

Kolistin Direncini Saptamak için Pratik Bir Yöntem: Kolistin Diskleriyle Tüpte Makrodilüsyon

Seniha Başaran, Gülşah Tunçer, Serap Şimşek-Yavuz, Elif Agüloğlu-Balı,
Atahan Çağatay, Oral Öncül, Halit Özsüt, Haluk Eraksoy

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve
Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Giriş

- Ülkemizde, özellikle 3.basamak hastanelerde ve YBÜ'lerde olmak üzere karbapeneme dirençli Gram-negatif çomak (KDGNÇ) infeksiyonları endemik hale gelmiştir
- KRGNÇ'lerde ilk tedavi seçeneği olan kolistine de son yıllarda gittikçe artan oranlarda direnç geliştiği bildirilmekte
- Kolistin direncinin tanımlanmasında, disk difüzyon veya gradiyent (Etest^R) testlerinin yetersiz, sıvı mikrodilüsyonla MİK belirlenmeli
 - **Sıvı mikrodilüsyon , rutinde zor ve ticari kitler pahalı**
- Bu nedenle, ülkemizde kolistin direncini güvenilir bir şekilde belirleyebilecek pratik yöntemlere acilen gereksinim var!

Yöntem

- KR 16 *Klebsiella pneumoniae* suşuna karşı kolistinin MİK değerleri öncelikle sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlendi
- Tarafımızdan tasarlanan ve “Kolistin Diskleriyle Tüpte Makrodilüsyon” adı verilen yeni bir yöntemle de aynı suşların kolistin MİK değerleri belirlendi
 - Bu yöntemde, klasik sıvı makrodilüsyon MİK belirleme yönteminde kullanılan antibiyotik solüsyonları yerine, disk difüzyon testi kolistin diskleri kullanıldı
- Testin detayları Tablo 1’de verildi.
- **Kolistin duyarlılık sınır değerleri her iki test yönteminde de $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ duyarlı, $> 2 \mu\text{g/ml}$ dirençli**
- Çalışmada kolistine dirençli NCTC *Escherichia coli* 13846 (MCR-1pozitif) kalite kontrol suşu olarak kullanıldı

Yöntem

A. Kolistin dilüsyonlarının hazırlanması:

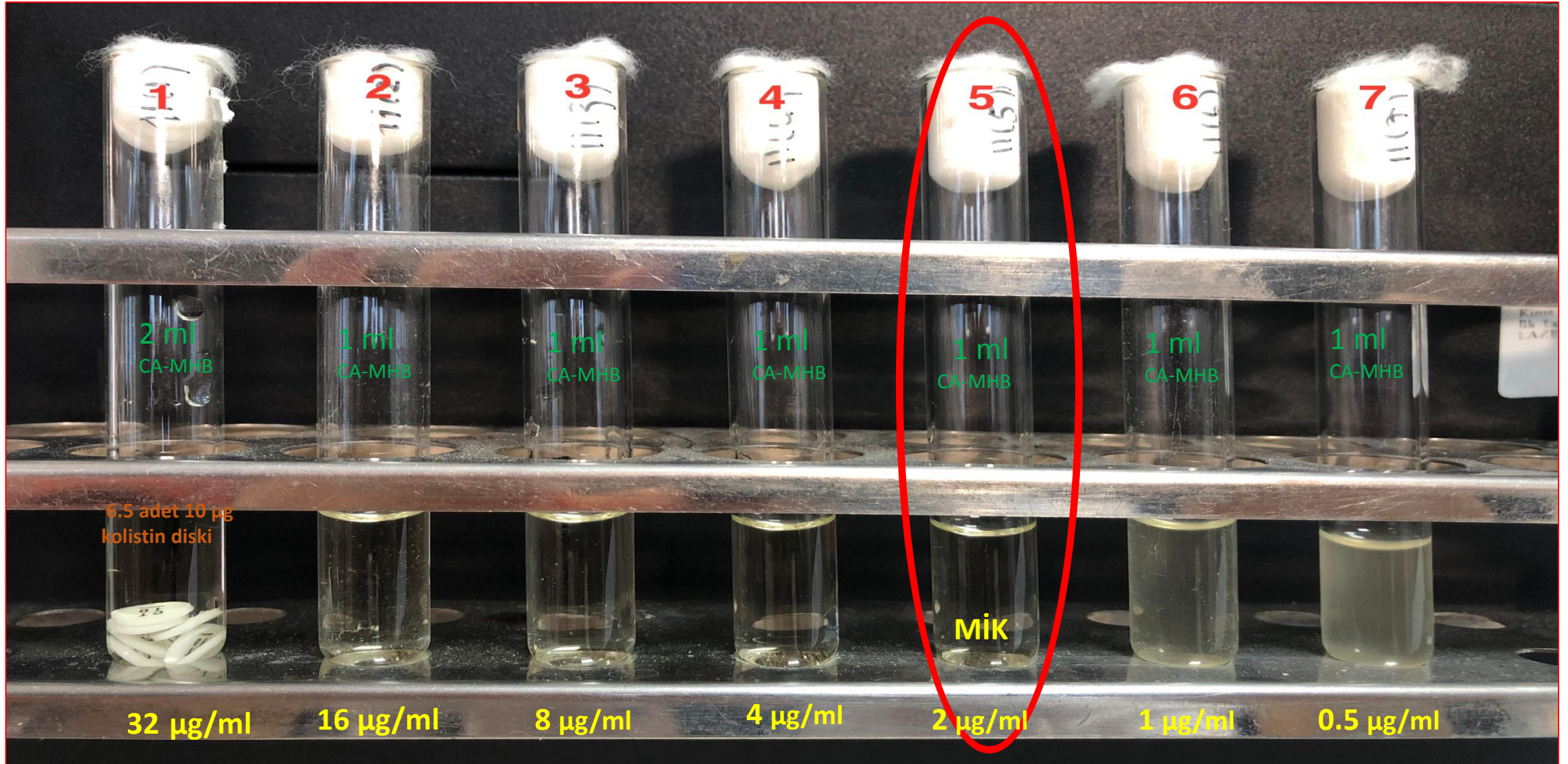
- 1) Her bir suş için 7 adet steril tüp alındı
- 2) 1. tüpe 2 ml, diğerlerine 1'er ml katyon eklenmiş Mueller Hinton sıvı besiyeri (CAMHB) eklendi
- 3) 1.tüpe 6.5 adet 10 µg kolistin diski atılarak 1 saat beklendi. Bu tüpün 32 µg/ml kolistin içerdiği kabul edildi
- 4) 1.tüpten başlayarak, her bir tüpten bir sonraki tüpe 1'er ml CAMHB transferi yapıldı, son tüpten 1 ml dışarı atıldı ve böylece kolistinin seri dilüsyonları hazırlanmış oldu

B. Bakteri inokulumunun hazırlanması:

- 1) Test edilecek bakterilerin 1 gün önce yapılmış pasajlarından direkt koloni alarak 0.5 McFarland Standardı bulanıklığında, 1×10^8 CFU/ml yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlandı
- 2) Bu süspansiyon, 1/100 oranında CAMHB'da dilüe edildi ve 1×10^6 CFU/ml bakteri yoğunluğu elde edildi, bu bakteri süspansiyonundan da 1'er ml alınarak, antibiyotikli tüplerin üzerine eklendi. Son bakteri yoğunluğu 5×10^5 CFU/ml idi

C. Bakteri inokülasyonundan sonra 35 °C'lik etüvde 18 saat inkübe edilen tüpler, bulanıklık olup olmadığına göre gözle değerlendirilerek, bulanıklığın olmadığı ilk tüp MİK olarak kabul edildi.

Kolistin Diskleriyle Tüpte Makrodilüsyon



Bulgular

Suş no	Mikrodilüsyonla belirlenmiř MİK, µg/ml (sonuç)	Disk sıvı dilüsyon yöntemiyle belirlenmiş MİK, µg/ml (sonuç)	İki yöntem arasındaki uyum
1.	8 (Dirençli)	2 (Duyarlı)	Uyumlu deęil
2.	2 (Duyarlı)	0.5 (Duyarlı)	Uyumlu
3.	64 (Dirençli)	16 (Dirençli)	Uyumlu
4.	4 (Dirençli)	4 (Dirençli)	Uyumlu
5.	1 (Duyarlı)	1 (Duyarlı)	Uyumlu
6.	8 (Dirençli)	16 (Dirençli)	Uyumlu
7.	64 (Dirençli)	32 (Dirençli)	Uyumlu
8.	64 (Dirençli)	32 (Dirençli)	Uyumlu
9.	32 (Dirençli)	32 (Dirençli)	Uyumlu
10.	0.5 (Duyarlı)	0.5 (Duyarlı)	Uyumlu
11.	0.5 (Duyarlı)	1 (Duyarlı)	Uyumlu
12.	32 (Dirençli)	32 (Dirençli)	Uyumlu
13.	4 (Dirençli)	16 (Dirençli)	Uyumlu
14.	8 (Dirençli)	32 (Dirençli)	Uyumlu
15.	16 (Dirençli)	32 (Dirençli)	Uyumlu
16.	32 (Dirençli)	16 (Dirençli)	Uyumlu
Kontrol suşu (MCR-1 pozitif)	4 (Dirençli)	8 (Dirençli)	Uyumlu

Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test To Determine Colistin *In Vitro* Activity against Gram-Negative Bacilli

Patricia J. Simner,^a Yehudit Bergman,^a I
Abida Q. Kazmi,^a Drew T. Bell,^a Shawna

^aDepartment of Pathology, Johns Hopkins University

^bDepartment of Pathology and Laboratory Medicine.^cAccelerate Diagnostics, Tucson, Arizona, USA^dDepartment of Pediatrics, Johns Hopkins University^cDepartment of Pathology and Laboratory Medicine,

10. *Journal of the American Medical Association*, 2000; 284: 2689-2695.

ABSTRACT Limited methods for colistin microbiology laboratories. The purpose of the colistin broth disk elution (CBDE) test (BMD) for identifying colistin MICs. CBDE detection of Gram-negative bacilli tested at 121 retrospectively tested, and 6 *mcr-1*-positive *Escherichia coli* 10-ml cation-adjusted Mueller-Hinton broth colistin 10-μg disks were added, generated growth control, 1, 2, and 4 μg/ml, respectively using Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M7-A2 broth compared CBDE to the reference broth (lates). Overall, CBDE yielded a categorical (EA) of 98% and 99%, respectively, for major errors occurred for *mcr-1*-producing 4 μg/ml on repeat testing. The results for BMD. CBDE versus BMAD had an EA of 98% and 99%, respectively, for major errors occurred for *mcr-1*-producing 4 μg/ml by BMD. As such, the results for CBDE should be confirmed by the reference broth (lates) and 4 μg/ml should be evaluated for the presence of *mcr-1*.

KEYWORDS colistin broth disk elution, a method

Colistin (polymyxin E) is a polymyxin antibiotic that is prescribed as an agent of last resort for the treatment of multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacterial infections, including those caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE). It consists of a large polycationic peptide that binds to the negatively charged cell wall of Gram-negative bacteria, causing disruption of the outer membrane, eventually leading to cell death (1). Resistance to colistin may be intrinsic or acquired, with the most common mechanism of resistance to colistin resulting from mutations in genes encoding the two-component regulatory system responsible for the synthesis of lipid A. These mutations yield alterations in lipid A, reducing the overall net negative charge

Copyright © 2019 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Patricia J. Simner,
psimner1@jhmi.edu.

For a commentary on this article, see <https://doi.org/10.1128/JCM.01608-18>.

Received 17 July 2018

Returned for modification 19 August 2018

Accepted 1 October 2018

Accepted manuscript posted online 3

October 2018



K.pneumoniae kolistin MİK değeri 1 µg/ml

siyeri (CAMHB) eklenmiş
25922. kalite kontrol suşu olarak kullanılmış
adet 10 µg kolistin diski atılarak 30 dakika

- Bu çalışmada, çalışmamızdan farklı olarak sadece 3 konsantrasyonda (4 µg/ml, 2 µg/ml ve 1 µg/ml) duyarlılık bakılmıştır
- Ancak özellikle çoğul dirençli bakterilerin tedavisinde, bazen sınır değerlere yakın olsa bile bu ajanların kombinasyon içinde kullanılması gerekebildiğinden, MİK değerinin tam olarak belirlenmesi tercih edilmektedir. Bu nedenle bizim kullandığımız fazla sayıda konsantrasyon içeren yöntemin daha uygun olduğu düşünülmüştür

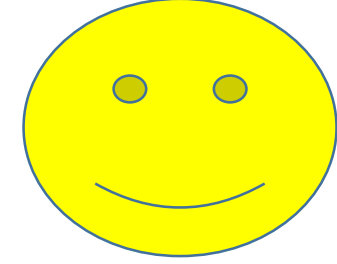
Tüp	Son antibiyotik konsantrasyonu
1.	Kontrol suşu
2.	1 µg/ml
3.	2 µg/ml
4.	4 µg/ml

5) Test edilecek bakterilerin 1 gün önce yapılmış pasajlarından direkt koloni olarak 0.5 McFarland Standardı bulanıklığında, bakteri yoğunluğu 7.5×10^5 CFU/ml olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanmış

6) Bu bakteri süspansiyonundan da 50'şer µl alınarak, antibiyotikli tüplerin üzerine eklenmiş

7) Bakteri inokülasyonundan sonra 35 °C'lik etüvde 16-20 saat inkübe edilen tüpler, bulanıklık olup olmadığına göre gözle değerlendirilerek, bulanıklık olmayan ilk tüp MİK olarak kabul edilmiş

Sonuç



- Karbapeneme dirençli *K.pneumoniae* suşlarında ve kolistine dirençli olduğu bilinen NCTC *E.coli* 13846 (MCR-1 pozitif) kalite kontrol suşunda, kolistin diskleriyle tüpte makrodilüsyon yaparak belirlenen MİK değerleri, standard yöntem olan mikrodilüsyon yöntemiyle, suşların **%94'ünde** olmak üzere **büyük oranda uyumlu** çıktı
- Bu yöntem, mikrodilüsyona oranla **çok daha kolay ve hızlı bir yöntem**
- İş yükünün yoğun olduğu rutin laboratuvarlarda kullanılabilme potansiyeli taşımakta
- Bu nedenle de üzerinde, duyarlılık, özgüllük, geçerlilik gibi ek çalışmaların yapılmasını hak etmektedir