve *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi veya otomatize sistem (VITEK 2, bioMérieux, Fransa) ile çalışılmış ve European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kriterlerine göre belirlenmiştir. Kolistin duyarlılığını saptamada sıvı mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır⁽²²⁾. Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde SPSS 22.0 (IBM Corp.) paket programında Ki-kare ve Fisher's Exact, Fisher-Freeman-Halton testleri kullanılmıştır. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma için Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi invaziv olmayan klinik araştırmalar etik kurulundan 07.12.2020 tarih ve 2020/253 numarası ile izin alınmıştır.

BULGULAR

Çalışmaya hastanemizin çeşitli poliklinik, servis ve yoğun bakım ünitelerinden gönderilen 722 hastaya ait yara yeri örneği dahil edilmiştir. Hastaların 337'sinin (% 47) kadın, 385'inin (% 53) erkek olduğu ve yaş ortalamalarının 55,7±22,9 (en küçük 0- en büyük 99) olduğu görülmüştür. Toplam 772 örnekten izole edilen 956 etkenin 628'i (% 66) Gram negatif basil, 301'i (% 31) Gram pozitif kok, 27'si (% 3) maya olarak saptanmıştır. 370'i (% 39) *Enterobacterales* takımına ait türler, 233'ü (% 23) stafilokok, 53'ü

enterokok (% 6), 134'ü (% 14) *Pseudomonas* spp., 83'ü (% 9) *A. baumannii*, 27'si (% 3) *Candida* spp. (16'sı *C.albicans*, altısı *C.glabrata*, ikisi *C.guilliermondii*, ikisi *C.tropicalis*, biri *C.krusei*), 15'i (%2) beta hemolitik streptokok, 11'i (% 1) *Stenotrophomonas maltophilia*, 30'u (% 3) diğer bakteriler olarak saptanmıştır.

Hastaların 526'sında (% 73) tek, 196'sında (% 27) çoklu etken üremesi saptanmıştır. Bir hastada iki veya üç mikroorganizma türü üremesinin, yoğun bakım ünitelerindeki hastalardan gönderilen yara yeri örneklerinde, dahili ve cerrahi bölüm hastalarından gönderilen yara yeri örneklerine göre daha fazla olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

Stapylococcus aureus suşlarında gentamisin, siprofloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SXT), eritromisin, klindamisin, sefoksitin ve fusidik asit direnç oranlarının koagülaz negatif stafilokok (KNS) suşlarından daha düşük olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Levofloksasin ve tetrasiklin duyalılığının ise KNS ve *S.aureus*'ta benzer olduğu görülmüştür ($p>0,05$). Stafilokok suşlarında vankomisin, teikoplanin ve linezolid direncine rastlanmamıştır. Bu antibiyotikler dışında *S.aureus*'a karşı en etkili antibiyotiğin TMP-SXT, KNS'ye karşı en etkili antibiyotiklerin ise gentamisin ve TMP-SXT oldukları saptanmıştır. Enterokoklarda da vankomisin,

teikoplanin ve linezolid direnci görülmemiş; siprofloksasin ve levofloksasin direncinin diğer antibiyotiklerden yüksek olduğu belirlenmiştir. Gram pozitif bakterilerin antibiyotik direnç oranları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Enterobacterales takımına ait türlerin antibiyotik direnç oranları incelendiğinde, *Klebsiella* spp. suşlarının çalışmaya dahil edilen tüm antibiyotiklere diğer bakterilerden daha yüksek oranda direnç gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,05$). Bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Nonfermenter Gram negatif bakterilerden *A.baumannii* ve *Pseudomonas* spp. suşlarının antibiyotik direnç oranları incelendiğinde; imipenem, gentamisin, amikasin ve tobramisin direncinin *A.baumannii* suşlarında *Pseudomonas* spp. suşlarından daha fazla olduğu belirlenmiştir. Kolistin direnci her iki bakteri türü için de % 1 olarak belirlenmiştir. Kolistin haricinde *Pseudomonas* spp. suşlarının en duyarlı olduğu antibiyotiklerin gentamisin, amikasin ve tobramisin; *A.baumannii* suşlarının ise en duyarlı olduğu antibiyotiklerin tobramisin ve tigesiklin olduğu saptanmıştır (Tablo 3).

Yoğun bakım ünitesindeki hastalardan gönderilen yara yeri örneklerinden izole edilen bakterilerde kinolonlar başta olmak üzere, bazı antibiyotiklere direncin diğer kliniklerden gönderilen örneklerden

Tablo 1. Gram pozitif bakterilerin antibiyotik direnç oranları (n=286).

Antibiyotik	Bakteri türü					
	<i>S. aureus</i> (n=142)		KNS (n=91)		<i>Enterococcus</i> spp. (n=53)	
	n	%	n	%	n	%
Metisilin	50/140	36	54/89	61	-	-
Gentamisin	21/125	17	26/86	30	-	-
TMP-SXT	15/137	11	25/90	28	-	-
Eritromisin	47/140	34	55/91	60	-	-
Klindamisin	28/139	20	42/88	48	-	-
Fusidik asit	2/14	14	5/6	83	-	-
Tetrasiklin	34/140	24	32/90	36	-	-
Levofloksasin	28/127	22	29/80	36	25/43	58
Siprofloksasin	33/140	24	34/89	38	23/48	48
Vankomisin	0/141	-	0/90	-	0/53	-
Teikoplanin	0/142	-	0/91	-	0/53	-
Linezolid	0/141	-	0/90	-	0/51	-
Gentamisin YD	-	-	-	-	15/50	30
Streptomisin YD	-	-	-	-	18/49	37
Ampisilin	-	-	-	-	16/51	31

TMP-SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol, YD: Yüksek düzey

Tablo 2. Enterobacterales takımına ait türlerin antibiyotik direnç oranları (n=370).

Antibiyotik	Bakteri türü									
	<i>Escherichia coli</i> (n=145)		<i>Klebsiella spp.</i> (n=82)		<i>Proteus spp.</i> (n=61)		<i>Enterobacter spp.</i> (n=50)		Diğer* (n=32)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Ampisilin	113/133	85	-	-	34/56	61	-	-	-	-
AMC	86/143	60	57/79	72	26/59	44	-	-	-	-
Sefuroksim	84/138	61	58/78	74	16/58	28	28/46	61	4/27	15
Sefotaksim	77/136	57	49/70	70	6/57	11	14/44	32	2/30	7
Seftriakson	78/143	55	54/77	70	3/59	5	14/46	30	4/32	13
Seftazidim	74/138	54	56/80	70	6/60	10	22/46	48	1/31	3
Sefepim	72/143	50	54/82	66	3/55	6	7/48	15	8/32	25
TMP-SXT	64/134	48	48/78	62	36/60	60	8/47	17	4/32	13
Gentamisin	40/139	29	35/75	47	20/57	19	6/45	13	2/29	7
Amikasin	28/143	20	25/81	31	6/58	10	5/49	10	3/28	11
Tobramisin	57/135	42	41/71	58	18/57	32	13/45	29	7/29	24
Piperasilin	102/137	75	59/71	83	20/56	36	16/46	35	2/31	7
TZP	62/140	44	48/79	61	5/58	9	16/48	33	5/31	16
Siprofloksasin	70/139	50	44/78	56	16/58	28	9/49	18	4/29	14
Levofloksasin	63/128	49	32/66	49	13/53	25	6/43	14	1/28	5
İmipenem	3/139	2	15/73	21	2/57	4	1/44	2	2/29	7
Ertapenem	22/145	15	34/78	44	6/60	10	11/46	24	17/27	63
Tigesiklin	15/177	13	35/69	51	-	-	14/41	34	-	-

AMC: Amoksisilin klavulanik asit, TMP-SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol, TZP: Piperasilin-tazobaktam,

*Diğer: *Morganella morganii* (n=15), *Serratia marcescens* (n=14), *Citrobacter spp.* (n=3), **: *Serratia marcescens* doğal dirençli olduğundan bu grup verisi tabloya dahil edilmemiştir.

Tablo 3. Nonfermenter Gram negatif bakterilerin antibiyotik direnç oranları (n=217).

Antibiyotik	Bakteri türü			
	<i>Pseudomonas spp.</i> (n=134)		<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=83)	
	n	%	n	%
İmipenem	43/132	33	72/78	92
Gentamisin	24/128	19	67/82	82
Amikasin	23/131	18	69/82	84
Tobramisin	19/123	15	52/71	73
TZP	48/133	36	-	-
Piperasilin	58/128	45	-	-
Sefepim	46/130	35	-	-
Kolistin	1/97	1	1/78	1
Tigesiklin	-	-	53/79	67
TMP-SXT	-	-	61/79	77
Seftazidim	46/130	35	-	-
Levofloksasin	54/127	43	63/67	94
Siprofloksasin	58/130	45	75/81	93

TZP: Piperasilin-tazobaktam,

TMP-SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol

izole edilen bakterilerdeki dirençten istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo 4).

TARTIŞMA

Mikrobiyolojik açıdan yara örneklerinin

Tablo 4. Yoğun bakım ünitelerinde diğer kliniklere göre daha yüksek direnç oranı saptanan antibiyotikler (%).

Antibiyotik	Enterobacterales	Stafilokoklar	Enterokoklar	NFGNB
Siprofloksasin	67	71	*	86
Levofloksasin	66	83	*	83
Gentamisin	44	71	-	54
Amikasin	34	-	-	62
Tobramisin	*	-	-	55
İmipenem	15	-	-	73
Ertapenem	36	-	-	-
TMP-SXT	65	*	-	*
Seftriakson	62	-	-	-
Seftazidim	64	-	-	-
Sefotaksim	62	-	-	-
Sefepim	60	-	-	65
TZP	59	-	-	76
Piperasilin	*	-	-	73

TMP-SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol, TZP: Piperasilin-tazobaktam, NFGNB: Nonfermenter Gram Negatif Basil

Piperasilin, TZP, seftazidim ve sefepim NFGNB'lerden yalnızca *Pseudomonas spp.* suşları için, SXT ise *A. baumannii* suşları için hesaplanmıştır.

-: değerlendirme dışı, *: diğer kliniklerle benzer direnç oranı

incelenmesi, diğer örnek türlerine göre daha zaman alıcıdır ve dikkat gerektirmektedir. Yara enfeksiyonu düşünülen hastalarda, örnekler doğru şekilde alınmaz ise deri florasında bulunan bakteriler etken mikroorganizma olarak izole edilebilirler⁽¹⁶⁾. Bu da uygunsuz antibiyotik kullanımına ve tedavi süresinin uzamasına yol açabilir. Mikrobiyoloji laboratuvarı

tarafından etkenin doğru tespit edilmesi ve antibakteriyel duyarlılıklarının belirlenmesi, klinisyenin tedavi kararlarında önemli kolaylık sağlamaktadır⁽¹⁵⁾.

Ülkemizde yapılan birçok çalışmada, bizim çalışmamızla benzer şekilde yara yeri enfeksiyonlarında Gram negatif bakterilerin daha sık etken olduğu görülmektedir. Gram negatif bakteri sıklığının % 53 ile % 80,2; Gram pozitif bakteri sıklığının ise % 21,2 ile % 46,4 arasında olduğu bildirilmektedir^(3,4,8,11,14,25). Zdravkovska ve ark.'nın⁽²⁷⁾ Kuzey Makedonya'da yapmış olduğu bir çalışmada ameliyat sonrası yaralarda en yaygın izole edilen patojenler *S.aureus* (% 27), *Escherichia coli* (% 17) ve *P.aeruginosa* (% 13) olarak belirlenmiştir. Abdu ve ark.⁽¹⁾ Nijerya'da yaptıkları çalışmada ise yara yeri enfeksiyonlarından en sık izole ettikleri bakterileri sırasıyla *P.aeruginosa*, *E.coli* ve *Klebsiella pneumoniae* olarak bildirmişlerdir. Gram negatif bakterilerin genel olarak antiseptiklere karşı daha dirençli olması ve antibiyotik direnç mekanizmalarının giderek yaygınlaşması nedeniyle gram pozitiflerden daha sık etken olarak karşımıza çıktığı düşünülmüştür.

Gram pozitif bakterilerden stafilokoklar ve enterokoklar yara yeri enfeksiyonlarının önemli etkenleri olarak görülmektedirler. Bunların içinde ise enfeksiyon kaynağı olarak karşımıza en sık *S.aureus* çıkmaktadır^(1,4,6,9,23,27,28). Ülkemizde yapılan çalışmalarda bu suşlarda genellikle vankomisin, teikoplanin ve linezolid direncine rastlanmamaktadır^(2,4,23). Davarcı ve ark.'nın⁽⁹⁾ 2014-2016 yıllarını kapsayan çalışmalarında *S.aureus*'ta bu antibiyotiklere direnç görülmezken, enterokoklarda % 10 vankomisin ve % 4 linezolid direncine rastlanmıştır. İtalya'da yapılan bir çalışmada yine *S.aureus* suşlarında vankomisin, teikoplanin, linezolid direncine rastlanmamış; KNS suşlarında ise vankomisin ve linezolid direnci görülmemiş ve % 28,6 oranında teikoplanin direnci saptanmıştır⁽⁶⁾. Malezya'da yapılan bir çalışmada da stafilokoklarda vankomisin direncine rastlanmazken; enterokoklarda % 1,2 oranında linezolid direnci görülmüş, vankomisin direnci saptanmamıştır⁽²⁸⁾. Çalışmamızda ise yara örneklerinde üreyen stafilokok

ve enterokok suşlarında vankomisin, teikoplanin ve linezolid direnci görülmemiştir. Metisilin direncinin giderek arttığı stafilokoklar düşünüldüğünde, yüksek olan glikopeptid duyarlılığının devamlılığının sağlanması için bu ajanların kısıtlı bildirimi ve kısıtlı kullanımı önem arz etmektedir.

Ampirik tedavide kullanılacak antibiyotiklerin direnç oranlarının % 20'nin altında olması gerekliliği düşünüldüğünde çalışmamızda KNS ve enterokok suşlarında ampirik tedaviye uygun antibiyotiğin olmadığı, *S.aureus* suşlarında ise TMP-SXT (% 11), fusidik asit (% 14), gentamisin (% 17) ve klindamisin (% 20) dışındaki antibiyotiklere karşı direnç oranlarının yüksek olduğu görülmüştür. Stafilokoklarda en yüksek metisilin direnci ise KNS suşlarında (% 61) bulunmuş, *S.aureus* suşlarından (% 36) çok daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu oranları Gündem ve ark. % 33,3 ve % 21,7; Avcıoğlu ve ark. % 58,8 ve % 16,7 olarak bulmuşken Turhanoglu ve ark. çalışmamızla benzer şekilde % 71,1 ve % 35,8; Bessa ve ark. % 85,7 ve % 21,8 olarak saptamışlardır^(4,6,15,23). TMP-SXT direncinin (% 11) bu suşlarda ülkemizde yapılan diğer çalışmalarla benzer şekilde oldukça düşük olduğu, eritromisin (% 34) ve siprofloksasin (% 24) direncinin ise çalışmamızda çok daha yüksek olduğu bulunmuştur^(4,9,23). Saptadığımız yüksek makrolid ve kinolon dirençleri, metisilin dirençli stafilokokların ampirik tedavisinde bu antibiyotik gruplarının uygun olmadığını, TMP-SXT kullanımının ise uygun klinik durumlarda daha etkin olacağını göstermektedir. Yara örneklerinde üreyen enterokokların duyarlılıkları incelendiğinde, Ödemiş ve ark.'nın⁽²⁰⁾ yaptığı bir çalışmada *E.faecium* suşları siprofloksasine % 86, yüksek doz gentamisine % 67; *E.faecalis* suşları ise siprofloksasine % 36, yüksek doz gentamisine % 42, ampisiline % 50 dirençli olarak bulunmuştur. Avcıoğlu ve ark.⁽⁴⁾ siprofloksasin ve ampisilin direncini % 20 olarak bildirmişlerdir. Davarcı ve ark.⁽⁹⁾ yüksek doz gentamisin direncini % 30, ampisilin direncini % 24 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda ise bu direnç oranları yüksek doz gentamisin için % 30, ampisilin için % 31, siprofloksasin için % 48 olarak saptanmıştır. Avcıoğlu ve ark.'nın⁽⁴⁾

çalışması ilimize komşu olan Bolu ilinde yapılmış olmasına rağmen direnci daha düşük saptamaları, bölgesel olarak yakın merkezler de bile antibiyotik kullanım politikalarına bağlı olarak direnç oranlarının değişebileceğini düşündürmüştür. Ayrıca enterokok suşlarındaki yüksek siprofloksasin direnci ampirik tedavi için kinolonların kullanımının uygun olmadığını göstermektedir.

Enterobacterales türlerinin antibiyotik direnç oranları incelendiğinde çalışmamıza dahil edilen tüm antibiyotiklere *Klebsiella* spp. suşlarının diğer bakterilerden daha yüksek oranda ve tüm antibiyotiklere % 20'nin üzerinde direnç gösterdiği belirlenmiştir. Avcioglu ve ark.⁽⁴⁾ ile Cirit ve ark.'nın⁽⁸⁾ yapmış olduğu çalışmalarda da benzer şekilde *Klebsiella* spp. suşlarının diğer bakterilerden daha yüksek oranda direnç gösterdiği belirlenmiştir. Karbapenemler ve aminoglikozidlerin çalışmamızda izole edilen *Enterobacteriaceae* üyelerine en etkili antibiyotikler olduğu saptanmıştır. Cirit ve ark.'nın⁽⁸⁾ yapmış olduğu çalışmada da benzer sonuçlar bildirilmiştir. Üçüncü kuşak sefalosporin direnci ise enterik bakterilerde giderek artmaktadır. Çalışmamızda *E.coli* suşlarının sefotaksime % 57, seftriaksona % 55, seftazidime % 54 oranında direnç saptanmışken *Klebsiella* spp. suşlarında üç antibiyotiğe de % 70 oranında direnç olduğu görülmüştür. Davarcioğlu ve ark.⁽⁹⁾ *E.coli* suşlarının seftazidim direncini % 60,7, *Klebsiella* spp. suşlarının seftazidim direncini ise % 69.7 olarak saptamışlardır. Avcioglu ve ark.⁽⁴⁾ da *E.coli* suşlarının seftriakson direncini % 47,9, seftazidim direncini % 41,7; *K.pneumoniae*'nin seftriakson direncini % 51,5, seftazidim direncini % 48,5 olarak bildirmişlerdir. Nijerya'da Abdu ve ark.'nın⁽¹⁾ yapmış olduğu çalışmada Gram negatif bakterilerde sefalosporinlere yüksek oranda direnç (sefotaksim % 91,46, seftriakson % 91,46, seftazidim % 87,20) tespit edilmiştir. Bu yüksek direnç Pondei ve ark.⁽²⁴⁾ tarafından da tespit edilmiştir. *Enterobacterales* suşlarındaki yüksek sefalosporin direnç oranları genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ve Amp-C beta-laktamaz gibi birçok beta-laktamaz enziminin bakterilerde hızlı şekilde

yayıldığını düşündürmektedir.

Nonfermenter bakteriler yara yeri enfeksiyonlarının önemli etkenleridir. Çeşitli çalışmalarda yara yeri enfeksiyonlarında en sık saptanan non fermenter etkenler *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. olarak bildirilmektedir⁽¹⁵⁾. Turhanoglu ve ark.⁽²³⁾ yaptıkları çalışmada *Pseudomonas* suşlarının gentamisine % 80,9, sefepime % 73,7, amikasin % 71,5, seftazidime % 70,9, siprofloksasine % 66,7, imipeneme % 59,6 oranında; *Acinetobacter* suşlarının gentamisine % 34,8, siprofloksasine % 16,7, imipeneme % 13,1 oranında duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Bessa ve ark.⁽⁶⁾ İtalya'da 217 enfekte yaranın incelendiği çalışmada 46 (% 17) örnekte *P.aeruginosa* üremesi tespit etmişler ve bu suşlarda amikasin % 81,7, meropenem % 69,6, gentamisine % 60,9 oranında duyarlılık saptamışlardır. Bayram ve ark.'nın⁽⁵⁾ 179 hastanın yanık yarasının incelendiği çalışmalarında da *P.aeruginosa* suşlarının 13'ünün (% 43) çoklu ilaca dirençli olduğu, meropenem, amikasin, siprofloksasin ve sefepimin *P.aeruginosa*'ya karşı en etkili antibiyotikler olduğu; *A.baumannii*'ye karşı en etkili antibiyotiklerin ise tigesiklin ve kolistin olduğu tespit edilmiştir. Cirit ve ark.⁽⁸⁾ çalışmalarında *P.aeruginosa* suşlarına en etkili antibiyotikleri meropenem ve tobramisin; *A.baumannii* suşlarına karşı en etkili antibiyotikleri ise tobramisin, kolistin ve tigesiklin olarak belirlemişlerdir. Çalışmamızda *P.aeruginosa* suşlarında kolistin duyarlılığı en yüksek olmakla birlikte diğer çalışmalarla benzer şekilde aminoglikozid duyarlılıklarının da diğer antibiyotiklerden daha yüksek olduğu ve *Pseudomonas* spp. suşlarının *A.baumannii* suşlarından daha düşük direnç oranlarına sahip oldukları tespit edilmiştir. *A.baumannii* suşlarında ise kolistin % 1 direnç oranıyla en duyarlı antibiyotik iken, tigesiklin % 33 direnç oranıyla ikinci sırada duyarlı olarak tespit edilmiştir. Özellikle *A.baumannii* suşlarındaki çoklu ilaç direnci kolistin kullanımını yeniden gündeme getirmiştir. Kolistin duyarlılığı çalışmamızda % 99 gibi yüksek bir oranda bulunmuştur. Kullanımına bağlı nefrotoksisite gibi önemli yan etkilerinin olduğu düşünüldüğünde bu

ajanın duyarlılığının önerilen şekilde sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle doğru şekilde tespit edilmesi gerekmektedir.

Yara yeri enfeksiyonlarında *Candida* türleri nadir etkenler olarak karşımıza çıkmaktadır. Altan ve ark.⁽²⁾ tüm yara yeri enfeksiyon etkenleri içerisinde % 11,4, Avcioğlu ve ark.⁽⁴⁾ % 0,6 oranında *Candida* spp. üremesi tespit etmişlerdir. Çalışmamızda ise bu oran % 3 olarak saptanmıştır. Enfeksiyonun bölgesi, akut ya da kronik olması, hastane kaynaklı olması gibi bir çok değişken nedeniyle farklı merkezlerde farklı oranların olabileceği düşünülmüştür.

Yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören hastaların yara yeri örneklerinde üreyen, enterokoklar dışındaki etkenlerin, antibiyotiklerin birçoğuna servis ve poliklinik hastalarında saptanan etkenlerden daha dirençli ve polimikrobiyal olduğu görülmüştür. Yoğun bakım ünitesindeki hastaların genellikle daha ileri yaş grubunda olması, eşlik eden kronik hastalıklarının bulunması ve yoğun antibiyotik kullanımının bu direnç yüksekliğinden sorumlu olduğu düşünülmüştür. Yara yeri enfeksiyonlarında Gram negatif ve Gram pozitif birçok bakteri etken olabilmekte ve yüksek antibiyotik direnci saptanmaktadır. Bu nedenle tüm yara yeri enfeksiyonu düşünülen örneklerle kültür ve antibiyogram işlemlerinin yapılarak tedavinin düzenlenmesi gerekmektedir.

Etik Kurul Onayı: Yerel invaziv olmayan klinik araştırmalar etik kurulundan onay alınmıştır (07.12.2020 - 2020/253).

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Ethics Committee Approval: Approval was obtained from the local non-invasive clinical trials ethics committee (07.12.2020 - 2020/253).

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

KAYNAKLAR

1. Abdu AB, Egbagba J, Fente BG. Identification and antimicrobial susceptibility profile of bacterial pathogens isolated from wound infections in a tertiary hospital, Bayelsa South southern, Nigeria. *Trop J Pathol Microbiol.* 2019;5(12):966-75. <https://doi.org/10.17511/jopm.2019.i12.01>
2. Altan G, Mumcuoğlu İ, Hazirolan G, Dülger D, Aksu N. Yara örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antimikrobiallere duyarlılıkları. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 2017;74(4):279-86. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2017.81598>
3. Aşık G, Özoğuz P, Tünay H, Bulut A, Kaçar S, Bal A. Yara kültürlerinden izole edilen etkenler ve antibiyotik direnç profilleri. *Cerrahi Sanatlar Derg.* 2014;7(1):18-22.
4. Avcioğlu F, Behçet M, Karabörk Ş, Kurtoğlu MG. Yara örneklerinden izole edilen mikroorganizmaların antimikrobiyal direnç oranları - üç yıllık değerlendirme. *DÜ Sağlık Bil Enst Derg.* 2019;9(3):110-14. <https://doi.org/10.33631/duzcesbed.538681>
5. Bayram Y, Parlak M, Aypak C, Bayram İ. Three-year review of bacteriological profile and antibiogram of burn wound isolates in Van, Turkey. *Int J Med Sci.* 2013;10(1):19-23. <https://doi.org/10.7150/ijms.4723>
6. Bessa LJ, Fazii P, Di Giulio M, Cellini L. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. *Int Wound J.* 2015;12(1):47-52. <https://doi.org/10.1111/iwj.12049>
7. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(2):244-69. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.244-269.2001>
8. Cirit OS, Müderris T, Mızraklı A, Vurupalmaz Y, Barış A. Yara kültürlerinden izole edilen aerop bakteriler ve antibiyotik duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2014;44(4):149-57.
9. Davarcı İ, Koçoğlu ME, Barlas N, Samastı M. Yara kültürlerinde izole edilen bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıkları: üç yıllık değerlendirme. *ANKEM Derg.* 2018;32(2):53-61. <https://doi.org/10.5222/ankem.2018.053>
10. Demirel M, Demiralp CÖ, Yormuk E. 2000-2005 yılları arası bası yaraları: klinik deneyimler. *Ankara Üni Tıp Fak Mec.* 2007;60(2):81-7.
11. Doğan SŞ, Paköz NİE, Aral M. Laboratuvarımıza gönderilen yara yeri örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotiklere direnç durumları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2010;40(4): 243-9.
12. Dündar D, Özcan SK, Atmaca E. Evde bakım hizmeti verilen hastaların bası yaralarındaki yüzeysel kolonizasyonun mikrobiyolojik incelenmesi. *Kocatepe Tıp Derg.* 2012;13(1):27-32.
13. Espejo E, Andres M, Borralló R-M, Padilla E, et al. Associated with pressure ulcers: a prospective cohort study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37(5):969-75. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3216-8>
14. Görmeli G, Duman Y, Karakaplan M, et al. Orthopedic Surgical wound infection: microorganisms and resistance figures. *J Turgut Ozal Med Cent.* 2015;22(1):13-7.
15. Gündem NS, Çikman A. Yara kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM*

- Derg. 2012;26(4):165-70.
<https://doi.org/10.5222/ankem.2012.165>
16. Güriz H, Çiftçi E, Gökdemir R, Aysev D. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesindeki yara kültürlerinin değerlendirilmesi. Ankara Üni Tıp Fak Mec. 2001; 54(3): 231-5.
 17. Okeke IN, Laxminarayan R, Bhutta ZA, Duse AG, Jenkins P, Brien TF, Pablos-Mendez A, Klugman KP. Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. Lancet Infect Dis. 2005;5(8):481-93.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70189-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70189-4)
 18. Owens CD, Stoessel K. Surgical site infections: epidemiology, microbiology and prevention. J Hosp Infect. 2008;70(Suppl 2):3-10.
[https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(08\)60017-1](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(08)60017-1)
 19. Özmen E, Geyik MF, Uluğ M, Çelen MK, Hoşoğlu S, Ayaz C. Yatan hastalardan izole edilen gram negatif bakteriler ve antibiyotik dirençlerinin değerlendirilmesi. Düzce Tıp Fak Derg. 2010;12(3):32-9.
 20. Pondei K, Fente BG, Oladapo O. Current microbial isolates from wound swabs, their culture and sensitivity pattern at the Niger delta university teaching hospital, Okolobiri, Nigeria. Trop Med Health. 2013;41(2):49-53.
<https://doi.org/10.2149/tmh.2012-14>
 21. Segre JA. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. J Clin Invest. 2006; 116(5): 1150-8.
<https://doi.org/10.1172/JCI28521>
 22. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST. MIC and zone diameter distributions and ECOFFs, V.9.0 valid from 2019-01-01.
 23. Turhanoğlu NM, Koyuncu E, Bayındır Bilman F. Microorganisms and antibiotic resistances isolated from wound cultures 2010-2015. Turk Hij Den Biyol Derg. 2018;75(2):183-94.
<https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2018.56338>
 24. Yıldırım AM, Çarkçı, HA, Yılmaz M, Toraman ZA. Yanık ve yara örneklerinden izole edilen mikroorganizma türlerinin belirlenmesi ve antimikrobiyal duyarlılıklarının araştırılması. Kocatepe Tıp Derg. 2019;20(1):26-32.
<https://doi.org/10.18229/kocatepetip.532122>
 25. Yurtsever SG, Kurultay N, Çeken N, ve ark. Yara yeri örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi. ANKEM Derg. 2009;23(1):34-8.
 26. Zafar A, Anwar N, Ejaz H. Bacteriology of infected wounds - a study conducted at Children Hospital Lahore. Biomedica. 2007;23:8(A):1-4.
 27. Zdravkovska M, Serafimovska T, Ribarska JT, Dimitrova M, Zivkova S, Georgijev A, Sadikarijo I, Balkanov T, Darkovska-Serafimovska M. Commonly isolated pathogens from postoperative wounds and antibiotic susceptibility testing at a tertiary care hospital in Stip, North Macedonia. IOSR J Pharm. Volume 10, Issue 2 Series. I (February 2020), PP. 46-52
 28. Wong SY, Manikam R, Muniandy S. Prevalence and antibiotic susceptibility of bacteria from acute and chronic wounds in Malaysian subjects. J Infect Dev Ctries. 2015;9(9):936-44.
<https://doi.org/10.3855/jidc.5882>

Klinik *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Siprofloksasin Direnci ve Direnç Mekanizmalarının Araştırılması

Investigation of Ciprofloxacin Resistance and Its Mechanisms in Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates

Nilüfer Uzunbayır Akel ©
Yamaç Tekintaş ©
Fethiye Ferda Yılmaz ©
İsmail Öztürk ©
Mustafa Ökeer ©
Sabire Şöhret Aydemir ©
Fatma Feriha Çilli ©
Mine Hoşgör-Limoncu ©

Öz

Pseudomonas aeruginosa hastane enfeksiyonlarının en temel etkenlerinden biridir. Farklı antibiyotik grupları *P.aeruginosa* tedavisi için kullanılsa da, kinolon grupları oral kullanılabilme avantajlarıyla öne çıkmaktadır. Ancak son yıllarda bu grubun üyelerine karşı kazanılan direnç, tedaviyi giderek daha zor hale getirmektedir. Bu çalışmanın amacı Ege Üniversitesi Hastanesi'nden izole edilen siprofloksasin dirençli *P.aeruginosa* izolatlarında, epidemiyolojik ilişkinin ve dirençten sorumlu olası mekanizmaların araştırılmasıdır.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* bakterilerinin tür düzeyinde tanımlanmaları VITEK compact, antimikrobiyal duyarlılıkları VITEK MS otomatize sistemleri aracılığıyla belirlenmiştir. Siprofloksasin dirençli olduğu belirlenen izolatların epidemiyolojik ilişkileri "Enterobacterial repetitive intergenic consensus"-polimeraz zincir reaksiyonu (ERIC-PZR) ile saptanmıştır. Genetik olarak ilişkisiz klonlardan seçilen temsilcilerde kinolon direncinden sorumlu olacağı düşünülen *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA* genlerinin varlığı PZR ile tespit edilmiştir. Dışa atım pompasına ait regülatör genleri olan *rfxB*, *mexR* varlığı PZR ile belirlenirken, phenylalanine-arginine β -naphthylamide (PA β N), dışa atım pompasının aktivasyonunun tespiti için kullanılmıştır.

Yirmi iki izolat (% 26.5) siprofloksasin dirençli olarak saptanmıştır. ERIC-PZR sonuçlarına göre 11 ilişkisiz klon tespit edilmiştir. PA β N varlığında 10 izolatta siprofloksasin minimum inhibitör konsantrasyon (MIK) değerlerinde 2-64 kat arasında azalma görülmüştür. Bir izolatta siprofloksasin MIK değişikliği belirlenmemiştir. On bir temsilci izolatın 10 tanesinde pompaya ait regülatör genlerinin varlığı belirlenirken, kinolon direnciyle ilişkili olan genlerden sadece *qnrB* yedi temsilci izolatta saptanmıştır. *qnrA*, *qnrS*, *qepA* genleri hiçbir izolatla belirlenmemiştir.

Siprofloksasin dirençli *P.aeruginosa* izolatları hastanemizden izole edilmektedir. Farklı genetik gruplara ait olan izolatların kliniklerde dolaşımında olması dikkat çekici bir durumdur. Temel direnç mekanizmalarının dışa atım pompası ve *qnrB* genleri olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: direnç, *Pseudomonas aeruginosa*, PZR, siprofloksasin

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is one of the most important causes of hospital infections. Although different antibiotic groups are used for the treatment of *P.aeruginosa* infections, quinolone groups are distinguished by the advantages of oral administration. However, in recent years, resistance against members of this group has made treatment more difficult. The aim of this study was to investigate the epidemiological relationship and possible mechanisms of resistance in ciprofloxacin resistant *P. aeruginosa* isolates from Ege University Hospital.

The identification of *P.aeruginosa* bacteria isolated from clinical samples in Ege University Medical Faculty Medical Microbiology Laboratory was determined by VITEK MS automated systems by VITEK compact, antimicrobial susceptibility. The epidemiological relationships of the ciprofloxacin resistant isolates were determined by Enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (ERIC-PCR). The presence of *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA* genes, the quinolone resistance genes and *rfxB*, *mexR*, the regulatory genes of the efflux pump, was determined by PCR. The phenylalanine-arginine β -naphthylamide (PA β N) assay was used to determine the activation of the efflux pump.

Twenty-two isolates (26.5 %) were found resistant to ciprofloxacin. According to the ERIC-PCR results, 11 unrelated clones were detected. Ciprofloxacin minimum inhibitory concentration (MIC) values were decreased 2-64 times in 10 isolates in the presence of PAIN. No ciprofloxacin MIC change was detected in one isolate. The presence of pump regulatory genes was determined in 10 of the 11 representative isolates, while only *qnrB* of the genes associated with quinolone resistance was detected in seven representative isolates. *qnrA*, *qnrS*, *qepA* genes were not detected in any isolate.

Ciprofloxacin resistant *P.aeruginosa* isolates are isolated from our hospital. It is noteworthy that the isolates belonging to different genetic groups are in circulation in clinics. Basic resistance mechanisms are thought to be efflux pumps and *qnrB* genes.

Keywords: ciprofloxacin, PCR, *Pseudomonas aeruginosa*, resistance

Received/Geliş: 19.02.2021
Accepted/Kabul: 12.04.2021
Published Online/Online Yayın: 29.04.2021

Atf/Cite as: Uzunbayır Akel N, Tekintaş Y, Yılmaz FF, Öztürk İ, Ökeer M, Aydemir SŞ, Çilli FF, Hoşgör-Limoncu. Klinik *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında siprofloksasin direnci ve direnç mekanizmalarının araştırılması. ANKEM Derg. 2021;35(1):22-7.

Mine Hoşgör-Limoncu
Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
İzmir - Türkiye
✉ mine.hosgor.limoncu@ege.edu.tr
minehosgorlimoncu@yahoo.com.tr
ORCID: 0000-0002-4892-8639

N. U. Akel 0000-0001-8192-5272
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı
İzmir - Türkiye

Y. Tekintaş 0000-0001-9437-7527
İ. Öztürk 0000-0002-2669-3090
İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
İzmir - Türkiye

F.F. Yılmaz 0000-0003-1102-7826
M. Ökeer 0000-0003-2869-7025
Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
İzmir - Türkiye

S.Ş. Aydemir 0000-0001-8354-9100
F.F. Çilli 0000-0003-3993-3396
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
İzmir - Türkiye

*Bu çalışmanın bir kısmı 10th Balkan Congress of Microbiology Kongresi'nde sunulmuştur. Poster no.27 (16-18 Kasım 2017, Sofya, Bulgaristan)

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa dış çevre ortamlarından, insan mikrobiyotasına kadar çok geniş bir alanda yaşayabilme yeteneğine sahip önemli bir fırsatçı patojendir⁽¹³⁾. Sağlık kuruluşlarında oldukça sık izole edilen bu bakterinin nozokomiyal enfeksiyonların yaklaşık % 10-15'inden sorumlu olduğu düşünülmektedir⁽²³⁾. Farklı ortamlarda yaşayabilmesi ve pulmoner ve üriner sistem enfeksiyonları, bakteriyemi, endokardit ve yanık enfeksiyonları gibi farklı bölgelerde enfeksiyona neden olabilmesi bakterinin yüksek adaptasyon yeteneğiyle ilişkilendirilmektedir. Farklı koşullara hızlıca adapte olabilmesi, özellikle kliniklerde antibiyotik ve dezenfektan stresi altındaki durumlarda hızlıca dirençli suşların seçilimine neden olmaktadır. Özellikle son yıllarda hemen tüm antimikrobiyal gruplarına dirençli izolatların etken olarak gözükmesi, tedavinin daha zor hale gelmesine ve artan ölüm oranlarına neden olmasını sağlamıştır⁽²²⁾.

Pseudomonas aeruginosa enfeksiyonlarının tedavisinde farklı antibiyotik grupları kullanılmaktadır. Bununla birlikte kinolon grupları kolay ulaşılabilirlik ve oral tedavi olanağı gibi avantajları nedeniyle sık kullanılan moleküllerdir. 1980'li yılların sonundan beri enfeksiyon tedavisinde başarıyla kullanılan bu moleküller DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerini inhibe ederek etkinlik gösterirler^(1,22). Özellikle siprofloksasin dünya sağlık örgütü tarafından esansiyel ilaçlar listesinde yerini almıştır. Bu gibi sebepler nedeniyle bu ilaca karşı oluşan hızlı direnç pek çok araştırmacının dikkatini çekmiştir⁽²⁰⁾. Bu moleküle karşı direncin ve sorumlu mekanizmaların tanımlanmasının, tedavi protokolleri açısından faydalı olacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmanın amacı kinolon dirençli *P.aeruginosa* izolatlarının epidemiyolojik ilişkisini ve dirençten sorumlu olması muhtemel mekanizmaların ortaya konulmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji

Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda farklı kliniklerden izole edilen örnekler VITEK MS otomatize sistemi (bioMérieux, Fransa) ile tür tayini yapılarak tanımlanmıştır. Bakteriler çalışılncaya kadar % 10 gliserinli buyyonda -80°C'de stoklanmıştır. İzolatlara ait antibiyotik duyarlılıkları VITEK 2 Compact® otomatize sistemi (bioMérieux, Fransa) kullanılarak belirlenmiştir. Otomatize sistemde elde edilen sonuçlar Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI)⁽⁶⁾ kriterleri doğrultusunda duyarlı, orta derece duyarlı ve dirençli olarak sınıflandırılmıştır.

Tüm polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) çalışmalarında kullanılmak üzere, DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla taze kültürden alınan koloniler steril ependorflar içerisindeki 400 µl steril ultra distile su (UDS) ile süspansiyon edilmiş ve 10 dk. vortekslenmiştir. Daha sonra 95°C'lik ısı bloğunda 10 dk. bekletilmiş, +4°C derecede 13.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant, steril boş mikrotüplere alınarak kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

Pseudomonas aeruginosa olduğu belirlenen ve kinolonlara dirençli olduğu saptanan izolatların epidemiyolojik olarak yakınlıklarını belirlemek için "Enterobacterial repetitive intergenic consensus"-polimeraz zincir reaksiyonu (ERIC-PZR) çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla tekrarlayıcı gen dizileri olan ERIC sekanslarını hedef alan primerler kullanılmıştır. (Tablo 1) Deney sonucunda elde edilen bant paternleri baz alınarak Jaccard katsayıları (S_j) hesaplanmış ve MEGA 4 programı aracılığıyla UPGMA dendogramı oluşturulmuştur. $S_j < 0.8$ ise, iki suş klonal olarak farklı olarak kabul edilmiştir. Her bir klondan seçilen temsilci izolatlar sayesinde direnç genleri, düzenleyici genlerin varlığı ve dışa atım pompasının aktivasyon deneyleri yapılmıştır.

Siprofloksasin direnç genleri ve dışa atım pompa genlerinin tespiti için ilgili bölgeleri hedef alan primerler (Tablo 1) kullanılarak yapılan DNA amplifikasyonları agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. İzolatlardaki dışa atım pompalarının aktif olup olmadıklarının tespiti siprofloksasin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin PAßN varlığında incelenerek karşılaştırılmasıyla tespit edilmiştir. MİK

Tablo 1. Çalışmada kullanılan primer dizileri.

Gen	Primer Dizisi (5'-3')	Referans	Bağlanma Sıcaklığı
ERIC-2	AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G	(12)	40 C°
mexR-1	CTG GAT CAA CCA CAT TTA CA	(24)	55 C°
mexR-2	CTT CGA AAA GAA TGT TCT TAA A	(24)	55 C°
nfxB-1	ACG CGA GGC CAG TTT TCT	(24)	60 C°
nfxB-2	ACT GAT CTT CCC GAG TGT CG	(24)	60 C°
qnrS-1	ACG ACA TTC GTC AAC TGC AA	(10)	63 C°
qnrS-2	TAA ATT GGC ACC CTG TAG GC	(10)	63 C°
qnrA-1	ATT TCT CAC GCC AGG ATT TG	(10)	52 C°
qnrA-2	GAT CGG CAA AGG TTA GGT CA	(10)	52 C°
qnrB-1	GAT CGT GAA AGC CAG AAA GG	(10)	50 C°
qnrB-2	ACG ATG CCT GGT AGT TGT CC	(10)	50 C°
qepA-1	GCA GGT CCA GCA GCG GGT AG	(8)	62 C°
qepA-2	CTT CCT GCC CGA GTA TCG TG	(8)	62 C°

Tablo 2. İzolasyon yapılan klinikler.

Klinikler	İzolat sayısı
Göğüs Hastalıkları	7
Anestezi	4
Pediyatri	3
Kardiyoloji	1
Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	1
Ortopedi	1
KBB	1
Üroloji	1
Gastroenteroloji	1
Radyoloji	1
Acil kliniği	1

değerlerinde 4 kat ve üzeri azalmalar pompaların aktive olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

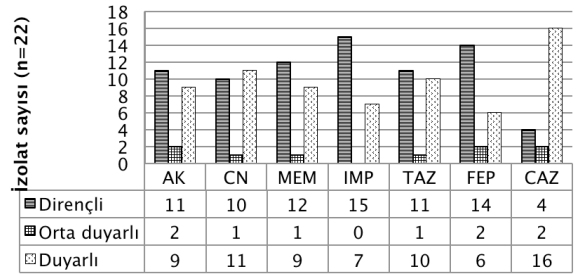
BULGULAR

Ekim 2014-Ocak 2015 tarihleri arasında hastane-mizde 83 adet *P.aeruginosa* izolatu belirlenmiştir. Bu izolatlar içerisinde 22 tanesinin siprofloksasin direnci gösterdiği saptanmıştır. Dirençli izolatlar 11 farklı klinikte tespit edilirken, Göğüs hastalıkları kliniği en çok izolasyonun yapıldığı klinik olarak belirlenmiştir. (Tablo 2).

Kinolon direnci gözlemlenen bu izolatların diğer antibiyotik gruplarına olan duyarlılıkları incelendiğinde, imipenem direncinin (% 68,2) oldukça yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır. Şekil 1'de antibiyotik duyarlılıkları özetlenmiştir.

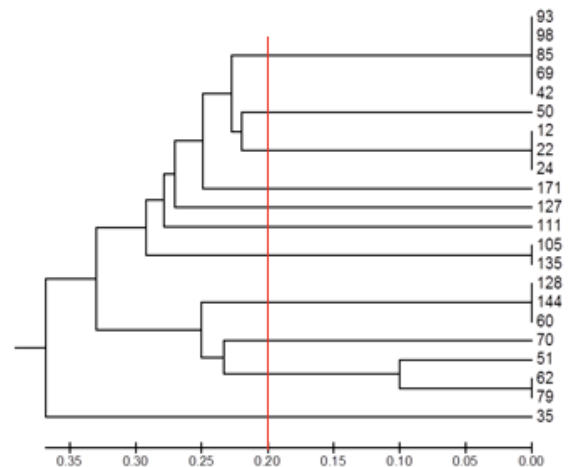
ERIC-PZR ile dirençli izolatların genetik yakınlıkları incelendiğinde % 80 benzerlik üzerinden 22 adet

Siprofloksasin dirençli izolatların antimikrobiyal duyarlılıkları



Şekil 1. Siprofloksasin dirençli izolatların antibiyotik duyarlılıkları. AK: Amikasin, CN: Gentamisin, MEM: Meropenem, IMP: Imipenem, TAZ: Tazobaktam, FEP: Sefepim, CAZ: Seftazidim

izolatın, 11 genetik ilişkisiz grupta yer aldıkları belirlenmiştir. 24, 35, 50, 70, 79, 85, 111, 127, 135, 144, 171 numaralı izolatlar genetik olarak ilişkisiz klonların temsilcileri olarak seçilmişlerdir (Şekil 2).



Şekil 2. İzolatlara ait ERIC-PZR dendrogramı (Kırmızı çizgi %80 benzerlik hattını (SJ 0.8) belirtmektedir.)

Tablo 3. Temsilci izolatlarda kinolon direnci ve dışa atım pompasına ait özellikler.

İzolat numarası	Kinolon direnç genleri			DAP genleri			DAP aktivasyonu		Siprofloksasin duyarlılığında azalma
	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>qepA</i>	<i>mexR</i>	<i>nfxB</i>	Cip (µg/mL)	Cip+PAβN (µg/mL)	
24	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	32	16	2 (kat)
35	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	16	2	8 (kat)
50	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	32	4	8 (kat)
70	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	8	1	8 (kat)
79	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	4	0,25	8 (kat)
85	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	16	16	0
111	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	32	8	4 (kat)
127	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	32	16	2 (kat)
135	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	2	0,5	4 (kat)
144	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	8	0,25	16 (kat)
171	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	16	0,125	64 (kat)

DAP: Dışa atım pompası, Cip: Siprofloksasin, PAβN: Phenyl-arginine beta naphthylamide

İzolatlarda siprofloksasin direncinden sorumlu mekanizmalar incelendiğinde, *qnrA*, *qnrS* ve *qepA* genleri hiçbir izolatta saptanmamıştır. *qnrB* geni ise 11 ayrı genetik klonu ait temsilcilerin yedi tanesinde belirlenmiştir (Tablo 3). Dışa atım pompa ilişkili düzenleyici genler olan *nfxB* ve *mexR* genleri 10 ayrı genetik klon temsilcisinde saptanmıştır. Ayrıca bu temsilcilerin dışa atım pompalarının aktivasyonu incelendiğinde PAβN ile 4 kat ve üzeri artış gösteren sekiz ayrı genetik temsilci olduğu belirlenmiştir (Tablo 3).

TARTIŞMA

Antimikrobiyal direnç nedeniyle enfeksiyon sağaltımında karşılaşılan problemler tüm dünyada önemli bir sorun haline gelmiştir. Hemen tüm ülkelerde ve kliniklerde izole edilen dirençli bakteriler, mortalite ve morbidite oranlarında artışa neden olmaktadır. Bu duruma ek olarak yeni antimikrobiyallerin kullanıma girme hızının düşmesi, yaşanan direnç probleminin boyutlarını artırmaktadır. Bu dirençli izolatlarla ait özelliklerin daha iyi tanımlanması cephanemizdeki moleküllerin daha akılcı kullanılabilmesi açısından önem arz etmektedir⁽¹⁸⁾.

Pseudomonas aeruginosa en sık izole edilen nozokomiyal enfeksiyon etkenlerinden biridir. Normal bireylerde nadiren enfeksiyona yol açmasına rağmen, fırsatçı patojen olarak sıklıkla izole edilmek-

tedir. Farklı antibiyotik gruplarına hızlıca dirençli hale gelmesi, farklı gen ve sistemler aracılığıyla direnç göstermesi ve bu direnci başka izolatlara aktarabilmesi gibi nedenler tedavisini oldukça zor hale getirmektedir^(14,17).

Sentetik olarak üretilen ilk antimikrobiyaller olan kinolon grupları DNA giraz ve topoizomerez IV, enzimlerini inhibe ederek etkinlik gösterirler. Bakteri içerisinde genetik materyalin istikrarlı şekilde sığabilmesini sağlayan bu enzimlerin yokluğunda bakteri hücrenin ölümü gerçekleşmektedir. Kinolonlar, *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılan antibiyotik gruplarıdır. Bu moleküllerin tek başlarına kullanılabilirliğinin yanında, çeşitli gruplarla kombine halde kullanılabilmesi, oral kullanımlarının mümkün olması gibi avantajları bulundurmaları, sıklıkla tercih edilmelerine sebep olmaktadır. Son yıllarda hızlıca görülmeye başlanan kinolon direnci farklı mekanizmalar aracılığıyla oluşabilmektedir. Bu mekanizmalar, dışa atım pompa genleri, enzimi kodlayan genlerde görülen mutasyonlar ve plazmit aracılığıyla olabilmektedir⁽¹⁶⁾.

Ülkemizde ve dünyada yapılmış çalışmalar incelendiğinde dışa atım pompaları aracılığıyla gelişen direncin önemli bir sorun olduğu bilinmektedir. "Resistance Nodulation Division" (RND) olarak tanımlanan pompa ailesi *P.aeruginosa*'da önemli direnç mekanizmalarında biridir. Oldukça fazla üyesi (günümüze kadar tanımlana 11 adet) bulunan bu

pompa ailesinde mexAB-oprM, mexXY-oprM, mexEF-oprN ve mexCD-oprJ pompa sistemleri, klinik izolatlardaki dirençle ilişkilendirilmiştir⁽¹⁹⁾. Bizim çalışmamızda mexAB-oprM ve mexCD-oprJ pompalarına ait düzenleyici genler olan *mexR* ve *nfxB*, oldukça yüksek yüzdeyle tespit edilmiştir (11’de 10 köken). Florokinolonlar başta olmak üzere pek çok farklı molekülün hücre dışına atılmasından sorumlu olan bu yapıların varlığı direk olarak dirençle ilişkilendirilmemektedir. Standart kökenlerde normal koşullarda düzenleyici genlerin bulunmasına rağmen direnç saptanmaması, genin varlığından öte mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkan farklılaşmanın bir sonucudur. Bu sebeple pompaların aktif olarak işlev yapıp yapmadığının tespiti amacıyla, pompa inhibitörü varlığında siprofloksasin MİK değerlerindeki değişimler incelenmiştir. Bizim çalışmamıza ait 11 temsilci izolatın sekiz tanesinde pompa inhibitörü varlığında MİK değerlerinde 4 kat ve üzeri azalmalar saptanmıştır. Bu veri hastanemizden izole edilen *P.aeruginosa* bakterilerinde kinolonlara ait ana direnç mekanizmasının dışı atım pompaları olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bu pompaların aynı zamanda beta-laktam antibiyotikler ve çeşitli dezenfektanları da substrat olarak kullanabilmesi nedeniyle, bu mekanizmayı bulunduran kinolon dirençli izolatların aynı zamanda farklı gruplara karşı da direnç gösterebileceği dikkat çeken bir durumdur.

ERIC-PZR bakterilerin genetik yakınlığını belirlemek için kullanılan basit ve hızlı bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Bakterilere ait parmak izleri elde edilerek izole edilen etkenlerin genetik olarak benzer olup olmadığı ortaya konulmaktadır⁽²⁾. Bizim çalışmamızdaki 22 dirençli izolatta 11 ayrı klon tespit edilmiş olması, multiklonal dağılım gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu durum hastanemizin geniş bir hasta popülasyonuna hizmet veren bölge hastanesi olması ve izolatların farklı kliniklerden izole edilmesi nedeniyle oluştuğu düşünülmektedir⁽⁹⁾.

Plazmit kaynaklı kinolon direnç determinantları, bakterinin pentapeptid yapıda bir protein sentezlemesi sayesinde işlev görürler. Oluşan bu protein DNA ve gen (DNA giraz veya topoizomeraz IV) kompleksle-

rini, kinolonların etki etmesini engelleyecek şekilde koruyarak işlev yaparlar⁽²¹⁾. Tanımlanan bu plazmit kaynaklı genler diğer direnç mekanizmalarına oranla daha nadir olarak gözükmeyle birlikte pek çok *Enterobacteriaceae* üyesinde ve *P.aeruginosa* izolatlarında tanımlanmıştır^(11,13). Bizim çalışmamızda temsilci izolatların yedi tanesinde *qnrB* geni saptanmıştır. Ülkemizde *P.aeruginosa* bakterilerinde *qnr* genlerinin araştırılan az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bununla birlikte çalışmalarda *qnr* genlerinin hiç biri saptanmamıştır^(5,7). Ülkemizde *P.aeruginosa* izolatlarında ilk defa belirlendiği düşünülen bu genin, farklı genetik klonlarda yer alan izolatlarda bulunması dikkat çekicidir. Ayrıca dışı atım pompasının aktif olmadığı 3 izolatta *qnrB* geninin saptanması, bu izolatlardaki direncin nedenini ortaya koymaktadır.

Pseudomonas aeruginosa izolatlarının kinolonlara olan duyarlılıkları tüm dünyada farklı düzeylerde seyretmektedir. Bununla birlikte ülkemizden yapılmış çalışmalarda bu direnç oranlarının % 24-35 aralığında seyrettiği görülmektedir. Bizim çalışmamızda da buna benzer bir direnç oranı saptanmıştır^(3,4). Bununla birlikte, gerek reçetelenme tercihleri gerek ampirik tedavide tercih edilmeleri gibi nedenlerin yanı sıra, plazmit kaynaklı direnç determinantlarının izolatlar arası yayılım göstermesi gibi sebeplerle, kökenlerin dirençlilik durumlarının dikkatle takip edilmesi gerektiğine inanıyoruz. Direncin yayılımının ve izolatların epidemiyolojik ilişkilerinin çok merkezli daha yüksek izolat sayılı çalışmalar ile araştırılması gerekmektedir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

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

KAYNAKLAR

1. Andriole VT. The quinolones: past, present, and future. Clin Infect Dis. 2005;15(41):113-9. <https://doi.org/10.1086/428051>
2. Bakhshi B, Afshari N, Fallah F. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR analysis as a reliable evidence for suspected Shigella spp. Outbreaks. Braz J Microbiol. 2018;49(3):529-33.

- <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.014>
3. Behçet M, Avcıoğlu F, Karabörk Ş, Kurtoğlu MG. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antimikrobiyal direnç oranları: üç yıllık değerlendirme. ANKEM Derg. 2019;33(2): 43-8.
 4. Çakmaklıoğulları EK, Kuru C. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları: farklı örnek türlerinde değerlendirme. ANKEM Derg. 2019;33(2):37-42.
 5. Cayci YT, Coban AY, Gunaydin M. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Indian J Med Microbiol. 2014;32(3):285-9. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.136567>
 6. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty sixth informational supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; (2016).
 7. Coban AY, Tanrıverdi Çaycı Y, Yıldırım T, Erturan Z, Durupınar B, Bozdoğan B. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients. Mikrobiyol Bul. 2011;45(4):602-8.
 8. Everett MJ, Jin YF, Ricci V, Piddock LJ. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. Antimicrob Agents Chemother. 1996;40(10):2380-6. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.10.2380>
 9. Hosgor-Limoncu M, Eraç B, Yurtman AN, Aydemir S. Plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms in ESBL positive *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains at a Tertiary-Care Hospital in Turkey. J Chemother. 2012;24(3):144-9. <https://doi.org/10.1179/1120009X12Z.00000000019>
 10. Jacoby GA, Chow N, Waites KB. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(2):559-62. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.559-562.2003>
 11. Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VC, Oh H, Robicsek A. qnrB, another plasmid mediated gene for quinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(4):1178-82. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1178-1182.2006>
 12. Jacome PRL, Alves LR, Cabral AB, Lopez ACS, Maciel MAV. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2012;45(6):707-12. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000600010>
 13. Köse Ş, Atalay S, Ödemiş İ, Adar P. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg. 2014;28(3):100-4. <https://doi.org/10.5222/ankem.2014.100>
 14. Meng L, Liu H, Lan T, Dong L, Hu H, Zhao S, Zhang Y, Zheng N, Wang J. Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from raw milk revealed by whole genome sequencing. Front Microbiol. 2020; 3(11):1005. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01005>
 15. Michalska AD, Sacha PT, Ojdana D, Wieczorek A, Tryniszewska E. Prevalence of resistance to aminoglycosides and fluoroquinolones among *Pseudomonas aeruginosa* strains in a University Hospital in Northeastern Poland. Braz J Microbiol. 2014;45(4):1455-8. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000400041>
 16. Nazik H, Öngen B. Türkiye’de plazmit aracılı kinolon direnci. ANKEM Derg. 2010;24(1):46-54.
 17. Nejma MB, Olfa Sioud O, Mastouri M. Quinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from University hospital in Tunisia. 3 Biotech. 2018; 8:1. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1019-8>
 18. Novais C, Freitas AR. Transmission of antibiotic resistant bacteria and genes: unveiling the jigsaw pieces of a one health problem. Pathogens. 2020;9(6):497. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060497>
 19. Pursell A, Poole K. Functional characterization of the nfxB repressor of the mexCD-oprJ multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology. 2013;159(10):2058-73. <https://doi.org/10.1099/mic.0.069286-0>
 20. Rehman A, Patrick WM, Lamont IL. Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: new approaches to an old problem. Journal of Medical Microbiology. 2019;68(1):1-10. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000873>
 21. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. Clin Microbiol Rev. 2009;22(4):664-89. <https://doi.org/10.1128/CMR.00016-09>
 22. Su HC, Ramkissoon K, Doolittle J et al. The development of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* involves multiple response stages and multiple proteins. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(11):4626-35. <https://doi.org/10.1128/AAC.00762-10>
 23. Tümer S, Kirişçi Ö, Özkaya E, Çalışkan A. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg. 2015;29(3):99-104.
 24. Vaez H, Faghri J, Isfahani BN, Moghim S, Yadegari S, Fazeli H, Moghohfeei M, Safaei HG. Efflux pump regulatory genes mutations in multidrug resistance *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wound infections in Isfahan hospitals. Adv Biomed Res. 2014;28(3):117. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.133183>

Türkiye’de İlk Defa Saptanan Gıda Kaynaklı *Vibrio Parahaemolyticus* Olguları*

Nilgün Kansak ©

Rıza Adaleti ©

Belkis Levent ©

Sebahat Aksaray ©

First Food-Borne Cases of *Vibrio Parahaemolyticus* in Turkey

öz

Vibrio parahaemolyticus, dünyanın birçok bölgesinde saptanmaktadır. Asya ülkelerinde ve Japonya’da gıda kaynaklı enfeksiyonların en yaygın sebeplerinden biri olup genellikle ondan az vakayı içeren küçük salgınlar şeklinde görülür.

Bu çalışmada laboratuvarımızda ishal etkeni olarak saptadığımız *V.parahaemolyticus* olgularına istinaden, artan kabuklu deniz ürünleri tüketimine bağlı olarak ülkemizde de *V.parahaemolyticus* olgularının görülebileceğine dikkat çekilmesi amaçlanmıştır.

Temmuz-Ağustos 2018 döneminde; deniz ürünleri tüketimi sonrası gelişen gastrointestinal sistem enfeksiyon semptomları ile hastanemiz acil servisine başvuran hastalara rutin incelemeler kapsamında gaita mikroskopisi ve kültürü yapılmıştır. Dışkı örnekleri Hektoen Enterik Agar, MacConkey agar ve koyun kanlı agar besiyerlerine ekilmiş ve 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Kültürde saptanan laktöz negatif, oksidaz pozitif kolonilere klasik biyokimyasal testler, VITEK 2 ve MALDI-TOF MS (bioMérieux, Fransa) ile tanımlama yapılmıştır.

Yaşları 12-59 arasında değişen yedi hastanın dördünde midye dolması, birinde balık, birinde ise “fast-food” tarzı gıda tüketimi sonrası ishal ile başlayan gastrointestinal sistem şikayetleri saptanmıştır. Bir hastaya ulaşılamadığından bilgi alınamamıştır. Makroskopik olarak sulu ve mukuslu olan dışkı örneklerinin mikroskopik incelemesinde bol lökosit, bir örnekte lökosit yanında bol eritrosit görülmüştür. Kültürde üreyen bakteriler, konvansiyonel testler ve otomatize sistemle yapılan tanımlamalarda VITEK 2 cihazı ile % 96 doğruluk ve MALDI-TOF MS ile % 99 doğrulukla *V.parahaemolyticus* olarak isimlendirilmiştir. Sonuçlar Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarı’nda konvansiyonel testler, API 20 E ve MALDI-TOF MS (BrukerDaltonics, ABD) ile doğrulanmıştır.

Yaz aylarında gelişen ishal vakalarında, özellikle deniz ürünleri tüketimi öyküsü varlığında *V. parahaemolyticus*’un gastroenterit etkeni olarak izole edilebileceği akılda tutulmalı ve bu yönde ileri incelemeler yapılmalıdır.

Anahtar kelimeler: Gastroenterit, gıda kaynaklı olgu, TCBS besiyeri, *Vibrio parahaemolyticus*

ABSTRACT

Vibrio parahaemolyticus (*V.parahaemolyticus*) is detected in many parts of the world. It is one of the most common causes of food-borne infections in Asian countries and Japan, and is usually seen as minor outbreaks involving less than ten cases.

In this study, it is aimed to investigate *V.parahaemolyticus* in diarrhea cases in our laboratory in order to draw attention to the possible cases of this agent due to the increase in the consumption of shellfish.

In the period of July-August 2018; patients who applied to the emergency service of our hospital with gastrointestinal tract infection symptoms following seafood consumption were investigated by stool microscopy and culture as part of routine procedures. Stool samples were cultured on Hektoen enteric agar, MacConkey agar, and sheep blood agar and were incubated at 37°C for 24 hours. After the incubation period, lactose negative and oxidase-positive colonies were identified by classical biochemical tests, VITEK 2 and MALDI-TOF MS (bioMérieux, France).

In seven patients aged between 12-59, clinical symptoms associated with gastroenteritis started after consuming stuffed mussels in four, eating fish in one, and in a patient after consuming fast food. One patient could not be contacted. In the microscopic examination of the macroscopically watery and mucous stool samples, abundant leukocytes in all samples, and abundant erythrocytes in addition to leukocytes in one sample were seen. The bacteria grown in culture were identified as *V.parahaemolyticus* by conventional methods and automated systems, Vitek 2 with 96 % and MALDI-TOF MS with 99 % accuracy. The results were also confirmed by the General Directorate of Public Health, National Enteric Pathogens Reference Laboratory by conventional methods, API 20 E and MALDI-TOF MS (BrukerDaltonics, USA).

It should be kept in mind that *V.parahaemolyticus* can be isolated as a cause of gastroenteritis in diarrhea cases during the summer months, especially in the presence of a history of seafood consumption, and further investigations should be performed in this direction.

Keywords: Food-borne cases, Gastroenteritis, TCBS media, *Vibrio parahaemolyticus*

Received/Geliş: 15.12.2020

Accepted/Kabul: 29.03.2021

Published Online/Online Yayın: 29.04.2021

Atf/Cite as: Kansak N, Adaleti R, Levent B, Aksaray S. Türkiye’de ilk defa saptanan gıda kaynaklı *Vibrio parahaemolyticus* olguları. ANKEM Derg. 2021;35(1):28-32.

Rıza Adaleti

Haydarpaşa Numune Eğitim ve
Araştırma Hastanesi, Tıbbi
Mikrobiyoloji Laboratuvarı,
İstanbul, Türkiye
✉ rizaadaleti@gmail.com

ORCID: 0000- 0002- 1117- 3906

N.Kansak 0000- 0002- 1117- 3906

Haydarpaşa Numune Eğitim ve
Araştırma Hastanesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı,
İstanbul, Türkiye

B.Levent 0000-0002-2866-0823

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları
ve Biyolojik Ürünler Dairesi Başkanlığı
Ulusal Enterik Patojenler Referans
Laboratuvarı,
Ankara, Türkiye

S.Aksaray 0000- 0002- 0552- 1337

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye
Tıp Fakültesi,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye

*Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti
Kongresi’nde sunulmuştur. Sözlü bildirisi
No.SS- 093 (4-8 Kasım 2018, Antalya)

GİRİŞ

Deniz ürünleri tüm dünyada yaygın olarak tüketilmekte ve gıda pazarında önemli oranlara ulaşmaktadır. *Vibrio* cinsi bakteriler deniz ürünlerini enfekte ederek, insan sağlığı için risk oluşturmaktadır. *Vibrio* türleri içinde önemli yeri olan *Vibrio parahaemolyticus* ilk olarak 1950’de Fujino tarafından Japonya’daki 272 kişiyi etkileyen, 20 ölümlü sonuçlanan büyük salgının ardından gıda kaynaklı hastalık etkeni olarak bildirilmiştir⁽⁶⁾.

V.parahaemolyticus nehir ağızı, deniz ve kıyı bölgelerinde bulunan, halofilik, kıvrık Gram negatif çomak şekilli, oksidaz pozitif, fakültatif anaerob bir bakteridir. *V.parahaemolyticus* çiğ, az pişmiş veya uygun olmayan şekilde hazırlanmış deniz ürünlerinin tüketimini takiben insanlarda akut gastroenterite sebep olmaktadır⁽⁸⁾. Nadir vakalarda ise yara, kulak enfeksiyonu ve immünkompromize hastalarda bakteriyemi etkeni olabilir⁽¹⁷⁾.

Vibrio parahaemolyticus, çeşitli çevresel koşullarda ürettikleri somatik (O) ve kapsüler (K) antijenlerine göre serotiplendirilir⁽¹⁰⁾.

V.parahaemolyticus deniz ürünleri tüketiminin yaygın olduğu çoğu ülkede global düzeyde bildirilmesine rağmen^(9,13,16) ülkemizde 2005 yılına kadar saptanmamıştır. Son yıllarda deniz suyu örnekleri, midyeler, tezgahtan satın alınan balık örnekleri ve balık çiftliklerinde izole edilmiş olmasına rağmen gastroenterit etkeni olarak bildirim yapılmamıştır^(2,14).

Bu çalışmada, deniz ürünleri tükettikten sonra, gastroenterit şikayeti ile hastanemize başvuran hastaların gaita örneklerinde, ülkemizde ilk defa saptanan *V.parahaemolyticus* olguları sunulmuştur.

GEREÇ VE YÖNTEM

Temmuz- Ağustos 2018 tarihleri arasında bulantı, karın ağrısı ve ishal şikayetleri ile hastanemiz acil servisine başvuran ve muayene edilen hastalardan gaita kültürü ve direkt mikroskopi istenmiştir. Laboratuvarımıza ulaşan örneklerden lökosit, eritosit ve parazit varlığı açısından direkt mikroskopik inceleme yapılmıştır.

Gaita örnekleri Hektoen Enterik agar (HE) (RTA, Türkiye), MacConkey agar (RTA, Türkiye) ve koyun kanlı agar (bioMérieux-Fransa) besiyerlerine ekim yapılarak 37°C’de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda MacConkey agar ve HE besiyerinde laktoz negatif olan koloniler şüpheli kabul edilmiştir. Bu koloniler üç şekerli demirli besiyeri (Triple Sugar Iron Agar, TSI), Simmon’s Sitrar Agar, üre agar ve triptofan içeren sıvı besiyerlerine ekim yapılmış ve

bir gece inkübe edilmiştir. Ayrıca Gram boyama ve oksidaz testi yapılmış, lam- lamel arası yöntemi ile hareket incelenmiştir. Şüpheli olan koloniler için ileri tanımlama VITEK 2 (bioMérieux, Fransa) ve MALDI-TOF MS (bioMérieux, Fransa) ile yapılmıştır. Tanımlama sonrası kolonilerden, Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS, Oxoid İngiltere) agara ekim yapılmış, ayrıca laboratuvarımızda hazırlanan Wagatsuma besiyerinde⁽³⁾ Kanagawa fenomeni araştırılmıştır.

Antibiyotik duyarlılık testi için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Bunun için 0.5 McFarland bulanıklıkta bakteri süspansiyonu (1-1,5x 10⁸ koloni/ml) hazırlanarak Mueller Hinton agara (MHA) ekim yapılmış ve ampicilin, sefotaksim, siprofloksasin, tetrasiklin ve trimetoprim/sülfametoksazol (Bioanalyse, Türkiye) diskleri agar yüzeyine yerleştirilerek 37°C’de 20-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testi sonucu Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Doküman M45-A2⁽⁴⁾ önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir.

İzolatlar doğrulama amaçlı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarına da gönderilmiştir. Referans Laboratuvarında izolatlar koyun kanlı agar ve TCBS agar (Oxoid, İngiltere) besiyerlerine ekilmiş ve 37°C’de aerobik olarak bir gece inkübe edilmiştir. Şüpheli koloniler konvansiyonel yöntemler (Koloni özellikleri, katalaz, oksidaz, Gram boyama, Kligler Iron Agar (KIA), IMViC testleri, üreaz, karbonhidrat fermentasyon testleri, lizin, arjinin ve ornitin aminoasit dekarboksilasyon testleri, hareket, O129 duyarlılığı, NaCl’de üreme) kullanılarak tanımlanmıştır⁽¹⁾. Ayrıca API 20E (bioMérieux, Fransa) ve MALDI-TOF MS (BrukerDaltonics, ABD) ile de tanımlama yapılmıştır. Antimikrobiyal duyarlılık testi CLSI⁽⁴⁾ önerilerine göre Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile çalışılmış ve değerlendirilmiştir. Kalite kontrol suşu olarak *E.coli* ATCC 25922 kullanılmıştır.

BULGULAR

Hastaların beşi erkek, ikisi kadın olup 12- 59 yaş aralığındadır. Hasta öykülerinden dört hastanın midye dolması, bir hastanın eşinin yakaladığı olta balığını ve bir hastanın “fast food” yediği öğrenilmiştir. Olgularda yemek yedikten 8- 15 saat sonra bulantı, mide ağrısı ve ishal şikayetleri başlamıştır. Bir hastaya ulaşılamadığından bilgi alınamamıştır.

Hastanemiz Mikrobiyoloji Laboratuvarında yapılan incelemede gaita örneklerinin makroskopik olarak sulu ve mukuslu olduğu görülmüştür. Mikroskopik incelemede tüm örneklerde bol lökosit, bir örnekte

lökosit yanında bol eritrosit görülmüş, protozoon, protozoon kisti, helmint ve helmint yumurtası saptanmamıştır.

Besiyerlerinde üreyen şüpheli kolonilerden, TSI besiyerinde yatık kısımda alkali, dipte sarı olan gaz ve H₂S oluşturmayan, sitrat negatif, katalaz, oksidaz, indol ve metil kırmızısı pozitif, hareketli Gram negatif çomaklar VITEK 2 cihazı % 96 ve MALDI-TOF MS % 99 doğruluk oranları ile *V.parahaemolyticus* olarak tanımlanmıştır. Tüm izolatlar TCBS besiyerinde yeşil renkli koloniler şeklinde üremiş (Resim 1A) ve Wagatsuma besiyerinde Kanagawa fenomeni pozitif (İnsan eritrositini hemoliz eden, sitotoksik ve kardiyotoksik özellik) bulunmuştur (Resim 1B)⁽¹²⁾. Antibiyotik duyarlılık testine göre, tüm suşlar ampisiline dirençli, trimetoprim/sülfametoksazol, tetrasiklin, sefotaksim ve siprofloksasine duyarlı bulunmuştur.

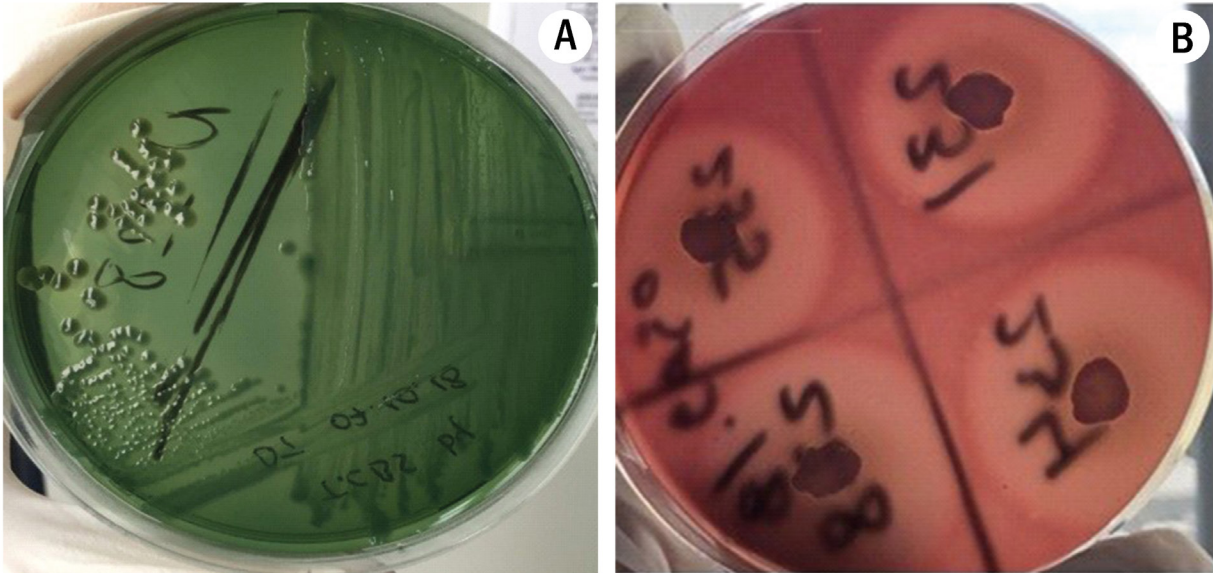
Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ulusal Enterik Patogenler Referans Laboratuvarında koyun kanlı agarda üreyen ve oksidaz pozitif oldukları belirlenen kolonilerden yapılan Gram preparatlarında; Gram negatif, hafif kıvrık çomaklar gözlenmiştir. İzolatların TCBS agar besiyerinde yeşil renkli koloniler oluşturduğu belirlenmiştir. Biyokimyasal testler sonucunda KIA'da laktozu kullanmayıp, gaz ve H₂S üretmedikleri saptanmıştır. İndol ve metil kırmızısı pozitif, Voges Proskauer, sitrat ve üre testleri negatif olarak değerlendirilmiştir. Tüm izolatların hareketli olduğu, lizin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz testleri pozitif,

arjinin dehidrolaz testlerinin negatif olduğu gözlenmiştir. Ayrıca laktoz ve sukroz negatif, mannitol pozitif oldukları saptanmıştır. O129 (pteridin) duyarlılığı incelendiğinde, izolatların 10 µg'lık diske dirençli, 150 µg'lık diske duyarlı oldukları belirlenmiştir. % 0 ve % 10 NaCl konsantrasyonlarında üreme gözlenmezken, % 3 ve % 6 NaCl konsantrasyonlarında üreme saptanmıştır. API 20E testi ve MALDI-TOF MS analizi sonucunda, izolatlar *V. parahaemolyticus* olarak değerlendirilmiştir. Antimikrobiyal duyarlılık testleri sonucunda, izolatlar ampisiline dirençli, kloramfenikol, sülfonamid, tetrasiklin, trimetoprim/sülfametoksazol ve siprofloksasine duyarlı bulunmuştur.

TARTIŞMA

Deniz ürünleri sağlıklı beslenmenin önemli bir parçasıdır. Dünya çapında denizlerdeki patojen bakterilerin varlığı ve çevresel koşullara bağlı olarak salgınların ortaya çıkması, insanların gıda koşullarına ilişkin endişelerini artırmaktadır⁽⁸⁾.

V.parahaemolyticus enfeksiyonları lokal üretilen kabuklu deniz hayvanlarının tüketimi ile ilişkili olarak genellikle sporadik vakalar halinde görülür. *V.parahaemolyticus* dağılımı buldukları ortamın sıcaklığı, tuz oranı ve coğrafi konum gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir⁽⁷⁾. *V.parahaemolyticus*'a bağlı gastroenterit salgınları, dünyanın birçok bölgesinde görülmektedir. Özellikle son yirmi yılda iklim değişikliği nedeniyle enfeksiyon küresel çapta genişleme



Resim 1. A. TCBS besiyerinde *V.parahaemolyticus* kolonileri.
B. Wagatsuma besiyerinde Kanagawa fenomeni pozitifliği.

göstermiştir.

Ülkemizde 2005 yılına kadar deniz ürünleri ile yapılan çalışmalarda farklı *Vibrio* türleri saptanmış olmasına rağmen *V.parahaemolyticus* bildirimi yapılmamıştır. Terzi ve ark.⁽¹⁴⁾ 2006-2010 yılları arasında yaptıkları çalışmada, Karadeniz bölgesinde inceledikleri toplam 114 midye, deniz suyu ve balık örneğinde % 39 oranında *V.parahaemolyticus* tespit etmişlerdir. Son dönemlerde Güneydoğu Karadeniz bölgesinde 2010- 2015 yılları arasında ağ kafeslerde kültürü yapılan levrek balıklarında % 30’a varan ölümler yaşanmıştır. Bu salgınlar esnasında 520 hastalıklı balık incelenmiş ve 52 adet *Vibrio* spp. izole edilmiştir. Yapılan tanımlama çalışmasında bunların 18’inin *V.parahaemolyticus* olduğu saptanmıştır⁽²⁾.

Qu ve ark.⁽¹³⁾ Pekin’de Nisan 2010- Aralık 2011 tarihleri arasında 4803 akut diyareli örneği inceledikleri çalışmada örneklerin 968’inde (% 20,2) enfeksiyon etkeni saptamışlar; sıklık sırasına göre *Shigella* spp.’den sonra ikinci sırada % 5,2 oranı ile *V.parahaemolyticus* izole etmişlerdir. Aynı çalışmada 55 ko-enfeksiyonun 28’inde (% 50,9) *V.parahaemolyticus*, ve bu bakteri ile birlikte en sık *Salmonella* spp. saptamışlardır.

Fildişi Sahili’nde, 322 kabuklu ile yapılan çalışmada, örneklerin % 7,8’inden *Vibrio* spp. izole etmişlerdir. *Vibrio* türlerinden en sık *Vibrio alginolyticus* (% 40) ve *V.parahaemolyticus* (% 36) saptanmıştır⁽¹⁵⁾. New ve ark.⁽¹¹⁾ tarafından Malezya’da yapılan çalışmada deniz ürünlerinde % 33,3, sebzelerde % 10 oranında *V.parahaemolyticus* tespit edilirken tavuk ve meyvelerde saptanmamıştır.

Literatürde *V.parahaemolyticus*’un enfeksiyöz dozu 10^5 - 10^7 olarak bildirilmektedir⁽⁵⁾. Olgularımızda aynı ürünü tüketen fakat semptom göstermeyen hasta yakınlarında, dışkı örneği temin edilemediğinden *V.parahaemolyticus* üremesi olup/olmadığı ve semptom görülmemesinin enfeksiyöz dozun düşüklüğüne bağlı olup olmadığı yorumu yapılamamıştır.

Çalışmamızda ampisiline duyarlılık gözlenmemiş, trimetoprim/sülfametoksazol, tetrasiklin, sefotaksim ve siprofloksasine karşı % 100 oranında duyarlılık saptanmıştır. Balta ve ark.⁽²⁾ balıklardan izole ettikleri 18 *V.parahaemolyticus*’ta benzer şekilde ampisiline % 100 direnç, sülfametoksazol ve trimetoprim/sülfametoksazole % 100 duyarlılık saptamıştır. Dünyanın birçok bölgesinde insanlarda *V.parahaemolyticus* kaynaklı enfeksiyonlar bildirilirken, iklim koşullarının değişimi ve artan deniz ürünleri tüketimi ile birlikte ülkemizde de vakaların görülmesi kaçınılmazdır. Rutin mikrobiyolojik çalışmalar sırasında özel olarak aranmadığı takdirde vakaların

atlanma olasılığı mevcuttur. Söz konusu dönemde bölgemiz dışında bildirim yapılmamış olması böyle bir ihtimali akla getirmektedir.

Laboratuvarımızda rutin çalışma kapsamında 2019 ve 2020 yaz aylarında *V.parahaemolyticus* saptanmamış olmakla birlikte, olgularımız nedeniyle ülkemizde yaz aylarında gastroenterit etkeni olarak *V.parahaemolyticus* izole edilme potansiyeli mevcuttur. Deniz ürünleri tüketim öyküsü olan veya laboratuvar olarak şüpheli durumlarda ileri tanımlama yapılmasının *V.parahaemolyticus* vakalarının atlanmaması açısından önemli olduğu düşüncesindeyiz.

Etik Kurul Onayı: Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’nun 26.04.2021 tarih ve 2021/136 no.lu etik kurul onayı alınmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Ethics Committee Approval: The approval of the Haydarpaşa Numune Training and Research Hospital Clinical Research Ethics Committee dated 26.04.2021 and numbered 2021/136 was obtained.

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

KAYNAKLAR

1. Abbott SL, Janda M, Farmer III JJ. *Vibrio* and Related Organisms, Carroll KC, Funke G (eds). Manual of Clinical Microbiology, 10. baskı” kitabında s.666- 676, ASM Press, Washington (2011).
2. Balta F, Yılmaz H. Kültür levreklerinde (*Dicentrarchus labrax*) *Vibrio parahaemolyticus* enfeksiyonu. JAES. 2019;4(2):104-10.
3. <https://doi.org/10.35229/jaes.544439>
4. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı, 41. Bölüm. Besiyerleri, Ayraçlar ve Deneyle, 2. baskı, s.641- 704, Barış yayınları, İzmir (1995).
5. CLSI. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated fastidious bacteria. 2nd edition. CLSI guideline M45. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011;30(18):36-8.
6. Daniels NA, MacKinnon L, Bishop R, et al. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. J Infect Dis. 2000;181(5):1661-6. <https://doi.org/10.1086/315459>
7. Fujino T, Okuno Y, Nakada D et al. On the bacteriological examination of shirasu food poisoning. Med J Osaka Univ. 1953;4(2/3):299-304.
8. Kaneko T, Colwell RR. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. J Bacteriol. 1973;113(1):24-32. <https://doi.org/10.1128/JB.113.1.24-32.1973>

9. Letchumanan V, Chan KG, Lee LH. *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advanced molecular identification techniques. *Front Microbiol.* 2014;5:705.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00705>
10. Martinez-Urtaza J, Trinanes J, Abanto M, et al. Epidemic dynamics of *Vibrio parahaemolyticus* illness in a hot spot of disease emergence, Galicia, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(5): 852-9.
<https://doi.org/10.3201/eid2405.171700>
11. Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK et al. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(1):39-48.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00025-06>
12. New CY, Übong A, Nur Hasria K, et al. Risk of transmission of *Vibrio parahaemolyticus* in foods. *IFRJ.* 2016;23(5):2249-57.
13. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenber PC, Woods GL. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 8th Chapter Curved Gram negative bacilli and oxidase positive fermenters, Seventh edition, s. 432- 471, Wolters Kluwer Health. Philadelphia (2017).
14. Qu M, Deng Y, Zhang X, et al. Etiology of acute diarrhea due to enteropathogenic bacteria in Beijing, China. *J Infect.* 2012;65(3):214-222.
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.04.010>
15. Terzi-Gulel G, Martinez-Urtaza J. Molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood from Black Sea, Turkey. *Lett Appl Microbiol.* 2016; 62(6):494-500.
<https://doi.org/10.1111/lam.12579>
16. Traore SG, Bonfoh B, Krabi R et al. Risk of *Vibrio* transmission linked to the consumption of crustacean in coastal towns of Coted'Ivoire. *J Food Prot.* 2012;75(6):1004-11.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-472>
17. XU F, Gonzalez-Escalona N, Haendiges J, et al. Sequence Type 631 *Vibrio parahaemolyticus*, an emerging food borne pathogen in North America. *J Clin Microbiol.* 2017;55(2):645-8.
<https://doi.org/10.1128/JCM.02162-16>
18. Zhang L, Orth K. Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Curr Opin Microbiol.* 2013;16(1):70-7.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.02.002>

DÜZELTME

ANKEM Dergisi Cilt 33 Sayı 1’de yer alan, “Tam idrar tetkiki ve idrar kültürünün gebe popülasyonunda karşılaştırması” başlıklı makalenin yazar sıralaması içindekiler sayfasında hatalı basılmıştır.

Başlık ve yazarlar aşağıdaki gibidir:

Tam İdrar Tetkiki ve İdrar Kültürünün Gebe Popülasyonunda Karşılaştırması
Nihan ÇEKEN¹, Esin AVCI²

¹Balıkesir Devlet Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, BALIKESİR

²Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, DENİZLİ

36. ANKEM

AKILCI ANTİBİYOTİK KULLANIMI

KONGRESİ

27 - 31 Ekim 2021
Grand Yazıcı Club Turban
Kongre Merkezi , Marmaris

SAĞLIK İÇİN AŞILAN, ANTİBİYOTİĞİ AKILCI KULLAN

Kongre Eşbaşkanları

Prof. Dr. Esin ŞENOL
esin.esenol@gmail.com

Prof. Dr. Anıl Aktaş TAPISIZ
atapisiz@gmail.com

Kongre Sekreterleri

Prof. Dr. Sebahat AKSARAY
aksarays@hotmail.com

Prof. Dr. Tutku SOYER
soyer.tutku@gmail.com



ANKEM Derneği Merkezi
Topkapı Mh. Turgut Özal Millet Cd.
No:176 Kat:5 Daire:16 Fatih, İSTANBUL
Tel: 0 212 219 93 40 Faks: 0 212 219 93 41
e-mail: ankem@ankemderneği.org.tr

www.2021ankem.org

Organizasyon Sekreteryası

burken
TÜRİZM & KONGRE

444 9 443

samet.basar@burkon.com

ANKEM DERGİSİ YAZIM KURALLARI

Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği'nin yayın organı olan ANKEM Dergisi; antimikrobiklere direnç başta olmak üzere mikrobiyoloji ve enfeksiyon hastalıkları alanlarındaki çalışma, derleme, olgu sunumu, yayın tanıtması ve haberleri yayınlar. Dergide yayınlanan çalışmalarla ilgili görüşler ve bunlara yayın sahibinin cevaplarına "Editöre mektup" bölümünde yer verir.

Gönderilecek makalelerde araştırma ve yayın etiğine uygunluk en başta aranan özelliklerdir.

ANKEM Dergisi 29. ciltten itibaren yılda üç sayı (Nisan, Ağustos, Aralık) olarak yayınlanmakta, her sayıda araştırma makalesi ağırlıklı olmakta, derleme ve olgu sunumuna az sayıda yer verilmektedir.

Makaleler microsoft word programında yazılmış olmalı ve ankem@ankemderneği.org.tr adresine gönderilmelidir. Ayrıca makalenin tam metin olarak başka bir dergide yayınlanmadığını (yayınlanmışsa tekrar yayınlama isteği için gerekçeyi), yazarların makalenin ANKEM Dergisinde yayınlanmasını ve tüm içeriğini onayladıklarını bildiren ve bütün yazarların imzaladığı, Bio, Dr, Uzm Dr, Prof Dr... gibi akademik unvanlarını da içeren bir yazı ve gerekli olduğunda Etik Kurul onayı posta ya da faksla Dernek adresine gönderilmelidir. Yazımacı yazarın posta adresi, tel, GSM, faks numaraları ve e-posta adresi belirtilmelidir. Makale önceden yapılmış bir sunu ile ilgili ise sununun yapıldığı toplantı isim-tarih-yer ve sunu numarası ile bildirilmelidir. Herhangi bir destek alınmışsa belirtilmelidir.

ANKEM Dergisinde yayınlanacak araştırma makaleleri editörler kurulunca hem kapsamı, hem düzeni bakımından uygun görülmelidir. Bu tür makaleler ANKEM formatına göre düzenlendikten sonra yazarlar ve adresler gizlenerek en az üç bilimsel hakeme gönderilir. Bir ciltteki makaleler için ANKEM'e yardımcı olan hakemler cildin 3. sayısında listelenmekte ve kendilerine teşekkür edilmektedir. Makalelerin yayınlanıp yayınlanmamasına, düzeltildikten sonra yayınlanmasına, yayınlanma önceliğine hakem raporlarını dikkate alarak editörler kurulu karar verir. Editörler kurulunun makalenin mesajını değiştirmeyen düzeltmeleri ve kısaltmaları yapma yetkisi vardır. Makale ile ilgili bilimsel ve hukuki sorumluluk yazarlara aittir. Derleme makaleler lüzum görürse hakeme gönderilir.

1. Yazım ve dil düzeni:

Makaleler Türkçe veya İngilizce olarak yayınlanır. Dilimize yerleşmiş terimler yazım kurallarımıza göre kullanılmalı, Türk Dil Kurumu'nun hazırladığı "Yeni Yazım Kılavuzu" ve "Türkçe Sözlük" esas alınmalıdır.

Metin içinde kullanılan (tablo ve kaynaklardakiler dışında) Lâtince mikroorganizma adları italik yazılmalıdır. İlk kullanıldığında tam olarak yazılan mikroorganizma adı, daha sonraki kullanışlarında cins adının ilk harfi kullanılarak kısaltmalıdır:

Escherichia coli *E.coli* gibi

Stafilokok, streptokok gibi Türkçe'ye yerleşmiş cins adları ve antibiyotik adları Türkçe olarak yazılmalıdır.

Yanında birim gösterilmeyen ondan küçük sayılar yazı ile yazılmalı, rakam ile yazılan sayılara takılar kesme işareti ile eklenmelidir.

beş hasta, suşların 38'i gibi

Sıra belirten sayılar: beşinci, 118. veya 118'inci gibi yazılmalıdır.

% işaretinden, birim eklenen sayılardan, ard arda yazılan sayılar arasındaki virgüllerden sonra bir harflik boşluk bırakılmalıdır.

% 18, 10 ml, Tablo 1, 2, 3, 4 1., 2., 3. sıra gibi

Boyama yöntemi olan Gram büyük harfle ve Gram (-) yerine Gram negatif şeklinde yazılmalıdır.

Cümleler zorunluluk olmadıkça rakamla gösterilen sayılarla başlamamalıdır.

Makaleler bir zorunluluk olmadıkça "mişli geçmiş" kipi ile yazılmalıdır.

2. Yazı formu:

Bir çalışma ile ilgili makaleler BAŞLIK, İNGİLİZCE BAŞLIK, ÖZ, ABSTRACT, GİRİŞ, GEREÇ VE YÖNTEM, BULGULAR, TARTIŞMA, KAYNAKLAR bölümlerini içermelidir. TEŞEKKÜR yazmak isteniyorsa kaynaklardan önceye konulmalıdır.

Derleme makaleler yazarın uygun göreceği şekilde bölümlere ayrılır.

Başlıkta yazar adlarında, soyadlar büyük harfle olmak üzere, ön adlar da açık olarak yazılmalıdır. Yazarların çalıştığı kuruluş adresi en kısa şekli ile yazar adlarının altında gösterilmeli, yazarlar farklı kuruluşlarda çalışıyorlarsa adlar ve kuruluşlar sayılarla belirtilmelidir.

ÖZ, yazının içeriğini, bulgularla ilgili önemli hususları içermeli ve okuyucuya makalenin bütünü hakkında yeterli bilgi verecek uzunlukta olmalıdır ve 250 kelimeyi geçmemelidir. Özden sonra 4-6 "Anahtar kelimeler" konmalıdır. Bu sözcükler konu indekslerinde kullanılacağından itina ile seçilmeli, uygunluğu Türkiye Bilim Terimleri (<http://www.bilimterimleri.com/>)nden kontrol edilmeli ve harf dizinine göre sıralanmalıdır.

ABSTRACT yazılırken özete sadık kalınmalıdır. Abstract'tan sonra (anahtar kelimelere karşılık) 4-6 "Keywords" Türkçe anahtar sözcükleri bulduğunuz sayfadaki MeSH karşılığında yer alan sözcüklerden seçilmelidir.

GİRİŞ konuyu anlamayı kolaylaştıracak bilgileri ve çalışmanın amacını kısa ve özlü bir şekilde vermelidir.

GEREÇ VE YÖNTEM bölümü konuyla ilgili kişilerce esasen bilinenleri tekrar anlatmamalı, kolay erişilebilecek kaynakların gösterildiği anlatım tercih edilmelidir.

BULGULAR, çalışmanın sonuçlarını gerekiyorsa tablo ve şekillerin yardımı ile vermelidir. Şekil, grafik ve fotoğraf çok gerekmedikçe kullanılmamalıdır.

TARTIŞMA bölümü bulgular ve tabloların tekrarı olmalı, bulguların önemli yönlerini vurgulamalı ve başka araştırmacıların bulguları ile karşılaştırmalıdır.

Makale, tablo ve şekiller dışında 10 sayfa, kaynak

sayısı (derlemeler dışında) 25'i geçmemelidir. Daha uzun makaleler editörler kurulunca gerekli görülürse kabul edilir, kurulca kısaltılabilir veya yazardan kısaltması istenebilir.

3. Tablo ve şekil düzeni:

Tablolar alt ve üst çizgiler ve gereğine göre ara çizgileri içermeli (gereksiz yatay ve dikey çizgilerden kaçınılmalı), arap rakamları ile sıralanmalı, tablo adı tablo üst çizgisinin üstüne yazılmalıdır.

Tablonun adı içeriğine uygun en kısa şekilde olmalıdır. Bulguların kolay anlaşılması için tablolar halinde verilmesine gayret edilmeli, ancak metin içinde birkaç cümle ile belirtilen hususlar için ayrıca tablo düzenlenmemelidir. Metin içinde tablodaki bilgiler gereksiz yere tekrar edilmemeli, önemli hususların belirtilmesi ile yetinilmelidir.

Tablolarda (ve metinde) ortalamalar ve yüzde oranları anlamlı değilse tam sayıdan sonra yürütülmemeli (veya anlamlı olduğu kadar yürütülmeli), en yakın sayıya yuvarlanarak gösterilmelidir.

Örneğin:

34 suşun 13'ünü % 38 olarak belirtmek anlamayı kolaylaştırıcı olabilir, fakat bu oran % 38,2 şeklinde uzatılmamalıdır. Uzatmadaki ilk rakamın binde bir olasılığı gösterdiği, ancak büyük sayılarda bu olasılığı belirtmek hakkı olacağı düşünülmelidir.

Ortalamalar anlamlı olacak ve kolay anlaşılacak şekilde verilmelidir. Örneğin eritrosit sayımlarının ortalaması 4,365,248 değil, 4,365,000 olarak verilmelidir.

Makaleye ancak çok gerekli ise eklenecek siyah-beyaz şekil, grafik, kimyasal formül, fotoğraf, mikrofotografılar "Şekil" olarak adlandırılıp sıralanmalıdır. Renkli şekil, grafik, fotoğraf..... kullanılmamalıdır.

4. Kaynakların düzenlenmesi:

Kaynakların yazım şekli "Vancouver" kaynak gösterme stiline uygun olmalıdır. Aşağıdaki örnekler ve dergimizin web sayfasındaki yazım kurallarından da örnek alınabilir. (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Yararlanılan bütün eserler kaynak olarak verilmeli, fakat sayıyı arttırma amacıyla kaynak kullanılmamalıdır. Yararlı olacak Türkçe kaynaklar göz ardı edilmemelidir.

Kaynakların tamamının metin içinde kullanılmış olması ve metin içinde kullanılanların tamamının da kaynaklar listesinde yer alması gereklidir.

Kaynaklar listesi **harf dizinine** göre sıralanmalı ve metin içinde cümle sonuna konacak paranteze numarası yazılmalıdır: "...gösterilmiştir^{1,5,6}" gibi.

Metinde kaynak verilirken yazar adı kullanılıyorsa kaynak numarası yazar adının yanına yazılmalıdır. Smith ve Jones'a⁽⁴⁾ göre....., ikiden fazla yazar varsa Smith ve ark.'a⁽⁴⁾ göre..... gibi. Kaynak listesi hazırlanırken altı veya daha az sayıdaki yazarların tümünün adları kullanılmalı, yedi ve daha fazla yazarlı kaynaklarda ilk üç yazar adından sonra "et al." veya "ve ark." kısaltması kullanılmalıdır. Sıralamada bütün

yazar adları aynı olan kaynaklar için yıl, aynı yılda ve dergide ise cilt ve sayfa numarası dikkate alınmalı, aynı yılda farklı dergide olan kaynaklardan metin içinde önce geçene önde yer verilmelidir.

Kaynak verilirken aşağıdaki örnekler esas alınmalı, noktalamar, sözcük ve harf aralıkları, büyük harfler, dergi, cilt, sayı, sayfa numaraları buna göre yazılmalıdır. Dergi adları: Uluslararası dergiler "PubMed Journals Database", yerli dergiler "http://www.atifdizini.com/Journals/tr-index.html" adresindeki şekilde kısaltılmalıdır.

9. Hindler JF, Stelling J. Analysis and presentation of cumulative antibiograms: a new consensus guideline from the clinical and laboratory standards institute. Clin Infect Dis. 2007;44(6):867-73.

<https://doi.org/10.1086/511864>

İnternette kullanılan kaynaklarda,

Yazarlı ise; ANKEM Dergisi yazım kurallarına uygun olarak yazar adı, konu başlığı, sayfanın ait olduğu kurum, erişim adresi ve erişim tarihi şeklinde,

Töreci K. Ankem Dergisinin genç yazarlarına, ANKEM Derneği, <http://www.ankemderneği.org.tr/?sp=konuk0606> (erişim tarihi 1.1.2015)

Yazarlı değil ise; konu başlığı, sayfanın ait olduğu kurum, erişim adresi ve erişim tarihi şeklinde verilmelidir.

Inappropriate antibiotic use for pneumonia common. Medscape Infectious Diseases, <http://www.medscape.com/viewarticle/876918>, (erişim tarihi 30.03.2017)

Kaynak olarak kitap ve kitap bölümü kullanıldığında yazım şekli ve noktalama işaretleri bakımından aşağıdaki örnekler esas alınmalıdır:

Kitap:

4. Baron EJ, Peterson LR, Fingeold SM. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 9. baskı, s.168-204, Mosby Co., London (1994).

Kitap bölümü:

4. Swenson JM, Hindler JA, Peterson LR. Special tests for detecting antibacterial resistance, "Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds): Manual of Clinical Microbiology, 6. baskı" kitabında s.1356-72, ASM Press, Washington (1995).

Yerli kitaplarda basımevinin değil, yayınlayan kuruluşun adı ve varsa yayın numarası kullanılmalıdır.

"İst Tıp Fak Yayını No.20, İstanbul (2001)" gibi. Dergi adları Index Medicus'daki gibi kısaltılmalıdır.

Kongre bildirileri:

ANKEM Kongrelerindeki özetler ve sunuların ANKEM Dergisinde yayınlanması gibi bir dergide yayınlanan bildiriler dergideki diğer makaleler gibi kaynak verilir.

Özel bir kongre kitabında yayınlananlar şu örneğe göre kaynak verilebilir:

1. Akyüz Z, Dinç U, Güler NC ve ark. Hastanemizde 2005-2008 yılları arasında kan örneklerinden izole edilen kandida türlerinin dağılımının belirlenmesi, XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı, s.846-7, Bodrum (2008) (sayfa yerine Poster no. da olabilir).