

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

**KLİNİK *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* İZOLATLARINDA
KOLİSTİN HETERODİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Ümran LİSTE

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2019

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

**KLİNİK *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* İZOLATLARINDA
KOLİSTİN HETERODİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Ümran LİSTE

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Cumhuri ÖZKUYUMCU

Prof.Dr.Banu SANCAK

ANKARA

2019

TEŞEKKÜR

Eğitimim boyunca yanlarında çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, bilgi ve tecrübelerinden her zaman yararlandığım, her durumda ilgi, anlayış ve desteklerini gördüğüm, dürüstlük, yardımseverlik ve çalışma azimlerini örnek aldığım, üzerimde çok büyük emekleri olan ve tezimin gerçekleşmesinde çok büyük katkıları bulunan, büyük saygı ve sevgi duyduğum değerli hocalarım Prof. Dr. Banu SANCAK'a ve Prof. Dr. Cumhuri ÖZKUYUMCU 'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca uzmanlık eğitimime onunla başlayıp onunla bitirdiğim, iyi ve kötü günde hep yanımda olan alışkan atom karınca arkadaşım Asiye BIAKIĞİL'e teşekkürü ederim.

Yine tezimin yapım aşamasında destekleri olan Nejla KILIÇ'a da teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Liste Ü., Klinik *Stenotrophomonas maltophilia* izolatlarında kolistin heterodirencinin araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi, Ankara, 2019. *Stenotrophomonas maltophilia*, özellikle hastanede yatan hastalarda görülen, fırsatçı ,çok ilaca dirençli, gram-negatif bir basildir. Aynı zamanda, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış ya da zayıflamış ve yoğun bakım ünitelerinde ventilatör desteği gerektiren hastalarda, önemli morbidite ve mortalite ile ilişkili nozokomiyal bir patojendir. İnsanlarda hastalık yapma insidansı son yıllarda artmıştır. 2010-2016 yılları arasında Taiwan'da yapılan bir çalışmada *S. maltophilia*'nın sağlık hizmetleri ile ilişkili enfeksiyon etkeni olarak izole edilen mikroorganizmalar arasında *Acinetobacter* spp. ve *Enterobacter* spp.'den sonra üçüncü sırada yer aldığı bildirilmiştir. *S. maltophilia*'nın etken olduğu bakteremi, pnömoni, idrar yolu enfeksiyonu, oküler enfeksiyon, endokardit, menenjit, yumuşak doku ve yara enfeksiyonu, mastoidit, epididimit, kolanjit, osteokondrit bursit ve peritonit dahil olmak üzere çeşitli klinik sendromlar tanımlanmıştır. Bu nedenle tüm dünyada görülme sıklığı artan bu mikroorganizmanın epidemiyolojisi, risk faktörleri ve tedavisi hakkında yeni çalışmalara ihtiyaç vardır

S. maltophilia, diğer gram negatif bakterilerin ampirik tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı intrinsik olarak dirençlidir. *S. maltophilia*'nın tedavisinde ilk sırada tercih edilen ilaç trimetoprim-sülfametoksaldur. Minosiklin, tikarsilin-klavulanat, kolistin ve aztreonam gibi diğer bazı ilaçlar *in vitro* aktivite gösterebilse de bu ilaçlarla ilgili yeterli deneyim bulunmadığından ve *S. maltophilia* hızla direnç geliştirebildiği için bu ajanların potansiyel etkinliği de şüphelidir. Fakat TMP/SMX direnci görüldüğünde özellikle invaziv enfeksiyonlarda kombinasyon tedavileri zorunlu olmaktadır. *S. maltophilia*'daki yüksek intrinsik ve tedavi sırasında kazanılmış direnç bu durumu gerekli kılmaktadır. Önerilen kombinasyonlar, her iki ajanın da *in vitro* testlerde etkili olmaları koşuluyla seftazidim, tikarsililin-klavulanat, aztreonam, kolistin veya bir kinolon dahil olmak üzere herhangi bir ikinci grup

ajan ile trimetoprim-sülfametoksazolü içermektedir. Kolistin, çoklu ilaca dirençli gram negatif bakterilere karşı etkinliğini koruyan az sayıdaki antibiyotikten biridir. Çok ilaca dirençli gram negatif non-fermenter bakterilerde kolistinin kombinasyon tedavilerinde kullanılmasının hem toksisiteyi önlemede hem de tedavinin etkinliğini arttırmadaki başarısı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir

Tüm bunların yanında *S. maltophilia*'daki kolistin için önerilen duyarlılık test yöntemlerinin, özellikle adaptif direnç ve heterodirenç dahil olmak üzere farklı direnç mekanizmaları arasındaki karmaşık etkileşim nedeniyle güvenilir sonuçlara yol açabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmektedir. Bu sebeple çalışmamızda *S. maltophilia* enfeksiyonlarının tedavisinde alternatif olabileceğini düşündüğümüz bir ilaç olan kolistin için antibiyotik duyarlılığına farklı yöntemlerle bakılmıştır. Ayrıca tedavi başarısızlıklarına yol açan heterojen direnç varlığı da kolistin için araştırılmıştır

Çalışmamıza Aralık 2015 ve Nisan 2018 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Patoloji Laboratuvarı Bakteriyoloji Ünitesine gönderilen örneklerden izole edilen 212 *S. maltophilia* suşu dahil edilmiştir. Kolistin için antibiyotik duyarlılık gradient test ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri ile bakılmıştır. Her suş için iki kez bu yöntemler tekrarlanmıştır. Bu tekrarlar ile birlikte kolistin duyarlılığında kullanılan yöntemlerin tekrarlanabilirliğinde sorun olduğu gözlemlenmiştir.

Gradyent test ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri arasında uyumsuzluk olan ayrıca gradiyent testte zon içi üremeleri olan 55 izolat heterojen direnç açısından değerlendirilmiştir. Heterojen direncin tespiti için altın standart yöntem olan PAP testi kullanılmıştır. Kolistin heterodirenci toplamda 54 izolatta tespit edilmiştir. Kolistin heterodirenç sıklığı 54/212 (%25,5) olarak saptanmıştır. Bir izolatta ise tekrarlayan PAP testi sonucu heterojen direnç saptanamamıştır.

Anahtar Kelimeler: Kolistin, *Stenotrophomonas maltophilia*, hetero direnç

Destekleyen Kuruluş: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje
Birimi

Proje no: TSA-2019-17952

ABSTRACT

Liste U., Investigation of colistin heteroresistance in clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates ,Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis In Medical Microbiology, Ankara, 2019.

Stenotrophomonas maltophilia is a multidrug-resistant gram-negative bacillus that is an opportunistic pathogen, particularly among hospitalized patients. It is also an important nosocomial pathogen associated with substantial morbidity and mortality, particularly in debilitated or immunocompromised patients and patients requiring ventilatory support in intensive care units. The incidence of human infection appears to have increased in recent years. *S. maltophilia* is a infectious agent associated with health services that were reported to be in the third place after *Acinetobacter spp.* and *Enterobacter spp.* between 2010-2016. A variety of clinical syndromes caused by *S. maltophilia* have been described, including bacteremia, pneumonia, urinary tract infection, ocular infection, endocarditis, meningitis, soft tissue and wound infection, mastoiditis, epididymitis, cholangitis, osteochondritis, bursitis, and peritonitis. Therefore, new studies are needed on the epidemiology, risk factors and treatment of this microorganism, whose incidence is increasing all over the world

S. maltophilia is intrinsically resistant to most antibiotics used in the empirical treatment of other gram-negative bacteria. TMP-SMX is the first agent for the treatment of *S. maltophilia*. Although some other agents, such as minocycline, ticarcillin-clavulonate, colistin, and aztreonam may show in vitro activity, the potential efficacy of these agents is questionable as there is insufficient clinical experience with these agents and *S. maltophilia* can rapidly develop resistance. However, when TMP / SMX resistance is seen, combination therapies are essential, especially in invasive infections. High intrinsic and acquired resistance in *S. maltophilia* necessitates this condition. The proposed combinations include trimethoprim-sulfamethoxazole and any second group of agents, including ceftazidime, ticarcillylin-clavulanate, aztreonam, colistin or a fluoroquinolone, provided both agents are effective

in in vitro tests. Colistin is one of the few antimicrobials that retains activity against multi drug resistant Gram-negative bacteria . The success of using colistin in combination therapies in multi-drug resistant gram negative non-fermenter bacteria has been shown to prevent both toxicity and increase the efficacy of treatment.

Overall, various studies show that recommended susceptibility testing methods for colistin in *S. maltophilia* may lead to unreliable results, mainly due to a complex interaction between different resistance mechanisms in the bacterial cells, including both adaptive resistance and heteroresistance. For this reason, in our study, antibiotic susceptibility to colistin, a drug that we think may be an alternative in the treatment of *Stenotrophomonas maltophilia* infections isolated from various samples, was investigated with different methods. The presence of heteroresistance leading to treatment failures was also investigated for colistin.

A total of 212 *Stenotrophomonas maltophilia* strains, which sent to the Bacteriology Laboratory of Hacettepe University Hospital between December 2015 and April 2018 were included in the study. Gradient test and broth microdilution methods were used for antibiotic susceptibility of colistin. These methods were repeated at two times for each strain. With these repetitions, it was observed that the reproducibility of the methods used in colistin sensitivity was a problem.

55 isolates that, have incompatibility between gradient test and broth microdilution methods and colonies within inhibition zone by gradient test, were evaluated for heteroresistance. The gold standard method PAP test was used to determine heteroresistance. 54 isolates were found to have heteroresistance. The frequency of colistin heteroresistance was 54/212 (25.5%). In one isolate, heteroresistance was not detected by repeated PAP test.

Keywords : Colistin, *Stenotrophomonas maltophilia*, heteroresistance

Supported by Hacettepe University Scientific Research Project Unit

Project number: TSA-2019-17952

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	x
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xiii
1-GİRİŞ ve AMAÇ	1
2-GENEL BİLGİLER	2
2.1. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2
2.1.1. Tarihçe ve Sınıflandırma	2
2.1.2. Morfolojik ve Mikrobiyolojik Özellikleri	3
2.1.3. Virulans Faktörleri ve Patogenez	5
2.2. <i>S. maltophilia</i> Enfeksiyonları	8
2.2.1. Epidemiyoloji	9
2.2.2. Risk Faktörleri ve Bulaş	10
2.2.3. Laboratuvar Tanısı	11
2.2.4. Tedavi ve Direnç Mekanizmaları	12
2.2.4.1. Tedavi	12

2.2.4.2. Direnç Mekanizmaları	14
2.2.4.2.1. Enzimatik Mekanizmalar	14
2.2.4.2.2. Efluks Pompaları	15
2.2.4.2.3. Diğer Direnç Mekanizmaları	16
2.2.5. Antibiyotik Duyarlılık Testleri ve Değerlendirilen Antibiyotikler	16
2.2.5.1. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	16
2.2.5.2. Değerlendirilen Antibiyotikler	17
2.2.5.2.1. Trimetoprim-sülfametoksazol	17
2.2.5.2.2. Beta-laktamlar	18
2.2.5.2.3. Florokinolonlar	18
2.2.5.2.4. Tetrasiklinler ve Glisilsiklinler	19
2.2.5.2.5. Kloramfenikol	19
2.2.5.2.6. Polimiksinler	20
2.2.6. Heterodirenç Tanımı ve Değerlendirilmesi	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1. Bakterilerin İzolasyonu ve Tanımlaması	27
3.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri	27
3.2.1. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi	28
3.2.1.1. MHB'nin Hazırlanması	28
3.2.1.2. Antibiyotik Stok Solüsyonunun Hazırlanması	28
3.2.1.3. Bakteri inokulumu	28

3.2.1.4. Testin Yapılışı	29
3.2.1.5. Değerlendirme ve Yorum	29
3.2.2. Gradient Test Yöntemi	29
3.2.2.1. MHA'nın Hazırlanması	29
3.2.2.2. Bakteri İnokulumu	30
3.2.2.3. Testin Yapılışı	30
3.2.2.4. Değerlendirme ve Yorum	30
3.3. Kolistin Heterodirencinin Saptanması	31
3.3.1. Heterodirenç Gösteren İzolatların Saptanması	31
3.3.2. "Popülasyon Analiz Profili" (PAP) Yöntemi	31
4. BULGULAR	33
5. TARTIŞMA	47
KAYNAKLAR	52

SİMGELER ve KISALTMALAR

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
NCTC	<i>The National Collection of Type Cultures</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
EUCAST	<i>European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
MHSB	Mueller-Hinton Sıvı Besiyeri
MHA	Mueller-Hinton Agar

PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PAP	<i>Population Analysis Profile</i>
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
KF	Kistik Fibrozis

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 'nın sınıflandırılması	3
2.2. Direnç mekanizmaları	14
2.3. Enfeksiyon sırasında heterodirencin dinamiği	23
4.1. Klinik izolatların örnek türüne göre dağılımı	34
4.2.a. Aynı <i>S. maltophilia</i> izolatına ait tekrarlanan gradient test görüntüleri	38
4.2.b Aynı <i>S. maltophilia</i> izolatına ait tekrarlanan gradient test görüntüleri	39
4.3. Gradient testte inhibisyon elipsi içinde üreme gösteren <i>S. maltophilia</i> suşları	39
4.4. Populasyon analizi yapılan 27 nolu <i>S. maltophilia</i> izolatının artan antibiyotik konsantrasyonlarında saptanan üreme paterni	41
4.5. Erişkin/çocuk hastalar gruplarında saptanan kolistin heterodirenç oranları	42
4.6. Kolistin heterodirenci saptanan ana suş ve elips içi üreyen koloninin gradient test görüntüsü	47

TABLolar

Tablo	Sayfa
2.1. <i>S. maltophilia</i> 'nın bazı kimyasal özellikleri	4
2.2. <i>S. maltophilia</i> 'nın kabul edilen bazı virulans faktörleri	5
2.3. <i>S. maltophilia</i> 'da biofilm oluşumuna etkili genler	6
2.4. <i>S. maltophilia</i> enfeksiyonlarında kullanılan antibiyotiklerin duyarlılık profilleri	13
2.5. <i>S. maltophilia</i> enfeksiyonları için önerilen tedavi seçenekleri	13
2.6. <i>S. maltophilia</i> 'da doğal ve kazanılmış dirençte rol oynayan efluks pompaları	15
2.7. <i>S. maltophilia</i> 'da doğal antibiyotik direnci	17
2.8. <i>S. maltophilia</i> 'da kolistin direnç oranları	20
2.9. Heterodirenç saptama metodları	25
3.1. <i>Pseudomonas</i> spp. için CLSI kılavuzunda yer alan kolistin MİK sınır değerleri	31
3.2. Standart kontrol suşları için belirlenen kolistin MİK aralıkları	31
4.1. <i>S. maltophilia</i> suşlarının izole edildiği klinik örneklerin gönderildiği klinikler	34
4.2. Gradient test ve sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile kolistin duyarlı saptanan izolatlar	35
4.3. Gradient test ve sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile kolistin dirençli saptanan izolatlar	37
4.4. Kolistin heterodirenci saptanan izolatların sıvı mikrodilüsyon ve gradiyent test ile elde edilen MİK değerleri ve alt popülasyon sıklığı	42

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Stenotrophomonas maltophilia, diğer non fermentatif bakteriler gibi doğada ve hastanelerde özellikle nemli ortamlarda yaygın olarak bulunan çevresel bir mikroorganizmadır (1). Tüm dünyada önemi giderek artan *S. maltophilia*, konak savunma mekanizmalarının bozulduğu yoğun bakım hastalarında ve bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde ciddi nozokomiyal enfeksiyonlara yol açmaktadır (2,3). Yapılan sürveyans çalışmalarında *S. maltophilia*'nın; *Acinetobacter* spp. ve *Pseudomonas aeruginosa*'dan sonra en sık izole edilen üçüncü non-fermentatif gram negatif bakteri olarak saptanması hastane kaynaklı non-fermentatif gram negatif bakteriler içinde de öneminin son yıllarda arttığını göstermektedir (4). Özellikle kistik fibrozis hastalarında *P. aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* 'tan sonra en sık izole edilen solunum yolu patojeni olup görülme oranı da yıllar içinde artış göstermektedir (5). Başta solunum yolu enfeksiyonları olmak üzere; bakteriyemi, endokardit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, kemik ve eklem enfeksiyonları, menenjit, göz enfeksiyonları, kolanjit, peritonit ve üriner sistem enfeksiyonları gibi farklı klinik tablolara yol açabilir (6,7).

S. maltophilia nozokomiyal enfeksiyonlarının ampirik tedavisinde sıklıkla kullanılan beta-laktamlar ve aminoglikozidlere karşı doğal olarak dirençli olduğu ve geçmişte etkin olan antimikrobiyallere karşı da günümüzde direnç oranları arttığından yol açtığı enfeksiyonların tedavisi güçleşmektedir (8-14). Trimetoprim-sülfametoksazol (TMP/SXT), tedavide ilk sırada tercih edilen bir antimikrobiyal ajandır; (3,15) ancak giderek artan oranlarda olmak üzere TMP/SXT direnci görülmektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, TMP-SXT direnci %2.7-45 olmak üzere farklı oranlarda saptanmıştır (16-21). Aynı durum yurt dışı çalışmalarda da geçerli olup %10-%75 aralığında TMP-SXT direnç oranları bildirilmiştir (8,22-25). TMP-SXT direnci saptanması durumunda kinolon grubu antibiyotikler tedavide kullanılan ikinci grup ajanlardır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda kinolon direncinin yıllara göre arttığı ve levofloksasin direnci %7.6-%23'; siprofloksasin direnci ise %42.8-%61 olarak bildirilmektedir (19,20,26-28). Farklı ülkelerden yapılan çalışmalarda ise levofloksasin direnci %3 ile %12 olmak üzere farklı oranlarda saptanmış ve yıllar içinde bu dirençte artış olduğu görülmüştür (29).

Bu çalışmada çeşitli örneklerden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* izolatlarının tedavisinde kullanılabilir alternatif bir ilaç olan kolistin için direnç oranlarına farklı yöntemlerle araştırılmıştır. Bunun yanısıra kolistin heterodirenci popülasyon analizi profili yöntemi kullanılarak saptanmıştır.

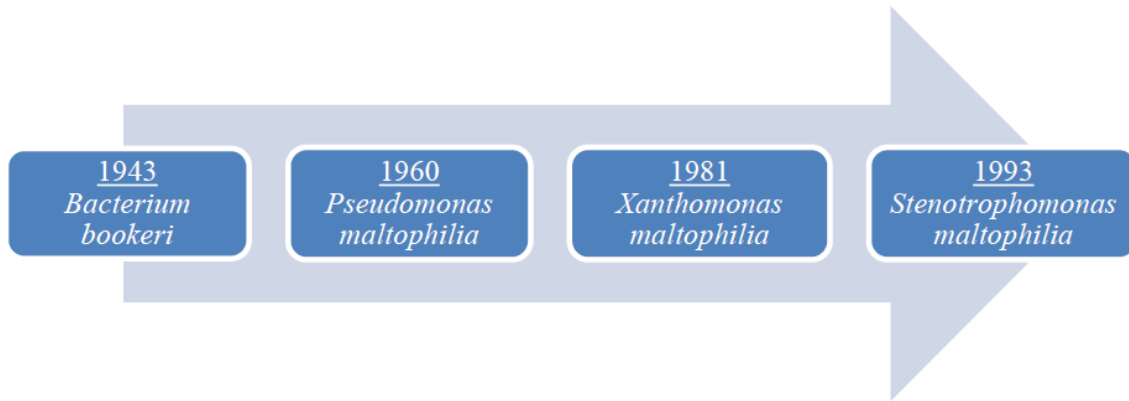
2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Stenotrophomonas maltophilia*

2.1.1. Tarihçe ve sınıflandırma

Stenotrophomonas maltophilia, ilk olarak İngiltere’de 1943 yılında J. L. Edwards tarafından plevra sıvısından izole edilip *Bacterium bookeri* olarak adlandırılmış ve bir deri kontaminantı olarak bildirilmiştir (30). Hugh tarafından 1958 yılında oral karsinomu olan bir hastanın orofaringeal sürüntü örneğinden izole edilmiş ve 1960 yılında Hugh ve Ryschenkow tarafından *Pseudomonas maltophilia* olarak adlandırılmıştır (31). Fenotipik ve genotipik çalışmalar sonucunda Swings ve ark., türün *Xanthomonas* cinsine dahil edilmesini önermişlerdir (32). Ancak bu görüş yeterince kabul görmemiş ve flajellum sayısı, nitrat redüksiyon özellikleri ve bitki patojeni olması gibi bazı farklı özellikleri olması nedeniyle 1993 yılında Palleroni ve Bradbury tarafından tek üyesi *Stenotrophomonas maltophilia* olan *Stenotrophomonas* cinsini ilk defa tanımlanmıştır (6,33). Dört yıl sonra yeni bir tür olan *Stenotrophomonas africana* tanımlanmış ancak daha sonra Coenye ve ark. tarafından bu türün de *S. maltophilia* ile aynı olduğu gösterilmiştir (34). Son zamanlarda, *Stenotrophomonas nitritireducens*, *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Stenotrophomonas koreensis*, *Stenotrophomonas humi*, *Stenotrophomonas terrae*, *Stenotrophomonas ginsengisoli* ve *Stenotrophomonas daejeonensis* olmak üzere sekiz farklı çevresel *Stenotrophomonas* türü tanımlanmıştır (35).

Şekil 2.1: *Stenotrophomonas maltophilia*’nın Sınıflandırması (36)



2.1.2 Morfolojik ve mikrobiyolojik özellikleri

Stenotrophomonas maltophilia Yunanca stenos (dar), trophos (beslenen), monas (bir birim) ;kısıtlı madde ile beslenen tek hücreli canlı anlamına gelmektedir. Bakteri 0.5-1.5 µm uzunluğunda düz veya hafif kıvrımlı spor oluşturmeyen gram negatif non-fermentatif bir basildir. Klinik izolatların çoğu oksidaz negatif, katalaz pozitifdir. Glukozu fermente etmez fakat maltoz, selobiyoz ve laktoz gibi disakkaritleri tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilir. Ekstrasellüler DNAaz pozitifdir. Polar flagellumları ile hareketlidir. Kanlı agarda üreyebilir ve küçük soluk sarı, gri-yeşil bazen hafif mukoid koloniler oluşturur. Hemoliz yaptığını gösteren çalışmalar olsa da bakterinin genel olarak beta-hemoliz yapmadığı kabul edilir.(37) Kanlı agarda bazı suşlar kahverengimsi koloniler şeklinde renk değişikliği gösterebilir. Bu fenomenin ekstraselüler ürünler arasındaki kimyasal reaksiyonlara bağlı olduğu ve 42 °C'de inkübasyon sonucunda daha belirgin olduğu saptanmıştır. *S. maltophilia* zorunlu aeorptur. 5-40 °C derece olmak üzere geniş bir sıcaklık aralığında üreyebilmesine rağmen optimum üreme ısısı 30-35 °C'dir. Klinik örneklerin rutin olarak inkübe edildiği 35-37 °C sıcaklıklarda aminoglikozidlere yanlıı duyarlı sonuçların saptanabileceği bildirilmiştir (38). Üreyebilmek için birçok izolat metiyonin ve sistein kullanır (33). Tüm bu metabolik özellikler çevrede yaygın olarak bulunan *Stenotrophomonas* suşlarında değişkenlik gösterebilir (39). *S. maltophilia*'nın bazı biyokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir (33).

Tablo 2.1. *S. maltophilia*'nın bazı biyokimyasal özellikleri

TEST	REAKSİYON ^a
İndofenol oksidaz	-
Katalaz	+
Üreme	
18°C	+
37°C	V
Hareket	
18°C	+
37°C	V
İndol	-
Lizin-dekarboksilaz	+
Ornitin-dekarboksilaz	-
Metil kırmızısı	-
Voges-Proskauer	-
Hidrojen sülfid	-
Nitrat redüksiyonu	V
Sitrat	V
Fenilalanin deaminaz	-
β-Galaktosidaz (ONPG)	V
Hidroliz	
Eskülin	+
Jelatin	+
Tween 80	+
DNA	+
Nişasta	-
Üre	-
Karbon kaynağı	
Adonitol	-
Arabinoz	-
β-Hidroksibutirat	-

Sellobioz	V
Dulsitol	-
Glukoz	+
Fruktoz	V
Galaktoz	V
Mannitol	-
Mannoz	V
Ramnoz	-
Salisin	-
Sorbitol	-
Trehaloz	-

^a+, >85% pozitif; v, 16 -84% pozitif ; -, <15% pozitif

2.1.3. Virülans faktörleri ve patogenezi

Artan klinik önemine rağmen *S. maltophilia*'nin virülansı ve patogenezi ile ilgili bilgiler sınırlıdır ve yapılan birçok çalışmaya rağmen virülansın moleküler ve hücrel mekanizmaları yeterince aydınlatılamamıştır (40-42). *S. maltophilia*'nin virülans faktörleri Tablo 2.2'de özetlenmiştir (43).

Tablo 2.2: *S. maltophilia*'nin kabul edilen bazı virülans faktörleri

VİRÜLANS FAKTÖRÜ	FONKSİYON	İLGİLİ GENLER
Fimbria	Adezyon, kolonizasyon, biyofilm oluşumu	<i>smf-1</i>
Proteaz	Protein lizisi	<i>StmPr</i>
Hemolizin	Hemoliz	<i>hly</i>
Lipopolisakkarid	Konak ortamında canlılığın sürdürülmesi	<i>rmlA, rmlC, xanB, spgM</i>
Zonula okludens toksini benzeri protein	Bilinmiyor, <i>Vibrio cholerae</i> 'nin zonula okludens toksinine benzer	<i>zot</i>
Siderofor	Demirin hücre içine alınması	<i>entACF</i>

Fosfolipaz C	Hücre membranının parçalanması	<i>plcN1</i>
Hemaglutinin	Adezyon ve yayılma	<i>fha</i>
Sekresyon sistemleri	Efektör proteinlerin sekresyonu	<i>hlyB/D, gsp, VirB/D, xps</i>

Bakterinin hareketinden de sorumlu olan fimbria ve flajellumların *S. maltophilia*'nin adhezyonunda da önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bakterinin hücre yüzeyine tutunması da biyofilm oluşumunun ilk aşamalarından biridir (44,45). Biyofilm oluşumu antibiyotik direnç patogenezinde rol oynayan önemli bir faktördür. Biyofilm varlığında, antibiyotiklerin bakterilerle direkt teması zorlaşmakta ve bunun sonucunda etkisini göstermemektedir. Ayrıca biyofilmin yapısına katılan bakterilerin sergilediği farklı metabolik durum sebebiyle de antibiyotiklere duyarlılıkta azalma meydana gelmektedir (46). Biyofilm oluşumunun nozokomiyal enfeksiyonların %65'i ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. *S. maltophilia*, hastane su tesisat sistemleri, endotrakeal tüpler, kateterler, diyaliz ekipmanları, lavabo ve musluklar gibi hastalarla direkt veya indirekt teması olan nemli yüzeylerde ve konak dokularında biyofilm oluşturabilmektedir (47). Biyofilm oluşumunda etkili genler Tablo 2.3'de verilmiştir (42)

Tablo 2.3: *S. maltophilia*'da biyofilm oluşumuna etkili genler

GEN	HEDEF ÜRÜN	FONKSİYON	VİRÜLANSA ETKİSİ
spgM	Fosfoglukomutaz ve fosfomannomutaz aktiviteli enzim	Lipopolisakkarit (LPS)sentezine katılım	Kolonizasyonu etkileyen, konak savunmasına karşı direnç (kompleman kaynaklı hücre öldürme)
rmlA	Glukoz-1-fosfat timidil transferaz	LPS/EPS 'ye bağlı biyosentetik yolağa dahil olma (rml1C ve xanB ile birlikte)	Seğirme hareketi, yapışma, biyofilm oluşumu
rpfF	DSF sentaz	DFS sentezine katılım	Virülans ekspresyonunun düzenlenmesi (hareketlilik, hücre dışı proteazlar, LPS) ve biyofilm oluşumu

bsmR	BsmR protein (biyofilm ve hareket regülatörü)	Fosfodiesteraz aktivitesi,sıklık digüanozin monofosfat yıkılması	Yüzme hareketliliğinin pozitif düzenlenmesi ve biyofilm oluşumunun negatif düzenlenmesi
ax21	Ax21 dış membran proteini	Türler arası iletişimde yer alan dağılık sinyal molekülü	Hareketliliği, biyofilm oluşumunu ve virülansı etkileyen

S. maltophilia, fimbria ve flajellumlar aracılığıyla prostetik yüzeylere olduğu gibi canlı yüzeylere de tutunabilmektedir (48-50). Bu virülans faktörü enfeksiyon hastalıklarının gelişmesinde etkilidir(51). *S. maltophilia*'nın tüm genom sekans analizinde, adezyon ve invazyon ile ilişkili olduğu bilinen filamentöz hemaglutinin proteinlerini kodlayan gen bölgelerinin varlığı da gösterilmiştir (52).

Quorum sensing (QS), hücre popülasyon yoğunluğundaki değişimlere cevap olarak gen ekspresyonunda regülasyona gidilmesi olarak tanımlanmaktadır. Bakteriler, otoindükleyiciler adı verilen kimyasal sinyal molekülleri salgılar ve hücre yoğunluğundaki artış sonucu olarak bu moleküller ekstrasellüler olarak birikir. Otoindükleyici konsantrasyonu, belirli bir eşik değeri geçtiğinde gen ekspresyonunda değişiklikler meydana gelir. Bu mekanizma ile virülans faktörlerinin üretimi ve antibiyotik direnci gibi birçok fizyolojik aktivite regüle edilir. Genel olarak Gram negatif bakteriler otoindükleyici olarak açillenmiş homoserin lakton yapısındaki molekülleri kullanırlar (LuxI/LuxR tipi QS) (53,54). *S. maltophilia*, LuxI/LuxR sistemi yerine dağılabilir (diffusible) sinyal faktör (DSF) sistemini kullanır (7,52,55). DSF sisteminin *S. maltophilia*'da virülans ve antimikrobiyal dirence aracılık eden faktörleri kontrol ettiği gösterilmiştir (56,57).

Gram negatif bakterilerin dış membranında bulunan lipopolisakkarid (LPS), antibiyotiklere ve deterjanlara karşı bir bariyer görevi görür (45). *S. maltophilia*, lipid A, oligosakkarid çekirdek ve O antijeninden oluşan LPS'ye sahiptir ve en az 31 farklı O antijeni tanımlanmıştır (7,58). Bunlar içerisinde en sık O3 antijenine rastlanmaktadır. *S. maltophilia*'nın O antijeninin *Brucella* türleri ve *Legionella pneumophila* ile çapraz reaksiyon verebildiği gösterilmiştir (33). *S. maltophilia*'nın LPS yapısı, komplemandan kaçışı sağlayan ve kolonizasyondan sorumlu önemli bir virülans faktörüdür (3,59). LPS biyosentezinde görev alan genlerdeki mutasyonların

LPS yapısını değiştirerek sonuçta bazı antimikrobiyal ajanlara direnç durumunu, hareket, tutunma ve biyofilm oluşumunu etkilediği gösterilmiştir (45,59). Lipid A parçası, potent bir proinflatuvar sitokin olan tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) salınımını uyarmaktadır. *S. maltophilia* ayrıca interlökin-8 (IL-8) salınımını da uyararak polimorfonükleer lökosit göçüne sebep olmaktadır (58). *S. maltophilia* klinik izolatları, jelatinaz, DNaz, lipaz, hemolizin proteaz, lesitinaz, heparinaz ve hyalüronidaz gibi enzimler üretebilmektedir. (60).

S. maltophilia izolatlarında bulunan tip I, II, IV, V ve VI sekresyon sistemleri, efektör proteinlerin hücre membranından çevreye salınımına aracılık eder ve önemli bir virülans faktörüdür (43,52). Gram negatif bakterilerde yaygın olarak bulunduğu bilinen tip II sekresyon sisteminin *S. maltophilia*'da proteolitik enzimlerin salınımına, konak hücre iskeletinde bozulmaya ve sitotoksik etkilere aracılık ettiği gösterilmiştir (40). Serin proteaz enzimi olan StmPr1 ve StmPr2 bu proteolitik aktivite ve konak hücre hasarından esas olarak sorumlu tutulmuştur. Söz konusu enzimlerin aynı zamanda ekstrasellüler matriks proteinlerinde parçalanmaya ve IL-8 yıkımına da yol açtığı gösterilmiştir (41).

İnvaziv ve invaziv olmayan *S. maltophilia* klinik izolatlarının çoğu tarafından üretilen melaninin, bakterileri konağın savunma mekanizmalarından ve çevresel faktörlerden korumasının yanısıra antibiyotik direnci ile de ilişkili olabileceği gösterilmiştir (60,61). *S. maltophilia*, siderofor sentezleyebilen mikroorganizmalardan biridir. Sideroforlar, birçok biyolojik süreç için esansiyel olan demirin bakteri tarafından hücre içine alınmasına aracılık eder ve mikroorganizmaların konak vücudunda hayatta kalmasını sağlaması açısından çoğu patojen için önemli bir virülans faktörüdür (62,63).

2.2. *S. maltophilia* enfeksiyonları

S. maltophilia sağlıklı bireyler için patojenik olmamakla birlikte bağışıklık sistemi baskılanmış veya yoğun bakım ünitelerinde mekanik ventilasyonla takip edilen hastalarda ciddi morbidite ve mortalite ile ilişkili bir fırsatçı nozokomiyal enfeksiyon etkenidir (6). Bu bakteri başta pnömoni olmak üzere solunum yolu enfeksiyonlarında başlıca etken olmakla birlikte; bakteriyemi, endokardit, deri ve yumuşak doku

enfeksiyonları, kemik ve eklem enfeksiyonları, menenjit, göz enfeksiyonları, kolanjit, peritonit ve üriner sistem enfeksiyonları gibi birçok klinik tabloya yol açabilir (6,7).

2.2.1. Epidemiyoloji

S. maltophilia enfeksiyonlarının insidansı son yıllarda artış göstermektedir (6). “Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends” ve “SENTRY Antimicrobial Surveillance” programı kapsamında 2012 yılında, Asya-Pasifik bölgesinde intra-abdominal enfeksiyonlarda *S. maltophilia*'nin ilk dört , Latin Amerika'da pnömoni etkenleri arasında ilk onda yer aldığı bildirilmiştir(64,65). 2010-2016 yılları arasında Taiwan'da yapılan bir çalışmada *S. maltophilia*'nin sağlık hizmetleri ile ilişkili enfeksiyon etkeni olarak izole edilen mikroorganizmalar arasında *Acinetobacter* spp. ve *Enterobacter* spp.'den sonra üçüncü sırada yer aldığı bildirilmiştir (66). Türkiye'den yapılan çalışmalarda, hastane kaynaklı enfeksiyonlarda %0-1.6 oranında *S. maltophilia* etken olarak saptanmıştır. Bu oran yoğun bakım ünitelerinde %4'e kadar yükselmektedir (16,17,67,68). Bu durum, kemoterapi uygulanması, geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanılması ve invaziv tıbbi uygulamalardaki gelişmeler sonucunda risk altında olan hasta popülasyonundaki artışa bağlanabilir (69).

S. maltophilia'ya bağlı toplum kaynaklı enfeksiyonlar görülebilmekle birlikte büyük çoğunluğu nozokomiyaldir ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından hastanelerde önde gelen çoklu ilaca dirençli mikroorganizmalar arasında gösterilmektedir (1,70). Hem genel popülasyonda hem de yoğun bakım hastalarında en sık solunum yolu enfeksiyonlarına ve ikinci sıklıkta da kan dolaşımı enfeksiyonlarına yol açmaktadır (15). Kistik fibrozis (KF) hastalarında da *S. maltophilia* 'nın bazı merkezlerde izole edilme oranı %25'e kadar çıkabilmekte ve bu oranlar giderek artış göstermektedir. *S. maltophilia* izole edilme oranı Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde 1996-2010 yılları arasında %4'den %14'lere yükselmiştir (72).

2.2.2. Risk faktörleri ve bulaş

S. maltophilia, çevresel bir mikroorganizmadır ve nemli ortamlarda varlığını sürdürebilmektedir. Suyla ilişkili, hastane içi ve dışı birçok kaynaktan izole edilmiştir (7). *S. maltophilia*'ya bağlı nozokomiyal enfeksiyonlardaki artış sebebiyle yapılan çalışmalarda, bakteri aspirasyon tüpleri, mekanik ventilasyon cihazları, santral venöz kateterler, nebülizatörler, endoskoplar, diyaliz ekipmanları, dezenfektanlar, sabunlar, irrigasyon solüsyonları, lavabo ve musluklardan izole edilmiştir. Bulaş, kaynakla direkt temas sonucu veya sağlık personelinin elleri ile indirekt yolla olabilmektedir. Ayrıca kistik fibrozis hastalarında aerosoller de bulaşta rol alabilirler (6,7). Moleküler epidemiyolojik çalışmalar sonucunda izolatlar arasında ciddi oranda genomik çeşitlilik saptanması, bulaşın çok sayıda çevresel kaynaktan gerçekleştiğini düşündürmektedir (72). *S. maltophilia* mikrobiyota elemanı olmamakla birlikte, hastanelerdeki yüksek prevalansı sebebiyle hastaların derisinde, solunum yollarında ve sindirim sisteminde kolonize olabilmekte ve intravenöz veya üriner kateterizasyon gibi tıbbi girişimler sonucunda steril olan vücut bölgelerine ulaşabilmektedir (1,38). Çoğu beta-laktam ve aminoglikozid grubu antibiyotiğe kalıtsal olarak dirençli olması nedeniyle geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı *S. maltophilia* kolonizasyonunu kolaylaştırmaktadır (2). *S. maltophilia*, nozokomiyal enfeksiyonlar yanında toplum kaynaklı bakteriyemi, göz enfeksiyonları, otit, solunum yolu enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ve idrar yolu enfeksiyonları gibi toplum kaynaklı enfeksiyonlara da yol açabilmektedir. Bu hastalarda sıklıkla, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), travma, HIV enfeksiyonu ve immüniteyi baskılayan diğer faktörler, malignensi, antibiyotik kullanımı, hastanede yatış öyküsü ve santral venöz kateter varlığı gibi komorbid durumlar söz konusudur (7,73). Lavabo giderleri, musluklar, içme suyu dağıtım sistemleri, kontakt lens solüsyonları, evde kullanılan nebülizatörler hastane dışı kaynaklar arasında gösterilmektedir (7).

Genel olarak *S. maltophilia* enfeksiyonları için risk faktörleri şu şekilde sıralanabilir (74):

- 1) Malignensi (özellikle hematolojik)
- 2) HIV enfeksiyonu
- 3) Kistik fibrozis
- 4) İntravenöz ilaç bağımlılığı
- 5) Travma (cerrahi travma veya kaza)

- 6) Uzamış hastanede kalış süresi
- 7) Yoğun bakım ünitesinde yatış ve mekanik ventilasyon
- 8) Damar içi kateter ve üriner kateter varlığı
- 9) Kortikosteroid ve immünoşüpresif tedavi uygulanması
- 10) Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı
- 11)Gastrointestinal kolonizasyon ve mukozit varlığı
- 12)Hematopoietik kök hücre nakli

2.2.3. Laboratuvar tanısı

S. maltophilia, çeşitli olumsuz çevre şartlarında ve klinik örneklerin inkübe edildiği standart sıcaklık derecelerinde (35-37 °C) de üreyebildiği için klinik örneklerden bu mikroorganizmanın izolasyonunda, standart örnek alma, transport ve saklama teknikleri yeterlidir (6). Tüm klinik laboratuvarlarda bulunan %5 koyun kanlı agar, çikolata agar ve McConkey agar gibi standart besiyerlerinde, normal ortam koşullarında veya %5 CO₂ varlığında bir gecelik inkübasyonu takiben, özel tekniklerin kullanımına, inkübasyon süresinin uzatılmasına gerek kalmadan rutin kan kültürü sistemlerinde standart beş günlük inkübasyon periyodunda üretilebilmektedir. (6,33). Selektif besiyerlerinin kullanımı klinik ve çevresel örneklerden *S. maltophilia* izolasyon oranlarını artırmaktadır. KF hastalarının balgamından *S. maltophilia* izolasyonunda kullanılmak üzere vankomisin, imipenem ve amfoterisin B içeren besiyeri geliştirilmiştir (6,75). Benzer şekilde Gram negatif selektif agar (GNSA) besiyerinde KF hastalarının balgamındaki Gram negatif bakteriler tespit edilebilmektedir. Novobiyosin, siklohekzimid, amfoterisin, nisin ve kristal viyole içeren GNSA'da *S. maltophilia*'ya ek olarak, KF hastalarının balgam örneklerinden izole edilebilen diğer Gram negatif bakteriler de üreyebilmektedir (76). Bu besiyerleri dışında maltoz, DL-metiyonin, vankomisin, imipenem, amfoterisin B ve brom timol mavisi eklenmiş, Mueller-Hinton agar içeren SM2i besiyeri *S. maltophilia* izolasyonunda selektif ve ayırt edici bir besiyeri olarak kullanılabilir. SM2i agarda *S. maltophilia* kolonileri mavi-yeşil renkli bir halo ile çevrilmiş, düzgün, yuvarlak, yeşil renkli koloniler şeklinde görünmektedir (77).

Diğer nonfermenter bakteriler gibi *S. maltophilia*'nın tanımlanmasında koloni morfolojisi ve biyokimyasal özelliklerinden yararlanılabilmekle birlikte *Burkholderia cepacia* ile benzer biyokimyasal profil gösterebilmektedir. Ancak bakterinin oksidaz testinin negatif olması *B. Cepacia* ile ayırımında yardımcıdır (1,2). Kesin tanısında kullanılan ve duyarlılık/özgüllüğü %100 olan 23S rRNA genini hedef alan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi altın standart test olarak kabul edilmiştir. PZR ile karşılaştırıldığında API 20NE (bioMérieux, Fransa), RapID NF Plus (Remel, ABD), Crystal Enteric/Nonfermenter ID (Becton Dickinson, ABD), Phoenix ID (Becton Dickinson, ABD), VITEK 2 ID-GNB (bioMérieux, Fransa) ve MALDI-TOF MS (bioMérieux, Fransa) gibi diğer ticari sistemlerle güvenilir identifikasyon sağlandığı gösterilmiştir (2,6). Bu sebeple otomatize sistemler doğru ve daha hızlı sonuç sağladığı için nonfermenterlerin identifikasyonunda günümüzde sıkça kullanılmaya başlanmıştır (78).

2.2.4. Tedavi ve direnç mekanizmaları

2.2.4.1 Tedavi

S. maltophilia, yatan hastalarda kolonize olabildiği için özellikle steril olmayan vücut bölgelerinden izole edildiğinde klinik önemini belirlemek zor olabilmekle birlikte tekrarlayan üremelerde sıklıkla tedavi gerektirmektedir (1,79). *S. maltophilia*'nın tedavisinde ilk sırada tercih edilen ilaç trimetoprim-sülfametoksazol (TMP/SMX) olmaktadır. Minosiklin, tikarsilin-klavulonat, kolistin ve aztreonam gibi diğer bazı ajanlar *in vitro* aktivite gösterebilse de bu ajanlarla ilgili yeterli klinik deneyim bulunmadığından ve *S. maltophilia* hızla direnç geliştirebildiği için bu ilaçların potansiyel etkinliği de bilinmemektedir. Farklı çalışmalarda *S. maltophilia*'nın antibiyotiklere karşı elde edilen *in vitro* duyarlılık sonuçları tablo 2.4 'de gösterilmiştir (7,80-83).

Tablo 2.4: *S. maltophilia* enfeksiyonlarında kullanılan antibiyotiklerin duyarlılık profilleri

	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
	Duyarlılık oranları	Açıklama

Trimetoprim- metoksazol	% 34.4 - >90	Bakteriyostatik.Yüksek dozlarda uygulanır.KF hastalarında direnç oranı yüksek
Tikarsillin–Klavulanat	% 6.7 - >70	Bakteriyostatik.Klavulanat L2 B-laktamazı inhibe eder.
Piperasillin-tazobaktam	% 6.7 – 20.1	Piperasillin–tazobaktam efektif değil.
Seftazidim	% 0–53	İnvitro etkisiz görünse de kombinasyon tedavilerinde etkindir.
Meropenem	–	İntrinsik dirençli
Florokinolonlar (siprofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin)	% 45–95	Bakteriyosidal.Post-antibiyotik ve biyofilm üzerine etkisi var.Yeni kuşak florokinolonlar (moksifloksasin ve levofloksasin) siprofloksasinden daha etkili
Minosiklin	% 92.4 –100	Klinik deneyim sınırlıdır.
Tigesiklin	% 66.7	Klinik deneyim sınırlıdır.
Kolistin	% 37.5–79	Değişken aktiviteye sahiptir.Antibiyotik duyarlılık testlerinin yorumlanmasında sorunlar mevcut
Kloramfenikol	% 11.5–82	İnvitro aktivitesi mevcut

Dolayısıyla bu ajanlar ancak TMP/SMX'e dirençli suşların varlığında tedavide düşünülmektedir. Fakat hastane kaynaklı enfeksiyonlarda çoklu ilaca dirençli izolatların görülme sıklığının arttığını göz önünde bulundurulduğunda bu durum tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır. Bunun sonucunda klinisyenlerin alternatif tedavi seçenekleri aranması kaçınılmaz hale gelmektedir (15). Günümüzde *S. maltophilia* enfeksiyonlarında önerilen tedavi seçenekleri öncelik sıralarına göre Tablo 2.5'te gösterilmiştir (79).

Tablo 2.5: *S. maltophilia* enfeksiyonları için önerilen tedavi seçenekleri

Birinci seçenek	Trimetoprim-sülfametoksazol
İkinci seçenek	Moksifloksasin/Levofloksasin Minosiklin/Tigesiklin Kolistin (± Rifampin)
Kombinasyon	Trimetoprim-sülfametoksazol + ikinci sıra ilaçlardan biri veya seftazidim

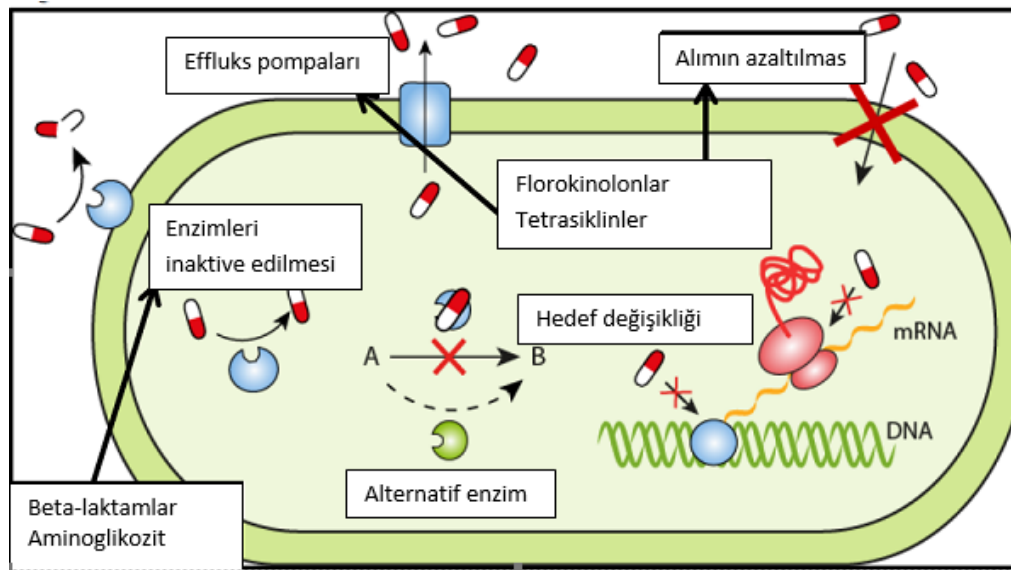
Alternatif kombinasyon	Tikarsilin-klavulonat + Aztreonam + Moksifloksasin/Levofloksasin
-------------------------------	---

Bu antibiyotiklere direnç; düşük membran permeabilitesi, efluks pompaları, antibiyotikleri inaktive eden enzimler ve kinolon direnç geni *Smqnr* gibi tüm *S. maltophilia* suşlarında yaygın olan doğal direnç faktörleri ile ilişkili olabilmektedir. Ayrıca mutasyonlar ve direnç genlerinin integron, transpozon, plazmidler vasıtasıyla horizontal yolla aktarılmasıyla da kazanılabilmektedir. Bu sebeple *S. maltophilia*, beta-laktamlar, kinolonlar, tetrasiklin ve aminoglikozidleri içeren yapısal olarak ilişkisiz birçok antibiyotiğe yüksek düzey doğal direnç göstermektedir (3,46).

2.2.4.2. Direnç mekanizmaları

S. maltophilia Şekil 2.2'de görüldüğü gibi birçok antibiyotiğe karşı primer ve sekonder dirence sahiptir.

Şekil 2.2: Direnç mekanizmaları (36)



2.2.4.2.1. Enzimatik mekanizmalar

S. maltophilia'daki *sul2* geni sülfonamidlerce inhibe edilemeyen dihidropteroat sentaz formlarını, *dfrA* geni ise trimetoprim dirençli dihidrofolat redüktaz enzimini kodlayarak TMP/SMX direncine yol açtığı bildirilmiştir (37). *qacED1* geni kuartener amonyum bileşiklerini içeren antiseptiklere karşı dirençten sorumlu gösterilmektedir

(34). *Smqnr* geni tarafından kodlanan kinolon direnç proteini olan SmQnr'ın topoizomeraz enzimlerine bağlanarak bakteriyi kinolon etkisinden koruduğu düşünülmektedir(35,37)

2.2.4.2.2. Efluks pompaları

Efluks (dışa atım) pompaları, toksik maddelerin ve antibiyotiklerin bakteri hücrelerinden dış ortama atılmasını sağlayan ve böylece hücre içerisinde yeterli konsantrasyona ulaşmasını engelleyen taşıyıcı proteinlerdir (84,85). *S. maltophilia*'da efluks pompaları ve düşük dış membran geçirgenliği doğal antibiyotik direncinin majör belirleyicileridir (3). Bu pompalar kazanılmış dirençte de rol oynamaktadır (46).*S. maltophilia*'da tanımlanan efluks pompaları ve ilişkili antibiyotik direnç fenotipleri Tablo 2.6' da gösterilmiştir.

Tablo 2.6: *S. maltophilia*'da doğal ve kazanılmış dirençte rol oynayan efluks pompaları (15).

Efluks pompaları	İlişkili antibiyotik direnci
RND ailesi	
SmeABC	Kinolonlar,beta-laktamlar, aminoglikozidler
SmeDEF	Kinolonlar, tetrasiklinler, makrolidler, kloramfenikol, novobiyosin, trimetoprim-sülfametoksazol
SmeIJK	Siprofloksasin, levofloksasin, tetrasiklin, minosiklin
SmeOP-ToICsm	Trimetoprim-sülfametoksazol, aminoglikozidler, makrolidler, doksisiklin, kloramfenikol, nalidiksik asit
SmeVWX	Kinolonlar, kloramfenikol, tetrasiklinler
SmeYZ	Trimetoprim-sülfametoksazol, aminoglikozidler
SmeABC	Kinolonlar,beta-laktamlar, aminoglikozidler
SmeDEF	Kinolonlar, tetrasiklinler, makrolidler, kloramfenikol, novobiyosin, trimetoprim-sülfametoksazol
ABC ailesi	
SmrA	Florokinolonlar, tetrasiklin
MacABCsm	Aminoglikozidler, makrolidler, polimiksinler
MFS ailesi	

2.2.4.2.3. Diğer direnç mekanizmaları

S. maltophilia dış membran lipopolisakkaritlerinin fosfat içeriği ve polisakkarit boyutu farklı sıcaklıklarla değişebilir. Belli sıcaklıklar karşılaştırıldığında aminoglikozid ve polimiksin B direncinin 30 °C de, 37 °C'den daha yüksek olduğu saptanmıştır (59).

Ayrıca *S. maltophilia* suşları farklı metallere karşı direnç gösterir. Bu nedenle gümüş kaplı kateteri tolere edebilir (52,86). LPS sentezinde rol oynayan SpgM'nin aşırı ekspresyonu, seftazidim, piperasilin-tazobaktam ve tikarsilin-klavulonat direnci ile ilişkili bulunmuştur (7,61). Ayrıca *spgM* mutant suşlarda polimiksin B, kolistin, nalidiksik asit ve gentamisine duyarlılıkta artış gözlenmiştir (59).

2.2.5. Antibiyotik Duyarlılık Testleri ve Değerlendirilen Antibiyotikler

2.2.5.1. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

S. maltophilia için in-vitro duyarlılık testlerinde çok sayıda teknik problemler tespit edilmiştir. "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) rehberinde TMP/SMX, levofloksasin ve minosiklin için hem disk difüzyon hem de minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) duyarlılık sınır değerleri mevcuttur. Seftazidim, tikarsilin-klavulanat ve kloramfenikol için ise sadece MİK duyarlılık sınır değerleri belirlenmiştir. "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST) klavuzunda ise sadece TMP/SMX için duyarlılık sınır değerleri tanımlanmıştır ve bu ajanın bakteriyostatik özelliğinden dolayı disk difüzyon veya gradient difüzyon yöntemi kullanıldığında, inhibisyon sınırı değerlendirilirken, üreme inhibisyon zonu/elipsi kenarlarındaki hafif üreme göz ardı edilerek, %80 inhibisyonun dikkate alınması gerektiği vurgulanmaktadır. EUCAST klavuzunda diğer antibiyotiklerle elde edilen duyarlılık sonuçlarının klinik yansımaları destekleyecek yeterli veri bulunmadığı belirtilmektedir (79,87). CLSI klavuzunda ko-trimoksazol için disk difüzyon metodunun farklı inokulum yoğunluğu, inkübasyon süresi ve sıcaklığının farklı sonuçlara yol açabileceği belirtilmiştir (3).

Antibiyotik duyarlılık testleri çalışılırken ve sonuçların rapor edilmesi esnasında *S. maltophilia*'nın doğal direnç paterni dikkate alınmalıdır. *S. maltophilia*'nın gösterdiği

doğal direnç antibiyotikler açısından CLSI ve EUCAST rehberleri arasında bazı farklılıklar bulunmaktadır (Tablo 2.7) (79).

Tablo 2.7: *S. maltophilia*'da doğal antibiyotik direnci (79)

Antibiyotik	CLSI	EUCAST
Amoksisilin-klavulonat	R	R
Piperasilin-tazobaktam	R	R
Seftriakson	R	R
Seftazidim	-	R
Sefepim	-	R
Aztreonam	R	R
Ertapenem	R	R
İmipenem	R	R
Meropenem	R	R
Siprofloksasin	b	-
Aminoglikozidler	R	R
Trimetoprim	R	R
Fosfomisin	R	R

-, doğal direnç yok; b, belirtilmemiş; R, dirençli.

2.2.5.2. Değerlendirilen Antibiyotikler

2.2.5.2.1. Trimetoprim-sülfametoksazol

Trimetoprim ve sülfametoksazol birlikte kullanıldığında folik asit sentezinin bozulması ile pürin sentezi ve buna bağlı olarak da DNA sentezi inhibe edilmiş olur. Böylece bu metabolik yol üzerinde ardışık inhibisyon sağlanarak sinerjizm elde edilir (84).

Yüksek *in vitro* duyarlılık oranları sebebiyle TMP/SMX, *S. maltophilia* enfeksiyonlarında tek başına veya kombinasyon tedavisinde ilk sırada tercih edilen ilaç olmaktadır. Bakteriyostatik etki gösterdiği için tolere edilebilen en yüksek dozda (≥ 15 mg/kg/gün trimetoprim, 3-4 doza bölünerek) kullanılması önerilmektedir (3,79,88). Fakat aşırı duyarlılık reaksiyonu ve intolerans, TMP/SMX kullanımını kısıtlayabilmektedir (3). Ülkemizde yapılan çalışmalarda, TMP-SXT direnci %2.7-45 olmak üzere oldukça farklı oranlarda saptanmıştır (16-21). Aynı durum tüm dünyada geçerli olup %10-%75 aralığında TMP-SXT direnç oranları bildirilmiştir (8,22-25).

S. maltophilia'da ko-trimoksazol direnci *sul1* ve *sul2* integronlarını taşımasına bağlıdır (3). Taiwan'da 2003'de yapılan bir çalışmada izolatların *sul1* integronu taşıma oranı %21 olarak gösterilmiştir (89). Dihidrofolat redüktaz enzimini kodlayan

sınıf 1 integronlarında bulunan *dfrA* geninin de yüksek düzeyde dirence neden olduğu raporlanmıştır. Son dönemde *SmeDEF*, *TolCsm* ve *SmeYZ* effluks pompalarının da dirençten sorumlu olabileceği bildirilmiştir (15)

2.2.5.2.2. Beta-laktamlar

Genel olarak hücre duvarı sentezini inhibe ederek bakterisidal etkili beta-laktam antibiyotikler *S. maltophilia* üzerinde düşük etkinliğe sahiptir (3). *S. maltophilia*'da, tüm karbapenemlere ve çoğu penisilin ve sefalosporine yüksek düzey doğal direnç söz konusudur. Beta laktam direncinden sorumlu iki beta laktamaz mevcuttur. Bunlar L1 ve L2 beta laktamaz enzimleridir. L1 Ambler B sınıfı çinko bağımlı metalloenzimdir. Monobaktamlar hariç tüm beta-laktamları hidrolize eder (3). Karbapenemler dahil birçok beta-laktam antibiyotiğe karşı dirençten sorumludur (33). L2 Ambler A sınıfı serin aktif beta-laktamazdır. Klavulanik asidi inhibe eder. Beta-laktamazlara ek olarak bazı izolatlarda TEM-2 penisilinaz ve CTX-M-1 beta-laktamaz da bulunabilir (3). Seftazidim ve tikarsilin-klavulanat, beta-laktam antibiyotikler içerisinde *S. maltophilia*'ya en etkili ilaçlardır. Ancak son on yıl içerisinde direnç oranlarında artış kaydedilmiştir (15). EUCAST tarafından *S. maltophilia*, seftazidime doğal olarak dirençli kabul edilmektedir (90).

2.2.5.2.3. Florokinolonlar

DNA topoizomerez II (giraz) ve DNA topoizomerez IV enzimlerini inhibe ederek DNA sentezini önleyen florokinolonlar, seftazidim ve tikarsilin-klavulanata göre *S. maltophilia* üzerinde daha güçlü bir etkinliğe sahip olmaları nedeniyle tedavide bir alternatif haline gelmişlerdir (84). Ancak aşırı kullanılmaları, *S. maltophilia*'yı da içeren birçok patojenik bakteride direnç oranlarında artışa sebep olmuştur. Özellikle siprofloksasin bu bakteri üzerinde zayıf etkinliğe sahiptir (15). Ülkemizde yapılan çalışmalarda levofloksasin direnci %14-%23'; siprofloksasin direnci ise %42.8-%61 olarak bildirilmektedir (19,20,26-28). Yurt dışından yapılan çalışmalarda ise levofloksasin direnci %3 ile %12 arasında değişkenlik göstermekte ve yıllar içinde direncin artış gösterdiği görülmektedir (29). Kinolon direncinde *SmeDEF* başta olmak üzere efluks pompa ekspresyonu ve dış membranın permeabilitesinde azalma

rol oynar. Bununla birlikte topoizomerez genlerinde meydana gelen mutasyonlar, *S. maltophilia* kinolon direncinde önemli görünmemektedir. Kinolon direncinde smeDEF, smeIJK, smeABC, smeVWX ve Smqnr genlerinin de rol aldığı bildirilmiştir (33). *S. maltophilia* enfeksiyonlarının tedavisinde moksifloksasin veya levofloksasin gibi biyofilm üzerine etkili ajanların kullanımı yararlı bulunmuştur ancak hızlı direnç gelişimi nedeniyle bu ajanların tek başına kullanılması önerilmemektedir (79).

2.2.5.2.4. Tetrasiklinler ve glisilsiklinler

Ribozomların 30S alt birimine bağlanarak protein sentezini inhibe eden bakteriyostatik etkili tetrasiklin grubu ilaçlardan olan minosiklin ve doksisisiklin *S. maltophilia* klinik izolatları üzerinde *in vitro* olarak iyi etkinlik göstermektedir. Ancak bu ajanlarla *S. maltophilia* enfeksiyonlarının tedavisi konusunda klinik deneyim yetersizdir. Geniş spektrumlu yeni bir antibiyotik olan tigesiklin, tetrasiklin direncine yol açan mekanizmalardan daha az etkilenmekte ve TMP/SMX'e dirençli izolatlar da dahil olmak üzere *S. maltophilia* izolatlarına *in vitro* etkisi bulunmuştur. Bu sebeplerden ötürü tigesiklinin, klinik deneyim eksikliğine rağmen ciddi enfeksiyonlarda kombine tedavide kullanılması önerilmektedir (3,15).

2.2.5.2.5. Kloramfenikol

Peptidil transferaz enzimini inhibe ederek etki eden kloramfenikol, *in vitro* olarak iyi aktivite gösterse de tedavide kullanımı minimal düzeydedir. Direnç olmadığına dair laboratuvar confirmasyonu sağlandığı durumlarda son seçenek tedavisi olarak düşünülebilir ancak myelotoksik yan etkisi unutulmamalıdır (3,38).

2.2.5.2.6. Polimiksinler

Kolistin (polimiksin E) ve diğer polimiksinler, gram negatiflerin dış membranında bulunan LPS'ler ve fosfolipidler ile etkileşime girerek hücre permeabilitesinde artışa ve bunun sonucunda hücre ölümüne yol açan siklik polipeptidlerdir (91).

Pseudomonas aeruginosa başta olmak üzere *Burkholderia cepacia* ve *S. maltophilia* dahil çoklu ilaç dirençli nonfermentatif gram negatif bakteriler öncelikle kistik fibrozisli

hastalar olmak hastane kaynaklı kronik enfeksiyonlarda en sık morbidite ve mortalite sebebidir (92). Bu çoklu ilaca dirençli suşlar terapötik tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır. Yapılan *in vitro* çalışmalarda *S. maltophilia*'nın kolistin ve polimiksin B'ye %70'in üzerinde duyarlı olduğu bildirilmektedir. Ayrıca kolistin ile rifampin, TMP/SMX ve doksisisiklin arasında sinerji göstermesi nedeniyle kombinasyon tedavisinde yer almaktadır (15).Kolistin için düşük direnç oranları bildirildiğinden (tablo 2.8) klinisyenlerin kolistin kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (82,93-95).

Tablo 2.8: *S. maltophilia* kolistin direnç oranları

İzolat	İzolat sayısı	Yıl	Method	Sınır değer için kullanılan rehber	Direnç oranı (%)	Ülke	Referans
<i>S.maltophilia</i>	18	2017	Disk difüzyon	CLSI	27.3	İsrail	93
	641	2014	Agar dilüsyon	CLSI	43.2	Arjantin	97
	27	2013	Gradyent test-Disk difüzyon	SFM	7.4	Fransa	96
	72	2012	Gradyent test	EUCAST	37.5	Fransa	82
	65	2011	Gradyent test	CLSI	60	Almanya	96
	24	2010	Gradyent test	CLSI	21	Suudi Arabistan	
	25	2010	Gradyent test Disk difüzyon Agar dilüsyon	CLSI	96 60 96	Türkiye	
	12	2010	Agar dilüsyon	CLSI	92	Amerika Birleşik Devletleri	
	36	2008	Gradyent test	CLSI	58.3	Yunanistan	
	9	2007	Agar dilüsyon	CLSI	100	Singapur	
	-70	2004	Disk difüzyon Gradyent test Agar dilüsyon	CLSI	7.2 20	Brezilya	

	-66				24		
	23	2001	Sıvı mikrodilüsyon	CLSI	26.1	SENTRY çalışması	

Ancak agarda zayıf difüzyon kabiliyeti ve plastik yüzeylere afinitesi nedeniyle *in vitro* kolistin duyarlılık testlerinde sorunlar yaşanmakta ve *in vitro* olarak elde edilen verilerin klinik önemi kesin olarak değerlendirilememektedir (98,99). Kolistin duyarlılığını saptamada yaşanan bu problemlerin yanısıra kolistin heterodirenç varlığını değerlendirmek zorlaşmakta ve standardizasyonu gerekmektedir (100,101). Kolistin *in vitro* duyarlılığının doğru olarak saptanması için artan önem ve acil ihtiyaç nedeniyle bu sorunlar da göz önüne alındığında çeşitli çalışmalarda gradiyent test, sıvı mikrodilüsyon yöntemi, agar dilüsyon yöntemi ve otomatize sistemler karşılaştırılmıştır. Turlej ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada iki farklı kolistin duyarlı *Klebsiella pneumoniae* suşu için üç kez tekrarlanan sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) aralığı sırasıyla 0.25-32 µg/ml ve 0.5-64 µg/ml olarak bulunurken agar dilüsyonda iki suş için de MİK değeri tüm tekraralarda 0.5 µg/ml bulunmuştur. Gradyent test yönteminde elde edilen MİK değerleri sıvı mikrodilüsyonla elde edilen değerlerden daha düşük tespit edilmiştir. Kolistin duyarlı saptanan suşlar için 1-2 kat, dirençli saptanan suşlar için ise en az 5 kat düşük MİK sonuçları elde edilmiştir. Sonuç olarak kolistin duyarlılık testlerinde agar dilüsyon methodunun kolistin duyarlılığını belirlemede en güvenilir yöntem olduğunu bildirmişlerdir (102).

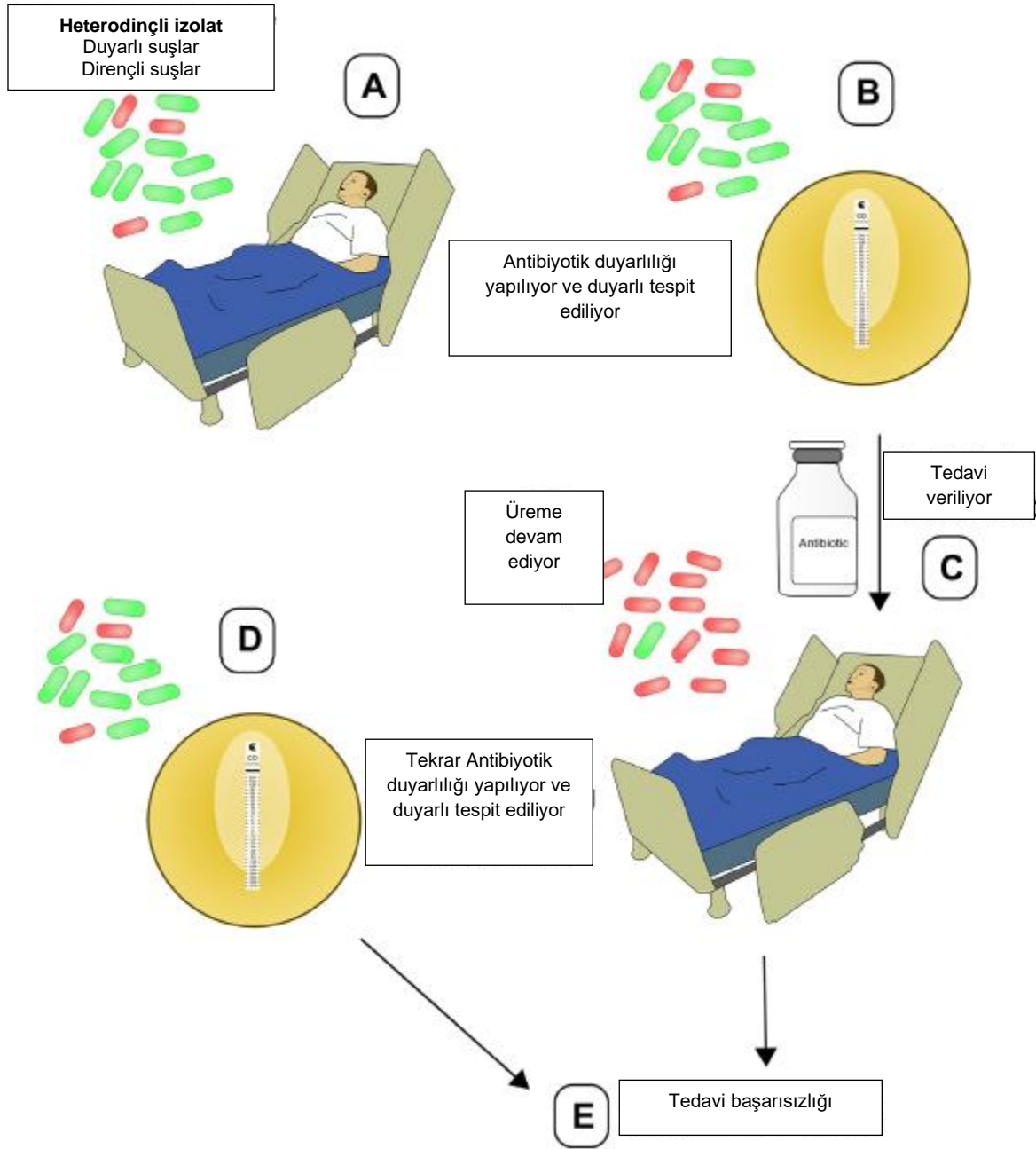
Kolistin için antibiyotik duyarlılık yöntemleri arasındaki uyum sorunlarının yanında antibiyotik duyarlılık testlerinin tekrarlanabilirliğinde de sorunlar yaşanmaktadır. Samuel ve arkadaşlarını kistik fibrozisli hastalardan izole edilen 25 *P. aeruginosa* and 12 *S. maltophilia* izolatu dahil ettikleri çalışmalarında kolistin duyarlılığı agar dilüsyon, sıvı mikrodilüsyon, gradiyent test ve disk difüzyon yöntemi uygulanarak araştırılmıştır. Dört yöntem karşılaştırılmış ve eş zamanlı yapılan tekraralarda %99 uyum saptanmıştır. Fakat aynı suşların farklı zamanlarda yapılan tekrarları arasındaki uyumsuzluk oranları agar dilüsyon için % 74, gradiyent test ve sıvı mikrodilüsyon için %84 ve disk difüzyon için %91 bulunmuştur. Agar dilüsyon ile diğer üç yöntem karşılaştırıldığında çok büyük hata oranı sıvı mikrodilüsyonda %12, disk difüzyon ve gradiyent testte %18 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla kolistin duyarlılığının

saptanmasında en iyi antibiyotik duyarlılık yönteminin agar dilüsyon olarak tespit edilmiştir (103).

2.2.6.Heterodirenç tanımı ve değerlendirilmesi

Heterodirenç, bir bakteri topluluğunda bulunan tüm bakterilerin normalde duyarlı ve aynı olması gerekirken herhangi bir antibiyotiğe farklı cevap vererek direnç gösteren subpopulasyonun olmasıdır. Bu durum Şekil 2.3'te görüldüğü gibi klinikte antibiyotik tedavisinde başarısızlıklara sebep olmaktadır.(104)

Şekil 2.3 :Enfeksiyon sırasında heterodirencin dinamiği



Antibiyotik direnci sonradan kazanılmış ve doğal olabiliyorsa heterodirenç de bu iki şekilde kazanılabilir (105). Heterodirenç mekanizması konusunda çeşitli genetik, epigenetik, genetik olmayan teoriler ortaya atılmışsa da henüz aydınlatılamamıştır (106). Belirlenen heterodirençli suşların seri 5-10 pasajından sonra bazı dirençli suşlar, orijinal popülasyon fenotipine yeniden dönüşürlerken diğerleri dirençli kalmaktadır (105,107,108).

Heterodirenç İlk kez 1947'de bir *Haemophilus influenzae* izolatında tanımlanmış bundan 20 yıl sonra da Stafilokoklarda saptanmıştır (105,109). CLSI, BSCA ve

EUCAST gibi uluslararası klinik laboratuvar standartları geliştiren ve standardize eden kuruluşlar heterodirenç konusunda yetersiz kalmıştır (106). Bu fenomeni belirlemede standart bir yöntemin olmaması, maliyetli ve zahmetli bir iş olması, bu fenomenin klinik öneminin belirlenmesini böylelikle de terapötik tedaviyi engellemektedir (106). İlk yapılan çalışmalarda bir antibiyotik konsantrasyon aralığı verilmemiştir. Herhangi bir antibiyotik için duyarlı olan bir grup içinde dirençli subpopulasyonların olması olarak ifade etmişler (105,110-113). Diğer bir tanımda ise tek bir sınır değeri belirlenerek örnek olarak *A.baumannii* için 8 µg/ml kolistin içeren agar plağında üreme olması ve bunun sıvı mikrodilüsyonla MİK değerinin 8 µg/ml bulunması olarak ifade edilmiştir.(100) Yine başka bir tanımda ise heterodirenç yüksek antibiyotik konsantrasyonlarında direnç görülürken düşük antibiyotik konsantrasyonlarında duyarlı sonuçların elde edilmesi şeklinde açıklanmış ve buna Eagle tipi heterodirenç denmiştir(114,115). Bu nedenlerle heterodirençin düzgün bir tanımlanması yok olmakla birlikte geriye dönük bir klinik değerlendirilmenin yapılması da imkansız olmaktadır (106)

Tablo 2.9 'da gösterildiği gibi heterodirenç belirlemede farklı yöntemler kullanılmakla birlikte populasyon analizi profili (PAP), heterodirençin saptanmasında altın standart kabul edilen bir yöntemdir (106). Fakat bu yöntemin uygulanışında da bir standart yoktur. Örneğin bazı çalışmalarda plakların konsantrasyon aralıkları 0.1 µg/ml alınırken (116) bazı çalışmalarda 1 µg/ml (117-120) olarak alınmıştır. Bu durum aynı suşun bir egride homojen değerinde ise heterojen olarak tespit edilmesine sebebiyet vermiştir (121). Heterodirençin tespit edilmesiyle ilgili PAP konusunda standartlar olmadığı gibi disk difüzyon ve gradiyent test yöntemlerinde de bir standart bulunmamaktadır (106).

EI-Halfawy ve arkadaşları, PAP yapıldığında en yüksek inhibisyon etkisinin görüldüğü antibiyotik konsantrasyonu, hiç inhibisyon görülmeyen antibiyotik konsantrasyonundan en az 8 kat yüksek ise bu izolat heterojen dirençli olarak kabul edilmişlerdir. Bu yöntem suşların antibiyotiğe karşı farklı davranışlarını karşılaştırma imkanı vermektedir (122).

Bu çalışmada da son tanımları baz alarak gradiyent test yöntemiyle zon içi üremeleri olan ayrıca gradiyent test ve sıvı mikrodilüsyon uyumsuzluğu olan 55 suş PAP'a alındı.

Tablo 2.9 : Heterodirenç saptama methodları

Method	Avantaj ve dezavantajları	Referans
PAP	<ul style="list-style-type: none"> -Altın standart -Zahmetli ve maliyeti yüksektir -Dirençli subpopulasyonun sıklığı ve MİK değeri saptanır 	106,123
Mikrodilüsyon PAP	<ul style="list-style-type: none"> -Normal PAP yönteminden daha hızlı ve maliyeti düşüktür -Yüksek inokulum heterodirencin saptanma olasılığını artırır. - Dirençli subpopulasyonun sıklığı ve MİK değeri saptanır 	123,124,125
PAP-Area under the curve (AUC)	<ul style="list-style-type: none"> -hVISA tespitinde altın standart - Zahmetli ve maliyeti yüksektir -Referans hVISA Mu3 suşu ile karşılaştırıldığında yanlış klasifiye edilebilir 	126
Gradyent test-Disk difüzyon	<ul style="list-style-type: none"> -Klinik laboratuvarlarda rutin kullanılmakta -Düşük inokulum nedeniyle düşük frekanstaki suşların zor tespiti -Dirençli subpopulasyonun tespiti inhibisyon zonu içindeki üremeye bağlı -Dirençli subpopulasyonun sıklığı ve MİK değeri hakkında bilgi vermez ya da zayıf bilgi sağlar 	100
Gradyent test ile makromethod	<ul style="list-style-type: none"> - Yüksek inokulum yakalama şansını artırır - Yüksek inokulum nedeniyle yanlış pozitiflikler olabilir 	124
Sıvı mikrodilüsyon	<ul style="list-style-type: none"> - Klinik laboratuvarlarda rutin kullanılmaktadır 	123,127-129

	-Dirençli subpopulasyon varlığında,MİK değerleri inokulum miktarına ve dirençli bakterinin üreme hızına bağlıdır	
Agar dilüsyon	- Klinik laboratuvarlarda rutin kullanılmaktadır -İnokulumun miktarı düşük olması nedeniyle düşük sıklıkta bulunanların kaçırılmasına sebep verir - Dirençli subpopulasyonun sıklığı ve MİK değeri saptanır	100
Sıvı mikrodilüsyon temelli otomatize sistemler (VITEK 2, MicroScan)	- Klinik laboratuvarlarda rutin kullanılmaktadır - Düşük inokulum nedeniyle dirençli subpopulasyon sıklığı düşük izolatların saptanması zordur	100,123,130
Üremeyi tespit eden otomatize sistemler (BACTEC 960 sıvı besiyeri sistemi)	- Klinik laboratuvarlarda rutin kullanılmaktadır - <i>Mycobacterium tuberculosis</i> için geliştirilmiştir -Uzun inkübasyon gereksinimi vardır -Dirençli subpopulasyon duyarlı suşlar tarafından yok edilebilir - Dirençli subpopulasyonun sıklığı ve MİK saptanamaz	131-136
Moleküler methodlar	- Klinik laboratuvarlarda rutin kullanılmaktadır -Dirence sebep olan mutasyonların hepsi olmasa da bir kısmını tespit eder -Hızlı -Dirençli bakteri oranı %5 in altında olsa dahi saptar	136-140

	Hastanın klinik örneği direkt kullanılabilir	
--	--	--

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması

Aralık 2015 – Nisan 2018 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Patoloji Laboratuvarı Bakteriyoloji Ünitesine gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 212 *S. maltophilia* izolatu çalışmaya dahil edilmiştir. Bu izolatlar çalışma süresince %15 gliserollü “Brain Heart Infusion Broth” (BHIB) besiyeri içerisinde -20°C’de saklanmıştır.

Stoktan açılan izolatlar %5 koyun kanlı agara pasajlanmıştır. Kanlı agar plaklarının 37°C’de 24 saatlik inkübasyonunu takiben saptanan koloniler, Gram boyanma özellikleri, koloni morfolojisi, oksidaz ve katalaz reaksiyonuna göre incelenmiştir. Saf kültür halinde elde edilen mikroorganizmalar, konvansiyonel yöntemlere ilaveten Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight, Mass Spectrometry (MALDI TOF MS- bioMérieux, France) otomatize identifikasyon sistemi ile tür düzeyinde tanımlanmıştır. Her hastanın tek bir *S. maltophilia* izolatu çalışmaya alınmıştır.

3.2. Antimikrobiyal duyarlılık testleri

Kontrol suşu olarak *E.coli* ATCC 25922, *E.coli* NCTC 13846 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşları kullanılmıştır.

3.2.1. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi CLSI önerileri doğrultusunda katyon ayarlı Mueller-Hinton sıvı besiyeri (MHB) içinde antibiyotiklerin seri iki kat konsantrasyonları hazırlanarak yapılmıştır. Son inokulum konsantrasyonu 5×10^5 CFU/mL olacak

şekilde bakteri süspansiyonu inoküle edilmiştir. 35°C'de 18-24 saat inkübasyon sonrası gözle görülür üremenin durduğu en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenmiştir.

3.2.1.1. MHSB'nin hazırlanması

- 1) Ticari toz besiyerinden üretici firmanın (Oxoid, İngiltere) talimatları doğrultusunda hazırlanmıştır.
- 2) Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

3.2.1.2. Antibiyotik stok solüsyonlarının hazırlanması

- 1) Antibiyotiklerin stok solüsyonları aşağıdaki formüle göre hazırlanmıştır (141):

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Volüm (mL)} \times \text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/mL})}{\text{Antibiyotik potensi } (\mu\text{g/mg})}$$

- 2) Kullanılan kolistinin potensi CLSI klavuzuna göre IU'den $\mu\text{g/mg}$ ' a dönüştürülerek 765.80 olarak hesaplanmıştır. Çözücüsü olarak distile su kullanılmıştır.(142)

3.2.1.3. Bakteri inokülumu

- 1) Bakteri inokülumları, 24 saatlik koyun kanlı agar kültüründen, MHB içerisinde 0.5 McFarland standart bulanıklıkta olacak şekilde, doğrudan koloni süspansiyonu yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır.
- 2) Bu süspansiyon, MHB ile 1/100 oranında dilüe edilerek, 10^6 CFU/mL konsantrasyonu elde edilmiştir.

3.2.1.4. Testin yapılışı

- 1) Steril U tabanlı 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakları kullanılmıştır.

- 2) Her bir kuyucuğa 50 µl MHB konulmuştur.
- 3) İlk kuyucuklara antibiyotik stok solüsyonundan konularak son kuyucuğa kadar dilüsyonları yapılmıştır. En son kuyucuktan sonra 50 µl dışarı atılmıştır
- 4) Hazırlanan bakteri süspansiyonundan her bir kuyucuğa 50 µl inoküle edilmiştir. Böylece kuyucuklardaki son inokulum konsantrasyonu 5×10^5 CFU/mL olarak belirlenmiştir.
- 5) Her bir izolat için, antibiyotik içermeyen kuyucuklarda üreme kontrolü ve her plakta iki kuyucukta besiyerinin sterilite kontrolü yapılmıştır.
- 6) Plaklar 35°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir.

3.2.1.5. Değerlendirme ve yorum

Üremenin görülmediği en düşük ilaç konsantrasyonu, o antibiyotik için MİK değeri olarak belirlenmiştir. *S. maltophilia* için CLSI kılavuzunda kolistin sınır değerleri olmadığından sonuçlar *Pseudomonas* spp. ve *Acinetobacter* spp. için belirlenen kolistin sınır değerlerine göre yorumlanmıştır (47,142). Kolistin için belirlenen duyarlılık sınır değerleri Tablo 3.1'de ve standart kontrol suşu için bildirilen MİK değerleri Tablo 3.2'de verilmiştir.

3.2.2. Gradyent Test Yöntemi

Gradyent test yöntemi, üretici firma önerileri doğrultusunda uygulanmıştır. Kolistin MİK değerlerinin gradyent test yöntemi ile saptanması için 0.016-256 µg/ml aralığında kolistin içeren gradyent test şeritleri (Etest, bioMérieux, Fransa) kullanılmıştır. Bu şeritler, kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.1. MHA'nın hazırlanması

- 1) Ticari toz besiyerinden üretici firmanın (Merck, Almanya) talimatları doğrultusunda hazırlanmıştır.
- 2) Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

3) 55°C'ye kadar soğuduktan sonra steril petri kaplarına 4 mm kalınlıkta olacak şekilde dökülüp katılaşmaya bırakılmıştır.

3.2.2.2. Bakteri inokulumu

İnokulum, 24 saatlik koyun kanlı agar kültüründen, serum fizyolojik içerisinde 0.5 McFarland standart bulanıklıkta olacak şekilde, doğrudan koloni süspansiyonu yöntemi ile hazırlanmıştır.

3.2.2.3. Testin yapılışı

1) Steril cam tüp içinde hazırlanan bakteri süspansiyonuna steril eküvyon batırılmış ve tüp kenarına bastırılarak pamuğun fazla sıvıyı bırakması sağlanmıştır.

2) Eküvyonla alınan inokulum, tüm agar yüzeyine yaklaşık 60 derecelik açılarla plak çevrilerek yayılmıştır.

3) Kullanılmadan önce oda sıcaklığına gelmesi beklenen gradiyent test stripleri paketinden çıkarılıp, aplikatör yardımıyla besiyeri üzerine yerleştirilmiştir. Striplerin yerleştirilmesi işlemi, inokulum MHA üzerine yayıldıktan sonra en geç 15 dakika içinde tamamlanmıştır.

4) Petriler 35°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir.

3.2.2.4. Değerlendirme ve yorum

Plaklar, koyu renk bir zemin üzerinde, aydınlık ortamda değerlendirilmiştir. İnhibisyon zonunun gradiyent test şeridine temas ettiği konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenmiştir. *S. maltophilia* için CLSI kılavuzunda kolistin sınır değerleri bulunmadığından sonuçlar *Pseudomonas spp.* ve *Acinetobacter spp.* için belirlenen klinik kolistin sınır değerlerine göre yorumlanmıştır (47,142). Klinik sınır değerler Tablo 3.1'de ve standart kontrol suşu için bildirilen MİK değerleri Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: *Pseudomonas* spp için CLSI kılavuzunda yer alan kolistin MİK sınır değerleri

Antibiyotik Adı	MİK sınır değerleri (µg/mL)	
	Duyarlı	Dirençli
Kolistin	≤ 2	≥ 4

Tablo 3.2. Standart kontrol suşları için belirlenen kolistin MİK aralıkları

Standart Kontrol Suşu	Kolistin için MİK aralığı (µg/mL)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.25-2
<i>E.coli</i> NCTC 13846	4-8
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.5-4

3.3.Kolistin heterodirencinin saptanması

3.3.1. Heterojen direnç gösteren izolatların saptanması

Çalışmaya dahil edilen tüm izolatların sıvı mikrodilüsyon ve gradient test yöntemi sonuçları değerlendirilmiştir. Tüm izolatlara sıvı mikrodilüsyon yöntemi ikinci kez yapılmıştır. Tekrarlanan sıvı mikrodilüsyon test sonuçlarında uyumsuzluk ya da gradient şeritlerinin etrafında oluşan inhibisyon elipsi içinde koloni oluşumu gözlenen izolatlar kolistin heterodirenci açısından ileri değerlendirmeye alınmıştır (47,143-146).

3.3.2. Populasyon Analiz Profili (PAP) yöntemi

Popülasyon analiz profili yönteminde (PAP), test edilmek istenen suşlarının sıvı besiyerinde hazırlanan süspansiyonlarından, artan konsantrasyonlarda kolistin içeren (0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 ve 256 µg/ml) MHA besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Kontrol suşu olarak *E.coli* ATCC 25922, *E.coli* NTCC 35218 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşları kullanılmıştır.

Test edilecek izolatlardan 3 farklı koloni alınarak Mueller Hinton sıvı besiyerine (MHB) ekilmiş 35°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra $\sim 10^8$ cfu/ml (A) (0.5 McFarland) bakteri içeren süspansiyonları hazırlanmıştır. Aynı tarafta 1.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine (*Eppendorf*) 900 µl serum fizyolojik (SF) dağıtılmıştır. Her bir izolat için 5 adet, 900 µl SF içeren mikrosantrifüj tüpü kullanılmıştır. Ana bakteri süspansiyonu (A) (10^8 cfu/ml) vorteks ile karıştırılmış ve bu süspansiyondan 100 µl alınarak, 900 µl SF içeren ilk mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Böylece bakteri süspansiyonu 10 kat seyreltilerek ilk mikrosantrifüj tüpünün $\sim 10^7$ cfu/ml kadar bakteri içermesi sağlanmıştır. Bu mikrosantrifüj tüpü de vorteks ile karıştırılmış ve 100 µl alınarak ikinci mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Bu işlem beşinci mikrosantrifüj tüpüne kadar devam ettirilerek 10^7 (B), 10^6 (C), 10^5 (D), 10^4 (E) ve 10^3 (F) cfu/ml'lik bakteri süspansiyonları elde edilmiştir. 'F' tüpünden (10^3 cfu/ml) 20 µl, alınarak antibiyotik içermeyen (0 µg/ml) MHA besiyerlerine ekilmiştir. Plaklar 48 saat $35\pm 2^\circ\text{C}$ 'de inkübasyona bırakıldıktan sonra 24. ve 48. saatlerde bakteri kolonileri sayılmıştır.

Her bir test edilecek izolat için ana bakteri süspansiyonundan (A) (10^8 cfu/ml) 10'ar µl alınarak kolistin içeren MHA besiyerlerine (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 ve 256 µg/ml) ekilmiştir. Bu işlem tüm heterojen direnç düşünülen suşlar için yapılmıştır.

Plaklar 48 saat $35\pm 2^\circ\text{C}$ 'de inkübe edildikten sonra farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren plaklarda üreme gösteren bakteri kolonileri sayılmış ve heterojen direnç popülasyon sıklığı hesaplanmıştır. Heterojen direnç popülasyon sıklığı; üremenin görüldüğü en yüksek ilaç konsantrasyonuna sahip plaktaki koloni sayısı, ilaç içermeyen plaktaki koloni sayısına bölünerek hesaplanmıştır (122).

PAP yöntemiyle heterodirenç saptanan izolatların en yüksek ilaç konsantrasyonunda üreyen kolonileri alınıp kanlı agarda 7 gün ardışık olarak pasajlanmıştır. Yedinci pasaj tamamlandıktan sonra tekrar sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle izolatların kolistin MİK değerlerine bakılmıştır (99,100,114).

4. BULGULAR

Çalışmamıza Aralık 2015 – Nisan 2018 tarihleri arasında olmak üzere çeşitli klinik örneklerden izole edilen 212 adet *S. maltophilia* suşu dahil edilmiştir. Aynı hastadan ikinci kez izole edilen suşlar çalışmaya dahil edilmemiştir.

Çalışmamıza dahil edilen 212 suşun 35'i (%16.5) çocuk, 177'si (%83.5) erişkin hastalardan izole edilmiştir. Çalışmaya alınan suşların 108'i (%50.9) erkek, 104'ü (%49.1) ise kadın hastalardan izole edilmiştir.

İzolatların kliniklere göre dağılımı Tablo 4.1'de verilmiştir.

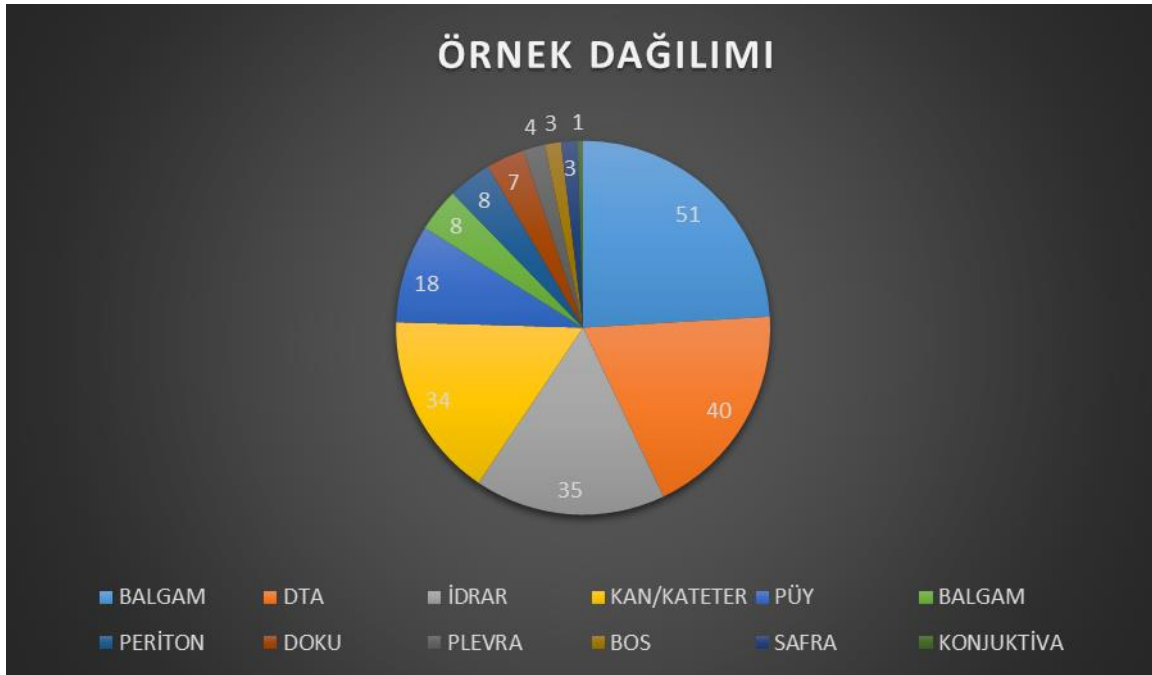
Tablo 4.1: *S. maltophilia* suşlarının izole edildiği klinik örneklerin gönderildiği klinikler

KLİNİKLER	SAYI (%)
DAHİLİYE	30 (14.1)
ONKOLOJİ	28 (13.2)
DAHİLİYE YOĞUN BAKIM	25 (11.7)
PEDİATRİ YOĞUN BAKIM	21 (9.9)
GÖĞÜS HASTALIKLARI	12 (5.6)
ÜROLOJİ	10 (4.7)
ONKOLOJİ YOĞUN BAKIM	9 (4.2)
PEDİATRİ	9 (4.2)
GENEL CERRAHİ YOĞUN BAKIM	8 (3.7)
NÖROŞİRURJİ YOĞUN BAKIM	7 (3.3)
NÖROLOJİ YOĞUN BAKIM	6 (2.8)
PLASTİK CERRAHİ	6 (2.8)
GENEL CERRAHİ	5 (2.3)
NÖROŞİRURJİ	3 (1.4)
NÖROLOJİ	2 (0.9)
DİĞER	31 (14.6)

TOPLAM	212
--------	-----

Çalışmamıza dahil edilen 212 suşun 51' i balgam, 40'ı derin trakeal aspirasyon (DTA), 35'i idrar, 34'ü kan ve kateter, 18'i püvy, 8'i bronkoalveolar lavaj (BAL), 8'i periton, 7'si doku, 4'ü plevra, 3'ü beyin omurilik sıvısı (BOS), 3'ü safra ve 1'i konjunktivadan izole edilmiştir.(Şekil 4.1)

Şekil 4.1 : Klinik izolatların örnek türüne göre dağılımı



Çalışmaya dahil edilen 212 izolatın sıvı mikrodilüsyon ve gradiyent test yöntemi ile elde edilen MİK sonuçları değerlendirilmiştir. Kolistin duyarlılığının saptanmasında altın standart olarak kabul edilen sıvı mikrodilüsyon testinin iki kez tekrarlanması sonucunda 95 izolat (95/157; %60.5) duyarlı, 62 izolat (62/157; %39.5) ise dirençli bulunmuştur. Bununla birlikte 55 (55/212; %25.9) izolatta testin ikinci kez tekrarlanması sonucunda uyumsuz sonuç elde edilmiştir.

Sıvı mikrodilüsyon ve gradiyent test yöntemi ile elde edilen MİK sonuçları karşılaştırıldığında ise her iki yöntemle 39 izolat (39/134; %29.1) dirençli, 95 izolat

(95/134; %70.9) ise duyarlı bulunmuştur. Sonuç olarak gradiyent test ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri karşılaştırıldığında toplam 134 (134/212; %63.2) izolatta kategorik olarak uyumlu sonuç elde edilmiştir. Her iki yöntemle dirençli bulunan izolatlara ait sonuçlar Tablo 4.3'de duyarlı bulunan izolatlara ise Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2: Gradyent test ve sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle kolistin duyarlı saptanan izolatlar

Duyarlı izolat no	MİK değeri	
	Gradyent test	Sıvı mikrodilüsyon
1	0.125	1
		2
2	0.5	2
		1
3	0.38	0.5
4	0.125	1
		1
5	0.5	2
6	0.5	2
		2
7	0.19	0.5
		1
8	0.38	1
		1
9	0.75	2
		1
10	0.125	≤0.06
		0.5
11	0.5	0.5
		2
12	0.25	0.5
		2
13	0.19	0.25
		1
14	0.19	0.5
		1
15	1.5	2
		1
16	1	1
	0.5	1
17	0.19	1
		1
18	0.125	2
		1
19	0.094	0.25
		0.5
20	0.38	1
21	0.19	1
		0.5
22	0.75	1
		1
23	0.19	1
		2
24	1	≤0.06
		2
25	1.5	≤0.06
	0.75	≤0.06
26	1	≤0.06
		1
27	0.75	2
		1
28	0.75	2
		1
29	1	1
	0.19	
30	2	1
	1	
31	1.5	1
32	0.5	0.25
		1
33	1	1
		1
34	2	0.5
		1
35	0.25	1
		1
36	0.125	2
		1
37	1	1
		1
38	0.19	2
		1
39	0.25	0.5
		1
40	0.125	0.125
		0.5

		1
41	2	2
		2
42	0.38	1
		1
43	0.38	2
44	0.064	0.5
	0.094	0.5
45	0.094	0.5
		2
46	0.19	2
47	0.125	1
		1
48	0.38	0.5
		2
49	0.125	0.5
		2
50	0.125	0.5
		0.5
51	0.125	0.25
		0.5
52	0.094	2
		0.5
53	0.25	0.5
		1
54	0.125	2
		2
55	0.125	2
		1
56	0.25	2
		1
57	0.125	0.5
58	0.25	0.5
59	0.125	2
		1
60	0.19	2
61	0.19	0.5
		0.5
62	0.19	1
63	0.25	0.5
64	0.125	1
	0.125	1
		1
65	0.094	1
		0.5
66	0.125	2
		0.5
67	0.125	0.5
		1
68	0.125	0.5
		0.5
69	0.094	
	0.25	2
	0.125	1
70	0.125	1

		0.5
71	0.094	1
	0.094	1
72	0.125	0.5
	0.25	0.5
73	1	1
		0.5
74	0.19	0.25
	0.125	1
75	0.125	0.5
		0.5
76	0.125	0.5
		0.5
77	0.125	1
		0.5
78	0.25	1
		0.5
79	0.125	1
		1
80	0.25	2
		1
81	0.38	2
	1	2
82	0.38	2
83	0.125	2
		0.5
84	0.19	0.5
		2
		2
85	1.5	2
86	0.125	0.5
		1
87	0.19	0.5
		0.5
88	0.19	0.5
		0.5
89	0.38	1
		2
90	0.19	0.25
		1
91	0.19	1
		2
		2
92	0.125	0.5
		0.5
93	0.125	0.5
		2
94	0.125	0.5
		2
95	0.125	2
		2

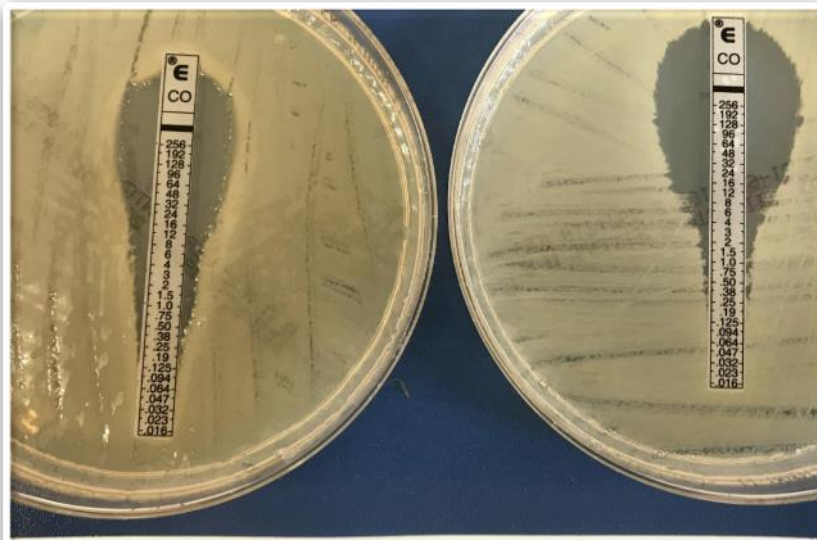
Tablo 4.3: Gradyent test ve sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle kolistin dirençli saptanan izolatlar

Dirençli izolat no	MİK değeri	
	Gradyent test	Sıvı mikrodilüsyon
1	8	≥128
		128
2	3	16
		16
3	>256	≥128
		≥128
4	24	16
	≥256	≥128
5	12	8
		16
6	4	32
		8
7	32	≥128
		≥128
8	≥256	4
	≥256	≥128
		≥128
9	12	4
		128
10	128	≥128
		≥128
11	≥256	≥128
		≥128
		≥128
12	6	16
	6	
13	6	128
	6	8
		32
14	4	128
		128
15	16	4
		8
16	3	≥128
	4	8
17	4	≥128
		8
18	4	64
		16
19	4	8
		16
20	3	64
		8
21	4	32
		128
22	3	8
		8

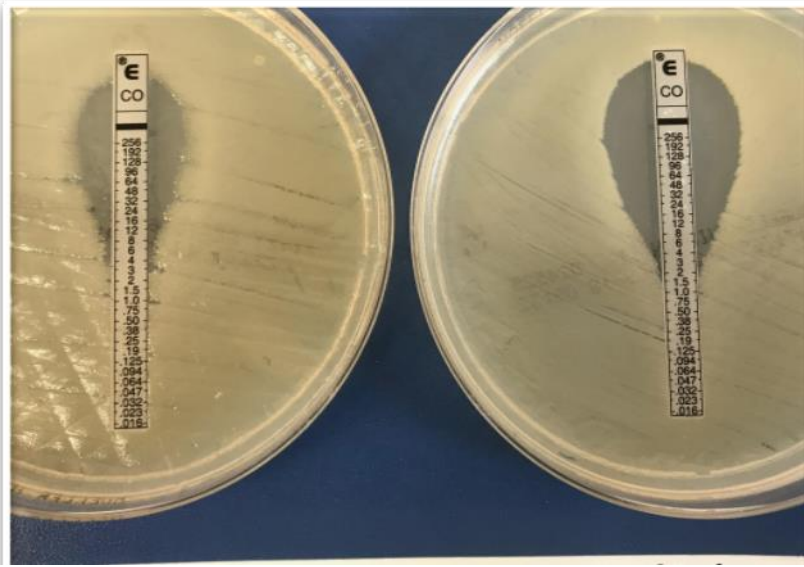
23	32	16
		≥128
24	3	8
	4	4
25	4	4
	4	8
26	6	≥128
		64
27	≥256	≥128
	16	≥128
		≥128
28	3	≥128
		64
29	8	≥128
		64
30	3	128
		32
31	6	≥128
		64
32	3	16
		≥128
33	64	16
		≥128
34	12	≥128
		≥128
35	4	128
		≥128
36	3	8
		≥128
37	>256	≥128
		≥128
38	4	16
		32
39	3	≥128
		8

Tablo 4.2 ve 4.3'te görüldüğü gibi aynı izolatın farklı zamanlarda duyarlılık testlerinin tekrarlanması sonucunda *kategorik olarak* aynı sonuç elde edilmesine rağmen, elde edilen MİK değerlerinin birbirinden oldukça farklı olduğu görülmüştür. Aynı suşa ait gradient test sonuçlarındaki farklılık da Şekil 4.2.a ve 4.2.b 'de verilmiştir.

Şekil 4.2.a: Aynı *S.maltophilia* izolatlarına ait tekrarlanan gradiyent test görüntüleri

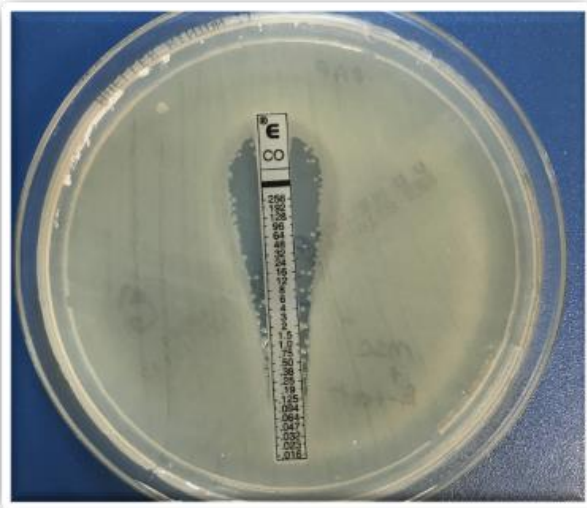


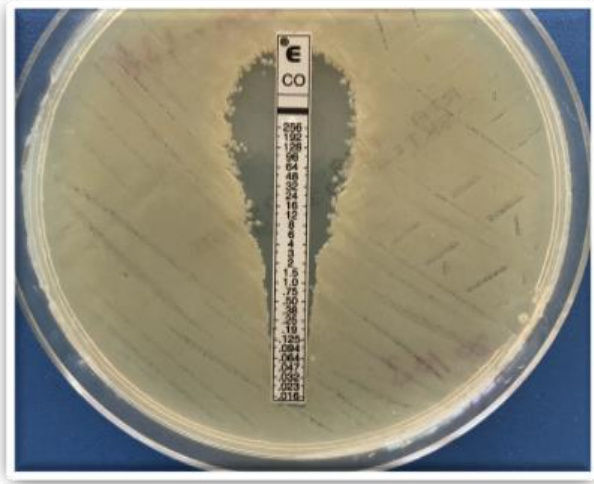
Şekil 4.2.b: Aynı *S.maltophilia* izolatlarına ait tekrarlanan gradiyent test görüntüleri



Gradient test sonuçları değerlendirilirken Sònia Martínez-Servat ve ark.larının (47) kullandığı kriterlere benzer şekilde gradient testte kolistin şeriti etrafında oluşan inhibisyon elipsi içinde üreme saptanan izolatlar olası heterodirençli izolat olarak kabul edilmiştir. Gradyent testte kolistin şeriti etrafında oluşan inhibisyon elipsi içinde üreme saptanan bazı izolatlara ait görüntü Şekil 4.3'de gösterilmiştir.

Şekil 4.3: Gradient testte inhibisyon elipsi içinde üreme gösteren *S. maltophilia* suşları

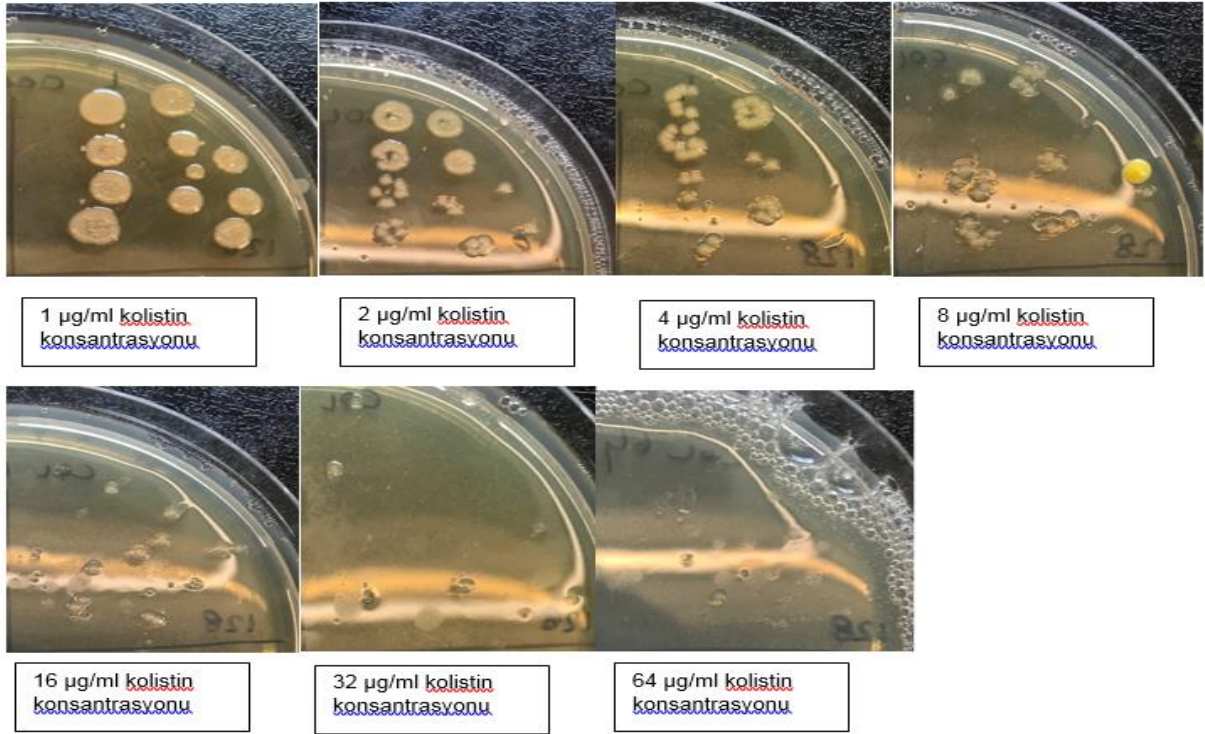




Sıvı mikrodilüsyon testinin iki kez tekrarlanması sonucunda uyumsuz sonuç elde edilen izolatlar ile gradiyent test yöntemiyle inhibisyon elipsi içinde üreme saptanan izolatlara heterojen direnç açısından ileri değerlendirmeye alınarak popülasyon analizi profili yöntemi uygulanmıştır (71,99,100,114,119).

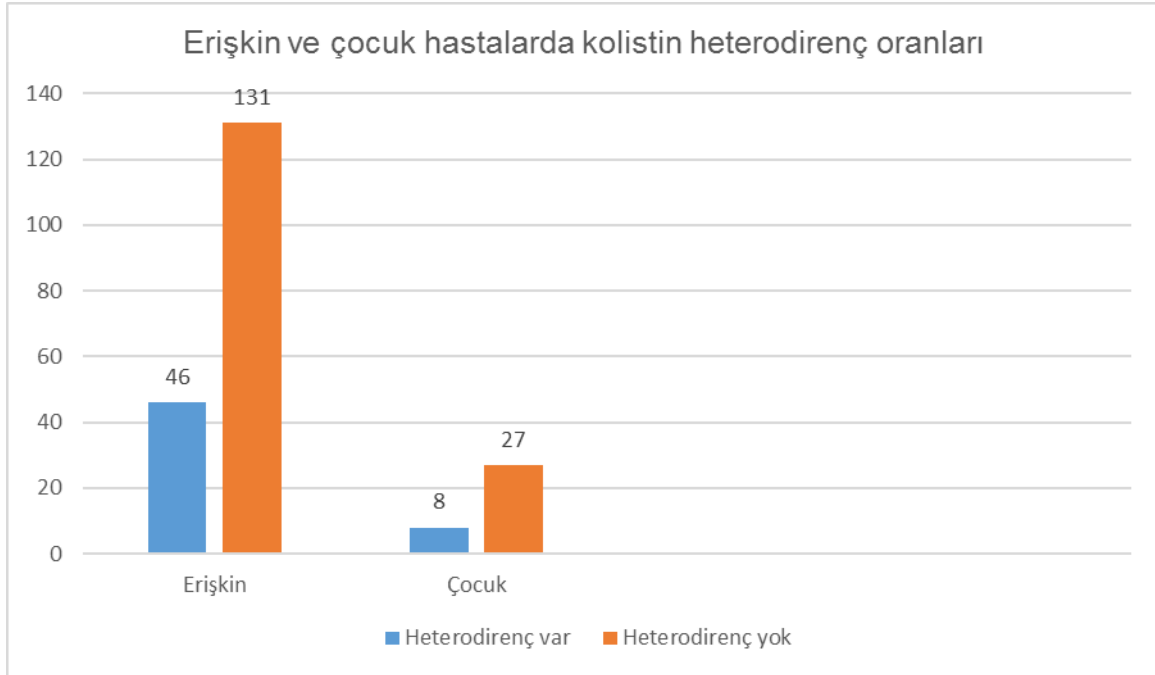
Kolistin heterodirenci saptanması amacıyla 55 izolata en az iki kez PAP yöntemi uygulanmıştır. Heterojen direnç saptanan izolatlarda 4 µg/ml ve üzerindeki konsantrasyonlarda bakteri üremesinin devam ettiği saptanmış, artan antibiyotik konsantrasyonlarındaki plaklarda elde edilen koloni sayısının giderek azaldığı görülmüştür (Şekil 4.4). Çalışmada elde edilen PAP analiz sonuçları Tablo 4.4'de verilmiştir. PAP uygulanan 55 izolatın 54'ünde heterodirenç tespit edilmiştir. Kolistin heterodirenç sıklığı 54/212 (%25,5) olarak saptanmıştır. Bir izolatta ise tekrarlayan PAP testi sonucu heterojen direnç saptanamamıştır.

Şekil 4.4: Popülasyon analizi yapılan 27 nolu *S.maltophilia* izolatının artan antibiyotik konsantrasyonlarında saptanan üreme paterni



Kolistin heterojen direnç oranı çocuk hastalarda %22.9 (8/35) olarak saptanırken erişkin hastalarda %26 (46/177) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5)

Şekil 4.5: Erişkin/çocuk hasta gruplarında saptanan kolistin heterodirenç oranları



Kolistin heterodirenci saptanan izolatların 16'sı kan/kateter, 14'ü DTA, 8'i balgam, 6'sı idrar, 3'ü pü, 2'si safra, 2'si periton, 1'i doku, 1'i plevral sıvı, 1'i BOS ve 1'i de BAL örneklerinden izole edilmiştir. Heterodirenç en sık kan ve kateter izolatlarında saptanmış olup, sıklığı ise %47.1 (16/34) olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.4 : Kolistin heterodirenci saptanan izolatların sıvı mikrodilüsyon ve gradiyent test ile elde edilen MİK değerleri ve alt popülasyon sıklığı

İzolat No	Gradyent test/ MİK değerleri	Sıvı mikrodilüsyon / MİK değerleri	PAP 'da saptanan en yüksek konsantrasyon	7 gün pasaj sonrası elde edilen MİK değeri	Frekans
1	0.75	4	32	16	1.25×10 ⁻⁵
	0.50	8			
	0.19	4			
2	0.125	1	32	1	3×10 ⁻⁴
	1 ziü,çz(+)	4			
	16 ziü(+)	32			
3	12 çz(+)	0.5	32	1	2.14×10 ⁻⁵
	0.75 çz(+)	8			
	0.25	128			
4	0.75 ziü(+)	1	128	16	3.7×10 ⁻⁷
		8			
5	0.38 ziü(+)	2	128	8	12.5×10 ⁻⁵
		4			
6	0.75 ziü(+)	1	128	16	3.57×10 ⁻⁵
		8			
7	8 ziü(+)	2	128	16	2.1×10 ⁻⁵
	1.5	8			
8	6 ziü(+)	0.5	128	32	6.13×10 ⁻⁵
	4 çz(+)	1			
	3	8			
9	2	2	128	>128	0.2×10 ⁻⁶
	1.5	2			
	1	4			
10	8 ziü(+)	1	128	8	8.75×10 ⁻⁴
		128			
11	4 ziü,çz(+)	0.5	128	8	1.86×10 ⁻⁵
		32			
12	1.5 çz(+)	0.5	128	128	1.23×10 ⁻⁵
	0.50 çz(+)	8			
	4 çz(+)	128			
13	6 ziü(+)	0.5	128	16	1.82×10 ⁻⁵
	0.25 ziü(+)	2			
	2 ziü(+)	1			
	6 ziü(+)	128			
14	0.125 ziü(+)	0.5	128	16	2.73×10 ⁻⁵
	12 ziü,çz(+)	4			
		1			
15	32 ziü,çz(+)	0.5	128	128	1×10 ⁻⁵
	0.125	16			
	6 ziü(+)	32			
16	1 ziü(+)	2	128	2	2.4×10 ⁻⁵
	1.5	8			
17	1.5	1	128	16	1.615×10 ⁻⁵
	24 çz(+)	4			
18	0.25	1	128	8	2.5×10 ⁻⁵
	0.50	8			
19	1	0.5	128	32	7.4×10 ⁻⁷
	0.38	4			
	0.38 ziü(+)	4			
	0.19 ziü(+)	2			

20	2 çz(+)	4	128	1	0.8×10^{-7}
	3 çz(+)	4			
	16	>128			
21	12 ziü(+)	<0.06	128	2	0.7×10^{-7}
	2 ziü(+)	16			
	1 ziü,çz(+)	1			
22	0.5 ziü(+)	0.25	128	4	3.43×10^{-6}
		64			
		64			
23	1 ziü(+)	2	128	64	7.8×10^{-7}
	16	>128			
		16			
24	8 ziü,çz(+)	2	128	4	0.19×10^{-5}
		16			
25	0.50 ziü(+)	0.5	128	2	0.5×10^{-6}
		8			
26	8 ziü(+)	0.5	128	1	4.4×10^{-6}
	0.38	1			
	16 çz(+)	>128			
27	0.19 ziü(+)	0.5	32	2	1.33×10^{-6}
	0.125	0.5			
		4			

İzolat No	Gradyent test/ MİK değerleri	Sıvı mikrodilüsyon / MİK değerleri	PAP 'da saptanan en yüksek konsantrasyon	7 gün pasajlandıktan sonraki MİK değerleri	Frekans
28	1 ziü(+)	0.5	256	32	1.8×10^{-6}
		>128			
29	0.50 ziü(+)	1	256	4	1.2×10^{-6}
		64			
30	1.5 ziü,çz(+)	4	128	4	2.26×10^{-6}
		8			
31	0.50 ziü,çz(+)	2	128	4	1.166×10^{-5}
		8			
32	0.50 çz(+)	0.5	128	128	4.4×10^{-5}
	0.19	8			
	0.125	1			
	0.125	8			
33	3 ziü,çz(+)	0.5	128	>128	4.28×10^{-4}
	4 çz(+)	64			
	12	128			
34	0.50	2	128	16	1.056×10^{-5}
	2 çz(+)	8			
	48	128			
35	0.25 ziü(+)	1	128	0.5	5.5×10^{-6}
		16			
36	4 ziü(+)	1	128	>128	5×10^{-4}
	0.38 ziü(+)	64			
37	0.25	1	128	2	1.3125×10^{-5}
	0.125	128			
	0.094	4			
38	1 ziü(+)	2	128	32	1×10^{-5}
	0.75 ziü(+)	2			
39	0.25 ziü(+)	2	128	64	2.32×10^{-7}
	6 ziü(+)	8			
40	8 ziü,çz(+)	4	128	32	3.33×10^{-6}
	6 ziü(+)	16			
		1			
41	0.125	0.5	128	4	2.66×10^{-6}
	0.125 ziü(+)	4			
		8			
42	1 ziü(+)	4	256	1	1.666×10^{-3}
	4 ziü(+)	32			
		64			
43	0.125	2	128	64	5.88×10^{-6}
		8			
	1.5 ziü(+)	2			
44	0.38	64	128	32	2.5×10^{-4}
		1			
45	0.25	8	128	64	2.083×10^{-5}
	0.75 çz(+)	8			
		1			
46	0.94	1	128	>128	6×10^{-5}
	3 ziü(+)	16			
		8			

		8			
47	0.094	0.5	128	1	8.97×10 ⁻⁵
		8			
		1			
48	4 ziü(+)	2	128	64	8.33×10 ⁻⁴
	8 ziü(+)	64			
49	0.25	0.5	128	>128	5.6×10 ⁻⁵
	0.125 ziü(+)	2			
	32	>128			
		4			
50	0.75 ziü,çz(+)	4	256	16	2×10 ⁻⁵
		16			
51	0.125	2	256	2	0.125×10 ⁻⁵
		4			
52	0.75	1	256	64	0.2325×10 ⁻⁵
		8			
		16			
53	0.25	8	32	4	0.1388×10 ⁻⁵
		2			
		2			
54	1 çz(+)	0.5	128	1	0.487×10 ⁻⁵
	0.19 ziü(+)	0.5			

ziü:zon içi üreme,çz:çift zon

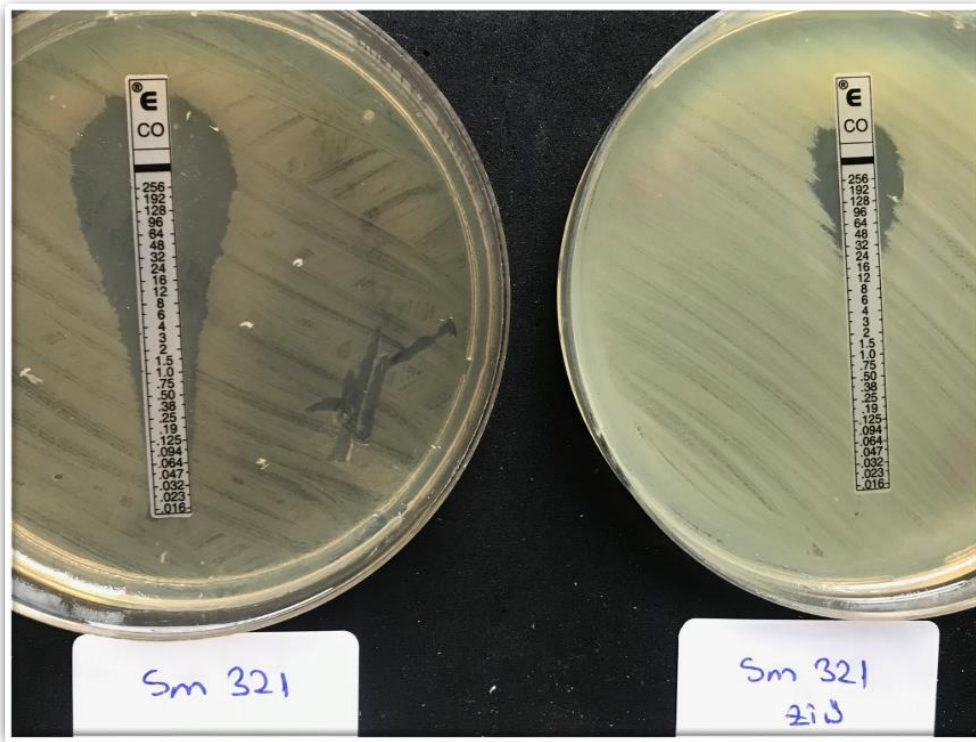
Çalışmamızda 78 (%36.8) izolatta gardiyent test ve sıvı mikrodilüsyon ile elde edilen MİK değerleri karşılaştırıldığında kategorik olarak uyumsuz sonuç elde edilmiştir. Bu izolatların 55'inde sıvı mikrodilüsyon yönteminin iki kez uygulanması sonucunda da kategorik uyumsuzluk saptanmıştır ve bu nedenle heterodirenç açısından değerlendirmek amacıyla ileri analiz için PAP uygulanmıştır. Geriye kalan 23 izolatta ise sıvı mikrodilüsyon testiyle yapılan tekrarlarda dirençli MİK değerleri elde edildiğinden bu suşlar kolistin dirençli olarak kabul edilmiş ve heterodirenç açısından değerlendirilmemiştir.

PAP yöntemiyle kolistin heterojen dirençli bulduğumuz 54 izolatın, PAP'da üreme gösterdiği en yüksek konsantrasyonda kolistin içeren plaklardan 7 günlük ardaşık pasajlar gerçekleştirilmiş ve 7. günün sonunda sıvı mikrodilüsyon testi tekrarlanmıştır. Bunun sonucunda bazı izolatların kolistin MİK değerlerinde düşme görülürken bazı izolatlarda MİK değerlerinin yüksek kalmaya devam ettiği saptanmıştır. Yedi gün pasajdan sonra 14 (14/54;%25.9) izolat kolistin duyarlı hale dönerken, 40 (40/54;

%74.1) izolat dirençli kalmaya devam etmiştir. Dirençli olarak saptanan izolatlardan 32 (32/54; %59.3)'sinde 4-64 µg/ml aralığında MİK değeri elde edilirken, 8 (8/54; %14.8) izolatta ≥ 128 MİK değeri elde edilmiştir. 7 günlük seri pasajlama sonrası elde edilen MİK değerleri Tablo 4.4 'de verilmiştir.

Heterodirenç saptanan ve gradiyent test yönteminde inhibisyon elipsi içinde üremeleri olan izolatların elips içi kolonilerinden de alt kültür yapılarak tekrar gradiyet test uygulanmıştır ve bazılarının MİK değerinin yükseldiği görülmüştür (Şekil 4.6).

Şekil 4.6: Kolistin heterodirenci saptanan ana suştan ve elips içinde üreme gösteren koloniden yapılan gradiyent test sonuçları



5.TARTIŞMA

Son yıllarda antibiyotik direnci konusu endişe verici bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi (CDC)'nin 2013 yılında yayınladığı raporda antibiyotik dirençli bakterilerin yılda 2 milyondan fazla insanı etkilediği ve bu durumun Amerika' da yılda en az 23.000 Avrupa Birliği'nde ise 25.000 kişinin

ölümüyle sonuçlandığı bildirilmektedir(147,148). İngiliz hükümetini 2016'da yayınladığı raporda ise 2050 yılında dünya çapında her yıl 10 milyon insanın antibiyotik direnci nedeniyle ölümünün gerçekleşeceği tahmin edilmektedir. Bu rakamın da kansere bağlı ölümlerden daha yüksek olduğu bildirilmektedir(149). CDC'nin hayatı tehdit edici mikroorganizmalar listesi içinde non fermenter gram negatif bakterilerden *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* yer almaktadır. Ancak *S. maltophilia*'nın görülme insidansının düşük olmasına rağmen özellikle hastanede yatan ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar için endişe verici bir durum halini almıştır.(150)

S. maltophilia enfeksiyonlarının tedavisinde ilk sırada tercih edilen antibiyotik trimetoprim-sülfametoksazoldur. Minosiklin, tikarsilin-klavulanat, kolistin ve aztreonam gibi diğer ilaçlar in vitro ortamda etkili olsa da bu ajanlarla ilgili yeterli klinik deneyim bulunmadığından ve *S. maltophilia*'nın direnç geliştirme özelliğinden dolayı bu ajanların potansiyel etkinliği de şüphelidir (1). Özellikle invaziv enfeksiyonlarda olmak üzere trimetoprim-sülfametoksazol direnci durumunda kombine ilaç tedavileri önem kazanmaktadır. Kombine ilaç tedavilerinin uygulanmasına ait veriler sınırlı olmasına rağmen *S. maltophilia*'da görülen gerek yüksek intrinsik direnç gerekse tedavi sırasında ortaya çıkan kazanılmış direnç bu durumu zorunlu kılmaktadır (6).

Günümüzde kolistin çok ilaca dirençli non-fermentatif ve *Enterobacterales* ailesinde yer alan bakterilerle meydana gelen enfeksiyonlarda tek başına kullanılmakla birlikte *S. maltophilia* ile gelişen enfeksiyonlarda genellikle kombinasyon tedavilerinde yer almaktadır (15). Gerek tek başına gerekse kombinasyon tedavilerinde kullanılabilmesi için bu izolatların kolistin duyarlılık sonuçlarının bilinmesi büyük önem taşımaktadır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda kolistin in vitro duyarlılıklarının saptanması amacıyla otomatize sistemler, gradient test, disk difüzyon, agar dilüsyon ve sıvı mikrodilüsyon olmak üzere farklı yöntemler kullanılmıştır (2,6) . Ancak günümüzde kolistin duyarlılığının saptanması amacıyla önerilen tek yöntem sıvı mikrodilüsyon yöntemidir çünkü diğer yöntemlerle yanlış duyarlı sonuçlar elde edilmektedir (87,142).

Yapılan çalışmalarda kolistin duyarlılığını saptamak amacıyla farklı yöntemler kullanılmış ve %7.4-%100 olmak üzere oldukça farklı oranlarda kolistin direnci saptanmıştır (82,93-95).

Bizim çalışmamızda kolistin duyarlılığının saptanmasında sıvı mikrodilüsyon ve gradiyent test kullanılmıştır. Altın standart olarak kabul edilen sıvı mikrodilüsyon yöntemi sonuçları dikkate alındığında 95 izolat duyarlı, 62 izolat dirençli bulunmuştur. Ancak 55 izolatta testin 2 kez tekrarlanması sonucunda uyumsuz sonuç elde edilmiştir. Dolayısıyla kolistin direnç oranımız saptanamamıştır.

Sıvı mikrodilüsyon ile gradiyent test sonuçları karşılaştırıldığında 134 *S. maltophilia* izolatında kategorik olarak uyumlu sonuç elde edilmiştir. Bu izolatların %29.1'i (39/134) dirençli, %70.9'u (95/134) duyarlı olarak saptanmıştır. Duyarlı izolatların MİK değeri aralığı <0.06-2 dirençli izolatların ise 4->256 olarak bulunmuştur.

Kolistinin in vitro duyarlılık sonuçlarının, uygulanan yönteme bağlı olarak değişkenlik göstermesi büyük bir sorun yaratmaktadır (15,102,151). Nicodomo ve arkadaşlarının çalışmasında (152) 70 *S. maltophilia* izolatında gradiyent test, disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemleriyle trimetoprim-sülfametoksazol, kloramfenikol, doksisiklin, gatifloksasin, tikarsilin-klavulanat, polimiksin B ve kolistin in vitro duyarlılığı çalışılmıştır. Polimiksin B ve kolistin dışında diğer ilaçlarda üç yöntem ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Polimiksin B ve kolistin için ise agar dilüsyon ile gradiyent test ve disk difüzyon yöntemi sonuçları arasında anlamlı fark olduğu saptanmıştır. Turlej ve ark.larının (102) ise 4 adet *Klebsiella pneumoniae*, 2 adet *Escherichia coli* ve 2 referans izolatını dahil ettikleri çalışmalarında kolistin duyarlılığını gradient test, sıvı mikrodilüsyon ve agar dilüsyon yöntemleriyle araştırmışlardır. Bu çalışmada tüm yöntemler üç kez tekrarlanmıştır. Sonuç olarak araştırmacılar sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle elde ettikleri sonuçların uyumsuz olduğunu agar dilüsyon ile elde ettikleri sonuçların ise uyumlu olduğunu saptamışlardır. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde sıvı mikrodilüsyon yönteminin tekrarlanması sonucunda %36.7 (78/212) oranında kategorik uyumsuz sonuç elde edilmiştir. Dolayısıyla günümüzde kolistin duyarlılığının saptanmasında altın standart yöntem olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi önerilmesine rağmen bizim çalışmamızda da görüldüğü gibi sıvı mikrodilüsyon

yöntemi aynı suşlarda tekrarlandığında oldukça farklı sonuçlar elde edilmektedir. Bazı izolatlarda kategorik değişim olurken bazılarında kategorik uyum olsa dahi birbirinden oldukça farklı MİK değerleri elde edilmiştir. Bu sebeplerden dolayı kolistin duyarlılığının doğru olarak saptanması için kullanılacak yöntemin belirlenmesi amacıyla çok sayıda izolatin dahil edildiği ve gradient test, sıvı mikrodilüsyon yöntemi, agar dilüsyon yöntemi ile PAP analizinin birarada değerlendirildiği çalışmalara büyük ihtiyaç bulunmaktadır.

Heterojen direnç kavramı, bir bakteri popülasyonunda bulunan alt grupların belirli bir antibiyotiğe karşı farklı duyarlılık sergilediği bir fenomeni tanımlamaktadır. Heterojen direncin belirlenmesinde kullanılacak standart bir yöntemin bulunmaması bu terimin uygunsuz kullanılmasına yol açmaktadır (109). Bu fenomeni belirlemede standart bir yöntemin olmaması, maliyetli ve zahmetli bir iş olması, bu fenomenin klinik öneminin belirlenmesini böylelikle de terapötik tedaviyi engellemektedir (106).

Heterodirenç konusunda farklı tanımlar mevcuttur. El-Halfawy ve arkadaşları (122) heterodirenç kavramını, PAP için kullanılan agar plaklarında üremenin inhibe olduğu en yüksek konsantrasyonun, üremenin olmadığı en yüksek konsantrasyondan 8 kat ve üzeri olması olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntem suşların antibiyotiğe karşı farklı davranışlarını karşılaştırma imkanı vermektedir. Çalışmamızda kolistin heterodirencinin araştırılmasında bu tanım esas alınmıştır.

Günümüzde *S. maltophilia* izolatlarının kolistin duyarlılığıyla ilgili sınırlı sayıda yayın olmasının yanısıra kolistin heterojen direncinin araştırıldığı sadece tek bir makale bulunmaktadır (47). Sònia Martínez-Servat ve arkadaşlarının bu çalışmasında sadece 4 kolistin dirençli *S. maltophilia* referans izolatında kolistin heterodirenci araştırılmıştır. Bizim çalışmamızda ise 212 adet *S. maltophilia* izolatında heterojen direnç araştırılmıştır. Çalışmamız bu yönüyle ve konuyla ilgili ikinci çalışma olduğu için literatüre önemli bir katkıda bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda PAP yöntemiyle 212 *S. maltophilia* izolatu içerisinde 54 (54/212; %25.5) kolistin heterodirençli izolat saptanmıştır. Çocuk ve erişkin hastalar ayrı olarak değerlendirildiğinde heterodirenç saptanma oranları sırasıyla % 22.9 (8/35) ve % 26 (46/177) olmak üzere birbirine benzer olarak belirlenmiştir.

Heterodirenç saptanan 54 izolat yedi gün pasajlandıktan sonra tekrar sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değerlerine bakıldığında 14 (14/54; %25.9) izolat kolistin duyarlı hale dönerken, 40 (40/54; %74.1) izolat dirençli kalmaya devam etmiştir. Bu durum, farklı antibiyotiklerde heterodirencin araştırıldığı diğer çalışmalarda da benzer olarak saptanmıştır (153-155). Örneğin Mei ve ark.larının (155) *P.aeruginosa* izolatlarında imipenem heterodirenci araştırdıkları çalışmalarında heterodirenç saptadıkları izolatları antibiyotiksiz ortamda 5 gün pasajlamışlardır. Bu çalışmada pasaj sonrası heterodirenç saptanan bazı izolatların dirençli olmaya devam ettiği bazı izolatların ise duyarlı hale dönüştüğü bulunmuştur. Araştırmacılar dirençli olmaya devam eden izolatları gerçek heterodirençli olarak kabul etmişlerdir. Bizim çalışmamızda bu kriter kullanılacak olursa 40 izolat (40/212; %18.9) gerçek heterodirençli olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda kolistin heterodirenç oranının yüksek olarak saptanmış olması, birçok antibiyotiğe karşı intrinsik ve kazanılmış dirence sahip olan *S. maltophilia* izolatlarında antibiyotik kombinasyon tedavilerinin etkinliklerinin araştırılmasını zorunlu kılmaktadır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, *S. maltophilia*'nın bu antibiyotiğe heterodirenç gösterme oranının yüksek olması nedeniyle, kolistin tek başına tedavide kullanılmaması gerektiğini göstermektedir.

Çok ilaca dirençli gram-negatif non-fermentatif bakterilerde kolistin kombinasyon tedavilerinde kullanılmasının hem toksisiteyi önlemede hem de tedavinin etkinliğini arttırmadaki başarısı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (156,157). Chung ve Ko'nun yaptıkları bir çalışmada (158) *A.baumannii* izolatlarında farklı antibiyotik kombinasyonlarının (kolistin+amikasin, kolistin+imipenem ve kolistin+siprofloksasin, amikasin + imipenem, amikasin +siprofloksasin, siprofloksasin + imipenem), sinerjistik etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak bu kombinasyonlar arasında en etkili kolistin ve amikasin kombinasyonu bulunmuştur. Ayrıca *A. baumannii* izolatlarında bu antibiyotikler tek başlarına uygulandıklarında canlılığı devam eden bakterilerin oranının en yüksek tek başına kolistin kullanıldığı durumda gerçekleştiğini göstermişlerdir. *S. maltophilia* izolatlarında ise farklı antibiyotiklerle kombinasyon çalışmaları az sayıda bulunmaktadır ve elde edilen sonuçlar birbirinden farklılık göstermektedir. Yapılan bu çalışmalarda *S.maltophilia* izolatlarına karşı tikarsilin-

klavulanat+aztreonam, tikarsilin-klavulanat+kolistin, tigesiklin+kolistin, rifampin+kolistin trimetoprim-sulfametoksazol +kolistin, trimetoprim-sulfametoksazol+seftazidim, trimetoprim-sulfametoksazol +kinolon, kombinasyonları sinerjik etkili olarak saptanmıştır (3,79,80,152,159-161). *S. maltophilia* enfeksiyonlarında kombinasyon tedavilerinin denendiği olgular da bulunmaktadır. Örneğin *S. maltophilia*'nın etken olduğu ventilatör ilişkili bir pnömoni olgusunda hastanın trimetoprim-sulfametoksazol tedavisine cevap vermemesi üzerine doksisiklin ve kolistin kombine tedavisi uygulanmış, bu kombine tedavi sonucunda klinik yanıt alınarak hasta tedavi edilmiştir (162). Kolistin ile diğer antibiyotiklerin kombine halde kullanılmasının etkin olup olmadığının anlaşılabilmesi için kolistin duyarlı, kolistin heterodirençli ve kolistin dirençli olmak üzere 3 farklı grupta in vitro duyarlılık çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

Kolistine karşı görülen heterojen direncin gerçek klinik etkisini ve kolistin duyarlı izolatlarda yer alan dirençli altpopüsyonların ilaç etkisi altındayken tam dirençli hale dönüşme olasılığını belirlemek amacıyla daha çok sayıda izolatların dahil edildiği in vitro ve in vivo çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

- 1-Tille PM. *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, and similar organisms. In: Bailey & Scott's diagnostic microbiology (13th ed) Elsevier, Missouri 2014, pp. 329-34.
- 2- Winn WC, Allen SD, Janda WM, et al. The nonfermentative Gram-negative bacilli. In: Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology (6th ed) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2006, pp. 303-91
- 3-Looney WJ, Narita M, Mühlemann K. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. Lancet Infect Dis 2009;9(5):312-23
- 4-Gales AC, Jones RN, Forward KR et al. Emerging importance of multidrugresistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–1999). Clin Infect Dis. 2001;32:104-13

- 5- Rutter, W. C., Burgess, D. R., and Burgess, D. S. (2017). Increasing incidence of multidrug resistance among cystic fibrosis respiratory bacterial isolates. *Microb. Drug Resist.* 23, 51–55. doi: 10.1089/mdr.2016.0048.
- 6- LiPuma J, Currie B, Peacock S, Vandamme P. *Burkholderia, Stenotrophomonas, Ralstonia, Cupriavidus, Pandoraea, Brevundimonas, Comamonas, Delftia, and Acidovorax*. In: Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D (eds), *Manual of clinical microbiology* (10th ed) ASM Press, Washington, DC 2011, pp. 692-713.
- 7- Brooke JS. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2012;25(1):2-41.
- 8- Friedman ND, Korman TM, Franklin CK, Spelman DW Bacteraemia due to *Stenotrophomonas maltophilia*: An Analysis of 45 Episodes. *J Infect.* 2002;45(1):47-53
- 9- Micozzi A, Venditti M, Monaco M et al Bacteremia due to *Stenotrophomonas maltophilia* in patients with hematological malignancies. *Clin Infect Dis.* 2000;31(3):705-11
- 10- Vartivarian S, Anaissie E, Bodey G, Sprigg H, Rolston K. A changing pattern of susceptibility of *Xanthomonas maltophilia* to antimicrobial agents: implications for therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(3): 624-27.
- 11-Marzouq A, Jasser A *Stenotrophomonas maltophilia* resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole: an increasing problem. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*2006;5:23.
- 12-Toleman MA, Bennett PM, Bennett DM, Jones RN, Walsh TR. Global Emergence of Trimethoprim/Sulfamethoxazole Resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* Mediated by Acquisition of *sul* Genes. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(4):559-65.
- 13-Zhao J, Xing Y, Liu W et al. Surveillance of Dihydropteroate Synthase Genes in *Stenotrophomonas maltophilia* by LAMP: Implications for Infection Control and Initial Therapy. *Front Microbiol* 2016;7:1723.
- 14-Cha MK, Kang CI, Kim SH et al. Emergence of fluoroquinolone-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* in blood isolates causing bacteremia: molecular epidemiology and microbiologic characteristics. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016;85(2):2010-2.

- 15- Chang YT, Lin CY, Chen YH, Hsueh PR. Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. *Front Microbiol* 2015;6:893.
- 16- Çaylan R. *Stenotrophomonas maltophilia* infeksiyonları. In: 6. Antimikrobik Kemoterapi Günleri (8-10 Nisan 2004), İstanbul, Turk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 2004:132.
- 17- Zer Y, Karaoğlan İ, Çevik S, Erdem M. *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının irdelenmesi. *Klinik Derg.* 2009;22(1):21-4.
- 18- Güzelant A, Kaya M, Güvenç Hİ, ve ark. Çeşitli klinik örneklerden beş yılda izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının dağılımı ve antimikrobiyal duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2014;44(2):75-9. <http://doi.org/10.5222/TMCD.2014.075>
- 19- Tanrıverdi Çaycı Y, Karadağ A, Yılmaz H, Yanık K, Günaydın M. *Stenotrophomonas maltophilia* klinik suşlarında antimikrobiyal direnç. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2013;43(1):22-5. <http://doi.org/10.5222/TMCD.2013.022>
- 20- Türk Dağı H, Arslan U, Tuncer İ. Kan kültürlerinden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının antibiyotik direnci. *ANKEM Derg.* 2011;25(1):27-30. <http://doi.org/10.5222/ankem.2011.27>
- 21- Özkaya E, Aydın F, Bayramoğlu G, Buruk CK, Sandallı C. Klinik örneklerden izole edilen trimetoprim-sülfametoksazole dirençli *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarında integron, sul1-2 ve dfr genlerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2014;48(2):201-12. <http://doi.org/10.5578/mb.7262>
- 22- JonesRN, Sader HS, Beach ML. Contemporary in vitro spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18569 strains non-fermentative Gram 140 Türk Mikrobiyol Cem Derg 2018;48(2):134-140 negative bacilli isolated in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Int J Antimicrob Agents.* 2003;22(6):551-6. [http://doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00245-0](http://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00245-0)
- 23- Flores-Treviño S, Gutiérrez-Ferman JL, Morfín-Otero R, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* in Mexico: antimicrobial resistance, biofilm formation and clonal diversity. *J Med Microbiol.* 2014;63(Pt 11):1524-30. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.074385-0>
- 24- Hu LF, Chen GS, Kong QX, et al. Increase in the prevalence of resistance determinants to trimethoprim/ sulfamethoxazole in clinical *Stenotrophomonas*

maltophilia isolates in China. PLoS One. 2016;11(6):e0157693. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0157693>

25- Song JH, Sung JY, Kwon KC, et al. Analysis of acquired resistance genes in *Stenotrophomonas maltophilia*. Korean J Lab Med. 2010;30(3):295-300. <http://doi.org/10.3343/kjlm.2010.30.3.295>

26- Çıkman A, Parlak M, Bayram Y, Güdücüoğlu H, Berktaş M. Antibiotics resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from various clinical specimens. Afr Health Sci. 2016;16(1):149-52. <http://doi.org/10.4314/ahs.v16i1.20>

27- Şen P, Yula E, Er H, Güngör S, Özdemir R, ve ark. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarında antibiyotiklere direnç oranı. Ortadoğu Tıp Derg. 2017;9(3):113-7. <http://doi.org/10.21601/ortadogutipdergisi.265431>

28- Kandemir İ, Özcan N, Alanbayı Ü, Bozdağ H, Akpolat N, Gül K. Klinik örneklerden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının dağılımı ve antimikrobiyal duyarlılıkları. Dicle Tıp Derg. 2016;43(2):237-40. <http://doi.org/10.5798/diclemedj.0921.2016.02.0673>

29- Farrell DJ, Sader HS, Jones RN. Antimicrobial susceptibilities of a worldwide collection of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates tested against tigecycline and agents commonly used for *S. maltophilia* infections. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Jun;54(6):2735-7. <http://doi.org/10.1128/AAC.01774-09>

30- Hugh R, Ryschenkow E. *Pseudomonas maltophilia*, an alcaligenes-like species. J Gen Microbiol 1961;26:123-32

31- Hugh R, Leifson E. A description of the type strain of *Pseudomonas maltophilia*. Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon 1963;13(3):133-8.

32- Swings J, de Vos P, van den Mooter M, de Ley J. Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov. Int J Syst Bacteriol 1983;33(2):409-13

33- Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. Clin Microbiol Rev 1998;11(1):57-80.

34- Coenye T, Vanlaere E, Falsen E, Vandamme P. *Stenotrophomonas africana* Drancourt et al. 1997 is a later synonym of *Stenotrophomonas maltophilia* (Hugh 1981) Palleroni and Bradbury 1993. Int J Syst Evol Microbiol 2004;54(Pt. 4):1235-7.

- 35- Lee M, Woo SG, Chae M, Shin MC, Jung HM, Ten LN. *Stenotrophomonas daejeonensis* sp. nov. , isolated from sewage. Int J Syst Evol Microbiol 2011;61(Pt. 3):598-604
- 36-Reese Cosimi, Pharm.D., BCPS PGY2 Infectious Diseases Pharmacy Resident South Texas Veterans Health Care System The University of Texas at Austin College of Pharmacy The University of Texas Health Science Center at San Antonio December 9, 2016 Nontraditional Therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* Infections: Ending the Sulfuring
- 37- Nord CE, Sjoberg L, Wadstrom T, Wretlind B. Characterization of three *Aeromonas* and nine *Pseudomonas* species by extracellular enzymes and haemolysins. Med Microbiol Immunol 1975;161:79–87
- 38- Nyc O, Matejkova J. *Stenotrophomonas maltophilia*: Significant contemporary hospital pathogen- review. Folia Microbiol (Praha) 2010;55(3):286-94.
- 39- Mukherjee P , Roy P. Genomic Potential of *Stenotrophomonas maltophilia* in Bioremediation with an Assessment of Its Multifaceted Role in Our Environment. Front Microbiol. 2016;7:967.
- 40- Karaba SM, White RC, Cianciotto NP. *Stenotrophomonas maltophilia* encodes a type II protein secretion system that promotes detrimental effects on lung epithelial cells. Infect Immun 2013;81(9):3210-9.
- 41- DuMont AL, Karaba SM, Cianciotto NP. Type II secretion-dependent degradative and cytotoxic activities mediated by *Stenotrophomonas maltophilia* serine proteases StmPr1 and StmPr2. Infect Immun 2015;83(10):3825-37
- 42- Angelina Trifonovaa and Tanya Stratevab. *Stenotrophomonas maltophilia* – a low-grade pathogen with numerous virulence factors. <https://doi.org/10.1080/23744235.2018.1531145>
- 43- Adamek M, Linke B, Schwartz T. Virulence genes in clinical and environmental *Stenotrophomas maltophilia* isolates: a genome sequencing and gene expression approach. Microb Pathog 2014;67-68:20-30
- 44- de Oliveira-Garcia D, Dall'Agnol M, Rosales M, Azzuz AC, Martinez MB, Girón JA. Characterization of flagella produced by clinical strains of *Stenotrophomonas maltophilia*. Emerg Infect Dis 2002;8(9):918-23.

- 45- Huang TP, Somers EB, Wong AC. Differential biofilm formation and motility associated with lipopolysaccharide/exopolysaccharide-coupled biosynthetic genes in *Stenotrophomonas maltophilia*. J Bacteriol 2006;188(8):3116-20.
- 46-Sánchez MB. Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. Front Microbiol 2015;6:658.
- 47-Sònia Martínez-Servat, Daniel Yero, Pol Huedo, Roser Marquez, Gara Molina, Xavier Daura, and Isidre Gibert. Heterogeneous Colistin-Resistance Phenotypes Coexisting in *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates Influence Colistin Susceptibility Testing. Front Microbiol 2018 Nov 22. doi: [10.3389/fmicb.2018.02871](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02871)
- 48- de Oliveira-Garcia D, Dall'Agnol M, Rosales M, et al. Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. Cell Microbiol 2003;5(9):625-36.
- 49- Pompilio A, Crocetta V, Confalone P, et al. Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients. BMC Microbiol 2010;10:102
- 50- Zgair AK, Chhibber S. Adhesion of *Stenotrophomonas maltophilia* to mouse tracheal mucus is mediated through flagella. J Med Microbiol 2011;60(Pt. 7):1032-7
- 51- Di Bonaventura G, Spedicato I, D'Antonio D, Robuffo I, Piccolomini R. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ceftazidime. Antimicrob Agents Chemother 2004;48(1):151-60
- 52- Crossman LC, Gould VC, Dow JM, et al. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. Genome Biol 2008;9(4):R74.
- 53- Bassler BL. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. Curr Opin Microbiol 1999;2(6):582-7
- 54- Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. Annu Rev Microbiol 2001;55:165-99
- 55- Alavi P, Starcher MR, Thallinger GG, Zachow C, Müller H, Berg G. *Stenotrophomonas* comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria. BMC Genomics 2014;15:482.

- 56- Fouhy Y, Scanlon K, Schouest K, et al. Diffusible signal factor-dependent cell-cell signaling and virulence in the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Bacteriol* 2007;189(13):4964-8.
- 57- Huedo P, Yero D, Martínez-Servat S, et al. Two different *rpf* clusters distributed among a population of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains display differential diffusible signal factor production and virulence regulation. *J Bacteriol* 2014;196(13):2431-42.
- 58- Waters VJ, Gómez MI, Soong G, Amin S, Ernst RK, Prince A. Immunostimulatory properties of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Infect Immun* 2007;75(4):1698-703.
- 59- McKay GA, Woods DE, MacDonald KL, Poole K. Role of phosphoglucomutase of *Stenotrophomonas maltophilia* in lipopolysaccharide biosynthesis, virulence, and antibiotic resistance. *Infect Immun* 2003;71(6):3068-75.
- 60- Thomas R, Hamat RA, Neela V. Extracellular enzyme profiling of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *Virulence* 2014;5(2):326-30.
- 61- Liaw SJ, Lee YL, Hsueh PR. Multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*: roles of integrons, efflux pumps, phosphoglucomutase (SpgM), and melanin and biofilm formation. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35(2):126-30.
- 62- Chhibber S, Gupta A, Sharan R, Gautam V, Ray P. Putative virulence characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia*: a study on clinical isolates. *World J Microbiol Biotechnol* 2008;24:2819-25.
- 63- García CA, Passerini De Rossi B, Alcaraz E, Vay C, Franco M. Siderophores of *Stenotrophomonas maltophilia*: detection and determination of their chemical nature. *Rev Argent Microbiol* 2012;44(3):150-4.
- 64- Liu YM, Chen YS, Toh HS, et al. In vitro susceptibilities of non-Enterobacteriaceae isolates from patients with intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region from 2003 to 2010: results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Int J Antimicrob Agents*. 2012;40(Suppl):S11-7. [http://doi.org/10.1016/S0924-8579\(12\)70004-3](http://doi.org/10.1016/S0924-8579(12)70004-3)
- 65- Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY

- Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;73(4):354-60. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.007>
- 66- Kuo SH, Lin WR, Lin JY, et al. The epidemiology, antibiograms and predictors of mortality among critically-ill patients with central line-associated bloodstream infections. *J Microbiol Immunol Infect*. 2017; pii: S1684-1182(17)30199-8.
- 67- Saçar S, Kavas ST, Asan A, Cevahir N, Serin S, Turgut H. Pamukkale Üniversitesi Hastanesinde hastane infeksiyonları sürveyansı: üç yıllık analiz. *Infeks Derg*. 2008;22(1):15-21
- 68- Dizbay M, Tunçcan ÖG, Maral I, Aktaş F, Şenol E. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde beş yıllık nozokomiyal *Stenotrophomonas maltophilia* enfeksiyonu sürveyansı. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 2009;29(6):1406-11.
- 69- Falagas ME, Valkimadi PE, Huang YT, Matthaiou DK, Hsueh PR. Therapeutic options for *Stenotrophomonas maltophilia* infections beyond co-trimoxazole: a systematic review. *J Antimicrob Chemother* 2008;62(5):889-94.
- 70- Brooke JS. New strategies against *Stenotrophomonas maltophilia*: a serious worldwide intrinsically drug-resistant opportunistic pathogen. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014;12(1):1-4.
- 71- Green H, Jones AM. The microbiome and emerging pathogens in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Semin Respir Crit Care Med* 2015;36(2):225-35.
- 72- Senol E. *Stenotrophomonas maltophilia*: the significance and role as a nosocomial pathogen. *J Hosp Infect* 2004;57(1):1-7.
- 73- Falagas ME, Kastoris AC, Vouloumanou EK, Dimopoulos G. Community-acquired *Stenotrophomonas maltophilia* infections: a systematic review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28(7):719-30.
- 74- Al-Anazi KA, Al-Jasser AM. Infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in recipients of hematopoietic stem cell transplantation. *Front Oncol* 2014;4:232.
- 75- Denton M, Hall MJ, Todd NJ, Kerr KG, Littlewood JM. Improved isolation of *Stenotrophomonas maltophilia* from the sputa of patients with cystic fibrosis using a selective medium. *Clin Microbiol Infect* 2000;6(7):397-8

- 76- Moore JE, Xu J, Millar BC, Courtney J, Elborn JS. Development of a Gram-negative selective agar (GNSA) for the detection of Gram-negative microflora in sputa in patients with cystic fibrosis. *J Appl Microbiol* 2003;95(1):160-6.
- 77- Adjidé CC, De Meyer A, Weyer M, et al. A sensitive, specific and predictive isolation medium developed for *Stenotrophomonas maltophilia* study in healthcare settings. *Pathol Biol (Paris)* 2010;58(1):11-7.
- 78- Hall GS. Nonfermenting and miscellaneous Gram-negative bacilli. In: Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G (eds), *Textbook of diagnostic microbiology* (5th ed) Elsevier, Missouri 2015, pp. 474-94.
- 79- Abbott IJ, Peleg AY. *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, and nonmelioid *Burkholderia* species: antimicrobial resistance and therapeutic strategies. *Semin Respir Crit Care Med* 2015;36(1):99-11
- 80- Milne KE, Gould IM. Combination antimicrobial susceptibility testing of multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(8):4071–4077
- 81- Abbott IJ, Slavin MA, Turnidge JD, Thursky KA, Worth LJ. *Stenotrophomonas maltophilia*: emerging disease patterns and challenges for treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011;9(4):471–488
- 82- Jacquier H, LeMonnier A, Carbonnelle E, et al;Gmc Study Group. In vitro antimicrobial activity of “last-resort” antibiotics against unusual nonfermenting Gram-negative bacilli clinical isolates. *Microb Drug Resist* 2012;18(4):396–401
- 83- Valenza G, Tappe D, Turnwald D, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2008;7(2):123–127
- 84- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Antimicrobial chemotherapy. In: Jawetz, Melnick & Adelberg’s *medical microbiology* (26th ed), McGraw-Hill Medical, New York 2013, pp. 371-405
- 85- Tille PM. Principles of antimicrobial action and resistance. In: *Bailey & Scott’s diagnostic microbiology* (13th ed) Elsevier, Missouri 2014, pp. 153-67.
- 86- Pages D, Rose J, Conrod S, Cuine S, Carrier P, Heulin T, et al. Heavy metal tolerance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PloS one*, 2008;3(2):e1539.

- 87- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2019. <http://www.eucast.org>
- 88- Durupınar B, Darka Ö. *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Burkholderia* türleri. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (editörler), Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi kitabında (3. baskı) Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2008, ss. 2187-95.
- 89- Chang LL, Lin HH, Chang CY, Lu PL. Increased incidence of class 1 integrons in trimethoprim/sulfamethoxazole-resistant clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother , 2007;59(5):1038-9.
- 90- Leclercq R, Cantón R, Brown DF, et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Infect 2013;19(2):141-60.
- 91- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Antibacterial agents. In: Medical Microbiology (7th ed) Elsevier, Philadelphia 2013, pp. 165-73
- 92- Moskowitz SM, Gibson RL, Effmann EL. Cystic fibrosis lung disease: genetic influences, microbial interactions, and radiological assessment. Pediatr Radiol 2005; 35: 739–57
- 93- D. Averbuch¹ · C. Avaky¹ · M. Harit² · P. Stepensky² · I. Fried² · T. Ben-Ami² · V. Temper³ · Y. Peled² · H. Troen² · R. Masarwa⁴ · W. Abu Ahmad⁵ · M. Weintraub² · S. Revel-Vilk² · D. Engelhard¹. Non fermentative Gram-negative rods bacteremia in children with cancer: a 14-year single-center experience. Infection (2017) 45:327–334 DOI 10.1007/s15010-017-0988-1
- 94- Moskowitz SM, Silva SJ, Mayer-Hamblett N et al. Shifting patterns of inhaled antibiotic use in cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 2008; 43: 874–81.
- 95- Frederiksen B, Koch C, Hoiby N. Antibiotic treatment of initial colonization with *Pseudomonas aeruginosa* postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 1997; 23: 330–5.
- 96- S. Biswas & J.-C. Dubus & M. Reynaud-Gaubert & N. Stremler & J.-M. Rolain. Evaluation of colistin susceptibility in multidrug-resistant clinical isolates from cystic fibrosis, France. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2013) 32:1461–1464 DOI 10.1007/s10096-013-1898-5
- 97- Carlos Hernan Rodríguez , Marcela Nastro , Jimena Lopez Calvo , Maria Elisa Farinã , Laura Dabos , Angela Famiglietti . In vitro activity of colistin against

Stenotrophomonas maltophilia. Journal of Global Antimicrobial Resistance 2 (2014) 316–317. DOI: 10.1016/j.jgar.2014.04.004

98- Hindler JA, Humphries RM (2013) Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant gram-negative bacilli. J Clin Microbiol 51(6):1678–1684. <https://doi.org/10.1128/JCM.03385-12>

99- Sader HS, Rhomberg PR, Flamm RK, Jones RN (2012) Use of a surfactant (polysorbate 80) to improve MIC susceptibility testing results for polymyxin B and colistin. Diagn Microbiol Infect Dis 74(4):412–414. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.08.025>

100- Lo-Ten-Foe JR, de Smet AM, Diederer BM, Kluytmans JA, van Keulen PH (2007) Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter Cloacae* and *Acinetobacter Baumannii* strains. Antimicrob Agents Chemother 51(10):3726–3730. <https://doi.org/10.1128/AAC.01406-06>

101- Landman D, Salamera J, Quale J (2013) Irreproducible and uninterpretable Polymyxin B MICs for *Enterobacter Cloacae* and *Enterobacter Aerogenes*. J Clin Microbiol 51(12):4106–4111. <https://doi.org/10.1128/JCM.02129-13>

102- Agata Turlej-Rogacka, Basil Britto Xavier, Lore Janssens, Christine Lammens, Olympia Zarkotou, Spyros Pournaras, Herman Goossens, Surbhi Malhotra-Kumar. Evaluation of colistin stability in agar and comparison of four methods for MIC testing of colistin. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (2018) 37:345–353 <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3140-3>

103- Samuel M. Moskowitz, Elizabeth Garber, Yunhua Chen, Sarah A. Clock, Setareh Tabibi, Amanda K. Miller, Michael Doctor and Lisa Saiman. Colistin susceptibility testing: evaluation of reliability for cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 1416–1423 doi:10.1093/jac/dkq131 Advance Access publication 29 April 2010

104- Victor I. Band1,2, David S. WeissID Band VI, Weiss DS (2019) Heteroresistance: A cause of unexplained antibiotic treatment failure? PLoS Pathog 15(6): e1007726. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007726>

- 105- Sutherland R, Rolinson GN. 1964. Characteristics of methicillin-resistant staphylococci. *J Bacteriol* 87:887–899
- 106- de Lencastre H, Figueiredo AM, Tomasz A. 1993. Genetic control of population structure in heterogeneous strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12(Suppl 1):S13–S18. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02389872>
- 107- Pournaras S, Kristo I, Vrioni G, Ikonomidis A, Poulou A, Petropoulou D, Tsakris A. 2010. Characteristics of meropenem heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing clinical isolates of *K. pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 48:2601–2604. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02134-09>.
- 108- Alexander HE, Leidy G. 1947. Mode of action of streptomycin on type b *Haemophilus influenzae*. II. Nature of resistant variants. *J Exp Med* 85:607–621.
- 109- El-Halfawy OM, Valvano MA. 2015. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. *Clin Microbiol Rev* 28:191–207. doi:10.1128/CMR.00058-14.
- 110- Kayser FH, Benner EJ, Hoepfich PD. 1970. Acquired and native resistance of *Staphylococcus aureus* to cephalosporins and other beta-lactam antibiotics. *Appl Microbiol* 20:1–5.
- 111- Markova N, Haydoushka I, Michailova L, Ivanova R, Valcheva V, Jourdanova M, Popova T, Radoucheva T. 2008. Cell wall deficiency and its effect on methicillin heteroresistance in *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 31:255–260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.09.015>.
- 112- Ryffel C, Strassle A, Kayser FH, Berger-Bachi B. 1994. Mechanisms of heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 38:724–728. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.38.4.724>.
- 113- Falagas ME, Makris GC, Dimopoulos G, Matthaiou DK. 2008. Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? *Clin Microbiol Infect* 14:101–104. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01912.x>.
- 114- Kondo N, Kuwahara-Arai K, Kuroda-Murakami H, Tateda-Suzuki E, Hiramatsu K. 2001. Eagle-type methicillin resistance: new phenotype of high methicillin resistance under *mec* regulator gene control. *Antimicrob Agents Chemother* 45:815–824. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.3.815-824.2001>.

- 115- Eagle H, Musselman AD. 1948. The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. *J Exp Med* 88:99–131. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.88.1.99>.
- 116- Morand B, Muhlemann K. 2007. Heteroresistance to penicillin in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14098–14103. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0702377104>.
- 117- Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, Liolios L. 2006. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2946–2950. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00103-06>.
- 118- Hartman BJ, Tomasz A. 1986. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 29:85–92. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.29.1.85>.
- 119- O'Brien FG, Botterill CI, Endersby TG, Lim RL, Grubb WB, Gustafson JE. 1998. Heterogeneous expression of fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus* with plasmid or chromosomally encoded fusidic acid resistance genes. *Pathology* 30:299–303. <http://dx.doi.org/10.1080/00313029800169486>.
- 120- Hermes DM, Pormann Pitt C, Lutz L, Teixeira AB, Ribeiro VB, Netto B, Martins AF, Zavascki AP, Barth AL. 2013. Evaluation of heteroresistance to polymyxin B among carbapenem-susceptible and –resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 62:1184–1189. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.059220-0>
- 121- Nakipoglu Y, Derbentli S, Cagatay AA, Katranci H. 2005. Investigation of *Staphylococcus* strains with heterogeneous resistance to glycopeptides in a Turkish university hospital. *BMC Infect Dis* 5:31. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-5-31>.
- 122- El-Halfawy OM, Valvano MA. 2013. Chemical communication of antibiotic resistance by a highly resistant subpopulation of bacterial cells. *PLoS One* 8:e68874. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0068874>
- 123- van Hal, S. J. et al. Performance of various testing methodologies for detection of heteroresistant vancomycin- intermediate *Staphylococcus aureus* in bloodstream isolates. *J. Clin. Microbiol.* 49,1489–1494 (2011).

- 124- Nicoloff, H., Hjort, K., Levin, B. R. & Andersson, D. I. The high prevalence of antibiotic heteroresistance in pathogenic bacteria is mainly caused by gene amplification. *Nat. Microbiol.* 4, 504–514 (2019). A comprehensive analysis of heteroresistance in four Gram- negative species that demonstrates that more than one quarter of all species–antibiotic combinations show heteroresistance and that it is mainly caused by gene amplification.
- 125- Pfeltz, R. F., Schmidt, J. L. & Wilkinson, B. J. A microdilution plating method for population analysis of antibiotic- resistant Staphylococci. *Microb. Drug Resist.* 7, 289–295 (2001).
- 126- Wootton, M. et al. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero- resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 47, 399–403 (2001).
- 127- Devi, Y. , P. M. , P. , Thomas, S. & Veeraraghavan, B. Challenges in the laboratory diagnosis and clinical management of heteroresistant vancomycin Staphylococcus aureus (hVISA). *Clin. Microbiol.* 4, 214 (2015).
- 128- Satola, S. W., Farley, M. M., Anderson, K. F. & Patel, J. B. Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin- intermediate *Staphylococcus aureus*, with the population analysis profile method as the reference method. *J. Clin. Microbiol.* 49, 177–183 (2011).
- 129- Silveira, A., Cunha, D., Caierão, G. R., Cordova, D. & Azevedo, C. Evaluation of the accuracy of phenotypic methods for the detection of heteroresistant vancomycin- intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA). *JSM Microbiol.* 4, 1031 (2016).
- 130- Gordon, N. C. & Wareham, D. W. Failure of the MicroScan WalkAway system to detect heteroresistance to carbapenems in a patient with *Enterobacter aerogenes* bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3024–3025 (2009).
- 131- Zhang, Z., Wang, Y., Pang, Y. & Liu, C. Comparison of different drug susceptibility test methods to detect rifampin heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5632–5635 (2014).
- 132- Rinder, H., Mieskes, K. T. & Löscher, T. Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 5, 339–345 (2001).
- 133- Zhang, Z., Lu, J., Wang, Y., Pang, Y. & Zhao, Y. Automated liquid culture system misses isoniazid heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates

with mutations in the promoter region of the *inhA* gene. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 555–560 (2015).

134- Nikolayevskyy, V. et al. Performance of the Genotype® MTBDRPlus assay in the diagnosis of tuberculosis and drug resistance in Samara, Russian Federation. *BMC Clin. Pathol.* 9, 2 (2009).

135- Chakravorty, S. et al. The New Xpert MTB/RIF Ultra: improving detection of *Mycobacterium tuberculosis* and resistance to rifampin in an assay suitable for point-of-care testing. *mBio* 8, e00812-17 (2017).

136- Driesen, M. et al. Evaluation of a novel line probe assay to detect resistance to pyrazinamide, a key drug used for tuberculosis treatment. *Clin. Microbiol. Infect.* 24, 60–64 (2018).

137- Hofmann- Thiel, S. et al. Mechanisms of heteroresistance to isoniazid and rifampin of *Mycobacterium tuberculosis* in Tashkent, Uzbekistan. *Eur. Respir. J.* 33, 368–374 (2008).

138- Cambau, E. et al. Evaluation of a new test, GenoType HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3600–3607 (2009).

139- Brennan, D. E. et al. Molecular detection of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in stool versus biopsy samples. *World J. Gastroenterol.* 22, 9214–9221 (2016).

140- Zetola, N. M. et al. Mixed *Mycobacterium tuberculosis* complex infections and false-negative results for rifampin resistance by GeneXpert MTB/RIF are associated with poor clinical outcomes. *J. Clin. Microbiol.* 52, 2422–2429 (2014).

141- Carrer A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive-carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(8): 2950–4.

142- The Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). Version 2019. <https://clsi.org>

143- Tato M, Morosini M, García L, Alberti S, Coque MT, Canton R. Carbapenem heteroresistance in VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates belonging to the same clone: consequences for routine susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 2010; 48(11): 4089-93.

144-Adams-Sapper S, Nolen S, Donzelli GF, Lal M, Chen K, Justo da Silva LH, Moreira BM, Riley LW. Rapid induction of high-level carbapenem resistance in heteroresistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. Send to Antimicrob Agents Chemother 2015; 59(6): 3281-9.

145-Sun JD, Huang SF, Yang SS, Pu SL, Zhang CM, Zhang LP. Impact of carbapenem heteroresistance among clinical isolates of invasive *Escherichia coli* in Chongqing, southwestern China. Clin Microbiol Infect 2015; 21(5): 469.

146-López-Camacho E, Paño-Pardo JR, Sotillo A, Elías-López C, Martínez-Martínez L, Gómez-Gil R, Mingorance J. Meropenem heteroresistance in clinical isolates of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*. Diagn Microbiol Infect Dis 2018; 20.

147- U.S. Department of Health and Human Services, CDC [Internet]. Antibiotic Resistance Threats in the United States. Atlanta (GA): CDC; 2013 [cited 2017 Dec 26]. Available from: <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>

148- The European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. Eur Food Saf Authority J. 2016;14(2):4380.

149--The Review on Antimicrobial Resistance [Internet]. Tackling Drug- Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. London (UK): O'neill J.; 2016 [cited 2017 Dec 26]. Available from: <https://amr-review.org>

150-Nadim G. El Chakhtoura, Elie Saade, Alina Iovleva, Mohamad Yasmin, Brigid Wilson, Federico Perez & Robert A. Bonomo (2018) Therapies for multidrug resistant and extensively drug-resistant non-fermenting gram-negative bacteria causing nosocomial infections: a perilous journey toward 'molecularly targeted' therapy, Expert Review of Anti-infective Therapy, 16:2, 89-110, DOI: 10.1080/14787210.2018.1425139

151-Personne Y, Curtis MA, Wareham DW, et al. Activity of the type I signal peptidase inhibitor MD3 against multidrug-resistant Gramnegative bacteria alone and in combination with colistin. J Antimicrob Chemother. 2014;69(12):3236–3243

152- A. C. Nicodemo¹, M. R. E. Araujo , A. S. Ruiz and A. C. Gales. In vitro susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates: comparison of disc diffusion,

Etest and agar dilution methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2004) 53, 604–608 DOI: 10.1093/jac/dkh128

153-Band, V. I., Crispell, E. K., Napier, B. A., Herrera, C. M., Tharp, G. K., Vavikolanu, K., et al. (2016). Antibiotic failure mediated by a resistant subpopulation in *Enterobacter cloacae*. *Nat. Microbiol.* 1:16053. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.53

154-Ji-Young Lee, Myung-Jin Choi, Hyeon Jin Choi, and Kwan Soo Ko. Preservation of Acquired Colistin Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Jan; 60(1): 609–612. doi: 10.1128/AAC.01574-15

155-Shencong Mei, Yulu Gao, Changtai Zhu, Chunlei Dong, and Yawen Chen. Research of the heteroresistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8(4): 6129–6132.

156- Jian Li, Roger L. Nation, Roxanne J. Owen, Stephanie Wong, Denis Spelman, and Clare Franklin Antibigrams of Multidrug-Resistant clinical *Acinetobacter baumannii*: Promising Therapeutic Options for Treatment of Infection with Colistin-Resistant Strains. 2007 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. 1058-4838/2007/4505-0011\$15.00 DOI: 10.1086/520658

157- Thean Yen Tan, Lily Siew Yong Ng, Eugene Tan and Gary Huang. In vitro effect of minocycline and colistin combinations on imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2007) 60, 421–423 doi:10.1093/jac/dkm178

158- Eun Seon Chung and Kwan Soo Ko. Eradication of persister cells of *Acinetobacter baumannii* through combination of colistin and amikacin antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2019; 74: 1277–1283 doi:10.1093/jac/dkz034.

159- Church D, Lloyd T, Peirano G, et al. Antimicrobial susceptibility and combination testing of invasive *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Scand J Infect Dis.* 2013;45(4):265–270

160- Betts JW, Phee LM, Woodford N, Wareham DW. Activity of colistin in combination with tigecycline or rifampicin against multidrug-resistant

Stenotrophomonas maltophilia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Sep;33(9):1565-72. doi: 10.1007/s10096-014-2101-3. Epub 2014 Apr 30.

161-Avgeri SG, Matthaiou DK, Dimopoulos G, et al. Therapeutic options for *Burkholderia cepacia* infections beyond co-trimoxazole: a systematic review of the clinical evidence. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33(5):394–404

162- Wood, G. C., Underwood, E. L., Croce, M. A., Swanson, J. M., and Fabian, T. C. (2010). Treatment of recurrent *Stenotrophomonas maltophilia* ventilator-associated pneumonia with doxycycline and aerosolized colistin. *Ann. Pharmacother*. 44, 1665–1668. doi: 10.1345/apn.1P217