

**ACINETOBACTER SPP. İÇİN HIZLI RESAZURİN BAZLI
POLİMİKSİN NP TEST VE BROTH MİKRODİLÜSYON YÖNTEMİ
İLE KOLİSTİN DUYARLILIĞININ KARŞILAŞTIRILMASI**

**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ANKARA DIŞKAPI YILDIRIM BEYAZIT EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
KLİNİĞİ**

Dr. Derya Tunç

Amaç

Acinetobacter türleri sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlarda etken olarak sıklıkla saptanmaktadır.

Bu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan kolistin, elde kalan son çare ilaçlardandır.

Kolistin, özellikle kliniği ağır seyreden hastalarda kullanıldığı için antimikrobiyal duyarlılık sonucunun daha kısa sürede elde edilmesinin ve tedavinin olabildiğince erken düzenlenmesinin büyük önemi vardır.

Çalışmamızda, bu konuda klinisyenlere yardımcı olacak, kolistin duyarlılığının 4 saat içinde saptanmasını sağlayan hızlı resazurin bazlı polimiksin NP test ve kolistin duyarlılığını tespit etmek için altın standart olan ancak yoğun emek gerektiren, 16 saatte sonuç alınabilen BMD yöntemini karşılaştırmayı amaçladık.

Gereç-Yöntem

Hastanemiz Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarına, 01.07.2019-15.11.2020 tarihleri arasında gelen klinik örneklerden izole edilen 112 *Acinetobacter* spp. izolatı çalışmaya dahil edilmiştir.

İzolatların kolistin duyarlılığı hem BMD yöntemi ile EUCAST standartlarına göre hem de hızlı resazurin bazlı polimiksin NP teste göre belirlenip her iki yöntemin sonuçları karşılaştırılmıştır.

Hızlı Resazurin Bazlı Polimiksin NP Test, kolistin varlığında üreyen bakterilerin bir renklendirici olan resazurinin reaktif olarak indirgenmesi sonucunda renk değişikliği ile kolistin direncini kısa sürede saptamaktadır.

Renk değişimi, metabolik olarak aktif hücrelerin aerobik solunum ile mavi resazurini pembe rezorufine indirgemesine dayanmaktadır.

Resazurin bu özelliğinden dolayı hücre canlılığının bir göstergesi olarak kullanılır.

Gereç-Yöntem/ HIZLI RESAZURİN BAZLI POLİMİKSİN NP TEST

İlk olarak iki farklı besiyeri hazırladık:

-5120 mg/ L konsantrasyonda hazırladığımız kolistin sülfatı (Sigma Aldrich, Almanya) MHB2-CA (Sigma Aldrich, Almanya) içinde nihai konsantrasyonu 3.75 mg/ L olacak şekilde dilüe ederek oluşturduğumuz kolistinli besiyeri,

-Kolistin sülfat içermeyen MHB2-CA besiyeri

Yirmi dört saat arayla iki kez pasajlayıp inkübe ettikten sonra etüvden çıkardığımız izolatları 3.5 MacFarland konsantrasyon elde edecek şekilde serum fizyolojik içinde homojenize hale getirdik ve inokulumları hazırladık.

- 96 kuyucuklu mikrodilüsyon plaklarını (Sigma Aldrich, Almanya) kullandık.

Gereç-Yöntem/ HIZLI RESAZURİN BAZLI POLİMİKSİN NP TEST

İnokülasyon basamağında sırasıyla şu işlemleri yaptık:

- 1.180 µl kolistinsiz MHB2-CA sıvı besiyerini A₁-H₁, A₃-H₃, A₅-H₅, A₇-H₇, A₉-H₉ ve A₁₁-H₁₁ arasındaki tüm kuyucuklara aktardık.
- 2.180 µl kolistin içeren MHB2-CA besiyerini A₂-H₂, A₄-H₄, A₆-H₆, A₈-H₈, A₁₀-H₁₀ ve A₁₂-H₁₂ arasında bulunan tüm kuyucuklara aktardık.
- 3.A₁₋₂ ve H₁₁₋₁₂ kuyucuklarına 20 µl serum fizyolojik ekledik ve homojenizasyon için yukarı aşağı pipetledik.
- 4.Negatif kontrol olarak kullanılan kolistine duyarlı *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşunun inokulumundan B₁₋₂ ve G₁₁₋₁₂ kuyucuklarına 20 µl ekledik.
- 5.Pozitif kontrol olarak kullanılan kolistine dirençli *E. coli* NCTC 13846 suşunun inokulumundan C₁₋₂ ve F₁₁₋₁₂ kuyucuklarına 20 µl ekledik.
- 6.Geriye kalan kuyucuklara, birbirlerine paralel ve kolistinli/ kolistinsiz MHB2-CA içinde olacak şekilde test edeceğimiz her bir izolatın inokulumundan yirmişer µl ekledik ve homojenizasyon için yukarı aşağı pipetledik.

Gereç-Yöntem/ HIZLI RESAZURİN BAZLI POLİMİKSİN NP TEST

İnoküle edilmiş plağı 35 °C-37 °C' de kapatmadan ve çalkalamadan inkübe ettik.

Plakların 3 saatlik inkübasyonundan sonra her bir kuyucuğa %2' lik resazurin reaktifinden yirmi ikişer µl ilave ettik ve her kuyucuğu yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırdık.

Resazurin reaktifini ekledikten sonra plağı 1 saat boyunca her 15 dakikada bir ve takibindeki 120 dakikada da saatte bir olmak üzere görsel olarak inceledik.

Gereç-Yöntem/ HIZLI RESAZURİN BAZLI POLİMİKSİN NP TEST

Bakteriyel inokulumun olmadığı serum fizyolojik içeren kuyucuklar (A₁₋₂ ve H₁₁₋₁₂) mavi kaldığında besiyeri kontaminasyonu olmadığı sonucunu çıkardık.

Bakteri süspansiyonunun olup kolistinin olmadığı MHB2-CA içeren kuyucuklar (B₁-H₁, A₃-H₃, A₅-H₅, A₇-H₇, A₉-H₉ ve A₁₁-G₁₁) maviden mor veya pembeye döndüğünde bakteri hücrelerinin canlılığını doğruladık.

Negatif kontrol olan *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşunun olduğu ve kolistin içeren MHB2-CA solüsyonunun olduğu kuyucuklar (B₂ ve G₁₂) mavi kaldığında bakterinin kolistin varlığında üremediğini doğruladık.

Pozitif kontrol olan *E. coli* NCTC 13846 suşunun olduğu ve kolistin içeren MHB2-CA çözeltisinin olduğu kuyucuklar (C₂ ve F₁₂) maviden mora veya pembeye döndüğünde bakterinin kolistin varlığında canlılığını doğruladık.

Gereç-Yöntem/ HIZLI RESAZURİN BAZLI POLİMİKSİN NP TEST

İzolat kolistin varlığında üremişse testi pozitif (mor veya pembe, polimiksin direncini gösterdi) olarak kaydettik.

İzolat kolistin varlığında ürememişse testi negatif (mavi, polimiksin duyarlılığını gösterdi) olarak kaydettik.

İstatiksel analiz için SPSS 22.02' yi kullandık.

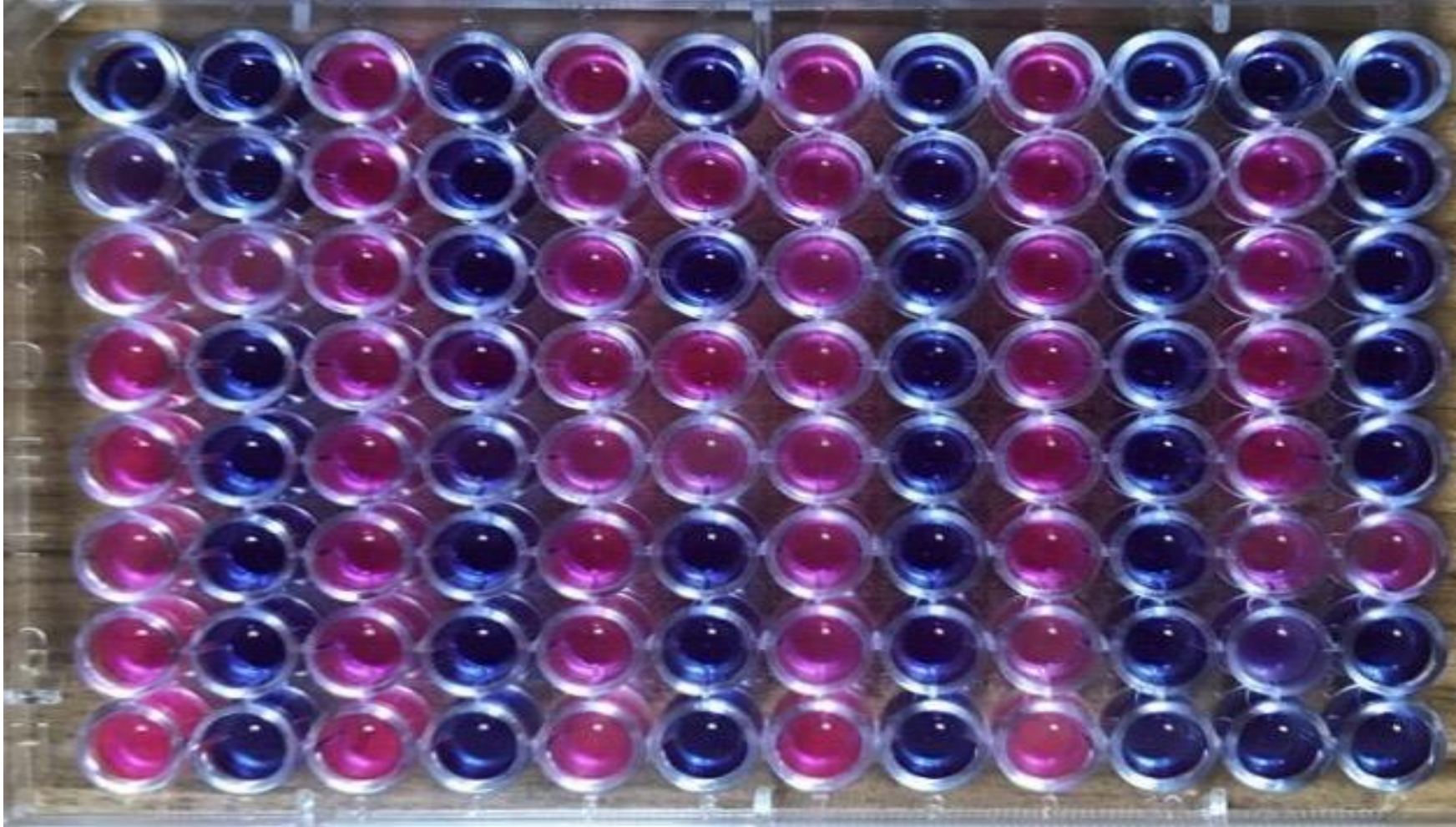
Kategorik değişkenleri ki-kare testi ile “%” olarak hesapladık.

BMD' ye göre hızlı resazurin bazlı polimiksin NP testin kategorik uyumunu belirledik.

Hızlı resazurin bazlı polimiksin NP testin duyarlılık, özgüllük, çok büyük hata oranı (ÇBH), büyük hata oranı (BH), pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değerini hesapladık

ÇBH; yanlış duyarlı sonuca, BH; yanlış dirençli sonuca karşılık gelmektedir.

Gereç-Yöntem/ HIZLI RESAZURİN BAZLI POLİMİKSİN NP TEST



Bulgular

Hızlı resazurin bazlı polimiksin NP test referans yöntem olan BMD' ye göre tüm *Acinetobacter* izolatlarının (n=112) 108' inin ve 6 kolistine içsel dirençli bakterinin kolistin duyarlılık sonucunu uyumlu saptamıştır.

BMD yöntemi ile 15 izolatta (%13,4), hızlı resazurin bazlı polimiksin NP test ile 11 izolatta (%9,8) kolistin direnci saptandı.

BMD' ye göre duyarlı izolatların hepsi hızlı resazurin bazlı polimiksin NP teste göre de duyarlıydı.

Bulgular

Hızlı resazurin bazlı polimiksin NP testin BMD ile uyumu

İstatiksel analiz	Test sonucu
Kategorik uyum	%96,4
Duyarlılık	%73,3
Özgüllük	%100
ÇBH	%26,7
BH	%0
Pozitif prediktif değer	%100
Negatif prediktif değer	%96

Çalışma/İstatistik	Lescat ve ark.	Germ ve ark.	Jia ve ark.	Bizim çalışmamız
İzolat sayısı	43 <i>A. baumannii</i> 49 <i>P. aeruginosa</i>	82 <i>A. baumannii</i>	58 <i>A. baumannii</i> 61 <i>P. aeruginosa</i> 70 <i>K. pneumoniae</i> 64 <i>E. coli</i>	112 <i>A. baumannii</i>
Kategorik uyum		%95,1		%96,4
Duyarlılık	%100	%93,3	%100-%100	%73,3
Özgüllük	%97	%93,3	%99-%96	%100
ÇBH		%1,2		%26,7
BH	n=1	%3,7	n=2	%0
PPD		%92,3		%100
NPD		%97,7		%96

(BH: Büyük hata, ÇBH: Çok büyük hata, PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer)

Sonuç

Çalışmamızda hızlı resazurin bazlı polimiksin NP testin kategorik uyumu %96, 4 saptanmıştır.

Kolistin duyarlılığı için altın standart yöntem olan BMD ile kıyaslandığında; pratikte kullanımını daha kolay olan ve aynı zaman aralığında daha çok sayıda izolatin test edilebileceği bu yöntemle daha kısa sürede sonuç alınabilmektedir.

Bu durum da hem antibiyotik yönetiminin hızla optimize edilmesini hem de izolasyon önlemlerinin daha hızlı uygulanmasını sağlayacaktır.