

ANTİMİKROBİYAL DİRENCİ BELİRLEMEDE FENOTİPİK YÖNTEMLER VEYA KLASİK YÖNTEMLER

Dolunay GÜLMEZ

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA
dolunayglm@gmail.com

ÖZET

Antimikrobiyal duyarlılık testleri ile tedavi için seçilen ilacın etkisinin doğru değerlendirilebilmesi ve etkisiz tedavilerin azaltılması amaçlanmaktadır. Fenotipik yöntemler bunun için ilk aşama olmayı sürdürmektedirler. İstenen sonuçların elde edilebilmesi, her mikroorganizma ve antimikrobiyal ajan için standart yöntemlerin geliştirilmesine ve eşik değerlerin geliştirilmesine bağlıdır. Daha kısa sürede sonuç veren ve mikroorganizmanın üretilmesine ihtiyaç duymadan uygulanabilen testler için arayış sürmektedir.

Anahtar sözcükler: antimikrobiyal direnç testleri, CLSI, disk difüzyon yöntemi, EUCAST mikrodilüsyon yöntemi, minimum inhibitör konsantrasyon

SUMMARY

Phenotypic or Classical Methods for Detecting Antimicrobial Resistance

Antimicrobial susceptibility tests are used to assess the effects of the drug chosen for therapy properly and reduce ineffective treatment. Phenotypic methods continue to be the first stage of resistance detection. To obtain desired results, standard methods for each microorganism-antimicrobial combination should be developed and breakpoints should be established. Search for methods that give results in a shorter time and that can be applied without the need to cultivate the microorganism is going on.

Keywords: antimicrobial resistance testing, CLSI, disk diffusion method, EUCAST microdilution method, minimum inhibitory concentration

Bulaşıcı hastalıkların kontrol altına alınmasında hastalık etkenlerinin ve bulaş yollarının tanımlanması, hijyen koşullarının iyileşmesi ve aşılama gibi koruyucu önlemlerin yaygınlaşmasının son derece önemli olduğu bilinmektedir. Yirminci yüzyılda antimikrobiyal ajanların kullanıma girmesi, infeksiyon hastalıklarında tedaviyi de mümkün kılmıştır. Ancak bu ilaçların kullanıma girmesinden sonra gözlenen tedavi başarısızlıkları, ilaçların tüm mikroorganizmalara karşı etkili olmadıklarını ve ilaca duyarlı mikroorganizmalarda zaman içinde direnç geliştiğini ortaya koymuştur.

Antimikrobiyal duyarlılık testleri ile tedavi için seçilen ilacın etkisinin doğru değerlendirilebilmesi ve etkisiz tedavilerin azaltılması amaçlanmaktadır. Fenotipik testlerde, mikroorganizma ile ilaç standart koşullarda bir araya

getirilerek etkileşim ölçülmektedir. Bu sayede bir minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri veya inhibisyon zon çapı elde edilmektedir. Elde edilen sonuç, bir eşik değer ile karşılaştırılmakta ve tedavi başarısı tahmin edilmeye çalışılmaktadır.

Antimikrobiyal duyarlılık testleri ile elde edilen değerlerin tedavi başarısını belirlemede yardımcı olabilmesi için test sonuçları tekrarlanabilir olmalıdır. Bunu sağlamak için testteki tek değişkenin mikroorganizmanın kendisi olması ve diğer değişkenlerin standardize edilmesi gereklidir. Bu amaçla antimikrobiyal duyarlılık testlerinde kullanması önerilen besiyeri, inkübasyon koşulları, antimikrobiyal miktarı ve mikroorganizma miktarı önceden belirlenmiştir^(9,10,13,14,25). Ayrıca, sonuçların güvenilirliğinin sağlanması için rutin kalite kontrol önerileri de

bulunmaktadır^(12,26). Bu sayede elde edilen MİK değerleri veya inhibisyon zon çapları, mikroorganizma ve antimikrobiyal kombinasyonları için tek tek belirlenen klinik eşik değerler ile karşılaştırılabilmektedir^(12,24). Klinik eşik değerler; mikroorganizma-ilaç kombinasyonu için bulunan in vitro MİK/zon çapı dağılımları, hayvan deneyleri ile elde edilen ilaç ile ilgili farmakokinetik ve farmakodinamik veriler ve klinik çalışmalarındaki tedavi başarısı ile MİK/zon çapı değerleri arasındaki korelasyonun değerlendirilmesi ile belirlenmektedir^(27,28,39,44).

Antimikrobiyal duyarlılık testleri için standartların belirlenmesi ve elde edilen sonuçlara göre tedavi başarısının tahmin edilebilmesi için farklı kurumlar uzun süredir çalışmaktadır. İlk olarak 1972'de Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) National Committee for Clinical and Laboratory Standards (NCCLS, sonra Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) tarafından standardizasyon önerileri yayınlanmıştır⁽³⁾. Bu girişimi farklı ülkelere ait kurumlar takip etmiştir. Günümüzde Avustralya, Birleşik Krallık, Almanya, Danimarka, Hollanda, Fransa, İspanya, İsveç, İsviçre ve ABD'de ulusal standartlar ve bunların kliniğe yansımaları üzerinde çalışan kurumlar ve/veya çalışma grupları bulunmaktadır⁽²⁹⁾. Ülkemizde de Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti bünyesinde 1994'te kurulan Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu (ADTS) çalışma grubu bu işlevi üstlenmiştir. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ise European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) ve the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) himayesinde, bu iki kurumun maddi desteğiyle 1997'de kurulmuş olup European Medicines Agency (EMA) ve ECDC için Avrupa çapında testlerin standardizasyonunu ve klinik eşik değerlerinin belirlenmesini üstlenmiştir⁽²⁹⁾. Günümüzde CLSI ve EUCAST antimikrobiyal duyarlılık testleri üzerinde çalışan iki önde gelen ekibi barındırmakta ve karşılıklı etkileşim içinde çalışmalarına devam etmektedirler.

Antimikrobiyal ajan ile mikroorganizmanın standart koşullarda bir araya getirilerek etkileşimin ölçülmesi, halen ilacın mikroorganizma üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi için

ilk adımdır. Bir antimikrobiyal maddenin mikroorganizmanın üremesini inhibe edebilen konsantrasyonunun düşük olması, ilacın in vivo etkinliğine yönelik ilk kanıttır. Aynı şekilde bir mikroorganizma için MİK değerlerinde yükselme/inhibisyon zon çapında azalma gözlenmesi direnç gelişimine işaret etmektedir. Değişim klinik eşik değeri geçtiğinde mikroorganizma dirençli olarak tanımlanmaktadır. Değişimin ölçülebilmesi için çoğu mikroorganizma/antimikrobiyal için tanımlanmış standart testler bulunmaktadır. Agarda veya sıvı besiyerinde (tüpte veya mikropakta) uygulanabilen dilüsyon yöntemleri ile tekrarlanabilir MİK değerleri elde edilebilmektedir^(7,9,15,16). Dilüsyon yöntemlerinde belirli miktarda mikroorganizma, farklı dilüsyonlarda antimikrobiyal içeren agar veya sıvı besiyerine eklenmekte ve inkübasyon sonrasında üremeyi inhibe eden en düşük antimikrobiyal konsantrasyonu MİK olarak belirlenmektedir. Benzer şekilde, daha kolay uygulanabilir bir yöntem olan disk difüzyon yöntemi ile de inhibisyon zon çapları elde edilebilmektedir^(6-7,10,38). Bu yöntemde, belirli miktarda mikroorganizma standart bir besiyeri yüzeyine yayılmakta ve belirli miktarda antimikrobiyal içeren bir disk besiyeri yüzeyine yerleştirilmekte ve inkübe edilmektedir. Diskten uzaklaştıkça, besiyerine yayılan antimikrobiyal miktarı azalmaktadır. Bu nedenle mikroorganizmanın inhibe olması için ne kadar az miktarda ilaç gerekli ise, inkübasyon sonrasında oluşan inhibisyon zonu o kadar geniş olmaktadır. İnhibisyon zon çapları belirlenen eşik değerler ile karşılaştırılarak duyarlılık üzerine yorum yapılabilmekte ve gerekirse elde edilen inhibisyon zon çapı ile MİK arasındaki ilişki hesaplanabilmektedir. Gradyent MİK yöntemleri ise difüzyon yöntemi ile MİK değeri elde edilmesine dayanan yöntemlerdir. Belirli miktarda mikroorganizma standart bir besiyeri yüzeyine yayılmakta ve alt ucundan üst ucuna doğru artan miktarda antimikrobiyal içeren bir şerit besiyeri yüzeyine yerleştirilmektedir. İnkübasyon sonrasında, daha fazla miktarda antimikrobiyal içeren üst tarafı daha geniş olan, armut şeklinde bir inhibisyon zonu oluşmaktadır. Mikroorganizmanın şeridin hemen yanında üreyebildiği noktadaki antimikrobiyal derişimi MİK değerini vermekte-

dir. Gradyent MİK yöntemleri için üretici firmaların önerileri kullanılmaktadır. EUCAST, makro gradyent yöntemleri olarak tanımlanan yüksek inokulum miktarı (2 MacFarland) kullanılarak zengin besiyerinde uygulanan gradyent yöntemleri ile direnç taraması yapılabileceğini belirtmiş ancak, elde edilen değerlerin MİK değeri olmadığını altını çizmiştir⁽²³⁾.

Her ne kadar MİK/zon çapı değerlerinin belirlenmesi antimikrobiyal ajanın mikroorganizmaya etkisinin belirlenmesine yönelik ilk aşama olsa da bazı durumlarda direncin ortaya çıkarılmasında yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle olası direnç mekanizmalarının saptanmasına yönelik bazı testler geliştirilmiştir ve belirli durumlarda MİK/zon çapı değeri ne olursa olsun, ilgili direnç mekanizmasının saptanması durumunda mikroorganizmanın dirençli olarak rapor edilmesi gerekmektedir.

Enterobacteriaceae'da genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) saptanması: 2010 yılında hem CLSI hem de EUCAST sefalosporin direnç eşik değerlerinde yapılan değişiklikler öncesinde GSBL doğrulama testi pozitif çıkan izolatlarda MİK/zon çapı sonuçlarına göre duyarlı görünen suşların dirençli olarak rapor edilmesi gerekmektedir. Günümüzde geçerli olan eşik değerleri ile bu gereksinim ortadan kalkmış olmakla birlikte, epidemiyolojik verilerin toplanabilmesi için GSBL testlerin yapılmaya devam edilmesi istenmektedir^(11, 12, 23). Bunun için tarama ve doğrulama testleri önerilmektedir. CLSI *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* ve *Proteus mirabilis* için önerilerde bulunmaktadır⁽¹²⁾. Tarama testinde bazı beta-laktamların MİK değerlerinde yükseklik gözlenirse (*P.mirabilis* dışındakiler için seftazidim, aztreonam, sefotaksim ve seftriakson ≥ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, sefpodoksim ≥ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$; *P.mirabilis* için seftazidim, sefotaksim ve sefpodoksim ≥ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) doğrulama testi önerilmektedir. Tarama disk difüzyon ile de yapılabilmekte, birden fazla ajan ile tarama yapıldığında duyarlılığın arttığı belirtilmektedir. Doğrulama testlerinde sefotaksim VE seftazidim disk zon çapı değerleri, bu antibiyotiklerin klavulanik asitle birlikte bulunduğu disk zon çapları ile karşılaştırılmakta ve ≥ 5 mm fark olması durumunda GSBL pozitif olarak değerlendirilmektedir. Aynı şekilde sefotaksim

VE seftazidim MİK değerleri ile klavulanik asitli formlarının MİK değerleri arasında ≥ 3 dilüsyon fark olması da GSBL pozitifliğine işaret etmektedir^(12,23). EUCAST ise, tarama için sefotaksim veya seftriakson VE seftazidim veya tek başına sefpodoksim MİK/zon çapı değerlerinin kullanılmasını önermektedir⁽²³⁾. Ayrıca, CLSI'dan farklı olarak, doğrulama testlerinde Enterobacteriaceae için iki grup belirlemiş, birinci grup (*E.coli*, *Klebsiella* spp., *P.mirabilis*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp.) için sefotaksim VE seftazidim ile klavulanik asitli formlarının test edilmesini; birinci grupta sefoksitin MİK değeri $>8\text{mg}/\text{L}$ ise veya doğrulama testi sonucu kesin değil ise ve indüklenebilir kromozomal AmpC içeren ikinci grup üyeleri için (*Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Serratia* spp., *Hafnia alvei*) sefepim ve klavulanik asitli formunun değerlendirilmesini önermiştir⁽²³⁾. Test yöntemi olarak agar dilüsyon, mikrodilüsyon, disk difüzyon, gradyent MİK yöntemleri veya otomatize sistemler kullanılabilir. Doğrulama testi olarak kombinasyon disk testinin çift disk sinerji testine ve gradyent MİK yöntemine göre daha başarılı olduğu belirtilmiştir⁽²³⁾.

Ek olarak AmpC varlığında GSBL'nin gösterilebilmesi için sefotaksim VE seftazidim ile bunların klavulanik asit ile birlikte bir AmpC inhibitörü olan kloksasilin içeren formları kullanılabilir⁽²³⁾. EUCAST sefoksitin MİK değeri $>8\text{mg}/\text{L}$ olan *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.mirabilis*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp.'de indüklenebilir AmpC tipi beta-laktamaz varlığının araştırılması için kloksasilin sinerjisine bakılabileceğini de bildirmiştir⁽²³⁾. *E.coli* ve *Shigella*'da AmpC kromozomal veya plazmide bağlı olabilmektedir ve bu test ile ayırım yapılamamaktadır. Boronik asit ile sinerji de AmpC tespiti için kullanılabilir ama, sınıf A karbapenemazlarla da pozitif sonuç gözlenebildiğinden her zaman AmpC varlığını göstermemektedir⁽²³⁾.

Enterobacteriaceae'da karbapenemaz saptanması: Direnç mekanizmasının tespitine yönelik olan bu testler, GSBL testlerine benzer şekilde 2010 yılında CLSI ve EUCAST'ın karbapenem duyarlılık eşik değerlerinde yaptıkları değişiklik sonrasında yalnızca epidemiyolojik amaçla uygulanmakta ve MİK/zon çapı sonuç-

larına göre elde edilen sonuçların raporlanmasına etkileri bulunmamaktadır^(11,12,23). CLSI, Enterobacteriaceae'da karbapenemaz doğrulama testi olarak ertapenem veya meropenem diskleri ile yapılan Modifiye Hodge Testi'ni (MHT) önermektedir⁽¹²⁾. MHT testinin duyarlılığı daha çok KPC üreten Amerika suşlarında yüksek olup NDM gibi farklı karbapenemazlarda düşüktür⁽¹²⁾. Özgüllüğü de istenen düzeye çıkamamaktadır^(23,37,45). Ayrıca MHT'nin *Proteus*, *Prevotella* ve *Morganella* gibi karbapenemaz dışında bir mekanizma ile karbapenem MİK değeri artabilen cinslerde yararı bilinmemekte, nonfermenterlerde karbapenemaz tespitindeki yeri ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır⁽¹²⁾. EUCAST, karbapenem epidemiyolojik sınır değerlerinden yararlanarak yapılan bir tarama önermektedir. Meropenem MİK değeri >0.12 mg/L veya zon çapı <25 mm olduğunda ve farklı beta-laktamaz inhibitörleri ile olası mekanizmanın tahmin edilebileceğini belirtmektedir (Tablo)⁽²³⁾. Bu testler ile bir gecelik inkübasyon sonrasında sonuç alınabildiğinden daha hızlı testlere ihtiyaç duyulmaktadır. "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight-Mass Spectrometry" (MALDITOF-MS) ile karbapenem hidrolizinin incelenmesi daha hızlı sonuç verebilmektedir^(23,31,33). MALDITOF-MS ile *Enterobacteriaceae*'da diğer beta-laktamazların belirlenmesi ve *Enterobacteriaceae* dışındaki bakterilerde, örneğin *Bacteroides fragilis*'te, karbapenemaz tespiti de araştırılmaktadır^(32,33). Daha kısa sürede sonuç alınabilmesi amacıyla pozitif sinyal veren kan kültürü şişelerine de uygulanmıştır⁽⁴⁾. Renk değişimi esasına dayalı olan Carba NP testi ile en fazla iki saatlik inkübasyon son-

rasında karbapenemazların saptanması mümkün olmaktadır^(21,23,40). Carba NP testi *Pseudomonas* için de kullanılabilir^(20,21).

Stafilokoklarda beta-laktamaz varlığının saptanması: Stafilokoklarda nitrosefin testinde sarıdan kırmızı/pembe renk değişikliği (negatif testin penisilin diski ile doğrulanması gerekmektedir) veya 10 U'lık penisilin diski ile keskin zon saptanması beta-laktamaz varlığını göstermekte ve bu suşlar penisilin, aminopenisilin, karboksipenisilin ve ureidopenisilinlere dirençli olarak rapor edilmektedir^(12,36).

Stafilokoklarda metisilin direncinin saptanması: Stafilokoklarda metisilin direnci, tüm beta-laktam ajanlara (seftarolin gibi MRSA'ya etkin sefalosporinler hariç) direncin göstergesi olarak kullanılmaktadır^(12,36). Ancak, fenotipik testlerde metisilin ve sonrasında onun yerine kullanılan oksasilinin yerini sefoksitin almaya başlamıştır. CLSI önerileri, *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus lugdunensis*'te tarama için %4 NaCl ve 6µg/mL oksasilin içeren Mueller Hinton agar (MHA) kullanılabileceğini, mikrodilüsyon ile sefoksitin veya oksasilinin test edilebileceğini, disk difüzyon testinde ise yalnızca sefoksitin sonuçlarının güvenilir olduğunu belirtmektedir⁽¹²⁾. EUCAST'ın *S.aureus* için önerileri de benzerdir⁽²³⁾. Ayrıca oksasilin ve sefoksitin birlikte test edildiği durumlarda, içlerinden birinin dirençli olarak yorumlanması durumunda sonuçun metisilin dirençli olarak bildirilmesi gerekmektedir^(12,23). *S.lugdunensis* dışındaki koagulaz negatif stafilokoklar (KNS) için CLSI sefoksitin disk difüzyon veya oksasilin mikrodilüsyon testlerinden birini önermektedir⁽¹²⁾.

Yakın zamanda stafilokoklarda *mecA* geni

Tablo. Enterobacteriaceae'da fenotipik testler ile olası direnç mekanizmalarının tespiti⁽²³⁾.

Beta-laktamaz	10 µg meropenem diski ile zon çapında artış şeklinde sinerji gözlenen madde					Temosilin MİK>32 mg/L veya zon çapı <11 mm
	DPA/EDTA	APBA/PBA	DPA+APBA	CLX		
MBL	+	-	-	-	-	Değişken ¹
KPC	-	+	-	-	-	Değişken ¹
MBL+KPC ²	Değişken	Değişken	+	-	-	Değişken ¹
OXA-48 benzeri	-	-	-	-	-	Evet
AmpC+porin kaybı	-	+	-	+	-	Değişken ¹
ESBL+porin kaybı	-	-	-	-	-	Hayır

Kısaltmalar: MBL: metallo-beta-laktamaz, KPC: *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaz, DPA: dipikolinik asit, EDTA: etilendiamintetraasetik asit, APBA: aminofenil boronik asit, PBA: Fenil boronik asit, CLX: kloksasilin

¹Temosilin duyarlılık testi yalnızca sinerji saptanmayan izolatlar için önerilmektedir.

²Birden fazla inhibitör içeren (DPA veya EDTA + APBA veya PBA) disk/tabletlerin kullanımı ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Bu kombinasyon karbapenemlere yüksek-düzey dirence neden olmaktadır ve Yunanistan dışında nadirdir.

ile % 70 benzerlik gösteren ve PBP2a benzeri bir penisilin bağlayan protein kodlayan mecC geni bulunmuş ve metisilin direncine neden olduğu gösterilmiştir^(2,23). Metisilin direncinin fenotipik olarak saptanmasında, hem mecA hem de mecC taşıyan suşlarda sefoksitin oksasilinden daha güvenilir olduğu bildirilmiştir^(23,43).

S.aureus'ta glikopeptit direncinin saptanması: Stafilokoklarda vankomisin duyarlılık durumunun belirlenmesi için bir dilüsyon yöntemi kullanılması gerekmektedir⁽¹²⁾. Disk difüzyon yöntemi *S.aureus* için duyarlı ve orta duyarlı suşları, KNS için ise duyarlı, orta duyarlı ve dirençli suşları ayıramamaktadır. EUCAST, glikopeptit dirençli *S.aureus* (GRSA) tespitinde disk difüzyon testinin kullanılabilmesini ancak duyarlı ve orta duyarlı suşlar için mikrodilüsyon, gradiyent MİK yöntemleri veya otomatize sistemler ile MİK belirlenmesi gerektiğini belirtmiştir⁽²³⁾. Ancak, gradiyent MİK yöntemleri ile belirlenen değer, standart mikrodilüsyon ile elde edilen değere göre 0.5-1 dilüsyon yüksek olabilmektedir^(23,41,42). CLSI, *S.aureus*'ta glikopeptit direnci taraması için 6µg/mL vankomisin içeren beyin kalp infüzyon agar (BHIA) kullanılabilmesini ve direncin doğrulanması için yine standart mikrodilüsyon yöntemlerine gerek olacağına işaret etmiştir⁽¹²⁾. Tarama için 5 mg/L teikoplanin içeren MHA öneren EUCAST, gradiyent testlerin de direnç saptamada yeri olduğunu belirtmiştir. EUCAST, GRSA ve glikopeptit orta duyarlı *S.aureus* (GISA) dışında heterojen glikopeptit orta duyarlı suşlar (hGISA) da bulunduğunu belirtmiş ve tedavi başarısızlığı şüphesinde hGISA aranmasını önermiştir⁽²³⁾. hGISA'nın doğrulanması için populasyon analizi profili-eğri altındaki alan (population analysis profile-area under curve, PAP-AUC) gerekmektedir.

Enterokoklarda glikopeptit direncinin saptanması: CLSI, enterokoklarda vankomisin direncinin saptanması için 30 µg vankomisin içeren disk kullanılabilmesini ancak, orta duyarlı suşların bir dilüsyon yöntemi ile ayrıca test edilmesini önermektedir⁽¹²⁾. EUCAST ise 5 µg disk veya dilüsyon yöntemlerini önermektedir⁽²³⁾. Her iki kurum da inkübasyonun 24 saate tamamlanmasının ve ince üremelerin gözden kaçırılmamasının önemine dikkati çekmiş, gerektiğin-

de tarama için 6 mg/L vankomisin içeren besiyeri (CLSI MHA, EUCAST ise BHIA) kullanılmasını önermişlerdir^(12,23). EUCAST, buna ek olarak zon sınırlarının bulanık olduğu durumlarda da zon çapına bakılmaksızın suşun dirençli rapor edilmesi gerektiğini belirtmiştir⁽²³⁾. Ayrıca, enterokoklarda, kromozomal direnç taşıyan iki tür olan *Enterococcus gallinarum* ve *Enterococcus casseliflavus* için infeksiyon kontrol önlemleri gerekli olmadığından bu iki türün ayırımının yapılması da gerekmektedir^(12,23).

Streptococcus pneumoniae'da penisilin direncinin saptanması: Pnömonokoklarda 1 µg oksasilin diski ile tarama yapıldığında penisilin duyarlılığı belirlenebilmekte ancak, zon çapı ≤19 mm ise MİK belirlenerek ayırım yapılması gerekmektedir^(12,23,36).

İndüklenebilir klindamisin direncinin saptanabilmesi için stafilokoklar, pnömonokoklar ve beta-hemolitik streptokoklarda eritromisin diski ile klindamisin diski belirli bir uzaklıkta yerleştirilmekte ve klindamisin zonunda düzleşme veya bulanıklık varlığında klindamisin dirençli olarak rapor edilmektedir^(12,36). Bu direnç, mikrodilüsyonda aynı kuyucuğa eritromisin ve klindamisin eklenerek de test edilebilmektedir⁽¹²⁾.

CLSI, ayrıca stafilokoklarda mupirosin direncinin ve enterokoklarda yüksek düzey gentamisin ve streptomisin direncinin belirlenebilmesi için de mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemi önerilerinde bulunmaktadır⁽¹²⁾.

Fenotipik antimikrobiyal duyarlılık testlerinde standart olarak önerilen yöntemlerin çok zaman almaları nedeniyle daha kısa sürede sonuç verebilen yöntem arayışları sürmektedir. Bakteri üremesi ile renk değiştiren ve disk difüzyon ve gradiyent MİK yöntemleri ile oluşan zonların 4-6 saatte okunmasına olanak veren Quicolor besiyeri bunlardan biridir^(19,22,34).

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında daha az sıklıkta karşılaştığımız bakteriler ve diğer mikroorganizmalar için de duyarlılık testleri standardize edilmeye çalışılmaktadır. CLSI, nadir izole edilen veya zor üreyen bakteriler, anaerob bakteriler, mikobakteri, *Nocardia* ve *Actinomyces*, maya ve küfler için standartlar yayınlamıştır^(5-8,15-17,29). Standartlara ek olarak daha hızlı sonuç veren ve maliyeti daha düşük yöntem arayışları devam etmektedir. Bunlara

örnek olarak mikobakterilerde kültür ve antimikrobiyal duyarlılık için kullanılabilen TK besiyeri ve mayalarda antifungal duyarlılık için geliştirilen Fungitest ve Sensititre YeastOne buna örnek verilebilir^(1,18,35). Bu yöntemler, üreme ile renk değişimi ilkesine göre geliştirilmişlerdir.

Fenotipik antimikrobiyal duyarlılık testlerinin standardizasyonunda oldukça yol alınmış olmasına karşın istenen sonuca her zaman kolay ulaşılamamaktadır. Örneğin katyonik bir antibiyotik olan kolistin disk difüzyon yöntemi ile test edilmesinde sorunlar yaşanmış ve dilüsyon yöntemleri ile de sorunlar tam olarak çözümlenememiştir⁽³⁰⁾. Bu konuda çalışmalar devam etmektedir.

Fenotipik yöntemler antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesinde ilk aşama olmayı sürdürmektedirler. Testlerin değerlendirmesinin doğru yapılabilmesi her mikroorganizma ve antimikrobiyal ajan için standart yöntemlerin geliştirilmesine, sonuçların yorumlanması için ise eşik değerlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulduğu unutulmamalıdır. Daha kısa sürede sonuç veren ve mikroorganizmanın üretilmesine ihtiyaç duymadan uygulanabilen testler için arayış sürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Altındış M, Çetinkaya Z, Kalaycı R, Çiftçi İH, Arslan A, Aktepe OC. Detection of Mycobacterium isolates with different methods and their resistance ratios against anti-tuberculosis drugs, *J Microb Infect Dis* 2011;1(1):5-9.
<http://dx.doi.org/10.5799/ahinjs.02.2011.01.0002>
2. Ballhausen B, Kriegeskorte A, Schleimer N, Peters G, Becker K. The mecA homolog mecC confers resistance against beta-lactams in Staphylococcus aureus irrespective of the genetic strain background, *Antimicrob Agents Chemother* 2014.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02731-13>
3. Bartlett RC, Mazens-Sullivan M, Tetreault JZ, Lobel S, Nivard J. Evolving approaches to management of quality in clinical microbiology, *Clin Microbiol Rev* 1994;7(1):55-88.
4. Carvalhaes CG, Cayo R, Visconde MF et al. Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision, *J Antimicrob Chemother* 2014.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dku094>
5. CLSI. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of nondermatophyte filamentous fungi; approved guideline. M51-A, baskı. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2010).
6. CLSI. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline-second edition. M44-A2, baskı. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2009).
7. CLSI. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline-second edition. M45-A2, baskı. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2010).
8. CLSI. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard-eighth edition. M11-A8, baskı. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2012).
9. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-ninth edition. M07-A9, baskı. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2012).
10. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard-eleventh edition. M02-A11, baskı. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2012).
11. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. CLSI Document M100-S20., baskı. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2010).
12. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. CLSI Document M100-S24, baskı. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2014).
13. CLSI. Protocols for evaluating dehydrated Mueller-Hinton Agar; approved standard - second edition. M06-A2, baskı. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2006).
14. CLSI. Quality control for commercially prepared microbiological culture media; approved standard-third edition. M22-A3, baskı. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2004).
15. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard-second edition. M38-A2, baskı. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2008).

16. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition, M27-A3, baskı. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2008).
17. CLSI. Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic Actinomycetes; approved standard-second edition. M24-A2, baskı. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2011).
18. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. Correlation between the procedure for antifungal susceptibility testing for *Candida* spp. of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) and four commercial techniques, *Clin Microbiol Infect* 2005;11(6):486-92.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01166.x>
19. Çiftçi IH, Aşık G, Er H, Karakeçe E. Rapid detection of resistance in *Staphylococcus aureus* by using Quicolor ES, *World J Microbiol Biotechnol* 2014;30(2):715-8.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11274-013-1474-2>
20. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas* spp, *J Clin Microbiol* 2012;50(11):3773-6.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01597-12>
21. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test, *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(12):6437-40.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01395-12>
22. Ercis S, Sancak B, Kocagoz T, Kocagoz S, Hascelik G, Bolmstrom A. Rapid 4 to 6 hour detection of extended-spectrum beta-lactamases in a routine laboratory, *Scand J Infect Dis* 2007;39(9):781-5.
<http://dx.doi.org/10.1080/00365540701367751>
23. EUCAST. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, www.eucast.org.Version 1.0 (2013).
24. EUCAST. <http://www.eucast.org/clinical-breakpoints/>. Erişim tarihi: 14.07.2013. (2013).
25. EUCAST. Media preparation for EUCAST disk diffusion testing and for determination of MIC values by the broth microdilution method, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, www.eucast.org.Version 3.0 (2013).
26. EUCAST. Routine internal quality control as recommended by EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, www.eucast.org.Version 3.1 (2013).
27. EUCAST. Standard operating procedure: Harmonization of breakpoints for existing antimicrobial agents, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.Version 2.1 (2013).
28. EUCAST. Standard Operating Procedure: Setting breakpoints for new agents, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.Version 1.1 (2013).
29. EUCAST. www.eucast.org. Erişim tarihi: 30.04.2014
30. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli, *J Clin Microbiol* 2013;51(6):1678-84.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03385-12>
31. Hrabak J, Studentova V, Walkova R et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *J Clin Microbiol* 2012;50(7):2441-3.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01002-12>
32. Johansson A, Nagy E, Soki J. Detection of carbapenemase activities of *Bacteroides fragilis* strains with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), *Anaerobe* 2014;26:49-52.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.01.006>
33. Jung JS, Popp C, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, Schubert S. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of beta-lactam resistance in Enterobacteriaceae derived from blood cultures, *J Clin Microbiol* 2014;52(3):924-30.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02691-13>
34. Kocagoz S, Budak F, Gur D. Evaluation of a chromogenic medium for rapid detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella* spp., *Indian J Med Res* 2006;124(4):443-6.
35. Kocagoz T, Altin S, Turkyilmaz O et al. Efficiency of the TK Culture System in the diagnosis of tuberculosis, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;72(4):350-7.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.12.004>
36. Leclercq R, Canton R, Brown DF et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing, *Clin Microbiol Infect* 2013;19(2):141-60.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x>
37. Mathers AJ, Carroll J, Sifri CD, Hazen KC. Modified Hodge test versus indirect carbapenemase test: prospective evaluation of a phenotypic assay for detection of *Klebsiella pneumoniae* car-

- capenemase (KPC) in Enterobacteriaceae, *J Clin Microbiol* 2013;51(4):1291-3.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03240-12>
38. Matuschek E, Brown DF, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories, *Clin Microbiol Infect* 2014;20(4):O255-66.
<http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12373>
39. Mouton JW, Brown DF, Apfalter P et al. The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach, *Clin Microbiol Infect* 2012;18(3):E37-45.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03752.x>
40. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Emerg Infect Dis* 2012;18(9):1503-7.
<http://dx.doi.org/10.3201/eid1809.120355>
41. Rybak MJ, Vidaillet C, Sader HS et al. Evaluation of vancomycin susceptibility testing for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of Etest and three automated testing methods, *J Clin Microbiol* 2013;51(7):2077-81.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00448-13>
42. Sader HS, Jones RN, Rossi KL, Rybak MJ. Occurrence of vancomycin-tolerant and heterogeneous vancomycin-intermediate strains (hVISA) among *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infections in nine USA hospitals, *J Antimicrob Chemother* 2009;64(5):1024-8.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp319>
43. Skov R, Larsen AR, Kearns A et al. Phenotypic detection of mecC-MRSA: cefoxitin is more reliable than oxacillin, *J Antimicrob Chemother* 2014;69(1):133-5
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt341>
44. Turnidge J, Paterson DL. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints, *Clin Microbiol Rev* 2007;20(3):391-408, table of contents.
<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00047-06>
45. Wang P, Chen S, Guo Y et al. Occurrence of false positive results for the detection of carbapenemases in carbapenemase-negative *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates, *PLoS One* 2011;6(10):e26356.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0026356>