

**T.C**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ HASTANELERİNDEKİ KLİNİK  
ÖRNEKLERDEN ELDE EDİLEN *ACINETOBACTER BAUMANNII*  
*COMPLEX*'İN KLORHEKSİDİN VE KOLİSTİN DUYARLILIKLARININ  
BELİRLENMESİ**

**Dr.Abdullah TOZLUYURT**

**UZMANLIK TEZİ**

**Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA**

**2023**

**T.C**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ HASTANELERİNDEKİ KLİNİK  
ÖRNEKLERDEN ELDE EDİLEN *ACINETOBACTER BAUMANNII*  
*COMPLEX*'İN KLORHEKSİDİN VE KOLİSTİN DUYARLILIKLARININ  
BELİRLENMESİ**

**Dr.Abdullah TOZLUYURT**

**UZMANLIK TEZİ**

**Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof.Dr.Cumhur ÖZKUYUMCU**

**ANKARA**

**2023**

## TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık hayatım boyunca ve tez çalışmalarımın her safhasında öğretim ve hayatımla ilgili beni destekleyen Prof.Dr.Cumhur ÖZKUYUMCU'ya

Buradaki eğitim-öğretim süresi boyunca beni destekleyen, daha çok okuma ve araştırmamı sağlayan Prof.Dr.Banu SANCAK'a

Tezin yapım aşamasında destekleri olan İrfan ATMACA, Nejla KILIÇ'a

Hacettepe'de ki, Eğitim-Öğretim hayatım boyunca bana yardımcı olan Uzm.Dr.Asiye BIÇAKÇIGİL ve Uzm.Dr.Ümran LİSTE'ye

Hayatım boyunca her koşulda sevgi ve desteklerini sunan Ömer TOZLUYURT, Hacer TOZLUYURT ve kız kardeşim Elif TOZLUYURT'a

Ankara Halk Sağlığı, Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarının, PFGE yapmam için yardımcı oldukları için tüm çalışanlarına ,

en içten teşekkürlerimi sunarım.

Dr.Abdullah TOZLUYURT

## ÖZET

**TOZLUYURT A. Hacettepe Üniversitesi Hastanelerindeki Klinik Örneklerden Elde Edilen *Acinetobacter Baumannii Complexin* Klorheksidin ve Kolistin Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı , Mikrobiyoloji Tıpta Uzmanlık Programı , Asistanlık Tezi , Ankara 2020.**

*Acinetobacter baumannii complex* (ABC)'in 2006'lı yıllarda yara yeri enfeksiyonu olarak ilk olgunun ortaya çıkmasından sonra tüm dünyaya yayılarak ve artan oranda antimikrobiyal direnç profilinin ortaya çıkması, WHO (Dünya Sağlık Örgütü)'nun bu patojeni hedef tahtasına oturtmasını sağlamıştır. Neden olduğu enfeksiyonun tedavisi yeni tedavi modaliteleri piyasaya sürülmesinin ardından gelişen direnç nedeniyle komplike bir duruma dönüşmüştür. Hem kromozomal hem de hareketli genetik yapılar olması bakımından, çok yetenekli bir patojene ile yıllardır maruz kalmaktayız. Bu çalışmanın amacı, ABC izolatlarında kolistin ve klorheksidin arasında çapraz direncin olup olmadığı ve kolistine karşı direnç profilini ortaya çıkartmaktır. Dolayısıyla, çalışma; kan kültürü, BAL, DTA gibi bölgelerde enfeksiyon yapan ABC'nin izole edilmesi, kolistin ve klorheksidin duyarlılık profilinin ortaya çıkarılması ve klonal varlığının çeşitliliğinin tesbiti üzerine dayanmaktadır. Çalışmaya dahil edilen 100 *A. baumannii* izolatı için, EUCAST (EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING) klinik eşik ve sıvı mikrodilüsyon önerilerine göre kolistin ve klorheksidin duyarlılık profili belirlenmiştir. 15 izolatta kolistin direnci, on yedi izolatta ise 17 klorheksidin orta duyarlı izolat bulunmuştur. Yalnız bir 1 izolatta, hem klorheksidin orta duyarlılık hem de kolistin direnci saptanmıştır. *A. baumannii* dışında yapılan diğer bakterilerle pleiotropik direncin araştırılması için yapılan in-vitro deneylere göre, *A. baumannii*'de kolistin direncinin, klorheksidinin maruziyetiyle kazanmasının uyumun maliyeti olabileceğini ifade edebilmesi için ileri deneylere gereksinim vardır. Ayrıca kolistin direnci olan ABC izolatı için, PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) yapılmış olup yedi farklı klon saptanmıştır. Bu çalışma klorheksidin ile kolistin arasındaki ilişkiyi *A. baumannii*'de inceleyen ilk çalışma olup, başta İç Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesinde, klorheksidin azalmış duyarlılığın ve kolistin direncinin diğer yataklılık bakım servislerine göre daha yüksek olduğu, kolistin dirençli enfeksiyon etkenlerinin tek bir klondan kaynaklanmayıp yedi farklı klondan kaynaklandığı ortaya çıkarılmıştır.

Anahtar Kelimeler:*Acinetobacter baumannii*, Kolistin, Klorheksidin, PFGE, Antimikrobiyal Direnç, Pleiotropik Direnç

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından THD-2019-18475 proje numarasıyla desteklenmiştir.

## ABSTRACT

**TOZLUYURT A. Determination of Sensitivity of *Acinetobacter Baumannii Complex* to Chlorhexidine and Colistin obtained from Clinical Samples at Hacettepe University Hospitals. Hacettepe University Faculty of Medicine Dean's Office, Microbiology Medical Specialization Program, Assistant Thesis, Ankara 2020.** *Acinetobacter Baumannii Complex* (ABC) covers all over the world soon after the emergence of the first case occurred as a wound site infection in 2006 and the emergence of an mounting number of antimicrobial compound with which the pathogens concerned could fight, which enabled WHO (World Health Organization) to locate this pathogen on the first rank. The treatment of the infection has become complicated due to the resistance that was developed following the introduction of new treatment modalities. Therefore, after isolation and identification of the agent, it is vital to reveal an accurate antibiogram resistance profile, however another problem that need to be overcome is that it is necessary to wait every other day for the antibiogram testing. We have been exposed to a highly skilled pathogen for years, given that both chromosomal and mobile genetic elements exploited. The aim of this study was to identify pathogen of interest, decipher susceptibility patterns to antimicrobials and elaborate if there was in exist a cross-resistance between the chlorhexidine and colistin in. ABC. Accordingly, The study was composed in the isolation of ABC that infects in part of the body such as blood culture, lavage fluid, tracheal aspirate material, on the detection of the susceptibility profile of colistin and chlorhexidine and determination of the diversity of clonal presence. The colistin and chlorhexidine resistance profiles were determined according to 100 isolates of *A. baumannii*, EUCAST clinical margin and broth microdilution guidelines. The colistin resistance was found in 15 isolates and chlorhexidine intermediate susceptibility was found in 17 isolates. In an isolate, both chlorhexidine intermediate sensitivity and colistin resistance were detected. According to in-vitro experiments thus far conducted to investigate pleiotropic resistance in other pathogens other than *A. baumannii*, it is stated that the colistin resistance in *A. baumannii* may be fitness-cost with exposure to chlorhexidine. Among the *A. baumannii* isolates showing resistance to colistin, the number of 7 different clones were detected by performing PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis). These thesis is the first study to examine the relationship between chlorhexidine and colistin. In this thesis, it has been

revealed that bacteria in especially the Internal Diseases Intensive Care Unit have decreased sensitivity to chlorhexidine and colistin resistance is higher than other inpatient care units one, and ones conferring resistance to colistin do not originate from a single clone, however from seven different clones.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Colistin, Chlorhexidine, PFGE, Antibiotic Resistance, Cross-Resistance.

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit with the project number of THD-2019-18475.

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ ve TABLOLAR DİZİNİ	xiii
<b>1.GİRİŞ</b>	1
<b>2.GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	3
2.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> Kolistin Direnç Mekanizmaları	5
2.2.1. Kolistinin Tarihiçesi ve Yapısı	5
2.2.2. Kolistin Etki Mekanizması	6
2.2.3. Kolistin Etki Spekturumu	8
2.2.4. Kolistinin Farmasötik Formları	8
2.2.5. Time-Kill Deneyleri	9
2.2.6. Kolistin Duyarlılık Testleri	10
2.2.7. Kolistin Direncine Yönelik Hızlı Testler	12
2.2.8. Kolistin Direncini Saptamada Seçici Besiyerleri	13
2.2.9. Kolistin Direncini Saptamada MALDI-TOF Kullanımı	13
2.3. Kolistin Direnç Mekanizmaları	16
2.3.1. Kolistin Doğal Direnci	17
2.3.2. Kolistine Kazanılmış Direnç	18
2.3.3. PmrC/A/B SİSTEMİ	19
2.3.4. PhoP/Q SİSTEMİ	



2.3.5. Genel Düzenleyiciler	21
2.3.6. Atım Pompaları	21
2.3.7. Mobile Colistin Resistance (MCR)	23
2.4. Klorheksidin	28
2.4.1. Klorheksidin Etki Mekanizması	29
2.4.2. Klorheksidine Azalmış Duyarlılık Mekanizması	31
2.4.3. Qac Atım Pompaları	31
2.4.4. İkili Sistem	33
2.4.5. Plazmid Kaynaklı Direnç	34
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>	<b>36</b>
3.1. İzolatların Eldesi ve Üretilmesi	36
3.2. Bakteri Tanımlanması	36
3.2.1. Kütle Spektrofotometrik Yöntemle Tanımlama	37
3.3. Antimikrobiyal Duyarlılık Profillerinin Belirlenmesi	37
3.3.1. Sıvı Mikrodilüsyon	37
3.3.2. Minimal İnhibitör Konsantrasyonun Belirlenmesi	38
3.4. Pulsed Field Gel Elektroforezi	40
3.4.1. Agaroz Gömme İşlemi	40
3.4.2. Hücrelerin Lizisi	40
3.4.3. Agaroz Kalıpların Temizlenmesi	41
3.4.4. Endonükleazlarla Kesim İşlemi	41
3.4.5. Jel Hazırlama ve Yükleme İşlemi	41
3.4.6. Elektroforez Sonrası ve Yorumlama	42
<b>4. BULGULAR</b>	<b>43</b>
4.1. Kolistin Duyarlılık Sonuçları	43
4.2. Klorheksidin Duyarlılık Sonuçları	44

4.3. Pulsed Field Jel Elektroforezi Klonal Analizi	47
<b>5. TARTIŞIMA</b>	50
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	55
<b>7. KAYNAKLAR</b>	50

## SİMGELER ve KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
µm	: Mikrometre
BAL	: Bronkoalveolar lavaj
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
CA-MHB	: Kalsiyum eklenmiş Mueller Hinton Buyyon
CCCP	: Karbonilsiyamid 3-klorfenilhidrazon
CHX	: Klorheksidin
CMS	: Colistimethate Sodyum
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DTA	: Derin trakeal aspirasyon
E.M	: Elektron Mikroskobu
EUCAST	: Avrupa Antimikrobik Duyarlılık Testleri Komitesi
IPTG	: İzopropiltiogalaktozid
IR	: Ters dönmüş Tekrar Dizileri
IRL	: Sol Ters Dönmüş Dizi
IRR	: Sağ Ters Dönmüş Dizi
IS	: İnsersiyon Dizisi
Kb	: Kilobaz
L-4-ARA-N	: 4-amino-4 deoksi-L-Arabinoz
MALDI-TOF MS	: Matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometrisi
MBC	: Mikrobisidal Konsantrasyon
MBL	: Metallo- β-laktamaz
MCR	: Hareketli Kolistin Direnci
MDR	: Çoklu Antibiyotik Dirençli Bakteri

MHB	: Müller Hinton Buyyon
MİK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MITE	: Küçük Ters Dönmüş Diziye Sahip Transposable Element
MLST	: Çoklu Lokus Dizilim Analizi
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Merkezi
NDM	: Yeni Delhi Metallo- $\beta$ -laktamaz
OD	: Optik Dansite
OXA	: Oksasilinaz
ORF	: Açık okuma bölgesi
PBRT	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tabanlı Replikon Analizi
pEtN	: Fosfoetanolamin
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TBE	: Tris Borik EDTA
Tn	: Transpozon
TSD	: Hedef kısım duplikasyonu
TIME	: Tn-3 Derivesi Ters Dönmüş Küçük Element
WGS	: Tüm Genom Dizisi
WT	: Vahşi Tip

## ŞEKİL ve RESİMLER

Şekil	Sayfa
1.1 Kolistin ve Polimiksin B'nin İki Boyutlu Yapısı	5
1.2 Membran Akışkanlığı ve Viskozitesi	7
1.3 Kolistin Etki Mekanizması	7
1.4 Checkerboard testi	9
1.5 Rezasurin – Resorufin Dönüşümü	13
1.6 LPS'ye L-4AraN ve pEtN eklenmesiyle beraber artan m/z değerleri	14
1.7 Kolistin Dirençli bakterideki LPS'ye pEtN eklenmesi	15
1.8 Kolistin Direnç Mekanizmalarından Sorumlu Genler	16
1.9 PmrCAB operonu ve dirençte sorumlu olabilecek mutasyonlar	19
2.0 CrrCAB ve PmrCAB ile ilişkisi	20
2.1 Gram negatiflerdeki Atım Pompa Tipleri	22
2.2 Mcr-10'un diğer mcr-10 içeren plazmidlerle benzerliği	25
2.3 Mcr-5'in olası aktarımı	26
2.4 Mcr-1'in olası orijini	27
2.5 Mcr-1'in tüm dünyada ki dağılımı	27
2.6 Klorheksidin İki boyutlu yapısı	28
2.7 Klorheksidin Olası Etki Mekanizması	29
2.8 Klorheksidin E.coli üzerine etkisi – E.M	30
2.9 Klorheksidin B.subtilis üzerine etkisi-E.M	30
2.10 Qac Atım Pompalarının Dağılımı	31
3.0 Klorheksidin ve AceR-I ve promotor/operon bölgesi	33
3.1 ChtR/S Mutant ve komplemantasyon sonrası mikroskobik Görüntüsü	34
3.2 QaCA4 içeren pAQZ1 plazmidi	35
3.3 Sınıf-1 integron içeren Tn402	35

3.4	Minimal İnhibitör Konsantrasyon değerlerin okunması	39
3.5	Pulsed Field Jel Elektroforez tankı	42
3.6	1 ile 13.izolatların PFGE görüntüsü ve standart suş	48
3.7	14-15. suşların PFGE görüntüsü ve standart suş	49
3.8	1-14 izolatlara ait dendrogram	49
3.9	Sıvı Mikrodilüsyonda Kullanılan Maddelerdeki Kolistin Yüzdesi	54

## TABLolar

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
1.1	Besiyeri Kalsiyum İçerikleri	11
1.2	Kolistin için Eşik Değerler	11
1.3	Kolistin Duyarlı ve Dirençli İzolat Sayısı	43
1.4	Kolistin Dirençli İzolatların Kendi İçerisinde Dağılımı	44
1.5	Kolistin Dirençli Gösteren İzolatların Servislere Göre Dağılımı	44
1.6	Klorheksidin Duyarlı ve Azalmış Duyarlı İzolatların Sayısı	45
1.7	Klorheksidin Azalmış Duyarlı İzolatların Kendi İçinde Dağılımı	46
1.8	Klorheksidin Azalmış Duyarlılık Gösteren İzolatların Bölümlere Göre Dağılımı	46

## 1. GİRİŞ

*Acinetobacter baumannii* non-fermenter, gram negatif kokobasil görünümünde olup, çevrede yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Gittikçe artan direnç profili ve yoğun bakımlarda özellikle ventilatör ilişkili pnomoni etkeni olması ve 2010'lu yıllarda, Hindistan'da ilk NDM (New Delhi Metallo- $\beta$ -Laktamaz)'nin üreten suşun izole edilmesinden sonra tüm dünyaya yayılmasıyla beraber daha da önem kazanmıştır.

Şu an için *A. baumannii* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde son kuşak antibiyotik olarak kolistin kullanılmaktadır. Kolistin, lipopolisakkarit içerisindeki negatif yükü fosfat gruplarıyla etkileşim sonucu lipopolisakkariti bir arada tutan kationların uzaklaşmasını sağlar ve ardından hücre içerisine girerek etkisini gösterir. İlk olarak Japonya'da üretilmesinden sonra tüm dünyada kullanılmaya başlanmıştır. Fakat ciddi böbrek ve nörolojik hasarlar bırakması gibi yan etkileri nedeniyle bir süre kullanım dışı kalmıştır. Ancak dirençli bakterilerin neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinde çaresiz kalındığı zaman son çare antibiyotik olarak tekrar kullanılmaya başlanmıştır. Bu beraberinde başka sorunları da getirmiştir. Aşırı derecede kolistin kullanımından sonra hızla direnç gelişmeye başlamıştır. Çin'de 2016 yılında artan kolistin direncinin sorumlusu olarak *mcr-1* içeren plazmid sorumlu tutulmuş olup dünyanın birçok yerinden bu ve benzeri gen dizisine sahip *mcr* içeren izolatlar tespit edilmiştir.

Klorheksidin, 1950'li yılların sonunda İngiltere'de kullanılmaya başlanan bir antiseptiktir. Kullanılmaya başlandıktan bir müddet sonra klinik izolatlarda azalmış duyarlılık saptanmıştır. Fakat yapılan çeşitli araştırmalara rağmen klorheksidinin etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Klorheksidin günümüzde hastanelerin çeşitli birimlerinde antiseptik olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Klinik izolatlarda azalmış duyarlılık saptanmasına rağmen etkin MİK değerleri ticari olarak satılan klorheksidin preparatları tarafından karşılanmaktadır. *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatları kullanılarak 2017 yılında yapılan bir çalışmada klorheksidin ile kolistin direnci arasında bir ilişki olabileceği düşüncesi ortaya atılmıştır. Bu çalışmada klorheksidine in-vitro artan maruziyet sonucu klinik izolatlarda kolistin direncinin ortaya çıktığı gösterilmiştir(1).

Bu araştırmada, yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen *A. baumannii* suşların klorheksidin ve kolistin duyarlılık profilleri ve aralarında var olabilecek bir ilişkinin sıvı mikrodilüsyon ve PFGE yöntemleriyle gösterilmesi hedeflenmiştir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter baumannii*, gram negatif kokobasil, katalaz pozitif, oksidaz negatif, zorunlu aerop, fırsatçı olan ve özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan bakteridir. Bu patojene ismini bakteriyolog Paul Baumann'dan esinlenerek verilmiştir. Bakteri flajelası olmamasına rağmen moleküler olarak hareket etmektedir. Bu hareketi salgıladığı eksopolisakkarit ile arkasında yüksek molekül ağırlıklı bir zincir oluşturarak, öne doğru yer değiştirerek sağlar(2).

*Acinetobacter. spp* en fazla *Moraxella. spp* ile karıştırılırsa da sitokrom oksidaz negatif ile ayrılabilir(90). DNA-DNA hibridizasyonu ile bugüne kadar 33 farklı *Acinetobacter spp* genomu bulunmuştur. Bunlardan genomtür-1 (*Acinetobacter calcoaceticus*), genomtür-2 (*A. baumannii*), genomtür-3, *Acinetobacter* genotür 13, birbirinden ayrılması güç olan fenotipik özellikler sergilediklerinden dolayı *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus kompleks* olarak adlandırılmıştır. Bunlardan *A. calcoaceticus*, daha çok çevresel kaynaklarda mevcutken ve daha az insanlardaki enfeksiyonlardan sorumluyken, *A.baumannii* ise daha çok insanlarda enfeksiyon yaparak klinik anlamı olan izolattır(3).

*A. baumannii* , ESKAPE (*E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter. spp*) patojenleri içersinde yer almaktadır(92). Bunun dışında, Amerika-Irak savaşı esnasında, Amerikalı askerlerin yara yeri enfeksiyonu etkeni olması nedeniyle “Iraqibacter“ olarak da isimlendirilmiştir ve buradan da tüm dünyaya yayılım olmuştur(4).

*A. baumannii* fenotipik olarak 44°C üremesiyle diğer *Acinetobacter. spp* ile de ayrılabilir. MacConkey, EMB (Eozin – Metilen Mavisı), kanlı agar besiyerlerinde kolaylıkla çoğalabilmektedir. Ayrıca *OXA-51* karbapenem direncinden sorumlu olan *A.baumannii*'de kromozomal olarak bulunmasından dolayı, polimeraz zincir reaksiyonu ile de saptanarak *A. baumannii*'nin tanımlanmasında kullanılabilir(5).

Bilindiği gibi, enfeksiyon hastalığına patojenlerin neden olabilmeleri için, öncelikle konağa tutunması gerekmektedir. *A.baumannii*'de OmpA isimli protein vasıtasıyla konağın epitelyum hücrelerine tutunmaktadır(6). Enfeksiyon oluşturmasındaki bir diğer önemli etken ise ortamda demir iyonlarının varlığıdır(7).

*A. baumannii*'de AbaR ismi verilen ve çeşitli antibiyotik direnciyle ilgili genleri kodlayan ve insersiyon sekanslarıyla çevrelenmiş patojenite adaları vardır(8).

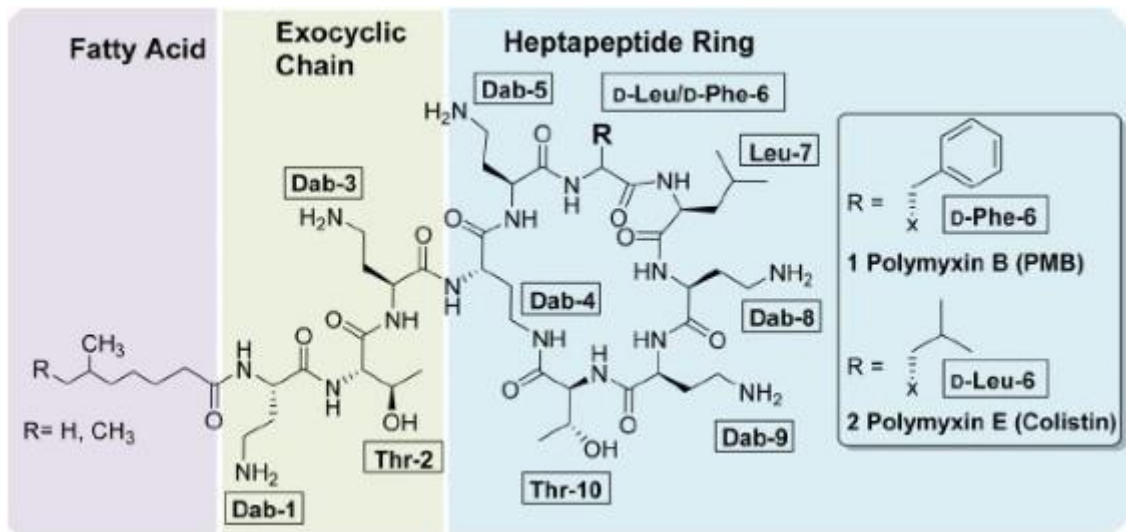
Bilindiği gibi antibiyotiklere direncin oluşmasında atım pompaları önemli rol oynamaktadır. *A. baumannii*'de bulunan ve AdeB olarak isimlendirilen atım pompası aminoglikozid direnciyle ilişkilidir(9). *A.baumannii*'de bulunan bir diğer atım pompası olan EmrB'nin kolistin direnciyle ilişkili olduğu ileri sürülmektedir(10).

## 2.2. *Acinetobacter baumannii* Kolistin Direnç Mekanizmaları

### 2.2.1. Kolistinin Tarihçesi ve Yapısı

Kolistin ilk defa *Bacillus polymyxa*'dan, Japonya'da izole edilmiş olup gram negatif bakterilerle oluşan enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır(11). Halen otuz kadar farklı polimiksin olmasına karşılık A'dan E'ye olmak üzere beş çeşit molekül klinik olarak daha fazla önem taşır. Kolistin, polimiksin E (6.aminoasit olarak lözin içerir) olarak da bilinmektedir. Polimiksin B (6.aminoasit olarak fenilalanin içerir) de aminoasit değişiklikleri dışında benzer moleküller yapıya sahip olup, etki mekanizmasının aynı olduğu düşünülmektedir(12). Kolistinin aktif ve ön ilaç formu mevcuttur. İlk defa 1959 yılında ön ilaç formu piyasaya sürülmüştür. Fakat 1970 yılında nefrotoksik ve nörotoksik olması nedeniyle kullanımı terk edilerek aminoglikozidler tercih edilmeye başlanmıştır. Antibiyotiklere direncin artmaya başladığı 2000'li yıllarda son çare olarak kolistine tekrar başvurulmuştur.

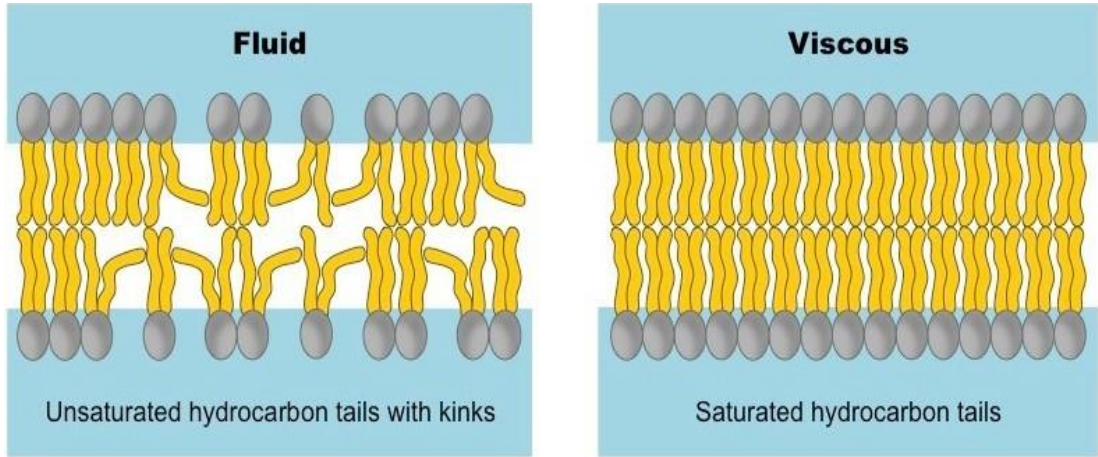
Kolistin altı L-Dab (diaminobutirik asit), yağ asidi ve yedi amino asit içeren peptid halkasına sahiptir. Polimiksin E ile B arasındaki fark;7 amino asit içeren halkanın 6. aminoasidinin sırasıyla lösin ve fenilalanin olmasından kaynaklanmaktadır(13).



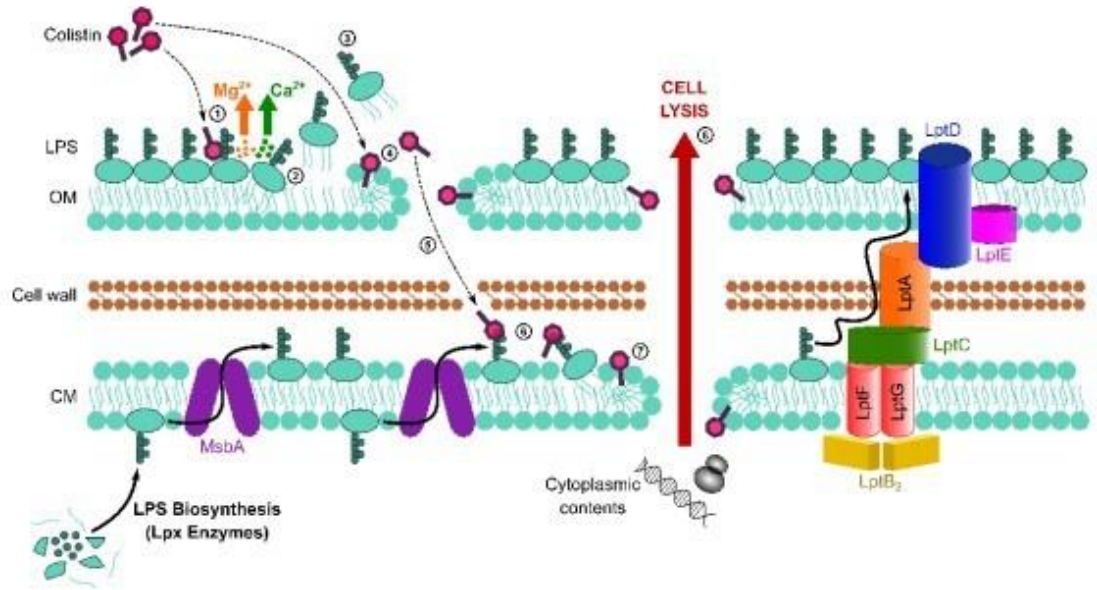
Şekil 1.1. Kolistin ve Polimiksin B'nin İki Boyutlu Yapısı(13)

### 2.2.2. Kolistinin Etki Mekanizması

Kolistin yapısındaki L-Dab'ın pozitif yüklü olmasıyla, negatif yüklü fosfat gruplarına bağlı magnezyum ve kalsiyum iyonlarının da üzerinde bulunduğu LPS ile etkileşmekte ve sonuç olarak magnezyum ve kalsiyum iyonlarını, fosfat gruplarından ayırarak dış membran stabilitesinin bozulmasına neden olmaktadır. Bir sonraki aşamada kolistinin hidrofobik kısımları olan yağ asidi kuyruğu ve yedi aminoasit içeren halkası dış membrandan içeri girer ve iç membran zarını geçerek hücre içerisine ulaşır(14). Kolistin, sadece gram negatif bakteriler üzerine etkili gibi gözükse de bazı gram pozitif bakteriler üzerine de etkili olabilir. Örneğin, *Bacillus polymyxa* üzerinede kolistin 80.000-160.000 IU/ml konsantrasyon ve üzerinde, hücre içeriğinin dışarı çıkarak ve hücre membranını parçalayarak etki eder(15). Magnezyum ve kalsiyum iyonlarının kolistin etkisi üzerindeki rolü bu iyonların dışardan eklenmesi yöntemiyle araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda kalsiyumun daha etkili olduğu gösterilmiştir. Böylesi bir etkinin olası nedeni ise, gram pozitif bakterilerin hücre duvarında daha fazla negatif yüklü teikoik asit mevcut olduğundan dolayı kolistinin etkili olabilmesi için daha yüksek konsantrasyonlar gerekmesi olabilir. Gram pozitif bakterilerin duvarının en dış kısmını oluşturan peptidoglikan tabaka, gram negatif hücre duvarına göre daha geçirgen olduğundan dolayı kolistin hücre içerisine de girebilir ve hücre içeriğinin dışarı çıkmasına da neden olabilir(15). Kolistinin bir diğer hedefi ise iç hücre zarındaki tip2-NADH-kinon-oksidoredüktaz enzimidir(16). Olası bir diğer mekanizma ise oksijen ya da hidroksi radikalleri üzerindedir. Hidroksi-radikalleri ve Fenton reaksiyonu, *A. baumannii*'nin, kolistin kaynaklı bakteri ölümünü artırmaktadır. Bu etki muhtemelen hidrojen radikal üretimini artıran ve kullanılan antibiyotiğe olan direnç durumuna göre değişen, ikili sistem sensörlerine bağlıdır. Bu ikili sensörlerin direkt olarak antibiyotik ile etkileşimini azaltmak için *Acinetobacter. spp*'de PetN, LPS'ye eklendiği gösterilmiştir(17). Bir diğer çalışmada ise, *A.baumannii*'de kolistinin 0,25 mg/L gibi değerlerde membran akışkanlığını artırdığı gözlemlenirken, artan dozlarda(2 mg/L) membranın dış kısmında akışkanlıkta bir azalma olduğu ve daha sert bir hale geldiği sonuç olarak hücre zarına zarar verip atım pompalarını etkileyerek akridin oranj atılımının azalması gösterilmiştir. Membran akışkanlığı (fludite), fizyolojik işlemlerin devam ettirilmesi için bakteri için çok önemlidir(17). Kolistinin etki mekanizması ayrıca Şekil 1.3'de gösterilmiştir(18).



Şekil 1.2. Membran Akışkanlığı ve Viskozitesi (<https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-1-cell-biology/13-membrane-structure/membrane-fluidity.html>)



Şekil 1.3. Kolistin Etki Mekanizması (18)

### 2.2.3. Kolistinin Etki Spekturumu

Başta *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter. spp*, *Citrobacter. spp*, *Salmonella. spp*, *Shigella. spp*, *Pseudomonas. spp*, *Acinetobacter. spp*, *Stenotrophomonas. spp*. başta olmak üzere gram negatif basillere etkilidir. *Morganella. spp*, *Providencia. spp*, *Proteus. spp*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia. spp*, *Legionella. spp*, *Brucella. spp*, *Neisseria. spp*, *Edwardsiella. spp*, *Campylobacter. spp*, *Vibrio cholerae*, *Chromobacter. spp*, *Hafnia. spp*. ve bazı anaerob bakteriler, kolistine karşı dirençlidir(19).

### 2.2.4. Kolistinin Farmasötik Formları

Kolistinin ön ilaç formu olan colistimethate-sulphate (CMS) ve aktif form olan kolistin farmakokinetik olarak birbirinden şu yönlerle farklıdır;

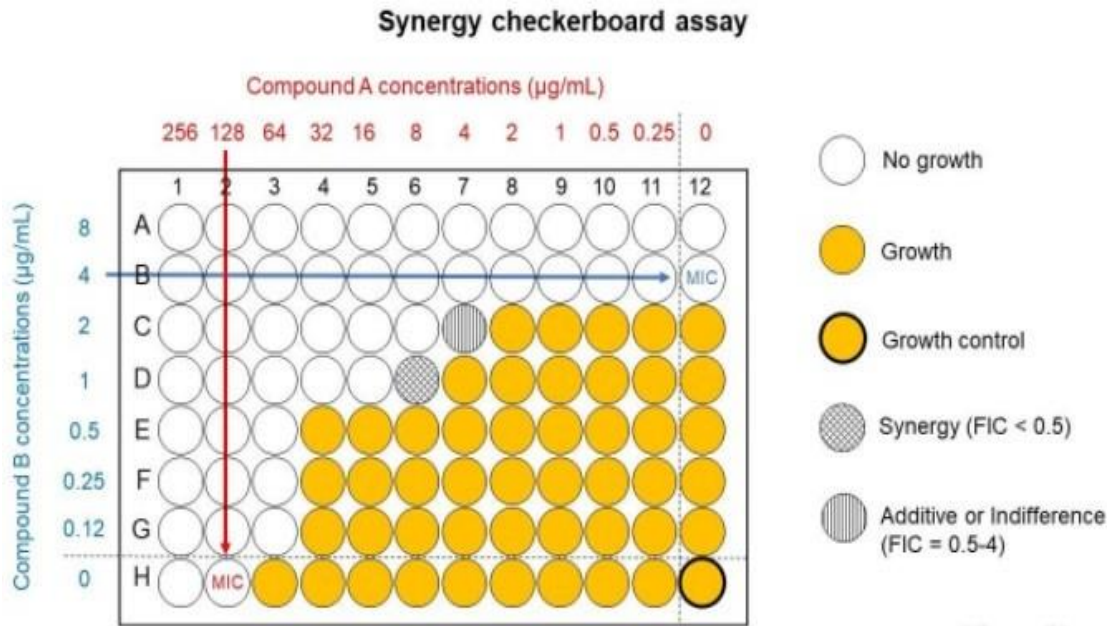
CMS aktif olmayan bir ön ilaç formu olup yıkıldığında metanosülfat ara ürünü ve kolistin açığa çıkmaktadır. CMS in vitro/in vivo olarak kolistinden daha az kararlıdır. CMS daha çok renal yol ile atılırken, kolistin ise hem renal emilime uğraması ve ekstra-renal yollarla atılması özellikleri ile farklılık göstermektedir(19). Bir diğer önemli farklılık ise kullanım yoludur. CMS parenteral yolla kullanılırken, kolistin topikal yolla kullanılmaktadır. Toksikite açısından da önemli farklılıklar vardır. CMS parenteral yolla kullanıldığında daha az toksik etkili olması geliştirilmesinin ana nedenidir.

CMS, *P. aeruginosa* 'ya karşı, kolistine göre iki ile dört kat daha az etkinliğe sahiptir. Ön ilaç olmasının dışında, CMS'in fizyolojik pH'da net elektriksel yükü -5 olurken, kolistinin ise +5 değerlidir, bu da LPS üzerine etki farkı yaratmaktadır (20).

Kolistinin, *Acinetobacter. spp*. için sırasıyla 1., 2., 3., 3.5. saatlerde post antibiyotik etkisinin yüksek MİK değerlerinde (16-32-64xMİK) olması nedeniyle klinik olarak post-antibiyotik etkinliği minimaldir(21, 22).

## 2.2.5 Time-Kill Deneyleri

Kolistin, bakteriler üzerine doza bağımlı olarak hızlı bir şekilde etki etmektedir. Diğer taraftan MİK değerlerinin 64 katı kadar yüksek bir değerde bile bakterilerin yeniden çoğalması, bir heterodirencin olduğunu göstermektedir. Aslında bu da kolistin ile tek başına yapılacak tedavide heterodirenç nedeniyle başarısızlık olabileceğini ve kombine tedavinin önemini göstermektedir(22). Kombine tedavi konusunda *mcr-1* üreten *E.coli* ile yapılan çalışmada, tek başına kolistin ya da kolistin-rifampin, kolistin-azitromisin kombinasyonunda sadece *E. coli* inhibisyonu daha başarılı olsalar da yeniden çoğalma göz önüne alındığı zaman kolistin-rifampin-azitromisin kombinasyon uygulamasında sinerji saptanmıştır(23).



Şekil 1.4. Sinerji testi (<https://emerypharma.com/biology/antimicrobial-synergy-study-checkerboard-assay>)

*Acinetobacter. spp.* ve *P. aeruginosa* ile yapılan sinerji testlerinde, kolistin-meropenem ya da kolistin-doksisiklin ya da kolistin-rifampisin sinerjistik olarak bulunmuştur(24). Diğer bir çalışmada ise kolistin-telavancin kombinasyonu, *A. baumannii* üzerine sinerjistik etkisi gösterilmiştir(25). Kolistin maruziyetinden sonra 24 saat içerisinde yeniden üreme gözlenirken, telavancin-kolistin kombinasyonunda yeniden üreme gözlenmemiştir(25). *A. baumannii* ile yapılan bir diğer çalışmada ise kolistin-doripenemin sinerji gösterdiği ve dokulara monoterapiye göre daha fazla zararlı olmadığı gösterilmiştir(26).

### 2.2.6. Kolistin Duyarlılık Testleri

Kolistin dirençli bakteriler genellikle ciddi hastane enfeksiyonlarına neden olur ve mortaliteleri yüksektir. Bu enfeksiyonlarda tedavinin doğru ve hızlı bir şekilde yapılması mortalite üzerine çok büyük etkilidir.

Kolistin direncinin saptanmasında kullanılan başlıca testler; mikrodilüsyon, agar dilüsyon ve makrodilüsyon testleridir. Bunun yanında disk difüzyon ve gradiyent testler de kullanılmaktadır.

Broth mikrodilüsyon (BMD), CLSI-EUCAST tarafından önerilen yöntemdir. İş gücü gerektirmesi, atlayan kuyucuk olması, kontaminasyona açık olması, kuyucukların yapılan maddeye göre duyarlılığın değişmesi gibi sorunları mevcuttur.

Makrodilüsyon prensip olarak mikrodilüsyon ile en yüksek uyumluluk gösteren yöntemdir.

Agar dilüsyon, mikrodilüsyon ile benzer sonuçlar vermesine rağmen iş gücü gerektirmesi bakımından uygulaması zordur. Bu nedenle BMD dışında herhangi bir yöntem önerilmemektedir([https://eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/General\\_documents/Recommendations\\_for\\_MIC\\_determination\\_of\\_colistin\\_March\\_2016.pdf](https://eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf)). Yukarıda sayılan üç yöntemde kullanılan besiyerleri çeşitli oranlarda magnezyum, kalsiyum, demir ve manganez içermekte olup bu bilgiler bir Tablo1.1-2 olarak verilmiştir.



**Tablo 1.1** Besiyeri Kalsiyum İçerikleri (19)

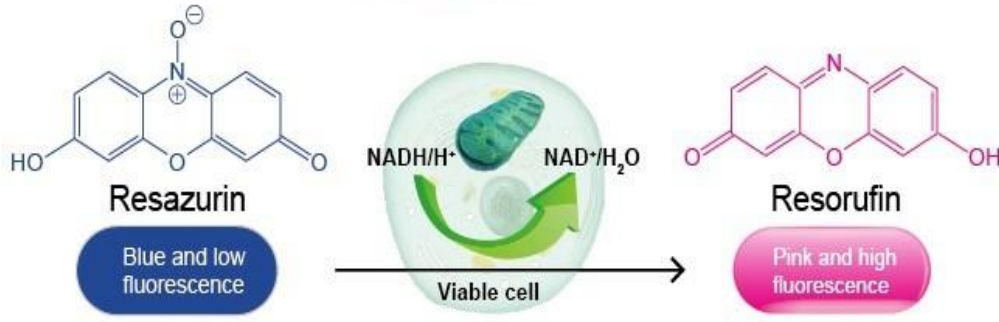
Besiyeri	Ticari Marka	Kalsiyum	İyon Konsantrasyonu (mg/L)			
			Magnezyum	Manganez	Demir	Çinko
MHB	Oxoid	3.1	3.9	<0.04	0.6	0.6
	Difco	2.4	2.5	<0.04	0.8	0.2
	Merck	2.1	0.6	<0.04	<0.5	<0.2
	Himedia	2.2	1.1	<0.04	<0.5	0.3
MHA	Oxoid	20.9	13.3	<0.09	<2.2	<0.7
	Difco	16.1	4.9	<0.09	<0.6	<0.7
	Merck	7.5	6.2	19.3	<2.2	1.1
	Himedia	25.3	31.2	<0.09	<2.2	<0.7
CLSI		20-25	10-12.5	-	-	-
Parametreleri						

**Tablo 1.2** Kolistin için Eşik Değerler (14)

Kriterler	Kolistin			Polimiksin B		
	MİK Kriterleri			MİK Kriterleri		
	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli
CLSI	≤2 mg/L	-	≥4 mg/L	≤2 mg/L	-	≥4 mg/L
EUCAST	≤2 mg/L	-	>2 mg/L	≤2 mg/L	-	>2 mg/L

### 2.2.7. Kolistin Direncine Yönelik Hızlı Testler

Kolistin hayati önem taşıyan bir antibiyotik kabul edildiği için, hızlı bir şekilde antibiyotik duyarlılık profilinin ortaya çıkarılması hastalar ve hastane enfeksiyon kontrolü açısından öneme sahiptir. Bu hızlı yöntemlerden bir tanesi, *Micromax* testidir. Bu yöntemde MHB'de 90 dakika eksponansiyonel faza kadar ulaşan bakteri daha sonra 60 dk kadar 0-0,5 mg/L kolistin içeren ortamda inkübe edilir. Bir sonraki aşamada ise bakteri agaroz içeren jele gömülür. Hücre artıkları ve zarar görmüş yapıları uzaklaştırmak amacıyla lizis çözültisi eklenerek ve SYBR gold ile boyanır. Hazırlanan preparat floresans veren mikroskop altında incelenir. Değerlendirmede DNA fragmanları ve intakt hücre oranı araştırılır. Temel amaç kolistin ile karşılaşan ve etkilenen bakteriden açığa çıkan DNA ve hücre içindeki DNA oranlarının karşılaştırılmasıdır. *Micromax* yönteminin *A. baumannii* kolistin duyarlılığı için duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %96-100'dür(27). Bir diğer test ise *Rapid-NP* test olup, 3.75 mg/L kolistin ve fenol kırmızısı içeren ortama yüksek miktarda bakteri ilave edilmesiyle sonuçlarının görsel olarak değerlendirilmesi esasına dayanır. Kolistin direnci olan suşlar, kolistin içeren ortamda çoğalacağından dolayı sarı renk gözlenmesi pozitifken, herhangi bir renk değişiminin olmaması ise negatif olarak yorumlanır. *Rapid-NP* testinin duyarlılık ve özgüllüğü %95-99 olarak belirlenmiştir. *Rapid-NP* testi kültür plaklarında üreyen bakterinin dışında, kan kültürü pozitif veren ve gram boyama özelliği doğrulanmış olan vasatlardan da doğrudan çalışmaya uygundur. *Rapid NP* testi 2-4 saat içinde sonuç vermektedir (28, 29). Bir diğer test ise kolistin varlığına rağmen, hayatta kalabilen dirençli bakterilerin varlığında rezasurin ve rezarufin dönüşümüne dayanan test olup duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %100-95 olarak bulunmuştur(30). Rezasurin'in rezarufine dönüşümü, Şekil 1.5`te gösterilmiştir.



Şekil 1.5. Rezasurin – Resorufin Dönüşümü (<http://www.abpbio.com/product/cell-viability-assay-based-on-metabolic-activity/>)

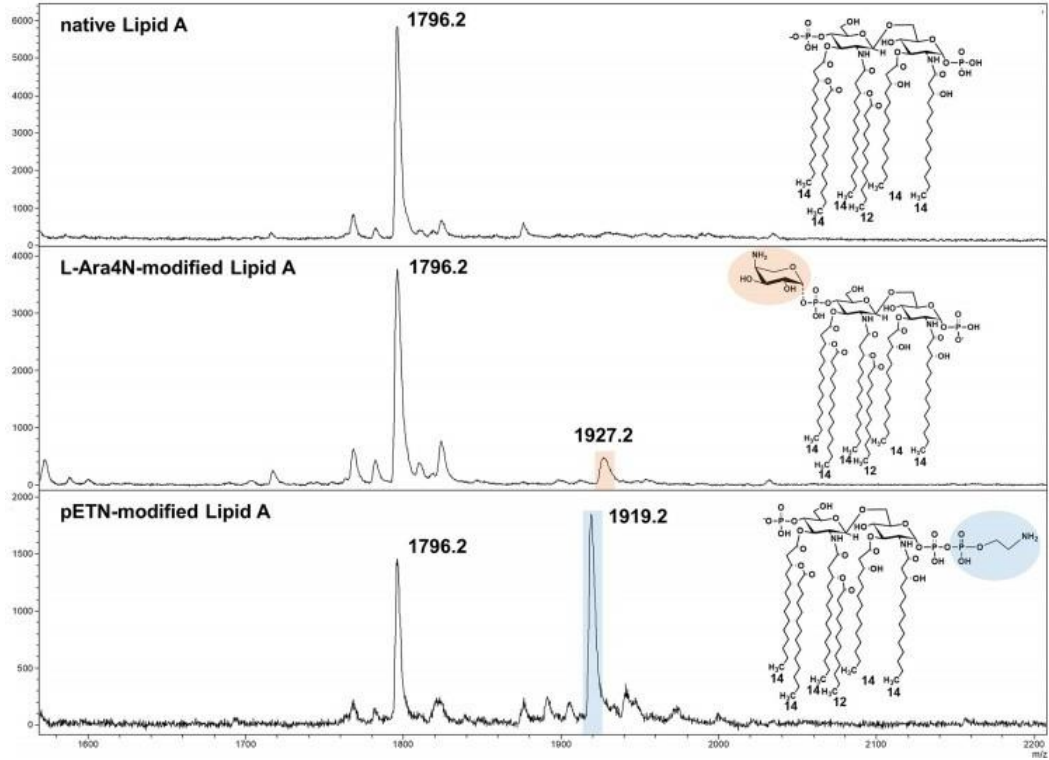
### 2.2.8. Kolistin Direncini Saptamada Seçici Besiyerleri

Kolistin direnci olan bakterileri saptamak amacıyla ticari maksatlı, besiyerleri geliştirilmiştir. Bunlardan ilk ikisi, CHROMAgar-COL-APSE agar ve CHROMID-Colistin-R agar olup, kolistin dirençli bakterileri saptama konusunda yüksek duyarlılığa sahiplerdir(31, 32). Bir diğer besiyeri ise SuperPolymyxin olup EMB agara 3,5 mg/L miktarında kolistin ilavesiyle oluşturulmuştur. Besiyerine ilave edilen daptomisin ve amfoterisin B ise kontaminasyonu engellemek için eklenmektedir. Besiyerinin kullanımının duyarlılık ve özgüllüğü %100'dür(33).

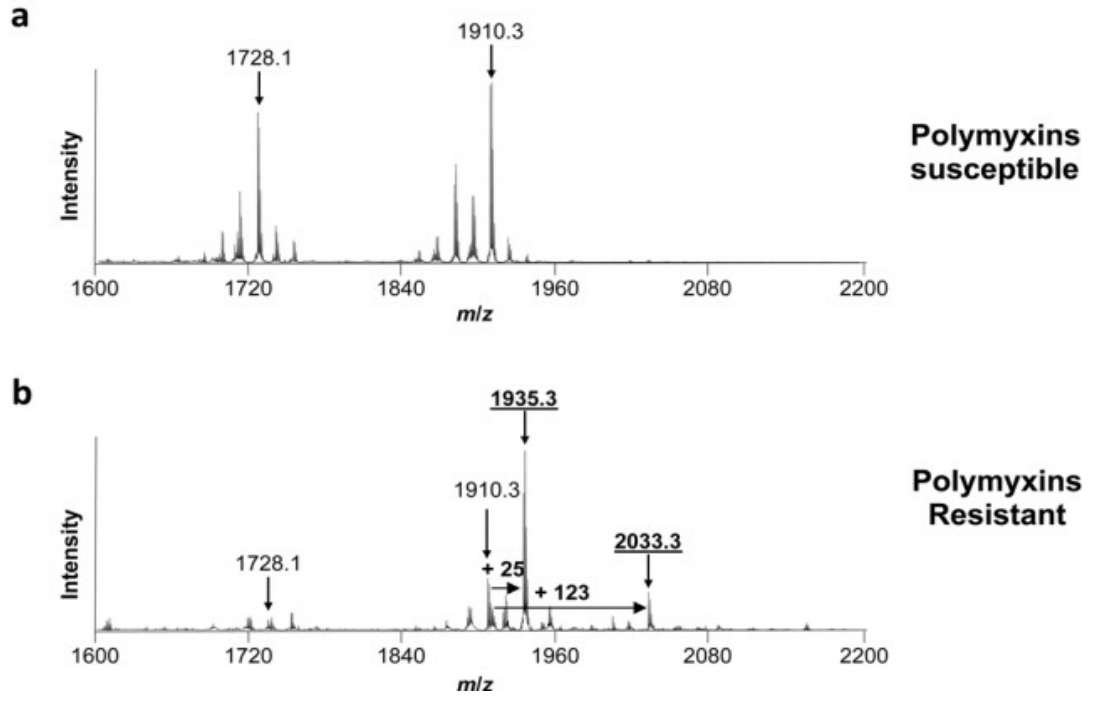
### 2.2.9. Kolistin Direncini Saptamada MALDI-TOF Kullanımı

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında, düşük rezolüsyonlu MS kullanılmaktadır oysa ki kolistin direncini saptayan kütle spektrofotometrisi yüksek rezolüsyonda çalışmaktadır. *MALDIXIN* yöntemi ise, düşük rezolüsyonlu MS kullanarak kolistin direncini saptayan bir yöntemdir. Bu yöntem *mcr-1,2,3,4,5* ve *8* ailelerini içeren *E. coli* suşlarının ve kromozomal kolistin dirençli *E. coli* suşlarının LPS piklerinde meydana gelen değişiklik saptamaya yöneliktir. Bu yöntemde kolistin-duyarlı *E. coli* ile suşlarının doğal LPS 1,796.2 m/z pik vermektedir. Buna karşılık *mcr* ailesi gen içeren *E. coli* suşları genlerin ekspresyonu sonucu ortaya çıkan pEtN-fosfotidiletanolamin'in LPS'e bağlanmasıyla 1,919.2 m/z'de pik vermektedir. Ancak bu pikin değeri pEtN'in, LPS'deki hangi fosfat (1-4')'a bağlandığına göre değişmektedir. Bir uç kısmına bağlandığı zaman +123 m/z'lik pik, LPS'nin 4' ucundaki fosfat bağına bağlı olması durumunda ise, 1 ucundaki fosfat gurbunun kopmasına ve +25 m/z'lik bir değer ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Diğer taraftan bir suş ise *mcr* içermeyip, kromozomal kaynaklı bir direnç geni

içermekte olan suşta 1,927.2 m/zde pik elde edilir ve bu da LPS'e L-4Ara-N eklenmesi sonucudur(34). *MALDIXIN* yöntemi *A. baumannii* ile yapıldığı zaman doğal-LPS'nin 1,728.1 m/z ve 1,910.3 m/zde iki adet pik veridiği görülmektedir. Bu farklılıklar muhtemelen , lipid zincirin uzunluklarından kaynaklanmaktadır. Deney sonuçlarında +25 m/z ve +123 m/z'lik değişim net bir şekilde görülmektedir(35).



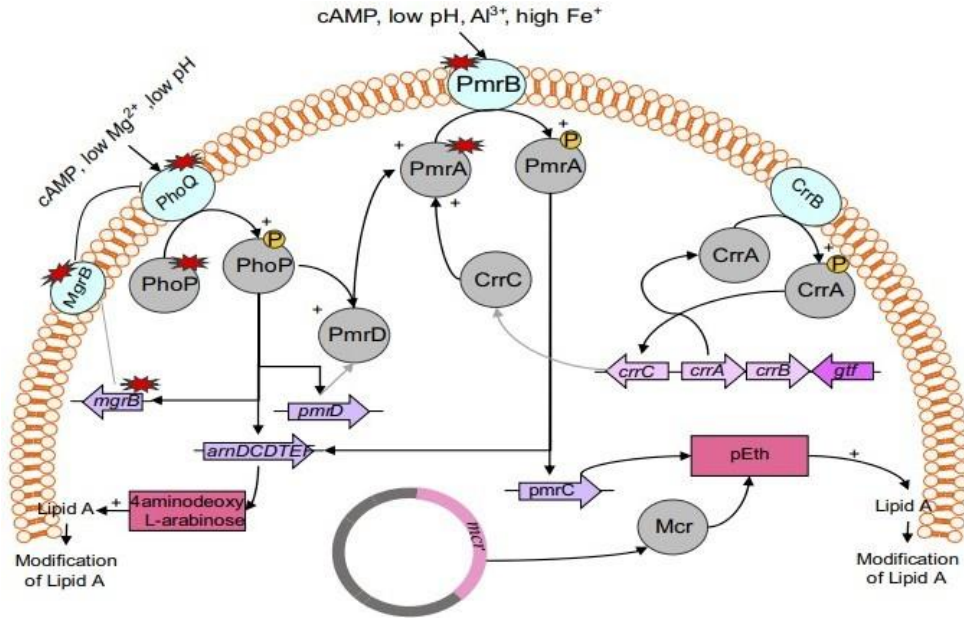
Şekil 1.6. LPS'ye L-4Ara-N ve pEtN eklenmesiyle beraber artan m/z değerleri (34)



Şekil 1.7. Kolistin Dirençli bakterideki LPS'ye pEtN eklenmesi , MALDI-TOF MSpikleri (35)

### 2.3. Kolistin Direnç Mekanizmaları

Kolistine olan direncin sebebinin tam olarak aydınlatılamamasına rağmen LPS modifikasyonu, kaybı, kolistini bağlayan kapsül mevcudiyeti veya kaybı, *mcr* türevi plazmid varlığı, atım pompası varlığı, doğal direnç gibi düzenlemeler kolistin direncinden sorumludur. Kolistin direncinden sorumlu genler Şekil 1.8`de yer almaktadır.(36)



Şekil 1.8. Kolistin Direnç Mekanizmalarından Sorumlu Genler (36)

Gram negatif bakterilerde, ortamlarındaki değişiklikleri algılayan histidin kinaz yada tirozin kinaz ailesinden olan PmrA/B, PhoP/Q, ColR/S, CprR/S, CrrB/A gibi çeşitli sensörler mevcuttur. Yukarıda görüldüğü gibi çeşitli değişkenlere karşı yanıt vermektedirler ve kolistinde bu çevresel faktörler arasında yer almaktadır. Bunlar dışında LPS sentezinde görev yapan genlerinde kolistin direncinden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Bu konuyla ilgili en dikkati çeken çalışma Moffatt ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yayınlanmıştır. Çalışmada kolistin duyarlı olan ATCC 19606 (kolistin için MİK 1mg/L) *A. baumannii*'nin, 10 mg/L-kolistin içeren besiyerinde ekimi yapıldıktan sonra, in-vitro mutant suş elde edildiği ve yapılan tüm sekans incelemelerinde histidin kinaz ailesinden olan *pmrA/B* genlerinde herhangi bir mutasyon saptanmadığı buna karşılık LPS sentezinde görevli *lpxA* geninde

translasyonu sonlandıran bir mutasyon saptandığı açıklanmaktadır. Mutasyona uğramış genin tekrar ana suşa aktarımı ile 128 mg/L'lik MİK değeri saptandığı ifade edilmektedir. Araştırmacılar *lpxA* geninin kodladığı enzimim önemini göstermek amacıyla SDS-PAGE yaptıkları zaman kolistin duyarlı bakterilerde gördükleri 6-10-kDA'luk bir bandın mutant suşlarda görülmediği saptamışlardır. LPS yokluğu limulus lizat testi ile teyit edilen çalışmada, kolistin direncinin LPS yokluğu ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. LPS tabakanın hasarını dolaylı gösteren bir başka yöntem ise NPN-floresans veren bileşiğin hücre içine alınmasıdır. Bu yöntemle kolistin dirençli varyantta, hücre zarının defektif olduğu gösterilmiştir. Hücre zarı defektif bakterinin kolistine dirençli iken diğer antibiyotiklere de olan duyarlılığın arttığı gösterilmiştir. Bunun dışında, lipid A sentezinde görevli *lpxA/C/D*'de görülebilecek mutasyonların kolistin direncine neden olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada klinik izolatta *lpxD*'de geninde, insersiyon-sekans ailesinden *IS4-benzeri* bir hareketli genetik elemanın'ın neden olduğu gen kesintinin olduğu dizileme ile gösterilmiştir(37).

Bir diğer çalışmada bir dış membran proteini olan OprH'nin *P. aeruginosa*'da, LPS'in divalan katyon bağlayan kısmına bağlanarak, polimiksinlerin bağlanmasını engellediği ve direncin tek nedeni olmadığı, gelişmesine olanak sağladığı ileri sürülmektedir(38).

### 2.3.1. Kolistin Doğal Direnci

*Photobacterium. spp, Providencia. spp.ve Serratia. spp.* kolistin için doğal dirençli olduğu bilinmektedir. Bu mekanizmalaradan bir tanesi ise *eptC* (fosfoetanolamin transferaz) genidir. Bu gen *Enterobacterales* ailesine özgül değildir; fakat yukarıda zikredilen cinsler içerisinde %75-77 oranında benzerlik göstermektedir. Doğal dirençte pEtN'in LPS'ye eklenmesi aracı yollardan bir tanesidir(38). Bir diğer yol ise L-4Ara-N'in LPS'ye eklenmesi olup, MS çalışmasında 131 m/z'lik artış L-4Ara-N değişimini göstermektedir(39-41).

*Burkholderia. spp.*de ise MS incelemesinde 131 m/z'lik bir farkın olması L-4-Ara-N'in lipidA kısmına eklendiğini ve bunun da kolistin için doğal direnç oluşmasında etkisi olduğunu göstermektedir(42). Bakteride *arn* tarafından kodlanan L-4-Ara-N'in LPS üzerinde olmaması durumunda hücre zarı geçirgenliği artmakta

olduğu gösterilmiştir(43). Bunun dışında, *rpoE*, *NorM* (atım pompası), *ispH* (izoprenoid sentezi ile ilgili gen), *hpnJ* (hapnoid) gibi genlerinde kolistin direncinde rolü olabileceği ifade edilmiştir(44).

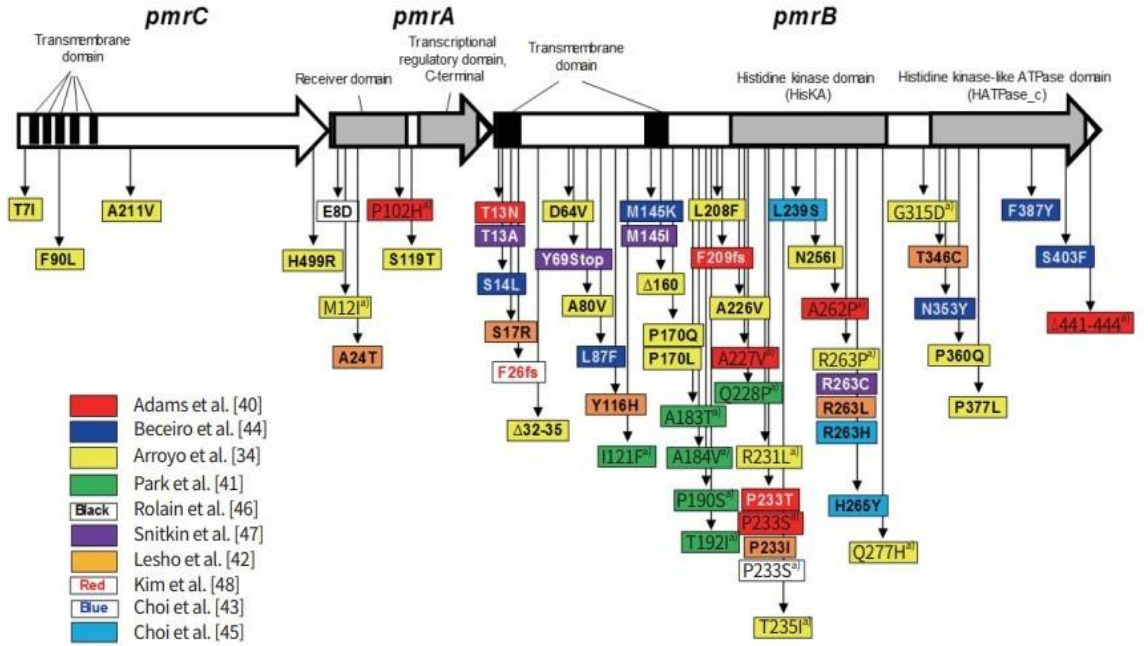
*Hafnia alvei* ve *Hafnia paralvei* ile yapılan incelemede, suşların önemli bir kısmında kolistin direnci saptanmıştır. İleri çalışmalarda PFGE ile klonal olarak farklılık göstermekle birlikte 16s-rRNA dizileme ve LeBiBi ile yapılan analizde *Hafnia alvei* (4 farklı PFGE tipi) ve *Hafnia paralvei* (10 farklı PFGE tipi) aynı kökenden geldiği gösterilmiştir. Klonal farklılığın olmasına karşılık aynı kökenden gelmeleri kolistin direncinin kromozomal olması lehine olarak yorumlanmaktadır. Bu durum *H.alvei* ve *paralvei*'nin doğal dirençli olabileceğini göstermektedir(18). Bir başka çalışmada ise *Hafnia. spp*'nin, kolistin doğal dirençli olan *Serratia. spp* ve *Providencia. spp* ile olan ilişkileri de gösterilmiştir(19). Bu sonuçlar ışığında, *H.alvei* ve *Hafnia paralvei*'nin kolistin dirençli olması muhtemeldir.

### **2.3.2. Kolistine Kazanılmış Direnç**

Kolistine karşı doğal dirençli olan bakteriler de çeşitli mekanizmaların direnç oluşumunda rol oynaması gibi kazanılmış dirençte de çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır.



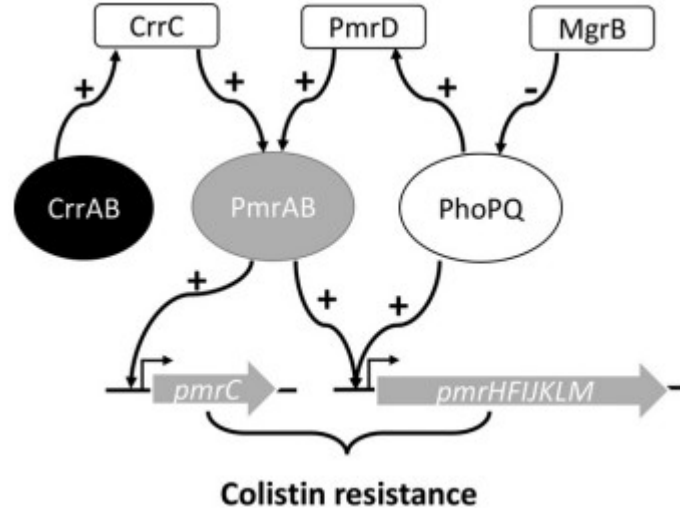
### 2.3.3. PmrC/A/B Sistemi



Şekil 1.9. *pmrCAB* operonu ve dirençte sorumlu olabilecek mutasyonlar (101)

Yukarıda, *pmrCAB*'ye ait operon gösterilmiştir ve sırasıyla *pmrC*, *pmrA* ve *pmrB* kodlar. *PmrB* (histidin kinaz/BasS) ailesindedir. *PmrB* bakteri çevresindeki katyonik peptid, düşük pH, yüksek demir içeriği, düşük alüminyum gibi çevresel değişiklikleri algılar ve *PmrA*'yı fosfatlayarak aktif hale getirir. *PmrA* (BasR/regülatör) *pmrC*'yi aktif hale getirilir. *PmrC* fosfoetanolamin transferaz olup, LPS'ye pEtN (katyonik)'yi ekler ve +5 değerlikli olan kolistini, elektriksel olarak kendisinden uzaklaştır aynı zamanda hücre zarını daha hidrofobik hale getirir. *A. baumannii*'de bu yol geçerlidir. *PmrCAB* yolunu düzenleyen başka bir yol ise *crrABC* yoludur ve site-directed mutagenesis ve komplementasyon deneyleri sonucu, *crrA/B*'in, *pmrCAB*'yi pozitif yönde etkileyerek kolistin direncinden sorumlu olduğu yönünde bilimsel görüşler de vardır. SMART tool yardımıyla olası mutasyonların histidin kinaz ve transmembran kısımlarında olduğu ve *crrB*'nin otofosforilasyonu ve konformasyonel değişikliğini indükleyebileceğine gösterilmiştir. Çalışmada *crrC*'nin de kolistin direncinde rol aldığı, bu gen bölgesinin *Enterobacter. spp* ile %45

aminoasit benzerliği olduğu ve transport yapan bir protein olduğu tahmin edilmektedir. Ancak TrSSP tool'a göre böyle bir görev yapabilecek spesifik substrat saptanamamıştır. Fakat *crrC*'nin *crrAB* ile *pmrAB* sistemleri arasında bağlantı kurduğu tahmin edilmektedir(45). *pmrC* ve *pmrHFIJKLM* arasındaki ilişki Şekil 2.0'de gösterilmiştir.



Şekil 2.0. *crrCAB* ve *pmrCAB* ile ilişkisi (45)

#### 2.3.4. PhoP/Q SİSTEMİ

Bir diğer ikili sistem ise *phoPQ* sistemi olup, tirozin kinaz ailesindedir. PhoQ bakteri makrofaj fagozomu içinde veya serbest halde iken düşük pH, düşük magnezyum düzeyini algılar ve *phoP*'yi fosfatlayarak aktif hale getirir. Hücre içine magnezyum alımı, hücre stresiyle, virülans ile ilgili olan genleri düzenleyerek, bu gibi şartlar altında bakterinin hayatta kalmasını sağlar. Kolistin direnciyle olan kısmı ise, *pmrHFIJKLM* operonunun transkripsiyonunu ve dolayısıyla LPS'ye L-4AraN (arabinoz-katyonik) eklenmesini sağlar. Bunun dışında *pmrD* (mediator) *phoPQ* ve *pmrCAB* operonunun arasındaki ilişkiyi sağlar. Bu yolun düzenleyicilerinden bir tanesi *mgrB* (YobG) olup, *phoP*'nin aktif olması *mgrB*'yi de aktifler. *MgrB* (repressör) ise PhoPQ sistemini baskılamaktadır. *mgrB*'de işlev bozukluğu yaratan mutasyonlar ikili sistemin aktif hale getirerek *pmrHFIJKLM* (*pmrF*, *pbg*, *arn*) operonunu aktif hale getirmektedir ve *mgrB* genine *IS4*, *IS10* gibi ailelerden -35, -

10 gibi promotor bölgeleriyle *mgrB* gen bölgesi arasına girdiği ve genin işleyişinde bozukluğa yol açtığı (insersiyonal inaktivasyon), ayrıca başka izolatlarda non-sense mutasyon olduğu ve yine bunun da *mgrB* geninin işleyişini etkilediği gösterilmiştir(46).

### 2.3.5. Genel Düzenleyiciler

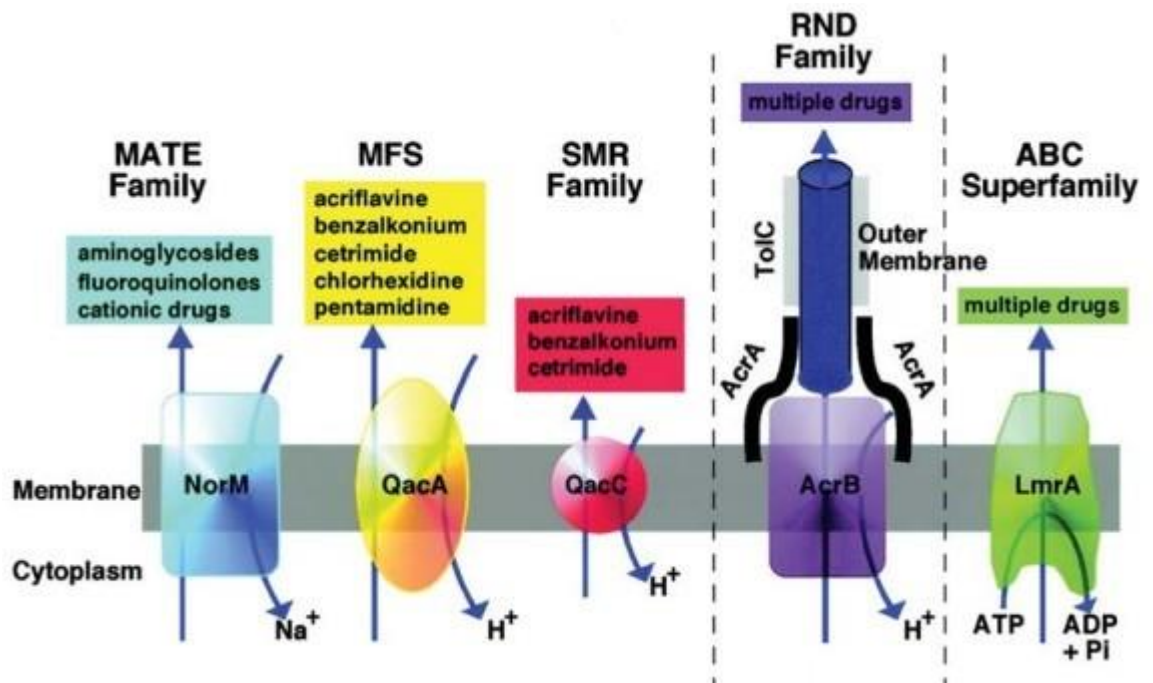
Antibiyotiğe özgü genlerin dışında, hücre içerisindeki strese ve antimikrobiyal kullanımına göre değişkenlik gösteren protein kodlayan genler mevcut olup bunlar; *ramA*, *rob*, *rara*, *soxS*, *marA*'dır. RamA en çok çalışılmış olanlarındandır. LpxC-L2-O gibi genlere bağlanarak LPS modifikasyonu yapar. AcrAB atım pompasını artırır ve OmpF, porin proteinini azaltarak antimikrobiyal dirençte rol oynar. MALDITOF-MS ile hiperaktif RamA'nin hidroksillenmiş lipid A yapılarını göstererek, LPS'in yapısının değiştiğinin, artan *m/z* değerleriyle, polimiksin B'ye de azalmış duyarlılığa neden olduğu ifade edilmektedir(47).

### 2.3.6. Atım Pompaları

KexD, RND-ailesi grubundan bir atım pompasıdır. Kolistin dirençli *crrB* mutant-*K. pneumoniae*'de bu atım pompalarının ifade düzeyi arttığı çalışmalarda gösterilmiştir. Diğer taraftan fenilalanin *arjinin-beta-naftilamid* atım pompası inhibitörü olup kullanıldığı zaman bakterinin atım pompalarının devre dışı kalması sonucu kolistin MİK değeri 1.024 mg/L'den 256 mg/L'ye düştüğü gösterilmiştir. Bu bulgu KexD'nin kolistin direncine katkıda bulunduğunu göstermektedir(48).

Bir diğer pompa ise *H239\_3064* olup, aynı zamanda tigesiklin direncinde de rol oynamaktadır. Kolistin dirençli *crrB* mutant bakteride ilgili gen bölgesinin silinmesiyle EtBr'nin dışarı atılması azalmakla beraber, floresansın artması ise bize bunun bir RND tipi atım pompası kolistin direncinde rolü olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan *crrB* ile *H239\_3064*'ün operon olarak birlikte transkribe edildiği gösterilmiştir(49). *K. pneumoniae*'da, AcrAB deterjan, boyaların atılmasından sorumlu pompadır. Bu atım pompasının AcrR (repressör) ve AcrB (sitoplazmik membran domain) kısımlarında yapılan mutasyonların fluorokinolonlar ve  $\beta$ -laktamlarda duyarlılıkta azalma buna karşılık polimiksine karşı artan duyarlılığa neden olduğu gösterilmiştir(50).

*A. baumannii*'de in-silico ve in-vitro testler sonucunda *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'da EmrB ve EmrA atım pompasına ait bir diğer protein incelendiğinde %50 ve üstü aminoasit benzerliği içerdiği saptanmıştır. Bu da genlerin mevcut olan diğer bakterilerde yakın dizilimi aynı operonda olabileceği düşüncesi akla getirmiştir. Bunu kanıtlamak için qPCR yapılarak cDNA ve gDNA elde edilmiş ve aynı boyutta olmuş olması genlerin birbirine yakın olduğunu ve birlikte transkribe edildiğini göstermektedir. Spot-assay'de ise daha önceden hazırlanan mutasyona uğratılmış *emrB* içeren atım pompasını içeren suşun kolistin duyarlılığının az olduğu ve kolistin içermeyen ortamda ise vahşi tipe göre herhangi bir büyüme defekti göstermemesi, *emrAB*'nin kolistin direncinden sorumlu olabileceğini göstermektedir(51). Bir diğer çalışmada, *Yersinia. spp*'de *rosA/B*'nin hücre sıcaklığının 37 °C'de olması ve polimiksin varlığında ifade yüzdesinin arttığı ve hem sitozölü asidifiye ettiği bununda katyonik peptidlere (polimiksin) karşı koruduğu hem de atım pompası vasfıyla polimiksini hücre dışına attığı gösterilmiştir(52). Gram negatif bakterilerdeki atım pompası aileleri Şekil 2.1'de gösterilmiştir(53).

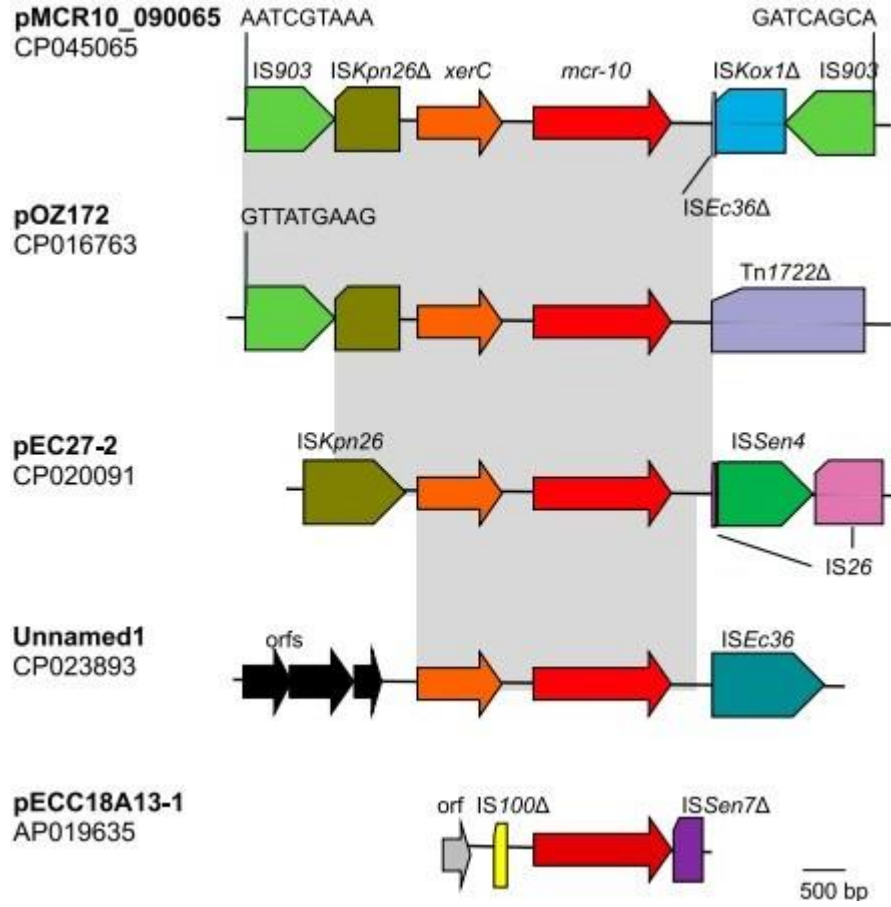


Şekil 2.1. Gram negatiflerdeki çeşitli atım pompa tipleri (53)

### 2.3.7. Mobile Colistin Resistance (MCR)

İlk plazmid kaynaklı kolistin direnci ile ilgili araştırma 2015 yılında yayınlanmadan önce sadece kromozomal kaynaklı bir direncin olduğu düşünülmekteydi. Fakat Çin'deki hayvan ve domuz çiftliklerindeki kolistin direncinin giderek artması ve *E. coli* için kromozomal kolistin direncin mevcudiyetinin nadir olması üzerine 2011-2014 yılları arasında sürveyans çalışması başlatıldı. Bu çalışmada kolistin- MİK değeri 8 mg/L olan *E. coli* suşu kullanılarak plazmid ayrılarak dizilemeye alınmıştır. Dizileme sonucu, 64-kb'lık, 60 adet ORF içeren IncI2 tipi plazmid olduğu anlaşılmıştır. Plazmidin 57kb'lık kısmı gen transferi, replikasyon genleri ve düzenlenmesi ile ilgili olduğu anlaşıldı. Plazmid üzerinde 1626bp'lık ve %46 GC oranına sahip kısmına *mcr-1* ismi verildi. Gen dizisinde ifade edildiği gibi plazmid transferiyle ilgili proteinlerin olması ve *in-trans*'ın olması plazmidin suşlar (*Klebsiella. spp* ve *Pseudomonas. spp*) arasında aktarılabildiğini ve oldukça yüksek bir frekansa sahip olduğu ortaya koymuştur. Çalışmanın devamında, 1322 adet *E. coli* ve *K. pneumonie* içeren klinik suşlar toplandı ve 16 tanesinde *mcr-1* saptandı. Daha sonra yapılan aminoasit dizi incelenmesiyle *Paenibacillus sophorae*'nin fosfoethanolamin transferaz (*eptA*) ile %63 gibi bir homoloji göstermesinin dışında *Moraxella. spp* ile %59 uyumluluğu *mcr-1* ile *eptA* ile aralarında yakınlık olduğunu göstermektedir. Kolistin-üreten bakteriden, *E.coli*'ye bir genetik transferi de göstermektedir. I-Tasser ile yapılan, protein homolojisini gösteren çalışmada ise *Neisseria. spp*'nin *lptA* ve *Campylobacter. spp*'nin *eptC*'si (her ikisi de fosfoethanolamin transferazdır) ile en yakın akraba olarak gözükmektedir. İsmi geçen enzimlerin katalitik aktivitelerinden sorumlu olan aminoasitlerinde *mcr-1*'de var olması işlevsel olarak da yakın ilişki içerisinde olduğunu göstermektedir(54). En son olarak *mcr-10*, *E. roggenkampii*'de kolistin MİK değeri 2 mg/L olan bir izolatta elde edildi ve *mcr-9*'a aminoasit benzerliği %83 olduğu gösterildi ve *in-trans* ile duyarlı bir *E. roggenkampii* suşu ile yapılan gen klonlama işleminde, kolistin MİK değerleri sırasıyla 1-4 mg/L olarak bulundu. Bu da kolistin direncinden sorumlu olduğunu göstermekle beraber *mcr-10*'un indüklenebilir olduğunu göstermek için laktoz-IPTG uygulanmasından sonra indüklenme görülmemiştir. Ana suş, WGS'ye tabii tutulduğunda, 2 adet 10 kb ve 71 kb'lık iki adet plazmid mevcut olduğu görüldü; fakat tekrarlanan konjugasyon çalışmalarında, herhangi bir *mcr-10* geninin aktıramadığı saptandı. Saptanan

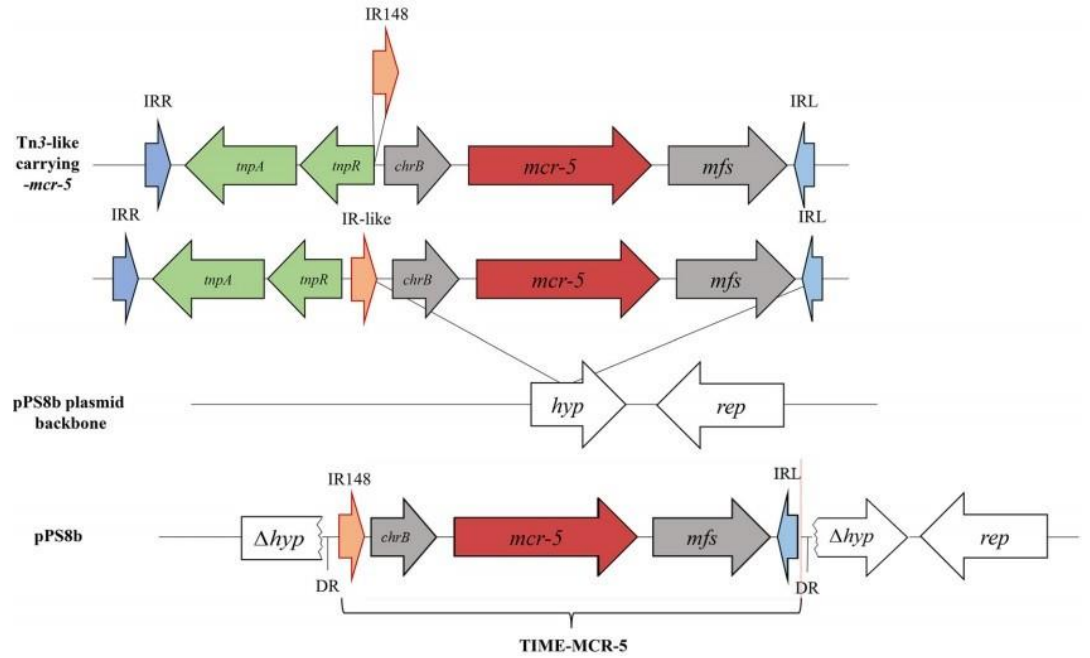
71kb'lık plazmid içinde, konjugasyon ilgili olan bir gene rastlanmaması sonucunda plazmidin aktarılma yeteneğinin olmadığı gösterildi. Yapılan elektroporasyon ile transkonjugat elde edilmesi sonucu *mcr-10*'un plazmid kaynaklı olduğunu göstermiştir. Daha sonra ulusal tıp kütüphanesi (NCBI) incelendiğinde *mcr-10* benzeri genlerin çeşitli suşlarda olduğu saptanmıştır. Daha sonra yapılan filogenetik analizde ise *mcr-9*, *mcr-10* ve *mcr-B*'nin diğerlerinden ayrı bir küme içerisinde yer aldığı, *mcr-B* ise *Buttiauxella brennerae*'nin kromozomunda yerleştiği izlenmiştir. Dolayısıyla *mcr-10* buradan kaynaklanmış olabileceği düşüncesi ortaya atılmıştır. Yapılan 3D-modelde ise *mcr-1* ile *10* ve *B*'nin katalitik kısımlarının korunduğu gözlenmiştir. Araştırma sonucunda *mcr-10*'un 5' ucunda (upstream), XerC-tipi tirozin rekombinaz olduğu görülüyor (site-spesific rekombinasyon yapabilir ve *Enterobacter. spp* içerisinde yaygındır) rekombinasyonun bundan kaynaklanmış olabileceğini gösteren durum bu olmasına rağmen, mevcut plazmidin her iki uç kısmında *IS903*'ün olması ve TSD'lerin farklı olması nedeniyle, *IS903*'kaynaklı bir insersiyon olması ihtimalini azaltmakta olduğu sonucuna varılmıştır(55). *Mcr-10* gen kıyaslaması Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.2.** *mcr-10*'un diğer *mcr-10* içeren plazmidlerle benzerliği (55)

Kolistin direnci ve *mcr-1-5* bağlantısını araştıran bir başka araştırmada ise domuz dışkılarından izole edilen 147 adet *E. coli*'nin 35'inde kolistin direnci saptanmıştır. Kolistin dirençli izolatlardan 15 tanesinin *mcr-1* ve 8 tanesinin *mcr-5* taşıdığı gösterilmiştir. Yapılan laboratuvar çalışmalarında farklı PFGE patternlerine sahip olmalarına rağmen, MLST sonuçları aynı orijinden geldiklerini göstermiştir. Transkonjugasyon sonrası plazmid analizi yapıldığında, *mcr-1* içeren suş IncH2 tipi plazmid içerirken, *mcr-5*'te ise konjugasyon sonucu herhangi bir plazmid saptanmaması üzerine yapılan elektroporasyon ile *mcr-5*'in *E.coli*'ye aktarımı sağlanmıştır. Çalışmanın devamında PBRT ile tiplendirme işlemi *mcr-5*'in 6kb'lık bir plazmid içerisinde 3810-bp'lik bir kasetin içerisinde yer aldığı ortaya çıkarılmıştır. Araştırmacılara göre bu kaseti çevreleyen AATTA dizisinin her iki uçta olmuş olması bunun bir yatay gen aktarım sonucu olduğunu akla getirmekte ise de diziyeye bakıldığında herhangi bir transposoz gen göze çarpmamaktadır. Diğer taraftan plazmidin 3' ucunda, *Tn3* ailesine ait olan IRL dizisi göze çarpması, IRR dizisinin

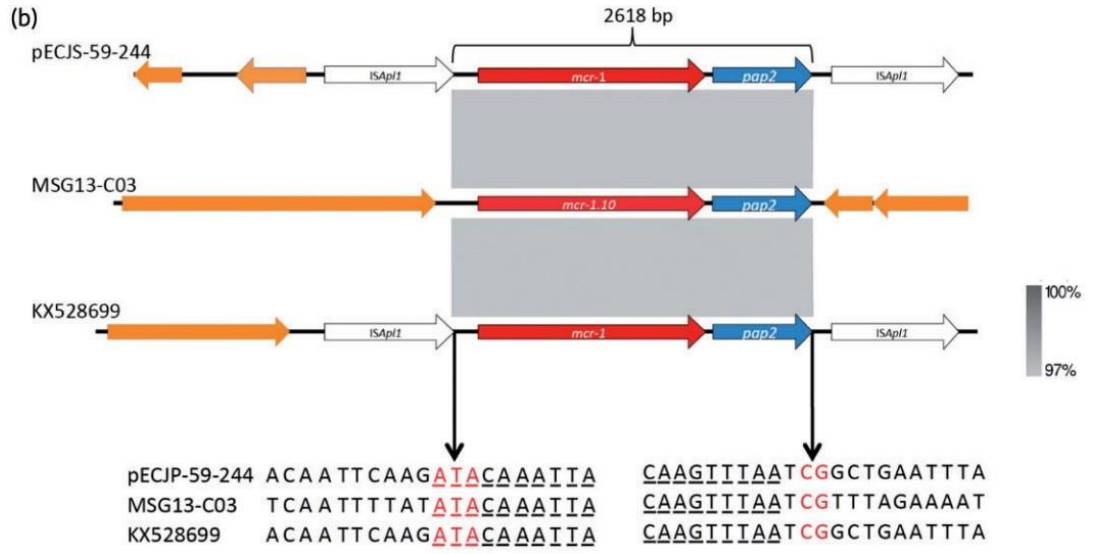
yerine 148bp uzunluğunda bir dizi 5bp'lik TSD'in alt kısmında (downstream) yer alması bunun mobilizasyondan sorumlu olabileceğini göstermiştir. In-silico olarak yapılan araştırmada 148bp'lik kısım *mcr-5* taşıyan başka bir suşun IRL kısmı ile %85 nükleotid benzerliği göstermesi *mcr-5* içeren plazmidin bir MITE olduğunu göstermiştir. Doğrulayan testlerde, *E. coli* (alıcı) ve *mcr-5* içeren başka bir plazmid ve transposozom içeren başka plazmidle beraber yapılan klonlama sonucunda, alıcı hücre üzerinde *mcr-5* 'in gözükmesi, konjugasyonun neden olmadığını ve bunun bir MITE olduğu düşüncesini doğrulamıştır (56). *Mcr-5*'in tahmini gen aktarımı Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.3.** *mcr-5*'in olası aktarımını (56)

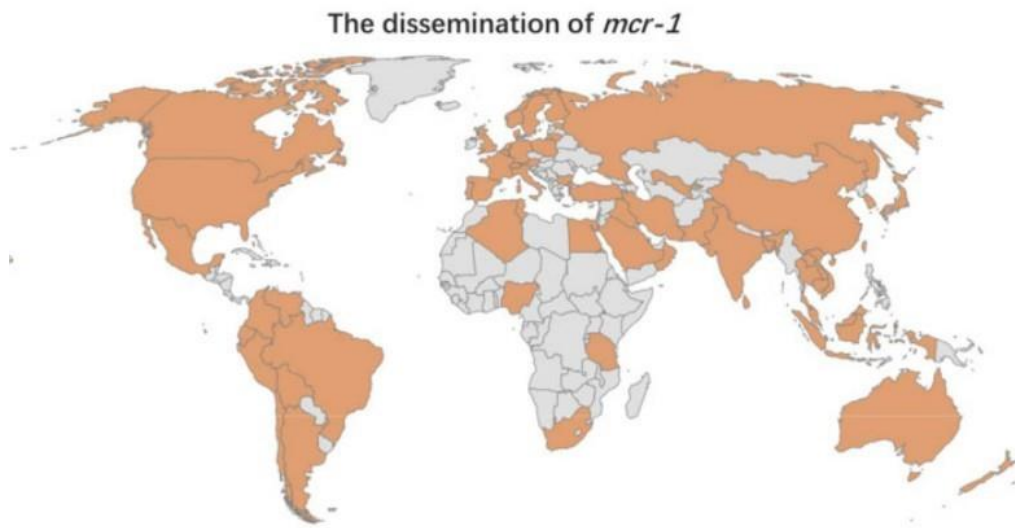
İngiltere'de 657 adet gram negatif bakteride yapılan çalışmada, *E. coli* plazmidini PECJS-59-244 ile *Moraxella. spp*'nin kromozomuyla karşılaştırılmıştır. Bulunan çok yüksek oranda genetik içeriğin benzerliği ve transpozon'un her iki uç kısımlarında üçlü ve ikili korunmuş bölgelerin olması, *mcr*'nin *Moraxella. spp.*'den kaynaklandığının bir diğer göstergesi olabilir düşüncesini oluşturmuştur(57). *mcr-1*'in olası orijini Şekil 2.4'de gösterilmiştir.





**Şekil 2.4.** *mcr-1*'in olası orijini (57)

Yapılan araştırmalarda *mcr* gruplamasının yapılmasında mevcut aminoasit benzerlik cut-off değeri %88-96 olmasına rağmen karışıklık olmaktadır. Bu nedenle, araştırmacılardan diziledikleri yeni *mcr* varyantlarını dergilere göndermeden önce NCBI'ya gönderip, değerlendirilmesini önermektedirler(57, 58). Ülkemizde ise *mcr* kaynaklı kolistin direnci daha çok *mcr-1* ile ilgilidir(59).



**Şekil 2.5.** *mcr-1*'in tüm dünya genelinde dağılımı (58)

## 2.4. Klorheksidin

İlk kez 1950'li yıllarda, İngilterede keşfedilen klorheksidin (CHX), renksiz, kokusuz olup daha çok alkol ya da povidin iyot ile kombine kullanılmaktadır. Fizyolojik pH'da +2 değerlikli yüke sahip bazik bir bileşiktir. Düşük dozlarda, bakteriyostatik etkiliyken, yüksek dozlarda ise bakteriyosidal etkinliğe sahiptir. Bunun dışında virosidal, fungisidal ve bazı protozalara da etkinliği mevcuttur. Başlıca oral hijyen, topikal antiseptik, katater girişim öncesi, enjeksiyon öncesi, pre-operatif yara yeri temizliği, uriner kataterizasyon öncesi, hastane yatışıyla beraber CHX banyosu yapmak için kullanılır(60). Nepalde, yenidoğanların umbilikal kord kaynaklı enfeksiyondan ölüm oranı %34'tür. Nepal'e, CHX kullanılarak enfeksiyonların azaltılmasından dolayı USAID ödülü verilmiştir. Klorheksidin'in iki boyutlu yapısı Şekil 2.6'de verilmiştir. İki adet biguanid halkasını bağlayan heksametilen zincirinden oluşmasının yanında, CHX-diglukonat, glukonat, asetat, fosfonilat gibi ek grupları da taşıyabilmektedir.

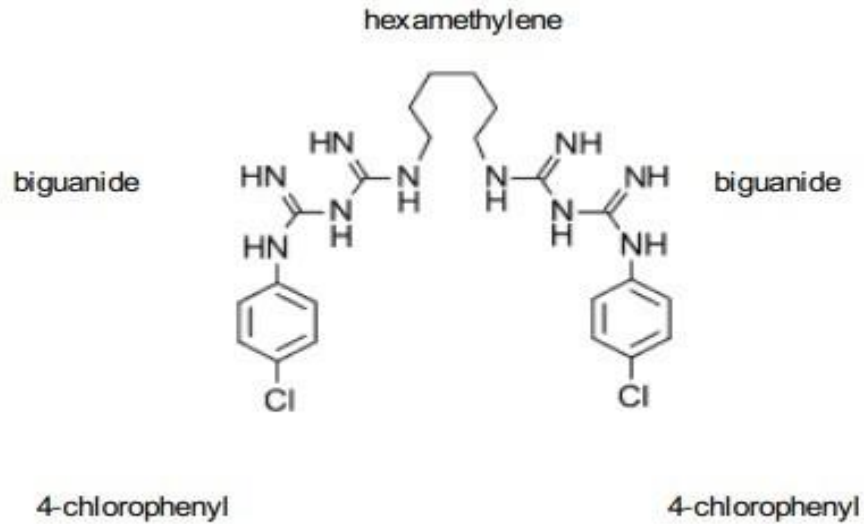
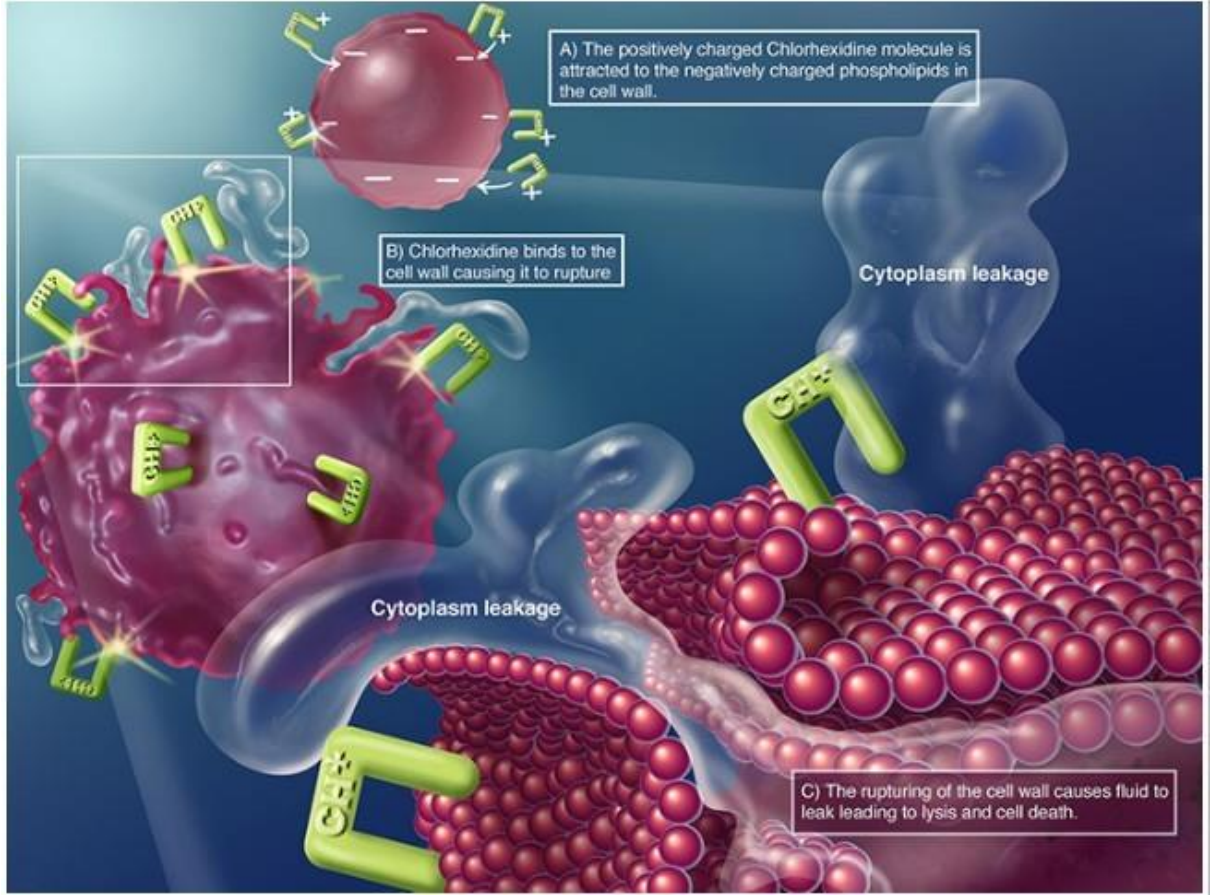


FIGURE 1: Structure of chlorhexidine [1:6 di(4-chlorophenyl-diguanido) hexane].

Şekil 2.6. Klorheksidin'in iki boyutlu yapısı (60)

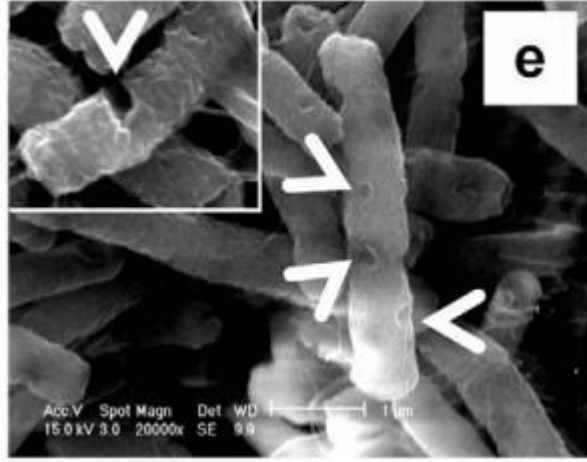
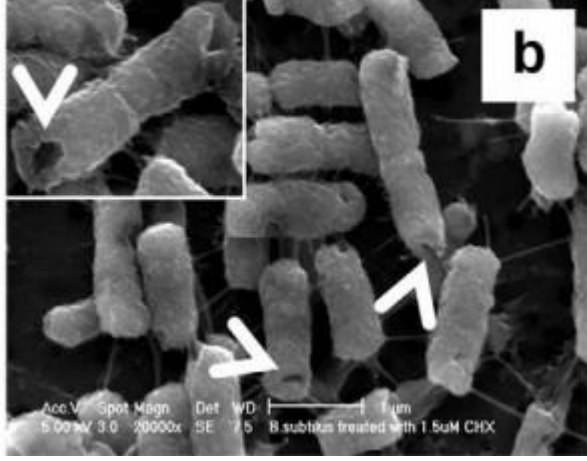
#### 2.4.1. Klorheksidin Etki Mekanizması



Şekil 2.7. Klorheksidin Olası Etki Mekanizması (<https://www.chlorhexidinefacts.com/mechanism-of-action.html>)

CHX, etki mekanizması olarak kolistine benzemektedir, hücre yüzeyindeki negatif yüklü lipid ve protein içeriğe elektrokimyasal olarak bağlanır ve hücre zarı hasarı meydana getirir, hücre içeriğinin dışarı çıkmasını sağlar, daha yüksek konsantrasyonlarda ise nükleik asitlerle birlikte geri dönüşümü olmayan presipitatlar oluşmaktadır(61). *Bacillus subtilis* ve *E. coli* kullanılarak elektron mikroskopuyla yapılan çalışmalarda, CHX'in *B.subtilis*'te hücre kutup kısımlarında etkinlik gösterirken, *E. coli*'de ise hücre gövdesini de içine alan bir tutulum gösterdiği saptanmıştır. Bu dağılım bölgelerine bakıldığında, *B. subtilis*'in kutup bölgeleri, kardiyolipin ve fosfoetanolamin'den zengin olurken, *E. coli*'de ise fosfoetanolamin daha homojen bir şekilde bakteride yayılmıştır.

Bu bilgiler ışığında CHX'in kardiyolipin veya fosfoetanolaminden zengin kısımlarla etkileşebileceği düşünülebilir ve her iki lipid negatif yüke sahiptir(62).



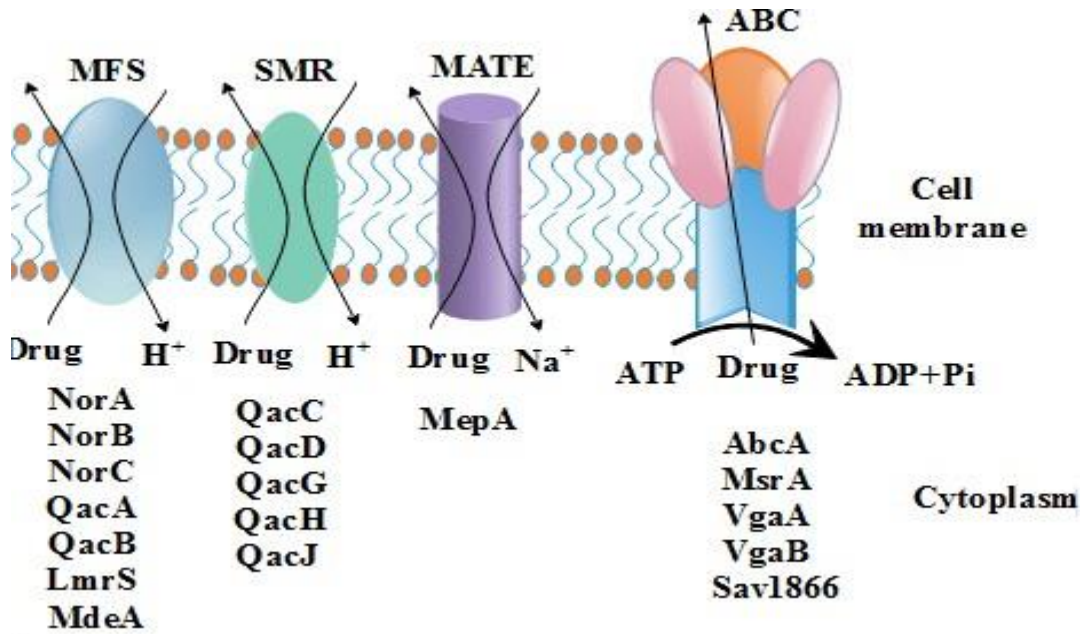
Şekil 2.8-9. Klorheksidin *E.coli* ve *B.subtilis* üzerine etkisi (62)

## 2.4.2. Klorheksidine Azalmış Duyarlılık Mekanizması

CHX'in atılımını kromozomal ve hareketli genetik elemanlar olmak üzere iki kısımda ele alabiliriz.

## 2.4.3. QAC Atım Pompaları

*qacA-B-C-D-E-EI-G-H-J* genleri içinde *qacAB* tipi ürünler MFS tipi atım pompası olarak görev yaparken, *qacC-D-E-EI-G-H-J* ise SMR grubu atım pompası olarak işlev görmektedirler. Başlıca dezenfektan, akridin oranj, EtBr gibi boya içerikli bileşikler hücreden dışarı atmaktadırlar(63). Qac atım pompalarının dağılımı Şekil 2.10'da verilmiştir. (64)



Şekil 2.10. Qac Atım Pompalarının Dağılımı (64)

Tayvan'da yapılan incelemede, 1990, 1995, 2000 ve 2005 yıllarında kandan izole edilen 240 MRSA incelenmiştir. Çalışmada CHX için ise sınır değeri olmadığı için başka bir çalışmadan faydalanarak CHX için MİK'i 4 mg/L olarak belirlenmiştir. PCR ile *qacAB* genlerini saptamışlardır. Yıllara göre %1.7, 50, 40 ve 46.7 olacak şekilde yüksek MİK'lere sahip MRSA'ları saptanmıştır. Yıllara göre

artan direncin nedeni olarak ilgili hastanede CHX kullanımı devreye sokulması düşünülmektedir(65). Bir diğer çalışmada ise 60 MSSA ve 96 MRSA kan izolatu CHX ve *qaCAB* ve *C* için değerlendirilmeye alınmıştır. MSSA suşların %3'ü *qaCAB* taşıırken MRSA izolatların %43'ü taşımaktadır. İzolatların %51.6'sının CHX MİK değeri agar dilüsyonla 4 mg/L olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmada *qaCAB* varlığı ve CHX için MİK 2 mg/L ve üzeri olan MRSA'lar için CHX-emdirilmiş katater ilişkili kan kültür (+) ile ilişki bulunmuştur(66).

Malezya`da yapılan çalışmada ise, hastanede takip edilen hastalardan elde edilen klinik *Staphylococcus aureus* izolatlardan 95 MRSA ve 164 MSSA *qaCAB*(+) olan suş sayıları sırasıyla 67(%70) ve 3(%1.8) iken, MİK ise sırasıyla 20.7 mg/L iken, 10.3 mg/L'dir. *QacC*'nin ise izolatlar çok az saptanması dikkati çekmektedir(67). Bir diğer çalışma karbapenem dirençli 51 adet *A. baumannii* ile yapılmış olup CHX'in için MİK 4-64 mg/L arasında değişmekle beraber, hemen hemen tüm suşlar *qacE1* içerdiği bulunmuştur. Bu suşlarda *qaCAB* az oranda bulunmaktadırlar, bu da *qaCAB*'nin genellikle gram pozitif suşlarda bulunması bilgisiyile uyumludur. Bu suşlarda ayrıca *qacJ*'ye rastlanılmamıştır(68).

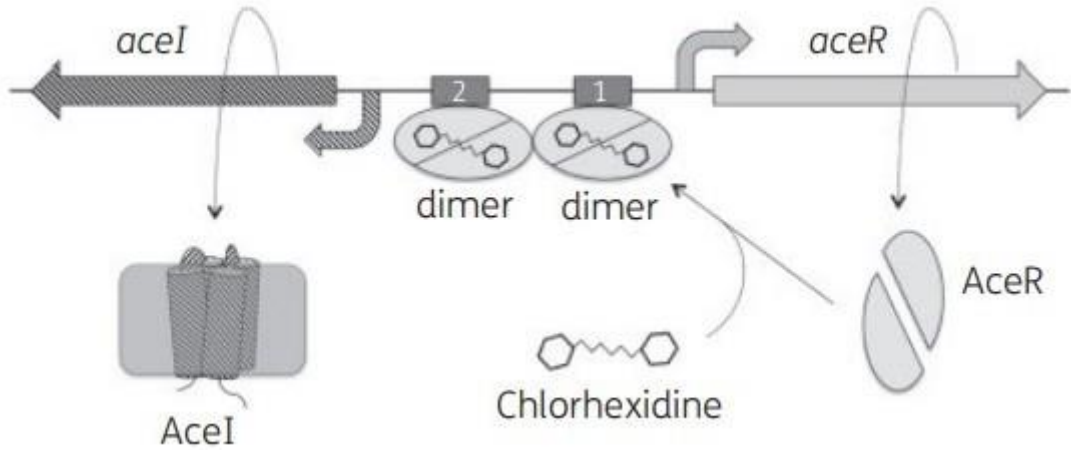
Klinik örneklerden izole edilen 64 adet *K. pneumoniae* izolatu ile yapılan araştırmada ise *qacE*, *qacE* (varyant)'nin, CHX duyarlılığı üzerine olan etkisini atım pompa inhibitörü kullanılarak incelenmiştir. Bir atım pompa inhibitörü olan CCCP varlığında 128 kata kadar varan MİK düşmeleri meydana gelmiş olması *cepA*'nın CHX direncinde rol oynadığını gösterebilir(69). Bazı çalışmalar *K. pneumoniae*'de CHX direnciyile *qacE1* ve *cepA* atım pompalarıyla arasında bir ilişki gösterse de bunun aksini gösteren çalışmalar da vardır(70).

Yapılan bir diğer çalışmada ise, 70 adet XDR ST258 *K. pneumoniae*, 56 adet XDR Non-ST258 *K. pneumoniae* incelenmiştir. ST258 klonunun, 32-256 mg/L'lik bir CHX dağılımı varken diğer grubun 8-256 mg/L dağılımı mevcuttur. *cepA*, *acrA*, *kdeA* genlerinin, CHX direncinden sorumlu olup olmadıkları anlamaya yönelik logaritmik faza ulaşan sub-MİK değerlerinde bekletilen ve bekletilmeyen bakterilerle qPCR yapılmasının ardından, CHX maruziyeti olan ile olmayan grup arasında RNA düzeyi olarak 1.5 kat fark mevcuttur ve dolayısıyla iki deney grubu arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Bunun üzerine, qPCR ile saptanamayacak bir sub-popülasyon olma ihtimaline karşı ST258 ve diğer klonlardan yapılan popülasyon



analizinde, MİK değeri ve klondan bağımsız olarak heterodirencin olduğu saptanmıştır(71).

Yapılan bir diğer çalışmada ise, 400 adet *S.aureus* izolatından 10 adet *smr*(+) ve 10 adet *smr*(-) izolatı alınarak, *smr* (*qacC*) geni varlığı ve CHX MİK düzeyleri karşılaştırıldığında, *smr* (*qacC*) geni varlığında, MİK değeri 0,5 mg/L ve MBC 64 mg/L iken ilgili gen yokluğunda ise 0,25 mg/L ve 4 mg/L olduğu gözlenmiştir(72). *A. baumannii* ile yapılan bir diğer çalışmada, CHX'inin AceI ismi verilen atım pompasıyla atıldığı ve bunu düzenleyen genin ise AceR olduğu ve alışlagelmiş atım pompalarının dışında PACE tipi aileye mensup olduğu gösterilmiştir. AceR'nin CHX'e bağlandığı ve bununda konformasyonel değişikliğe neden olarak, AceI geninin -35 promotor bölgesinin yukarısında, genler arası bölgeye bağlandığı ve AceI'nın transkripsiyonunu artırdığı gösterilmiştir(73). *AceR-I* ve promotor/operon bölgesi Şekil 3.0`de verilmiştir.

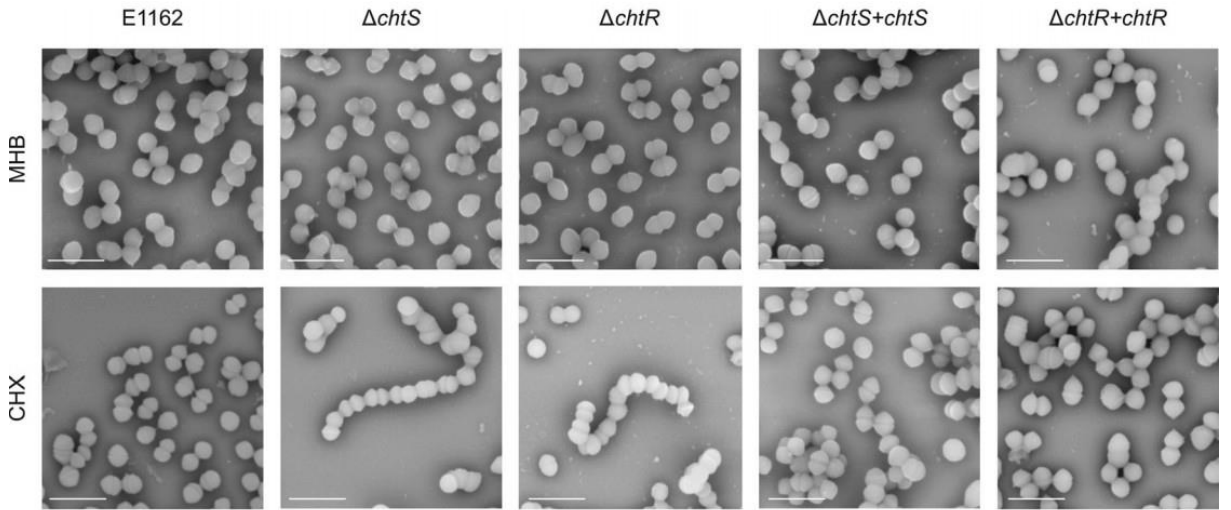


Şekil 3.0. Klorheksidin ve AceR-I ve promotor/operon bölgesi (73)

#### 2.4.4. İkili Sistem

Bir diğer incelemede, kan kaynaklı ve CHX MİK değeri 1,7 mg/L olan *E. faecium* C-1 1,2 mg/L CHX içeren ortamda inkübe edilmesi ve daha sonra yapılan microarray based-transposon mapping (M-TraM) işleminde *EfmE1162\_2203* isimli genin ifadesi, CHX'e maruz kalmayan bakterilere göre 8.7 kat daha az ifade edildiği ve bu genin DNA bağlayan yanıt elemanı olduğuna saptanmıştır. Bu gene yakın olan bir diğer gen *Efm E1162\_2202* ise bir histidin kinaz kodluyor olup ve CHX maruziyetiyle 3 kat kadar genin ifade düzeyi düştüğü gözlenmiştir. Her iki gen

bölgesine *E1162\_2202* için *ChtS*, *E1162\_2203* için ise *ChtR* olarak ve ikili sistem , *ChtRS-2CS* olarak isimlendirilmiştir. CHX ve *E. faecium* incelenen yayınlara ve NCBI'ye göre, *ChtRS-2CS* 'nin tüm suşlarda mevcut olduğu, CHX- tolerant olan suşlarda, P102H aminoasit değişikliği olduğu saptanmıştır. Bu kısmın, ChtR'nin sinyal alma kısmında dimerizasyon ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Daha sonra *ChtRS*'de mutasyon yaparak ve bu genler yönelik komplementasyon ile büyüme eğrileri incelenmesinin ana suşa göre, lag fazının 4 saat kadar daha uzun olduğu, log fazının da uzadığı gözlenmektedir. In-trans incelemede ise ana suş gibi üreme zamanı gözlemlendi. Daha sonra yapılan elektron mikroskopisi işleminde, in- vitro yapılan mutantların zincir formasyonu gösterirken, mutant olmayan genin komplementasyon sonrasında yeniden eski hallerine geldikleri gözlenmektedir(74). *ChtR/S* mutant ve komplementasyon sonrası mikroskopik görüntüsü Şekil 3.1`de mevcuttur.

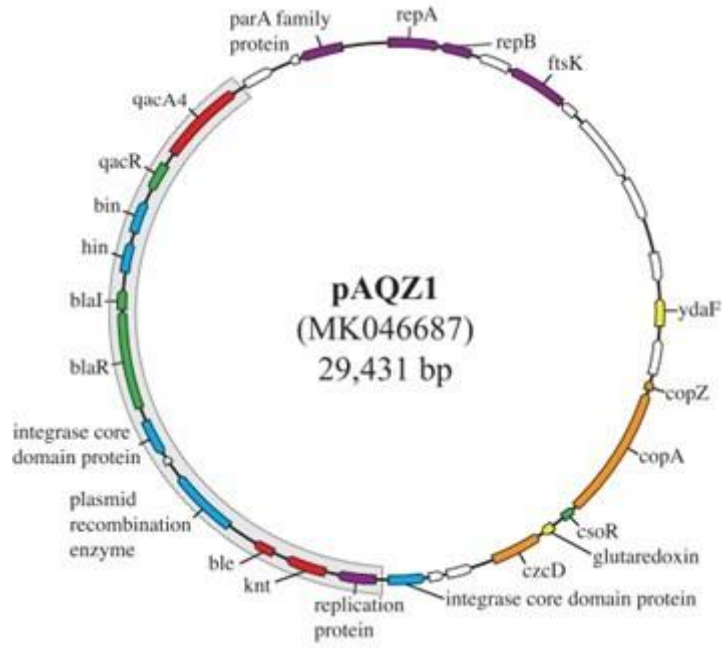


**Şekil 3.1.** *chtR/S* Mutant ve komplementasyon sonrası mikroskopik görüntüsü (74)

#### 2.4.5. Plazmid Kaynaklı Direnç

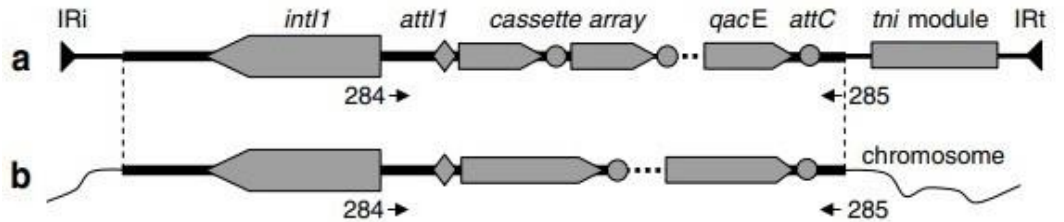
Yukarıda ismi geçen atım pompalarının, plazmidler vasıtasıyla direncin taşınması da söz konusudur. Qac4(Yeni varyant)-içeren plazmid (pAQZ1) taşıyan *Staphylococcus. spp*'in daha yüksek CHX MİK-50 (4 mg /L) sahiptir, *qaCA* ve *B* pozitif olanların ise MİK-50 değeri 1 mg/L'dir. NCBI'de *qaCA4* içeren suşlar şimdiden beş ayrı ülkede mevcuttur(75). *QaCA4* içeren pAQZ1 plazmid Şekil 3.2`de yer almaktadır.





**Şekil 3.2.** QaCA4 içeren pAQZ1 plazmidi (75)

Brezilya`da yapılan bir diğer çalışmada ise, su kaynaklarından izole edilen 27 adet *E. coli*`ye ait sınıf-1 integron ailesinin incelenmesi için yapılan çalışmada, izolatların çoğunda *qaCE1* genine rastlandığı gösterilmiştir(76). Sınıf-1 integron içeren *Tn402* Şekil 3.3`de mevcuttur. Avustralya`da yapılan bir diğer çalışmada ise çevre izolatlarından elde edilen *Tn402*-tranpozon içeren plazmid içerisinde sınıf-1 integron dahil olduğu gösterilmiştir(77). Sınıf-1 integron içeren *Tn402*, Şekil 3.3`de verilmiştir.



**Şekil 3.3.** Sınıf-1 integron içeren *Tn402* (76)

### **2.4.1. GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu çalışma Ocak 2020 ile Temmuz 2020 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı'na gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilen ABC suşları üzerinde yürütülmüştür.

Bu çalışmada bakterilerin üretilmesi için %5 koyun kanı içeren kanlı agar (Sigma, Almanya) ve EMB agar (Sigma, Almanya), stok için %15 gliserol içeren stok besiyeri, antibiyotik duyarlılık testleri için katyon içeren MHB kullanılmıştır. Tüm besiyerleri besiyeri ana bilim dalımızda standart formüllere göre hazırlanmıştır.

Kolistin sülfat, klorheksidin diglukonat (Sigma, Almanya) temin edilmiştir. Diğer malzemelerden; melting agarose (ThermoFisher, ABD), ApaI (Takara, Japonya) ve MS matriks solüsyonu (Biomeriux, Craponne, Fransa) firmalarından temin edilmiştir.

Kullanılan standart suşlar Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Merkez Laboratuvarı stoklarından temin edilmiştir.

### **3.1. İzolatların Eldesi ve Üretilmesi**

Hacettepe Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Birimi Merkez Laboratuvarı'na gelen klinik örneklerden izole edilen ABC, %15 gliserol içeren stok besiyerine-20°C'de stoklanmıştır. Bakteri stoklarından daha sonra %5 kanlı agar ve EMB agar plaklarına öze ile tek koloni ile ekim tekniği ile pasajlar yapılmıştır. Besiyerleri daha sonra 37°C'lik etüvde 18-24 saat inkübe edilmiştir.

### **3.2. Bakteri Tanımlanması**

Stoktan çıkartılan bakteriler oda sıcaklığında bekletildikten sonra %5 koyun kanlı agar ve EMB agara tek koloni ekim 37°C'de 18-24 saat kadar inkübe edildikten sonra, bakteri tanımlanması için otomatize sistem olan MALDI-TOF MS (Biomerieux, Fransa) kullanılmıştır.

### 3.2.1. Kütle Spektrofotometrik Yöntemle Tanımlama

Hacettepe Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Birimi Merkez Laboratuvarı'nda tanımlama amaçlı kütle spektrometri yöntemi olarak matriks destekli lazer dezorpsiyon iyonizasyon-uçuş süresi kütle spektrometrisi, MALDI-TOF MS (Biomerieux, Crappone, Fransa) kullanılmıştır. Bu nedenle, eküvyon ile bakteri kolonisi metal plak üzerindeki alana sürüldükten sonra üzerine 1 µl matriks çözelti damlatılarak 25°C'de kurutulmuştur. Metal plak, MS içine yerleştirildikten sonra lazer ışınları atışlarıyla protein içerikleri ayrıştırılmıştır. Proteinlerin hepsi +1 yüklenerek uçuşları süresince sadece kütlelerin farklılıkları ile analizöre ulaşmaları sağlanmıştır. Elde edilen veriler, bakteri kütüphanesiyle karşılaştırılmış ve skor elde edilmiştir değeri 1.7 üzerinde olan skorlar anlamlı kabul edilmiştir(78).

### 3.3. Antimikrobiyal Duyarlılık Profillerinin Belirlenmesi

İzolatların kolistin duyarlılıklarının belirlenmesinde 1148001 ürün numarası olan kolistin sülfat (Sigma, ABD) ve C9394 ürün numarası olan %20'lik klorheksidin diglukonat stok solüsyon (Sigma, ABD) kullanılmıştır.

Kolistin Sülfat(H)=[A x P] / D formülüne göre 1024 mg/L stok çözeltisi hazırlanmıştır. (H: Distile-Deiyonize miktarı, A: ağırlığı, P: potens, D: derişim). Hazırlanan 512 mg/L ileri kullanım için mikrosantrifüj tüplerine konularak -20 °C'ye konulmuştur. Derin dondurucuda saklanan antibiyotik çözeltilerinin, kullanmadan önce 25 °C sıcaklıkta erimesi için bekletilmiştir.

Klorheksidin için ise %20'lik stok çözelti kullanılmıştır. Stok çözelti SF içerisinde 1024 mg/L'lik konsantrasyona sahip derişik çözelti hazırlanmıştır.

#### 3.3.1. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi için steril U tabanlı 96 kuyucuk içeren plaklar kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 (kolistin duyarlı, 1 mg/L ) *E. coli* NCTC13846 (kolistin dirençli, 4 mg/L) kullanılmıştır. *E.coli* ATCC 25922 (2 mg/L), klorheksidin duyarlılık testi için kontrol olarak kullanılmıştır.

Bir gün öncesinden kanlı besiyerine ekilmiş olan taze pasajdan koloniler alınarak serum fizyolojik (SF) içerisinde 0,5 McFarland yoğunluğa ulaşanlar dansitometre ile ölçülmüştür. Sırasıyla aşağıdaki sıra takip edilmiştir ;

1.-Bütün kuyucuklara 50 µl CA-MHB konmuştur. Onikinci kuyucuk antibiyotik/antiseptik içermeyen kontrol olarak ayrılmıştır.

2.-Mikrosantrifüj tüpü içerisindeki antibiyotik çözelti 25°C'de çözünerek vortekslenmiştir.

3.-Sulandırım hazırlanmış (kolistin 512mg/L ve klorheksidin 1024 mg/L) ve plaklara her sıranın ilk kuyucuklarına 50'şer µl konulmuştur.

4.-İlk kuyucuklardan diğerlerine çok kanallı pipet ile 50'şer µl dağıtılmıştır. Bu sayede soldan sağa gittikçe azalacak şekilde kolistin ve klorheksidinin sırasıyla 256-025 mg/L, 512 mg/L-0,5 mg/L aralığında seri derişimleri hazırlanmıştır.

5.-Bir gün öncesinden kanlı besiyerine ekilmiş olan taze pasajdan koloniler alınarak serum fizyolojik (SF) içerisinde 0,5 McFarland yoğunluğa ulaşanlar dansitometre ile ölçülmüştür.

6.-0,5 McFarland olan tüpten 50 µl alıp 4950 µL katyon-içeren-Mueller-Hinton besiyeri içeren tüpe aktarılmıştır, kontrol dışındaki her bir kuyucuğa 50'şer µl eklenmiştir.

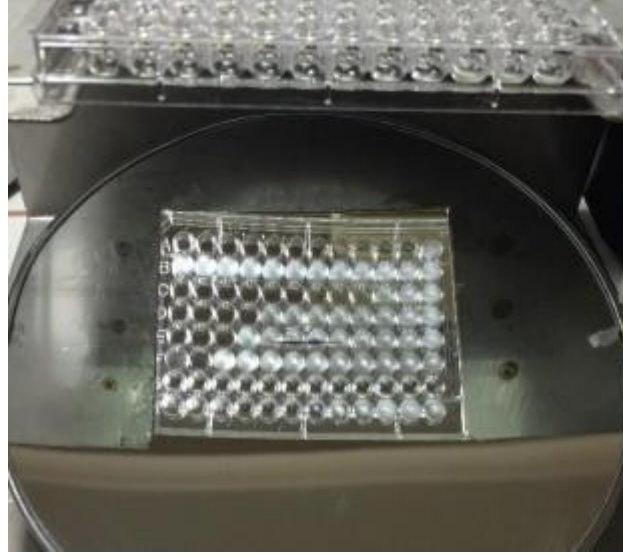
7.-Son olarak her kuyucukta 100 µl hacimde besiyeri, bakteri, antimikrobiyal karışımı bulunurken, kolistinin ve klorheksidin ilk konsantrasyonu sırasıyla 128 mg/L ve 256 mg/L'den 0,125 mg/L ile 0,25 mg/L'ye kadar belirlenmiştir.

8.-İnoküle edilmiş plaklar 35°C'de 18-24 saat süre ile aerobik koşullarda etüvde inkübe edilmiştir. Tüm kültürlerde aynı inkübasyon sıcaklığını sağlayabilmeye özen gösterilmiştir.

### **3.3.2. Minimal İnhibitör Konsantrasyonun Belirlenmesi**

MİK, bakterilerin kuyucuklardaki üremesini çıplak gözle görülemeyecek kadar üremenin olmadığı en düşük antibiyotik derişimidir. Duyarlılık kategorileri EUCAST'ta belirtilen klinik duyarlılık sınır değerlerine göre değerlendirilmiştir. Kolistin için  $MİK \leq 2$  mg/L bulunan izolatlar duyarlı olarak kabul edilmiştir.(79)

Klorheksidin duyarlılık herhangi bir uluslararası standart olmadığı için MİK değeri  $\geq 64$  mg/L olan izolatlar dirençli,  $\leq 16$  mg/L olan izolatlar duyarlı olarak kabul edilmiştir. Klorheksidin için  $16 \text{ mg/L} < \text{MİK} < 64 \text{ mg/L}$  bulunan izolatlar orta duyarlı kabul edilmiştir(80).



**Resim 3.4.** MİK değerlerin okunması

### 3.4. Pulsed Field Gel Elektroforezi

Pulsed Field Jel Elektroforezi (Biorad, Kaliforniya, ABD) Halk Sağlığı Laboratuvarı Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarında uzmanların gözetiminde yapıldı.

Dirençli izolatlar % 5 koyun kanlı agar besiyerine tek koloni ekimi yapıldı. Etüvde (ISOLAB) 35 °C'de 20–24 saat aerobik koşullarda inkübe edildi. Bir gecelik inkübasyondan sonra, saf kültür halinde üreyen koloniler, plastik öze ile toplanarak 4 ml SF içinde MacFarland 4.0 olacak şekilde süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonu 10.000 rpm'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Çökelti üzerine tekrar 1 ml soğuk SF eklenerek kısa süreli vorteks yapıldı.

#### 3.4.1. Agaroz Gömme İşlemi

Düşük erime ısı 2%lik agaroz hazırlandı. Hazırlanan agaroz 50 °C'lik ısı bloğuna konuldu ve % 10'luk SDS'den 1 ml eklenerek karıştırıldı. Agaroz-SDS karışımından 100 µl mikrosantrifüj tüplere dağıtılarak 55 °C'de ısı bloğunda bekletildi. Bakteri süspansiyonunda 100 µl alınarak 55°C'de tutulan ve içerisinde 100 µl düşük erime ısı 2%lik agaroz-SDS bulunan tüpe eklendi. Birkaç defa pipetaj yapıldı. Hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlanarak bekletilmeden hücre-agaroz-SDS karışımından hava kabarcığı olmayacak şekilde agaroz kalıbına 100 µl dağıtıldı. Kalıplar, +4°C'de agaroz katılaşıncaya kadar 10 dakika bekletildi. Agaroz kalıpların soğukta tutulması kaliteli DNA hazırlanması için önemlidir.

#### 3.4.2. Hücrelerin Lizisi

Hücre lizis çözeltisi-1 (HLS-1); 50 mM Tris-HCL (Sigma, Steinheim, Almanya) (pH 8.0), 50 mM EDTA (Sigma, Steinheim, Almanya), 2.0 mg/ml lizozim, 1.5 mg/ml proteinaz K (Sigma, Steinheim, Almanya) hazırlandı. Ancak, lizozim ve proteinaz K parçalama tamponunun içerisinde kullanım sırasında eklendi. Hazırlanan lizis-çözelti-1 5 ml'lik steril kapaklı tüplere 0.5 ml olacak şekilde dağıtıldı. Agaroz, kalıptan çıkarılarak lizis çözeltisine yerleştirildi, 37 °C'de 1 saat çalkamalı su banyosunda bekletildi. HLS-1 dökülerek yerine hücre lizis çözeltisi-2 (HLS-2; 0.4 M EDTA, % 1 N-sarkozil, 300 µg/ml proteinaz K) konuldu. HLS-1'de

olduğu gibi proteinaz K, parçalama tamponu içerisine kullanım sırasında eklendi. 50 °C’de 1,5 saat su banyosunda bekletildi.

### **3.4.3. Agaroz Kalıpların Temizlenmesi**

Tüpler buz içerisinde 15 dakika bekletilerek agaroz kalıbının katılaşması sağlandı. Ardından, HLS–2 dikkatlice ortamdan çekildi. Agaroz kalıp bulunan tüpe, 50°C’ye ısıtılmış olan steril saf sudan 4 ml eklenerek 50°C su banyosunda 15 dakika bekletildi. Su tamamen çekildikten sonra yıkama işlemi iki defa daha tekrarlandı. Daha sonra agaroz kalıpları üç defa (her biri 50°C’de 15 dakika olmak üzere) 4 ml TE tamponuyla yıkandı. Yıkama sonrasında agaroz kalıplarının şeffaılaştığı görüldü.

### **3.4.4. Endonükleazlarla Kesim İşlemi**

Bir lam üzerine alınan agaroz kalıbı ¼ oranında kesilerek mikrosantrifüj tüpüne koyuldu. Parçalardan biri 100 µl 1X ApaI (Sigma, Almanya) tamponu içerisine konularak su banyosunda 37°C’de 10 dakika tutuldu. Ardından sıvı içerik döküldü. Her 15 agaroz kalıbı için; 10 µl 10X ApaI tamponu 2 µl ApaI enzimi (15 U/örnek) 88 µl steril saf su, total hacim 100 µl olacak şeklinde ölçüldü. Süre sonunda enzim tamponu dökülerek yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan enzim karışımından mikrosantrifüj tüpüne konulup su banyosunda 37°C’de 2 saat kadar bekletildi. İşlem sonunda tüpler 4 °C’de 20 dakika kadar bekletildi.

### **3.4.5. Jel Hazırlama ve Yükleme İşlemi**

TBE (0,5X) içerisinde 100 ml % 1’lik agaroz hazırlandıktan sonra 45-55°C’de su banyosunda bekletildi. Agarozun döküleceği kaset hazırlandı. On beş dişli tarağın uç kısmına enzimle kesilmiş agaroz kalıplarının her biri yerleştirildi. Tarağın iki kenar ve ortasındaki dişlere kontrol suşuna ait kalıplar yüklendi. Sıcaklığı yaklaşık 45–55°C olan agaroz, dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşmasına izin verilmeksizin kaset içine pipet yardımıyla konuldu. 25 °C’de katılaşıncaya kadar beklenildi. Tarak dikkatlice çıkarıldıktan sonra agaroz kasetinin

çerçeveleri çıkarılarak tabla üzerindeki agaroz, içerisinde 1900–2000 ml 0.5X TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi.

#### **3.4.6. Elektroforez Sonrası ve Yorumlama**

Elektroforez sonrasında jel, etidyum bromür içeren ultra saf su içine alındı. 20 dakika boyanarak UV ışığı altında görüntüledi. DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Ekran görüntüleri kaydedildi ve bant dizileri analiz edildi. Öncelikle her resimde iki adet bulunan kontrol suşuyla ile görüntüler arası optimize edildi. PFGE profillerinin dendrogram oluşturuldu. Bantlara bağlı %80 benzerliğe göre suşlar arasındaki ilişkiler Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) ile belirlendi(81, 82).



**Resim 3.5.** PFGE Tankı (Biorad, ABD)



## 2.4.2. BULGULAR

### 4.1. Kolistin Duyarlılık Sonuçları

100 ABC izolatının kolistin duyarlılığı sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile saptanmıştır. Duyarlılık EUCAST uluslararası standartlarına göre değerlendirilmiştir. Buna göre, MİK değeri >2 mg/L olan izolatlar dirençli, ≤2 mg/L olan izolatlar duyarlı olarak kabul edilmiştir. Değerlendirilen izolatlara ait sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilmiş direnç oranları MIC50, 0,5 mg/L ve MIC-90, 4 mg/L olarak bulunmuştur. Kolistin duyarlı ve dirençli izolatların dağılımı ve hangi bölümden kaynaklandığına yönelik tablo aşağıdaki Tablo 1.3.`de verilmiştir. Kolistin dirençli izolatların, %53`ü DTA, %33,3`ü kan, %6,6`sı balgam ve diğer %6,6`sı ise BAL`dan izole edilmiştir. Kolistin dirençli izolatların bölümlere göre dağılımı ise şöyledir; izolatların %40`ı iç hastalıkları yoğun bakımdan, %13,3`u anestezi servisinden, %13,3`u genel cerrahi yoğun bakım kliniğinden, %13,3`ü nöroloji kliniğinden, %6,6`sı KBB kliniğinden, %6,6`sı acil servisten, %6,6`sı beyin cerrahi kliniklerinden köken almaktadır. Kolistin direnci ve bölümlere göre dağılımı Tablo 1.4.-5.`de yer almaktadır. Bizim çalışmamızda , 100 A. baumannii ile yapılan çalışmada 15 adet izolat kolistin dirençli olup MİK değeri 4 mg/L ile 128 mg/L arasındadır.

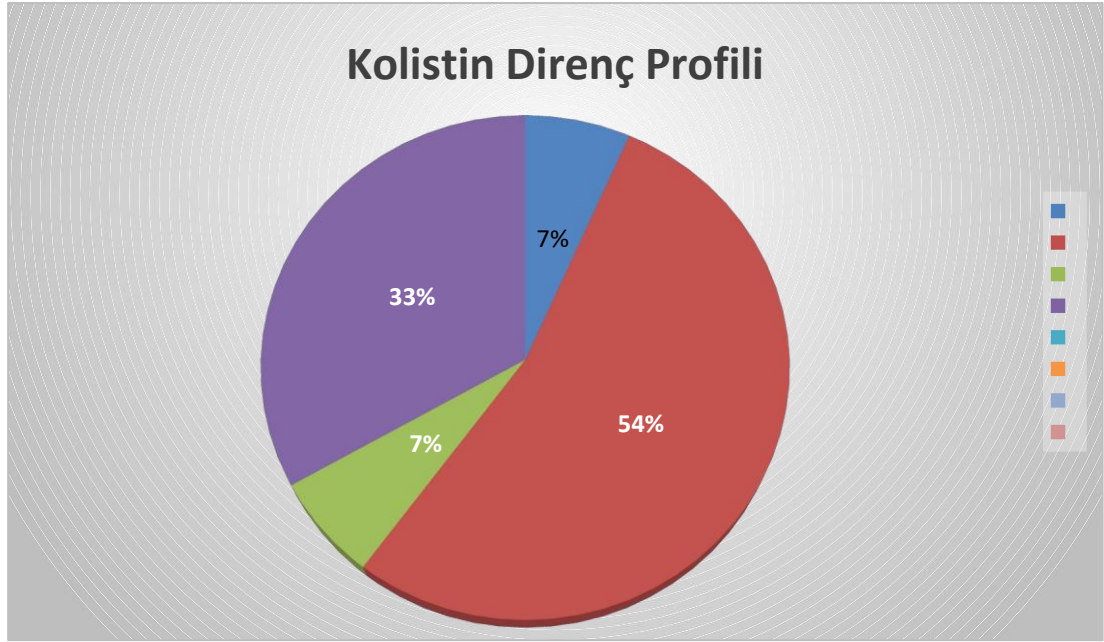
İlgili örnek türlerine ait sırasıyla duyarlı ya da azalmış duyarlılık ve toplam izolat sayısı kesir şeklinde ifade edilmiştir.

**Tablo 1.3.** Kolistin Duyarlı ve Dirençli İzolat Sayısı

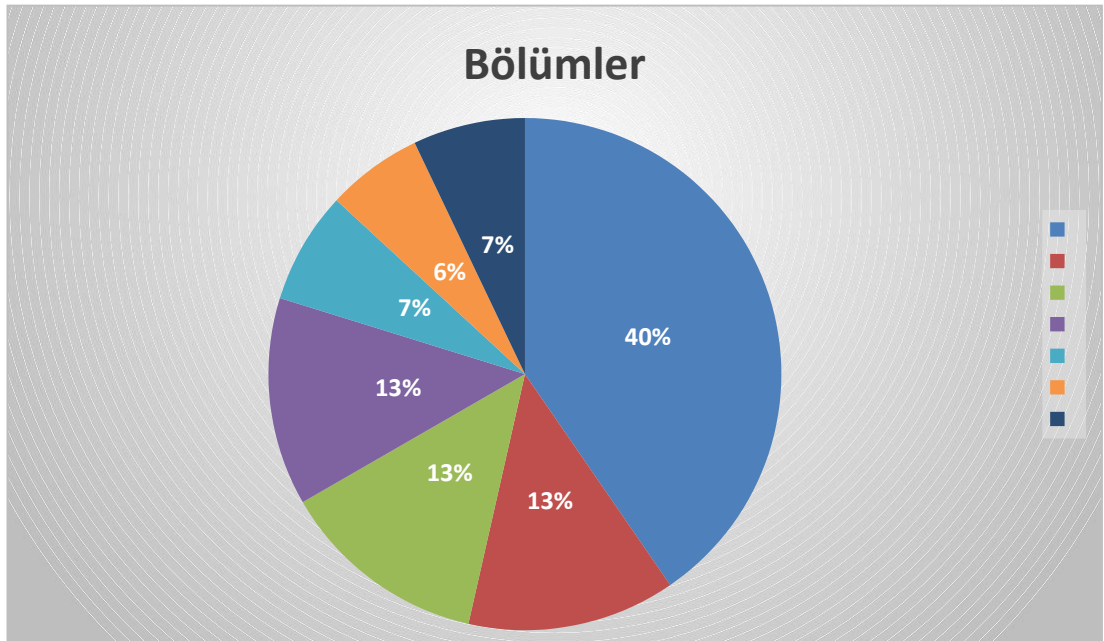
	<b>Duyarlı</b>	<b>Dirençli</b>
<b>Balgam</b>	11/12	1/12
<b>DTA</b>	36/44	8/44
<b>BAL</b>	1/2	1/2
<b>KAN</b>	33/38	5/38
<b>BOS</b>	1/1	0/1
<b>PLEVRA</b>	3/3	0/3

DTA: Derin Trakeal Aspirat, BAL: Bronko-alveolar Lavaj, BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

**Tablo 1.4.** Kolistin Dirençli İzolatların Kendi İçerisinde Dağılım



**Tablo 1.5.** Kolistin Dirençli Gösteren İzolatların Servislere Göre Dağılımı



#### 4.2. Klorheksidine Duyarlılık Sonuçları

Yüz ABC izolatının klorheksidin duyarlılığı sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile saptanmıştır. Duyarlılık herhangi bir uluslararası standart olmadığı için, MİK değeri

$\geq 64$  mg/L olan izolatlar dirençli,  $\leq 16$  mg/L olan izolatlar duyarlı olarak kabul edilmiştir. 17 izolatın (%17), klorheksidin MİK değeri 32 mg/L olan orta duyarlı olmakla beraber, izolatların klorheksidin MİK dağılımı 0,5 mg/L ile 32 mg/L arasında olduğu ve dirençli izolatın saptanamadığı gözlenmiştir. Klorheksidine karşı orta duyarlı olan bir izolatın, ayrıca kolistin dirençli olduğu da gözlenmiştir. Suşların klorheksidin sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilmiş direnç oranları : test edilen izolatların sayıca %50 ve daha fazlasının inhibisyon olan değeri 8 mg/L ve MIC90 değeri 32 mg/L olarak bulunmuştur. Klorheksidin duyarlı ve azalmış duyarlı olan izolatların sayısı ve hangi bölümden kaynaklandığına yönelik tablo aşağıda verilmiştir. Klorheksidine azalmış duyarlılığı olan bakterilerin %47'si kan kaynaklı izolatlar olup %29,4'ü ise DTA ve %23,5'i balgamdan izole edilmiştir. Klorheksidine azalmış duyarlılığa sahip örneklerin %47'si İç hastalıkları yoğun bakımdan, %12'si Nöroloji yataklı servisinden, %12'si genel dahiliye servisinden, %6'sı medikal onkoloji, %6'sı acil servisten, %6'sı genel cerrahiden, %6'sı anestezi kliniği ve diğer %6'sı ise ürolojiden elde edilmiştir. Klorheksidin azalmış duyarlılık profili ve bölümlere göre dağılımı Tablo 1.7-8`de yer almaktadır.

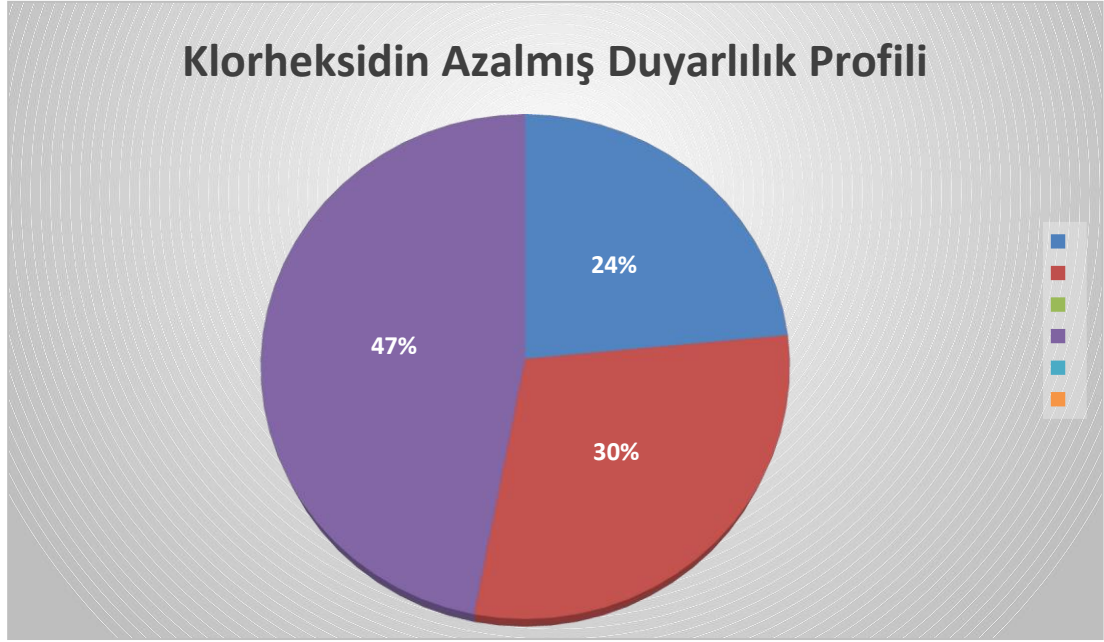
İlgili örnek türlerine ait sırasıyla duyarlı ya da azalmış duyarlılık ve toplam izolat sayısı kesir şeklinde ifade edilmiştir.

**Tablo 1.6.** Klorheksidin Duyarlı ve Azalmış Duyarlı İzolatların Sayısı

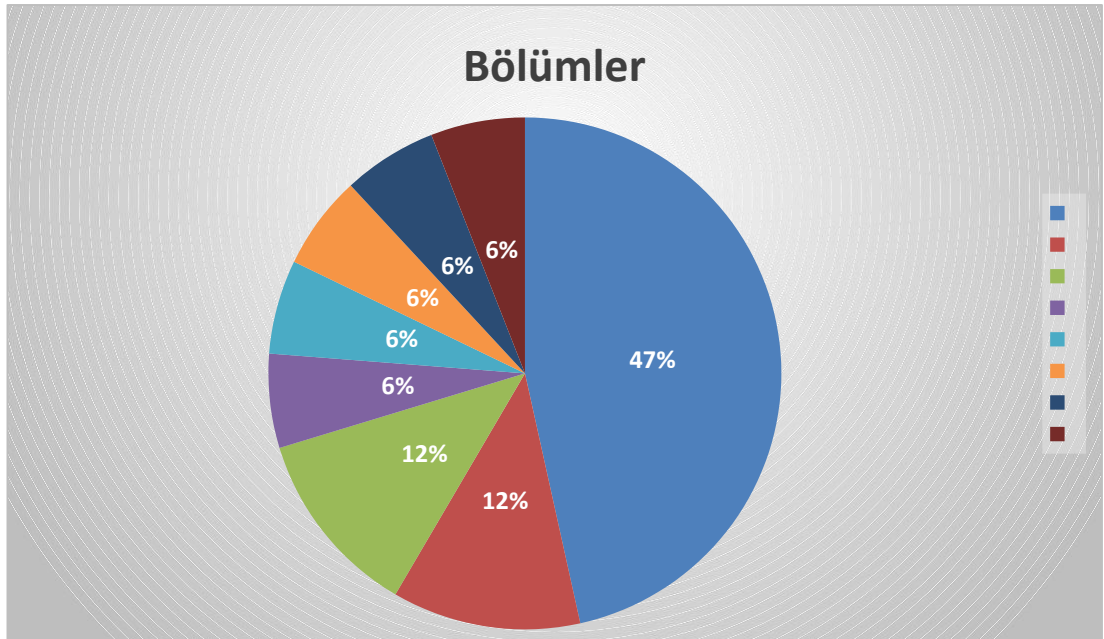
	<b>Duyarlı</b>	<b>Azalmış Duyarlılık</b>
<b>BALGAM</b>	8/12	4/12
<b>DTA</b>	39/44	5/44
<b>BAL</b>	2/2	0/2
<b>KAN</b>	30/38	8/38
<b>BOS</b>	1/1	0/1
<b>PLEVRA</b>	3/3	0/3

DTA: Derin Trakeal Aspirat, BAL: Bronko-alveolar Lavaj, BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

**Tablo 1.7.** Klorheksidin Azalmış Duyarlı İzolatların Kendi İçinde Dağılımı

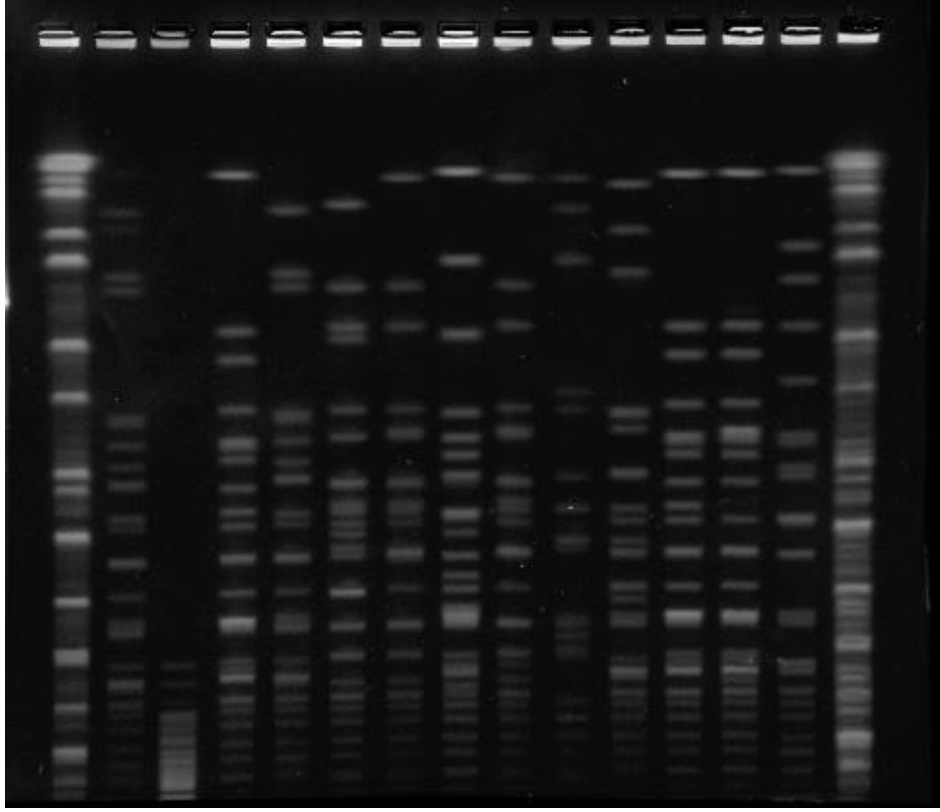


**Tablo 1.8.** Klorheksidine Azalmış Duyarlılık Gösteren İzolatların Servislere Göre Dağılımı

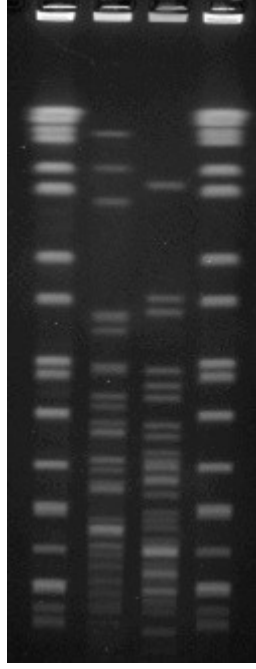


### 4.3. PFGE Klonal Analizi

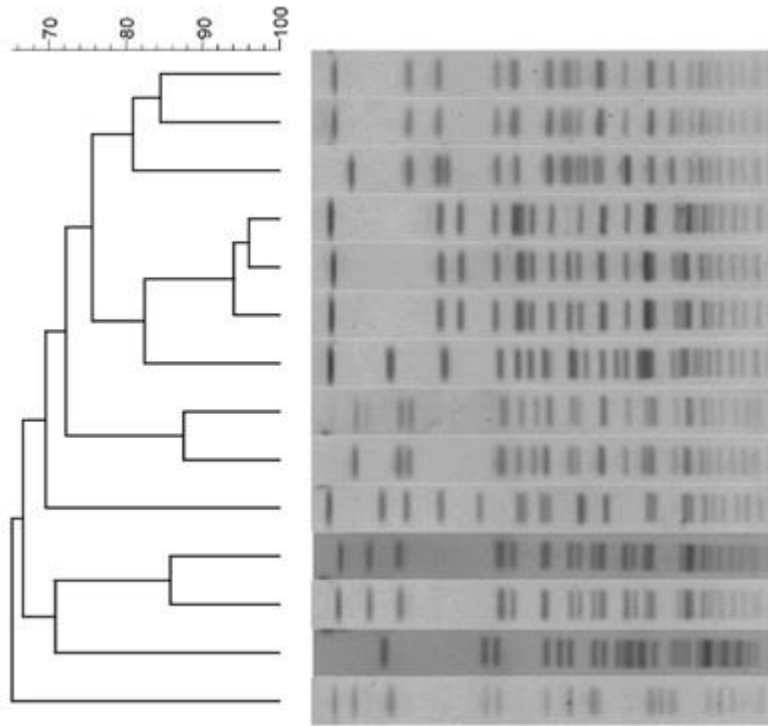
İncelenen 15 izolattan, 1 izolatın iki kez ApaI ile kesim yapılmasına rağmen PFGE’de görüntü elde edilememiştir ve dolayısıyla %80 benzerlik göz önüne alındığında 14 izolatta 7 farklı pulsotip olduğu saptanmıştır(76). Aşağıda gösterilen elektroforezde, sağ ve sol kenarlarda standart suş olan *Salmonella braenderup* H9812 kullanılmıştır. PFGE bilgi bankasındaki verileriyle eşleştirerek, elektronik görüntüleri normalleştirmek amacıyla *S. braenderup* H9812 (Türkiye Halk Sağlığı Kurumundan temin edilmiştir.) referans suş olarak kullanılmıştır. Sol en baştaki referans suştan sonra ritmik olarak incelenen *A. baumannii* izolatları gösterilmiştir. 2 numaralı izolat iki kez kesim işlemine tabii tutulmasına rağmen herhangi bir şekilde elektroforezde patern alınamamıştır ve dendrogram çizilirken göz ardı edilmiştir(83). PFGE analizi ve ilgili dendrogramlar Şekil 3.6-8`de yer almaktadır.



**Şekil 3.6.** 1 ile 13.izolatların PFGE görüntüsü ve standart suş (*Salmonella braenderup* H9812)



**Şekil 3.7.** 14 ve 15.izolatların PFGE görüntüsü ve standart suş (*Salmonella braenderup* H9812)



**Şekil 3.8.**1-14 izolatlara ait dendrogram

## 5. TARTIŞMA

A. *baumannii* klinik izolatlarında 2000’li yılların başından itibaren, antimikrobiyal direnç profilinde giderek artması sonucu, Dünya Sağlık Örgütü’nün(DSÖ) bu patojeni, hedef listesinde ilk sıraya almıştır. Son kuşak antimikrobiallerden olan kolistinle karşı da direnç gelişmesiyle beraber, yeni antimikrobiyal geliştirme çabalarını tetiklemiştir.

1960’lı yıllardan itibaren klorheksidinin, kullanıma girmesiyle beraber, moleküler tekniklerin gelişmesi ve dizileme yöntemlerinin ucuzlamasıyla daha yaygın hale gelmesi, çeşitli hareketli genetik elemanların dizisinin belirlenmesini sağlamıştır. Çeşitli plazmid ve integron kaynaklı antiseptik direnç genlerinin çevrede mevcudiyeti toplum sağlığı açısından son derece kaygı vericidir.

Değişik tarihlerde yapılan çalışmalar antiseptikler ile antibiyotik direnci arasında ilişkinin aydınlatılmasına ihtiyaç oluşturmuştur. Klorheksidin kullanımının artmasıyla eşlenik olarak, kolistin direncinin artmasının paralel olması üzerine “klorheksidine maruz kalan bakterilerde kolistin direnci gelişiyor olabilir mi?” tezi ortaya atılmış ve incelenmiştir. A. *baumannii* CHX setrimid ile birlikte ve ayrı olarak bir dakika kadar muamele edilmesinin bakterinin zeta potansiyeli üzerindeki etkisinin incelenmesi sonuç olarak bakteri üzerindeki negatif yükte ciddi bir azalma olduğunun gözlenmesi bu konuda dikkatleri çeken araştırmalardan birisidir(84). Klinik örneklerden izole edilen *K. pneumoniae* izolatların, kademeli olarak klorheksidine maruz kalmasından sonra kolistin direncinin ortaya çıktığı ve bunun da *pmrB* genlerinden kaynaklanan mutasyonların sonucu olduğu, ayrıca klorheksidine dirençli hale getirilen suşlarda OD (optik dansite) ile yapılan incelemede fitness-cost saptandığı gösterilmiştir(78). *K. pneumoniae*’nın kademeli olarak alkol, benzalkolyum, klorheksidin gibi anti-septik maruziyetleri sonucunda sadece klorheksidin maruziyeti olan izolatlarda kolistin direnci meydana geldiği ve *pmrDK*, *phoPQ*’nun mRNA düzeyleri 5 ile 19’a kata kadar arttığı gözlenmiştir. Klorheksidin dirençli hale getirilen suşların çeşitli genlerinde mutasyon meydana gelmiş olup bunlar arasında; *phoP* ve *smvR* gibi sırasıyla kolistin ikili sistem ve MFS grubu atım pompası düzenleyici genlerde vardır(1).

A. *baumannii* de literatürde yeterli çalışmanın olmaması bizim bu konuya eğilmemizi sağlamıştır. Bu tezde A. *baumannii*’nin klorheksidin, kolistin duyarlılık



profillerinin ve dirençli izolatlarda klonal analizinin incelenmesi üzerinde durulmuştur.

Çalışmada Ocak- Temmuz-2020 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarına gönderilen çeşitli örneklerden izole edilen yüz *A. baumannii* izolatı dahil edilmiştir.

Bizim çalışmamızda , yüz *A. baumannii* ile yapılan çalışmada onbeş izolatın (%15) kolistin dirençli olup MİK değerleri 4 mg/L ile 128 mg/L arasında saptanmıştır. Onyeddi izolatın (%17) klorheksidin orta duyarlı olduğu, bu izolatların 32 mg/L MİK değerine sahip olduğu ve dirençli izolatın saptanamadığı gözlenmiştir. Klorheksidine karşı orta duyarlı olan sadece bir (%1) izolatın kolistin dirençli olduğu gözlenmiştir. Klorheksidin azalmış duyarlı olan bakterilerin %47'si kan kaynaklı izolatlar olup %29,4'ü ise DTA gibi numunelerden izole edilmesi ve izolatların %47'sinin ise iç hastalıkları yoğun bakımdan izole edilmesi kaygı vericidir. Kolistin dirençli izolatların %53,3'ü DTA, %33,3'ü kan kaynaklı olması ve dirençli izolatların %40'ünün iç hastalıkları yoğun bakımdan kaynaklanmaktadır. Bu durum iç hastalıkları yoğun bakım servisinin enfeksiyon kontrol komitesi tarafından daha sıkı karar ve tedbir almasını sağlayabilir. Bunun dışında *prnB*, *crrA,B,C*, *pmrA*, *pmrC*, genlerdeki değişikliklerin, gen klonlanmasıyla ekspresyon vektörü içerisine konarak etkinliklerinin değerlendirilmesi gibi ileri düzey çalışmalara ihtiyaç vardır.

Vakili ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, %95 izolatın MDR olduğu 60 adet *A. baumannii* izolatının, 7(%11,6) tanesi E-test ile kolistin dirençli olduğu saptanmıştır(85). Hameed ve arkadaşlarının 62 adet *A. baumannii* izolatını mikrodilüsyon yöntemiyle değerlendirdikten sonra 6 (%9,6) izolatın kolistin dirençli olduğu görülmüştür(86). Pormohammad ve arkadaşlarının ele aldığı bir metaanalizde, Lübnan'da (%17), Çin'de (%12) ve en düşük olan ülke ise Almanya (%0,2) olduğu gözlenmiştir(87). Nowak ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, İtalya, İspanya ve Yunanistan'da ventilatör ile ilişkili pnömoni hastalarından izole edilen 124 *A. baumannii*, kolistin direnç oranı sırasıyla %42.9, %28.6 ve % 56.8 olarak bulunmuştur(88). Lin ve arkadaşları 42 *A. baumannii* klinik izolatı ile yaptıkları çalışmada kolistin duyarlı, orta duyarlı ve direnç oranlarını sırasıyla; %36, %17 ve %47 olarak bulmuşlardır(80).

*S. mutans* izolatlarında, klorheksidine maruz bırakıldığında, daptomisin ve kloramfenikol için artmış MİK değerlerine sahip koloni varyantlarının olduğu ve azalmış bakteriosin üretimi ve artmış hidrojen peroksit duyarlılığı gözlenmektedir. Ayrıca bu çalışmada insan kaynaklı oral biyofilm içerisinde *S. mutans*'ın izolasyonun azalması klorheksidin maruziyetinin fitness-cost olduğunu göstermektedir(84). Bundan hareketle, bizim çalışmamızda *A. baumannii*'lerin klorheksidin orta duyarlı 17 adet (%17) izolattan, 1 (%1) tanesinde kolistin direnci olması fitness-cost olabileceğini gösterebilir.

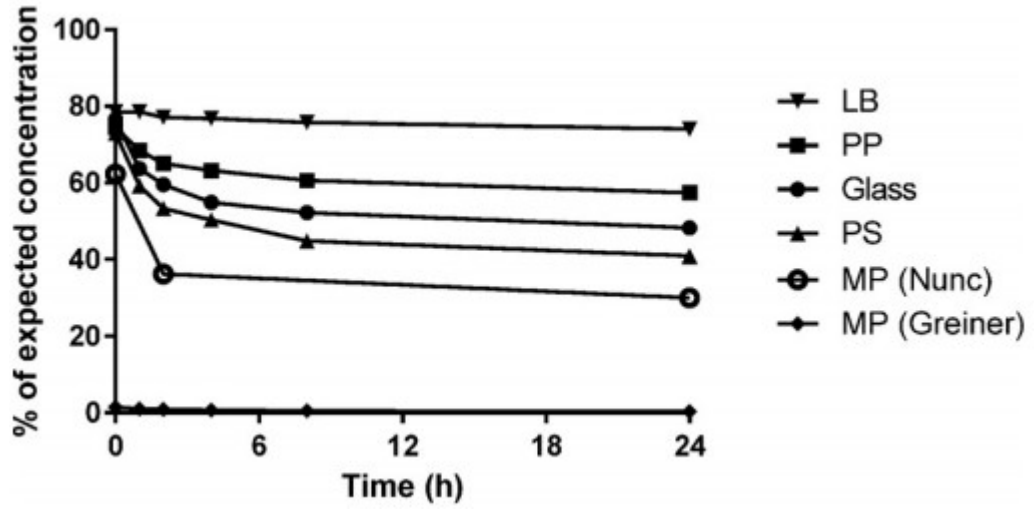
Diğer taraftan kolistin direnci ile ilgili laboratuvar çalışmalarında ciddi yöntem kısıtlılıkları vardır. Yöntem kısıtlılıkları çalışmaların bire bir karşılaştırılmaları üzerindeki en büyük engeldir. Kolistin, hedefinde kalsiyum, magnezyum ile yarışmaya girdiği için, yüksek katyon konsantrasyonu kolistinin etkisini azaltarak ve MİK değerlerinde yalancı yüksekliklere neden olabilir. Diğer taraftan, idrardaki artmış kalsiyum ve azalan pH fizyolojik değişikliklerin her ikisinde de MİK değerleri artırdığı gösterilmiştir. Bunun dışında in vivo ve in vitro MİK değeri arasında farklılıklar olabilir. Dolayısıyla, insan serumunda var olan antibakteriyal maddelerin MİK değeri üzerine etkili olduğu düşünülmektedir. Antibakteriyal peptidlerin ve komplemanın bakteriyel membran bütünlüğünü bozarak porlar oluşmasına nedcen olmaktadır. Bakteri bunlardan kaçınmak için LPS'ye bağlı açıl miktarını azaltmaktadır ve bu da kolistin duyarlılığını artırmaktadır. Fakat ısı ile muamele edilen serumda herhangi MİK değeri değişikliği gözlenmemiştir(89). Bunun dışında, kullanılan besiyerine göre de antimikrobiyal duyarlılık değişmektedir. Isosensitest (Oxoid), sabit mineral içeriğiyle antimikrobiyal duyarlılık ve heterodirenç gösteren suşları saptama konusunda MHA'a göre daha iyi sonuç vermektedir(90).

CLSI, kalsiyum ve magnezyum değerlerini sırasıyla 20-25 mg/L ve 10-12,5 mg/L arasında olmasını önermektedir. Tablo 1.1-2. gösterildiği gibi ticari sistemlerde divalant katyon değerleri oldukça düşüktür ve test öncesi istenilen seviyeye getirilmesi gerekmektedir ve muhtemeldir ki disk difüzyon ve gradient testlerindeki daha yüksek kalsiyum, magnezyum değerleri nedeniyle, MİK değerleri referans yöntemine göre daha yüksek çıkmaktadır(91).

Yöntemler arasında bir diğer farklılık ise inokulum miktarının değişmesidir. İnokulum miktarı arttıkça, ticari olarak kullanılan, CA-MHB besiyerlerine göre

ayarlanan duyarlılık testlerindeki MİK değeri artmaktadır. Bu fenomen inokulum etkisi olarak da bilinmektedir. Artan inokulum miktarlarında duyarlı *E.coli*'nin kolistin MİK değerleri, yanlışlıkla dirençli olarak okunmasına neden olabilecek eşik değeri geçecek seviyelere gelebilmektedir. Ayrıca yapılan fare modelinde ise, inokulum artmış olması , *mcr-1* ihtiva eden *E. coli* ile aynı mortalite oranına sahiptir ve bu da ilacın etkinliğinin azalması konusunda fikir vermekle beraber, kolistin-dirençli sub-popülasyon olma ihtimalinin de arttığı gösterilmiştir(92).

Kullanılan kolistin moleküler yapısı da yöntemi etkilemektedir. Bilindiği gibi ticari kolistin içeriği çeşitli oranlarda polimiksin E ve B içeriği mevcut olup daha çok polimiksin B oluşturmaktadır. Ticari olarak hazırlanmış olan polimiksinin B (1-4) kendi içerisinde dikkate değer bir fark olmadığı gözlenmiştir(93). Mikrodilüsyonun yapıldığı materyal; polipropilen, polistren, düşük sıcaklıkta protein bağlayan tüpler, cam tüplerden oluşmaktadır. Kolistin doğası gereği polikasyonik, hidrofilik ve lipofilik yapısından dolayı, bir çok maddeyle etkileşmektedir. Dolayısıyla sinerji testi, duyarlılık testi, pK-pD testlerinin yapıldığı mikropalakaların hangi maddeden olduğu önem arz etmektedir. Polistren negatif yüke sahip olup, kolistin adsorbsiyonuna neden olur ve etkin miktarın azalmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak yapılan deney sonuçlarına göre polistren önerilmezken, düşük-protein bağlayan tüpler (polypropilen) CLSI/EUCAST tarafından önerilmektedir. Bunun dışındaki cam tüpler ve polistren kolistini bağlaması nedeniyle önerilmemektedir. Laboratuvar çalışmalarında kolistin seyreltilirken, yeni kuyucuklara konulduğunda da yüzeylere bağlanacağı için, konsantrasyon daha da düşmektedir(94). Sıvı mikrodilüsyonda kullanılan maddelerdeki kolistin yüzdesi Şekil 3.9'da mevcuttur. Polimiksin B, plastik yüzeylere, kolistine göre daha çok bağlanmaktadır ve bu da kolistin duyarlı suşlarda MİK değerlerinden daha yüksek değerlerde seyretmesine neden olmaktadır. Aksi olarak, kolistin dirençli olan suşlarda ise polimiksin B daha etkili gibi gözükmektedir(95).



Şekil 3.9. Sıvı Mikrodilüsyonda Kullanılan Maddelerdeki Kolistin Yüzdesi (94)

Kullanılan mikroplaka ve tüplerin yapısındaki farklılıkların sonuçlar üzerine ciddi etkisi olacağı açıktır. Bu problemin üzerinden gelmenin bir yolu ise sürfaktan olan Twen-80/Polysorbat 80 kullanmak olabilir. Bu bileşik kozmetikten, aşı ve ilaç endüstrisine kadar, köpük oluşmasını engelleyici madde ve eksipiyen madde olarak kullanılmakla beraber, CLSI tarafından henüz kullanımını önermemektedir. Diğer taraftan sürfaktanların özellikle P-80'in kendisine ait hem antimikrobiyal aktivitesi olup hem de diğer antimikrobiyal maddelerle-klorheksidin ve kolistin-sinerjistik etkileşime girebilir. Ancak sürfaktanların bu intrinsik antimikrobiyal aktivitesinin kolistin dirençli olan suşlar üzerinde etkisi tartışmalıdır. Sürfaktanlar diğer antimikrobiallerle kombine edildiğinde hücre geçirgenliğini artırmaktadır(96, 97). Sonuç olarak P80 polimiksinlerle beraber kullanıldığında, kolistinin hücre duvarına zarar vermesinden sonra hücre içerisine girerek, hücre ölümünü hızlandırabilir(98).

Yöntem olarak farklılık olarak ifade edilmese de kolistin direncinin korunması testler arasında farklı sonuçların elde edilmesine neden olabilir. Ortamda antimikrobiyal madde olmaksızın, çeşitli hareketli genetik elementlerin, hücreden ayrıldığı bilinmektedir(99). Benzeri durum, kolistin içinde geçerli olabilmektedir ve yapılan bir çalışmada ise in-vitro, kademeli olarak kolistin-dirençli hale getirilen bakterilerin, kolistin içermeyen ortamda, yeniden duyarlı hale gelebildiği gösterilmiştir(100). Bakterilerin -70°C ortamda uzun süre (6-8 ay) saklanması kolistin duyarlılığı üzerine bir etkisi olabilir(101).

Bu araştırma ülkemizde, *A. baumannii* izolatlarının klorheksidin duyarlılık profilini değerlendiren ilk çalışma olma özelliğine sahiptir.

Sonuç olarak, *A. baumannii* kaynaklı enfeksiyonlarda kullanılan son kuşak antimikrobiyal olan kolistine karşı gerek kromozomal gerekse plazmid kaynaklı direncin artması göz önünde bulunduğu ve klorheksidin için ticari olarak satılan solüsyonlar içerisinde konsantrasyonun henüz mevcut MİK değerlerinin çok üzerinde olması, endişe verici olmasada, antiseptiklerin daha akılcı kullanımı ve direncin takip edilmesine yönelik standart bir test veya testlerin yayımlanması gerekmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ocak 2020 ile Temmuz 2020 tarihleri arasında, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri, Merkez Laboratuvarından elde edilen yüz *A. baumannii* izolatının onbeşinin (%15) kolistin dirençli olduğu, on yedisinin (%17) ise klorheksidine azalmış duyarlılık gösterdiği gözlenmiştir. Bunlardan bir izolat ise hem klorheksidine azalmış duyarlılık hem kolistine direnç göstermiştir.

İzolatların kolistin için, EUCAST (2019) yılı önerilerine göre sıvı mikrodilüsyon kullanılarak analiz edilirken, klorheksidin için herhangi bir rehberin olmaması nedeniyle, alanında güvenilen dergilerde yayınlanan makalelerin yöntemlerinin EUCAST ve CLSI kriterlerine adapte edilmesiyle oluşturulan sıvı mikrodilüsyon yöntemine göre değerlendirilmiştir.

PFGE çalışmasında, eşik değer %80 olarak belirlenmiştir on dört kolistin dirençli izolatın yedi farklı pulsotip geldiği bulunmuştur. Bu ise vertikal olarak farklı klonlardan *A.baumannii* izolatların, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanelerinde mevcut olduğunu ve enfeksiyon nedeni olduğunu göstermektedir.

In-vitro klorheksidine kademeli olarak dirençli hale getirilen *K. pneumoniae* suşlarının kolistin direnci göstermesi; on yedi klorheksidin azalmış duyarlılığı olan *A. baumannii* suşlarından, bir tanesinin kolistin direncinin olması fitness-cost'a neden olduğunu gösterebilir.

Mevcut kolistin direncinin artmasından dolayı ülkemizdeki direnç frekansını saptayacak ve bu izolatların var olan dirençten sorumlu elemanların gerek kütle spektrofotometrik yöntemle gerekse günümüz teknolojisini kullanarak moleküler çalışmaların yapılması gerekmektedir. Klorheksidine ait ulusal çapta, izolatların toplanıp sınır değeri oluşturmak ve buna yönelik bir kılavuz oluşturulması bizi bu alanda ön plana geçirecektir. Çünkü henüz dünya genelinde mevcut antiseptiklerle çalışma klavuzu bulunmamaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Wand ME, Bock LJ, Bonney LC, Sutton JM. Mechanisms of increased resistance to chlorhexidine and cross-resistance to colistin following exposure of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to chlorhexidine. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017;61(1):e01162-16.
2. McQueary CN, Kirkup BC, Si Y, Barlow M, Actis LA, Craft DW, et al. Extracellular stress and lipopolysaccharide modulate *Acinetobacter baumannii* surface-associated motility. *Journal of microbiology*. 2012;50:434-43.
3. Vázquez-López R, Solano-Gálvez SG, Juárez Vignon-Whaley JJ, Abello Vaamonde JA, Padró Alonzo LA, Rivera Reséndiz A, et al. *Acinetobacter baumannii* resistance: a real challenge for clinicians. *Antibiotics*. 2020;9(4):205.
4. Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. The University of Chicago Press; 2008. p. 1079-81.
5. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the bla OXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(8):2974-6.
6. Choi CH, Lee JS, Lee YC, Park TI, Lee JC. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC microbiology*. 2008;8:1-11.
7. Gentile V, Frangipani E, Bonchi C, Minandri F, Runci F, Visca P. Iron

- and *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Pathogens*. 2014;3(3):704-19.
8. Šeputienė V, Povilonis J, Sužiedėlienė E. Novel variants of AbaR resistance islands with a common backbone in *Acinetobacter baumannii* isolates of European clone II. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(4):1969-73.
  9. Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(12):3375-80.
  10. Abdi SN, Ghotaslou R, Ganbarov K, Mobed A, Tanomand A, Yousefi M, et al. *Acinetobacter baumannii* efflux pumps and antibiotic resistance. *Infection and drug resistance*. 2020:423-34.
  11. Yin J, Wang G, Cheng D, Fu J, Qiu J, Yu Z. Inactivation of polymyxin by hydrolytic mechanism. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2019;63(6):e02378-18.
  12. Nation RL, Li J. Colistin in the 21st century. *Current opinion in infectious diseases*. 2009;22(6):535-43.
  13. Gallardo-Godoy A, Muldoon C, Becker B, Elliott AG, Lash LH, Huang JX, et al. Activity and predicted nephrotoxicity of synthetic antibiotics based on polymyxin B. *Journal of medicinal chemistry*. 2016;59(3):1068-77.
  14. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clinical microbiology reviews*. 2017;30(2):557-96.



15. Yu Z, Cai Y, Qin W, Lin J, Qiu J. Polymyxin E induces rapid *Paenibacillus polymyxa* death by damaging cell membrane while Ca<sup>2+</sup> can protect cells from damage. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135198.
16. Deris ZZ, Akter J, Sivanesan S, Roberts KD, Thompson PE, Nation RL, et al. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *The Journal of antibiotics*. 2014;67(2):147-51.
17. Sampson TR, Liu X, Schroeder MR, Kraft CS, Burd EM, Weiss DS. Rapid killing of *Acinetobacter baumannii* by polymyxins is mediated by a hydroxyl radical death pathway. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(11):5642-9.
18. Sabnis A, Hagart KL, Klöckner A, Becce M, Evans LE, Furniss RCD, et al. Colistin kills bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane. *Elife*. 2021;10:e65836.
19. Jayol A, Saly M, Nordmann P, Ménard A, Poirel L, Dubois V. *Hafnia*, an enterobacterial genus naturally resistant to colistin revealed by three susceptibility testing methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017;72(9):2507-11.
20. Bergen PJ, Li J, Rayner CR, Nation RL. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(6):1953-8.
21. Owen RJ, Li J, Nation RL, Spelman D. In vitro pharmacodynamics of colistin against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007;59(3):473-7.

22. Bergen PJ, Landersdorfer CB, Zhang J, Zhao M, Lee HJ, Nation RL, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 'old' polymyxins: what is new? *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2012;74(3):213-23.
23. Li Y, Lin X, Yao X, Huang Y, Liu W, Ma T, et al. Synergistic antimicrobial activity of colistin in combination with rifampin and azithromycin against *Escherichia coli* producing MCR-1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018;62(12):e01631-18.
24. Timurkaynak F, Can F, Azap ÖK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SÖ. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *International journal of antimicrobial agents*. 2006;27(3):224-8.
25. Hornsey M, Phee L, Longshaw C, Wareham DW. In vivo efficacy of telavancin/colistin combination therapy in a *Galleria mellonella* model of *Acinetobacter baumannii* infection. *International journal of antimicrobial agents*. 2013;41(3):285-7.
26. Wang Y, Li H, Xie X, Wu X, Li X, Zhao Z, et al. In vitro and in vivo assessment of the antibacterial activity of colistin alone and in combination with other antibiotics against *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2020;20:351-9.
27. Tamayo M, Santiso R, Otero F, Bou G, Lepe JA, McConnell MJ, et al. Rapid determination of colistin resistance in clinical strains of *Acinetobacter baumannii* by use of the micromax assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(11):3675-82.

28. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid detection of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. *Emerging infectious diseases*. 2016;22(6):1038.
29. Jayol A, Dubois V, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of polymyxin-resistant Enterobacteriaceae from blood cultures. *Journal of clinical microbiology*. 2016;54(9):2273-7.
30. Lescat M, Poirel L, Tinguely C, Nordmann P. A resazurin reduction-based assay for rapid detection of polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of clinical microbiology*. 2019;57(3):e01563-18.
31. Abdul Momin MHF, Bean DC, Hendriksen RS, Haenni M, Phee LM, Wareham DW. CHROMagar COL-APSE: a selective bacterial culture medium for the isolation and differentiation of colistin-resistant Gram-negative pathogens. *Journal of Medical Microbiology*. 2017;66(11):1554-61.
32. García-Fernández S, García-Castillo M, Ruiz-Garbajosa P, Morosini M-I, Bala Y, Zambardi G, et al. Performance of CHROMID® Colistin R agar, a new chromogenic medium for screening of colistin-resistant Enterobacterales. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2019;93(1):1-4.
33. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. A universal culture medium for screening polymyxin-resistant Gram-negative isolates. *Journal of clinical microbiology*. 2016;54(5):1395-9.
34. Furniss RCD, Dortet L, Bolland W, Drews O, Sparbier K, Bonnin RA, et al. Detection of colistin resistance in *Escherichia coli* by use of the MALDI

Biotyper Sirius mass spectrometry system. *Journal of clinical microbiology*. 2019;57(12):e01427-19.

35. Dortet L, Potron A, Bonnin RA, Plesiat P, Naas T, Filloux A, et al. Rapid detection of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* using MALDI-TOF-based lipidomics on intact bacteria. *Scientific reports*. 2018;8(1):16910.

36. Aghapour Z, Gholizadeh P, Ganbarov K, Bialvaei AZ, Mahmood SS, Tanomand A, et al. Molecular mechanisms related to colistin resistance in Enterobacteriaceae. *Infection and drug resistance*. 2019:965-75.

37. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JD, Vinogradov E, Seemann T, et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(12):4971-7.

38. Emma L. A. Macfarlane AK, Martina M. Ochs, Robert E. W. Hancock. PhoP–PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Molecular Microbiology*. 1999;34(2):305-16.

39. Aquilini E, Merino S, Knirel YA, Regué M, Tomás JM. Functional identification of *Proteus mirabilis* eptC gene encoding a core lipopolysaccharide phosphoethanolamine transferase. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(4):6689-702.

40. Tavares-Carreón F, Fathy Mohamed Y, Andrade A, Valvano MA. ArnT proteins that catalyze the glycosylation of lipopolysaccharide share common features with bacterial N-oligosaccharyltransferases. *Glycobiology*.

2016;26(3):286-300.

41. McCoy AJ, Liu H, Falla TJ, Gunn JS. Identification of *Proteus mirabilis* mutants with increased sensitivity to antimicrobial peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(7):2030-7.

42. Novem V, Shui G, Wang D, Bendt AK, Sim SH, Liu Y, et al. Structural and biological diversity of lipopolysaccharides from *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2009;16(10):1420-8.

43. Ortega XP, Cardona ST, Brown AR, Loutet SA, Flannagan RS, Campopiano DJ, et al. A putative gene cluster for aminoarabinose biosynthesis is essential for *Burkholderia cenocepacia* viability. *Journal of bacteriology*. 2007;189(9):3639-44.

44. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: a new worry and cause for vigilance. *Elsevier*; 2016. p. 1-3.

45. Cheng Y-H, Lin T-L, Lin Y-T, Wang J-T. Amino acid substitutions of CrrB responsible for resistance to colistin through CrrC in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(6):3709-16.

46. Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas M-V, Ozdamar M, Türkoglu S, et al. The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015;70(1):75-80.

47. De Majumdar S, Yu J, Fookes M, McAteer SP, Llobet E, Finn S, et al. Elucidation of the RamA regulon in *Klebsiella pneumoniae* reveals a role in

LPS regulation. *PLoS pathogens*. 2015;11(1):e1004627.

48. Sun L, Rasmussen PK, Bai Y, Chen X, Cai T, Wang J, et al. Proteomic changes of *Klebsiella pneumoniae* in response to colistin treatment and *crrB* mutation-mediated colistin resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2020;64(6):e02200-19.

49. Cheng Y-H, Lin T-L, Lin Y-T, Wang J-T. A putative RND-type efflux pump, H239\_3064, contributes to colistin resistance through *CrrB* in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73(6):1509-16.

50. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. *Klebsiella pneumoniae* *AcrAB* efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(1):177-83.

51. Lin M-F, Lin Y-Y, Lan C-Y. Contribution of *EmrAB* efflux pumps to colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Microbiology*. 2017;55:130-6.

52. Bengoechea JA, Skurnik M. Temperature-regulated efflux pump/potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*. *Molecular microbiology*. 2000;37(1):67-80.

53. Walsh C, Wencewicz T. *Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities*: John Wiley & Sons; 2020.

54. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular

biological study. *The Lancet infectious diseases*. 2016;16(2):161-8.

55. Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerging microbes & infections*. 2020;9(1):508-16.

56. Kieffer N, Nordmann P, Millemann Y, Poirel L. Functional characterization of a miniature inverted transposable element at the origin of *mcr-5* gene acquisition in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2019;63(7):e00559-19.

57. AbuOun M, Stubberfield EJ, Duggett NA, Kirchner M, Dormer L, Nunez-Garcia J, et al. *mcr-1* and *mcr-2* variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017;72(10):2745-9.

58. Partridge SR, Di Pilato V, Doi Y, Feldgarden M, Haft DH, Klimke W, et al. Proposal for assignment of allele numbers for mobile colistin resistance (*mcr*) genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73(10):2625-30.

59. Ling Z, Yin W, Shen Z, Wang Y, Shen J, Walsh TR. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020;75(11):3087-95.

60. Lim K-S, Kam P. Chlorhexidine-pharmacology and clinical applications. *Anaesthesia and intensive care*. 2008;36(4):502-12.

61. Leikin J, Paloucek F. *Poisoning and toxicology handbook*. 4th. New York: Informa healthcare. 2008.

62. Cheung H-Y, Wong MM-K, Cheung S-H, Liang LY, Lam Y-W, Chiu S-K. Differential actions of chlorhexidine on the cell wall of *Bacillus subtilis* and

*Escherichia coli*. PLoS One. 2012;7(5):e36659.

63. Correa J, De Paulis A, Predari S, Sordelli D, Jeric P. First report of *qacG*, *qacH* and *qacJ* genes in *Staphylococcus haemolyticus* human clinical isolates. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;62(5):956-60.

64. Lekshmi M, Ammini P, Adjei J, Sanford LM, Shrestha U, Kumar S, et al. Modulation of antimicrobial efflux pumps of the major facilitator superfamily in *Staphylococcus aureus*. *AIMS microbiology*. 2018;4(1):1.

65. Wang J-T, Sheng W-H, Wang J-L, Chen D, Chen M-L, Chen Y-C, et al. Longitudinal analysis of chlorhexidine susceptibilities of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a teaching hospital in Taiwan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008;62(3):514-7.

66. Ho C-M, Li C-Y, Ho M-W, Lin C-Y, Liu S-H, Lu J-J. High rate of *qacA*- and *qacB*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from chlorhexidine-impregnated catheter-related bloodstream infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(11):5693-7.

67. Ghasemzadeh-Moghaddam H, van Belkum A, Hamat RA, van Wamel W, Neela V. Methicillin-susceptible and-resistant *Staphylococcus aureus* with high-level antiseptic and low-level mupirocin resistance in Malaysia. *Microbial Drug Resistance*. 2014;20(5):472-7.

68. Liu WJ, Fu L, Huang M, Zhang JP, Wu Y, Zhou YS, et al. Frequency of antiseptic resistance genes and reduced susceptibility to biocides in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of medical microbiology*. 2017;66(1):13-7.

69. Abuzaid A, Hamouda A, Amyes S. *Klebsiella pneumoniae*



susceptibility to biocides and its association with *cepA*, *qacΔE* and *qacE* efflux pump genes and antibiotic resistance. *Journal of Hospital Infection*. 2012;81(2):87-91.

70. Mahmoudvand H, Azadpour M, Nowroozi J, Goudarzi G. Presence of *qacEΔ1* and *cepA* genes and susceptibility to a hospital biocide in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Iran. *Tropical Biomedicine*. 2015;32(1):109-15.

71. Naparstek L, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Banin E, Navon-Venezia S. Reduced susceptibility to chlorhexidine among extremely-drug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Hospital Infection*. 2012;81(1):15-9.

72. McNeil JC, Hulten KG, Kaplan SL, Mason EO. Decreased susceptibilities to retapamulin, mupirocin, and chlorhexidine among *Staphylococcus aureus* isolates causing skin and soft tissue infections in otherwise healthy children. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(5):2878-83.

73. Liu Q, Hassan KA, Ashwood HE, Gamage HK, Li L, Mabbutt BC, et al. Regulation of the *acel* multidrug efflux pump gene in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73(6):1492-500.

74. Guzmán Prieto AM, Wijngaarden J, Braat JC, Rogers MR, Majoor E, Brouwer EC, et al. The two-component system *ChtRS* contributes to chlorhexidine tolerance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017;61(5):e02122-16.

75. Addetia A, Greninger AL, Adler A, Yuan S, Makhsous N, Qin X, et al.

A novel, widespread *qacA* allele results in reduced chlorhexidine susceptibility in *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2019;63(6):e02607-18.

76. Canal N, Meneghetti KL, Almeida CPd, Bastos MdR, Otton LM, Corção G. Characterization of the variable region in the class 1 integron of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from surface water. *Brazilian journal of microbiology*. 2016;47:337-44.

77. Gillings MR, Xuejun D, Hardwick SA, Holley MP, Stokes H. Gene cassettes encoding resistance to quaternary ammonium compounds: a role in the origin of clinical class 1 integrons? *The ISME journal*. 2009;3(2):209-15.

78. Jeong S, Hong JS, Kim JO, Kim K-H, Lee W, Bae IK, et al. Identification of *Acinetobacter* species using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Annals of laboratory medicine*. 2016;36(4):325.

79. Villalón P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Rubio V, Vindel A, Saez-Nieto JA. Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(3):875-82.

80. Lin F, Xu Y, Chang Y, Liu C, Jia X, Ling B. Molecular characterization of reduced susceptibility to biocides in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:1836.

81. Romesburg C. *Cluster analysis for researchers*: Lulu. com; 2004.

82. Goering RV. *Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease*.

Infection, Genetics and Evolution. 2010;10(7):866-75.

83. Rafei R, Dabboussi F, Hamze M, Eveillard M, Lemarié C, Gaultier M-P, et al. Molecular analysis of *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Lebanon using four different typing methods. *PLoS One*. 2014;9(12):e115969.

84. Krishnamoorthy S, Shah BP, Lee HH, Martinez LR. Microbicides alter the expression and function of RND-type efflux pump AdeABC in biofilm-associated cells of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016;60(1):57-63.

85. Vakili B, Fazeli H, Shoaie P, Yaran M, Ataei B, Khorvash F, et al. Detection of colistin sensitivity in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Iran. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2014;19(Suppl 1):S67.

86. Hameed F, Khan MA, Muhammad H, Sarwar T, Bilal H, Rehman TU. Plasmid-mediated *mcr-1* gene in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: first report from Pakistan. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2019;52.

87. Pormohammad A, Mehdinejadi K, Gholizadeh P, Nasiri MJ, Mohtavinejad N, Dadashi M, et al. Global prevalence of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: A systematic review and meta-analysis. *Microbial pathogenesis*. 2020;139:103887.

88. Nowak J, Zander E, Stefanik D, Higgins PG, Roca I, Vila J, et al. High incidence of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain

as part of the MagicBullet clinical trial. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017;72(12):3277-82.

89. Loose M, Naber KG, Coates A, Wagenlehner FM, Hu Y. Effect of different media on the bactericidal activity of colistin and on the synergistic combination with azidothymidine against *mcr-1*-positive colistin-resistant *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11:54.

90. Lo-Ten-Foe JR, de Smet AMG, Diederens BM, Kluytmans JA, van Keulen PH. 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. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(10):3726-30.

91. Girardello R, Bispo PJ, Yamanaka TM, Gales AC. Cation concentration variability of four distinct Mueller-Hinton agar brands influences polymyxin B susceptibility results. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(7):2414-8.

92. Fantin B, Poujade J, Grégoire N, Chau F, Roujansky A, Kieffer N, et al. The inoculum effect of *Escherichia coli* expressing *mcr-1* or not on colistin activity in a murine model of peritonitis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019;25(12):1563. e5-. e8.

93. Tam VH, Cao H, Ledesma KR, Hu M. In vitro potency of various polymyxin B components. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(9):4490.

94. Karvanen M, Malmberg C, Lagerbäck P, Friberg LE, Cars O. Colistin

is extensively lost during standard in vitro experimental conditions. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017;61(11):e00857-17.

95. Sader HS, Rhomberg PR, Farrell DJ, Jones RN. Differences in potency and categorical agreement between colistin and polymyxin B when testing 15,377 clinical strains collected worldwide. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2015;83(4):379-81.

96. Nielsen CK, Kjems J, Mygind T, Snabe T, Meyer RL. Effects of Tween 80 on growth and biofilm formation in laboratory media. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:1878.

97. Brown DF, Wootton M, Howe RA. Antimicrobial susceptibility testing breakpoints and methods from BSAC to EUCAST. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;71(1):3-5.

98. Ezadi F, Ardebili A, Mirnejad R. Antimicrobial susceptibility testing for polymyxins: challenges, issues, and recommendations. *Journal of clinical microbiology*. 2019;57(4):e01390-18.

99. Camps M. Modulation of ColE1-like plasmid replication for recombinant gene expression. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences (Discontinued)*. 2010;4(1):58-73.

100. Lee J-Y, Choi M-J, Choi HJ, Ko KS. Preservation of acquired colistin resistance in Gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(1):609-12.

101. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(6):1678-84.

