

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

**FLOW SİTOMETRİ YÖNTEMİ İLE BAKTERİLERİN
ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Arş. Gör. Dr. Hüseyin HATİPOĞLU

Kasım-2019

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

**FLOW SİTOMETRİ YÖNTEMİ İLE BAKTERİLERİN
ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Arş. Gör. Dr. Hüseyin HATİPOĞLU

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet KÖROĞLU
Kasım-2019**

BEYAN

Bu çalışma T.C. Sakarya Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulu'ndan 26/10/2018 tarihinde onay olarak hazırlanmıştır. Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih:

15/10/2019

Arş. Gör. Dr. Hüseyin HATİPOĞLU

İmza

TEŞEKKÜR

Her zaman desteğiyle güç veren ve sonsuz sabır gösteren sevgili eşim Ayőe Yelda HATİPOğLU'na, tüm eğitim hayatım boyunca her zaman destek olan başta annem ve babam olmak üzere tüm aileme,

Uzmanlık eğitim sürecimde bilgi, fikir ve tecrübelerinden faydalandığım tez danışman hocam Prof. Dr. Mehmet KÖROğLU'na, uzmanlık eğitim sürecim boyunca bilgi, fikir ve tecrübelerini sunan değerli hocam Prof. Dr. Mustafa ALTINDİŐ'e, deneyimlerini ve ciddi katkılarını sunan Dr. Öğr. Üyesi Gülay ERMAN'a,

Laboratuvar çalışmalarını süresince yardımlarıyla bana destek olan uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan uzman doktorlarımız Tayfur DEMİRAY, Özlem AYDEMİR, H. Agah TERZİ, Engin KARAKEÇE'ye, asistan arkadaşlarım, Mehmet ÖLMEZ, Tuğba AYHANCİ, Elif ÖZÖZEN ŞAHİN, Kerem YILMAZ'a, Merve İlhan AKSU'ya, Hande TOPTAN'a ve bütün laboratuvar teknisyenlerimize teşekkürlerimi sunarım.

Saygılarımla

Arş. Gör. Dr. Hüseyin Hatipoğlu

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMA VE SİMGELER.....	v
TABLolar.....	viii
ŞEKİLLER.....	x
EKLER.....	xiii
ÖZET.....	xiv
SUMMARY.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 BAKTERİYEL DİRENÇ.....	3
2.2. ANTİBİYOTİKLER.....	4
2.3. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ.....	8
2.3.1 Manuel Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	8
2.3.2 Otomatize Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri.....	11
2.3.3 Yeni kullanıma giren sistemler ve teknolojiler.....	14
2.3.4 Gelecek teknolojiler.....	16
2.4 FLOW SİTOMETRİ (FCM).....	21
2.4.1 Flow sitometri tarihi.....	21

2.4.2 Flow Sitometri Çalışma Prensipleri	22
2.4.3 Flow Sitometrinin Mikrobiyolojide Kullanımı	24
2.4.4 Antimikrobiyal Etki ve Duyarlılık Testlerinin Flow Sitometri yöntemi ile Çalışılması.....	25
3. MATERYAL VE METOD	30
3.1. ETİK KURUL ONAYI.....	30
3.2. SUŞLARIN SEÇİMİ.....	30
3.3 BAKTERİ SÜSPANSİYONLARININ HAZIRLANMASI	30
3.4 ANTİBİYOTİK DUYARLILIK ÇALIŞMALARI.....	31
3.4.1 VITEK® 2 otomatize sistemi ile antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi	31
3.4.2 Broth mikro dilüsyon yöntemi ile MİK değerlerinin belirlenmesi	31
3.4.3 Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla flow sitometrik yöntemin optimizasyonu ve bu yöntemle antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi	31
4.BULGULAR	41
4.1. BAKTERİLERİN DUYARLILIK SONUÇLARI	41
4.1.1 <i>Escherichia coli</i> suşlarının duyarlılık sonuçları.....	41
4.1.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları.....	46
4.1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşlarının antibiyotik duyarlılıkları.....	56
4.1.4. <i>Acinetobacter baumannii</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları	60
4.1.6. <i>Staphylococcus aureus</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları	64
4.1.5 <i>Enterococcus spp.</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları	68
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	75
KAYNAKLAR	83
EKLER	97

KISALTMA VE SİMGELELER

7-AAD	7-Aminoactinomicina D
<i>A.baumannii complex</i>	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>
AA	Alternatif Akım
ADT	Antibiyotik duyarlılık testi
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
BMD	Broth mikrodilüsyon
CFU	Colony-forming unit
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Deoksiribonükleik asit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FAS	Hızlı ADT yöntemi
FCM	Flow Sitometri
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

FITC	Fluorescein isothiocyanate
FLLS	İleri lazer ışık yayma teknolojisi
FSC	Forward scatter
GSBL	Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz
He-Ne	Helyum-neon lazer
IMC	İzotermal mikro kalorimetri
İYE	Üriner Sistem Enfeksiyonları
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemases
MAC	Mikroakışkan agaroz kanalı
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry
MBK	Minimum bakterisidal konsantrasyon
m-EIS	Mikroakışkan elektrik empedans spektroskopisi
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyon
MRSA	Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
NDM	New Delhi Metallo-Beta-Laktamaz
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBP	Penisilin bağlayıcı protein
PE	Phycoerythrin
PerCP	Protein cyanine dye
PI	Propidium iodide

PMT	Fotomultiplier tüp
RD	Tetramethylrhodamine
RNA	Ribonükleik asit
RSC	Hızlı Hücre Spektrofotometresi
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SERS	Yüzey Geliştirilmiş Raman Spektrumu
SSC	Side scatter
TMP-SMX	Trimetoprim-Sulfametoksazol
VRE	Vankomisin Dirençli Enterokok

TABLÖLAR

Tablo 1. *E. coli* 25922 nolu ATCC suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 ve EUCAST önerisi ile beklenen duyarlılıklarının karşılaştırılması

Tablo 2. *E. coli* GSBL pozitif klinik suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 duyarlılıklarının karşılaştırılması

Tablo 3. *K. pneumoniae* 700603 ATCC suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 ve EUCAST önerisi ile beklenen duyarlılıklarının karşılaştırılması

Tablo 4. KPC pozitif *K. pneumoniae* suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 duyarlılıklarının karşılaştırılması

Tablo 5. NDM-1 pozitif *K. pneumoniae* suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 duyarlılıklarının karşılaştırılması

Tablo 6. OXA- 48 pozitif *K. pneumoniae* suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 duyarlılıklarının karşılaştırılması

Tablo 7. *P. aeruginosa* 27853 ATCC suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 ve EUCAST önerisi ile beklenen duyarlılıklarının karşılaştırılması

Tablo 8. *P. aeruginosa* klinik suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 duyarlılıklarının karşılaştırılması

Tablo 9. *A. baumannii complex* 1 nolu klinik suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 duyarlılıklarının karşılaştırılması

Tablo 10. *A. baumannii complex* 2 nolu klinik suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 duyarlılıklarının karşılaştırılması

Tablo 11. *S. aureus* 29213 ATCC suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 ve EUCAST önerisi ile beklenen duyarlılıklarının karşılaştırılması

Tablo 12. *S. aureus* klinik suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 duyarlılıklarının karşılaştırılması

Tablo 13. *E. faecalis* 29212 ATCC suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 ve EUCAST önerisi ile beklenen duyarlılıklarının karşılaştırılması

Tablo 14. *E. faecalis* klinik örnekten izole edilen vankomisin dirençli suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 duyarlılıklarının karşılaştırılması

Tablo 15. *E. faecium* klinik örnekten izole edilen vankomisin dirençli suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 duyarlılıklarının karşılaştırılması

ŞEKİLLER

Şekil 1. Flow sitometrik yöntemin optimizasyon çalışmalarında yapılan kapılama işlemi ile canlı ve ölü hücrelerin dot blot grafik görüntüleri

Şekil 2. Flow sitometrik yöntem ve BMD ile bakterilerin antibiyotik MİK değerlerinin tespit edilmesinin şematize edilmiş hali

Şekil 3. Flow sitometrik yöntem ile antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde kullanılan overlay grafik görüntüleri.

Şekil 4. *E. coli* 25922 nolu ATCC suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, siprofloksasin ve ampisilin duyarlılık overlay grafikleri

Şekil 5. Klinik örnekten izole edilen GSBL pozitif *E. coli* suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, sefoksitin tarama, sefepim ve meropenem duyarlılık overlay grafikleri

Şekil 6. *K. pneumoniae* 700603 ATCC suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, amikasin ve seftazidim duyarlılık overlay grafikleri

Şekil 7. KPC pozitif *K. pneumoniae* suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, seftazidim ve gentamisin duyarlılık overlay grafikleri

Şekil 8. KPC pozitif *K. pneumoniae* suşunun flow sitometrik yöntem ile meropenem ve imipenem duyarlılık overlay grafikleri

Şekil 9. NDM-1 pozitif *K. pneumoniae* suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, ertapenem ve imipenem duyarlılık overlay grafikleri

Şekil 10. OXA-48 pozitif *K. pneumoniae* suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, meropenem ve ertapenem duyarlılık overlay grafikleri

Şekil 11. *P. aeruginosa* 27853 ATCC suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, gentamisin ve ampisilin/sulbaktam duyarlılık overlay grafikleri

Şekil 12. *P. aeruginosa* 27853 ATCC suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, gentamisin ve seftazidim duyarlılık overlay grafikleri

Şekil 13. *A. baumannii complex* 1 nolu klinik suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, amikasin ve imipenem duyarlılık overlay grafikleri

Şekil 14. *A. baumannii complex* 2 nolu klinik suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, gentamisin ve imipenem duyarlılık overlay grafikleri

Şekil 15. *S. aureus* 29213 ATCC suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, penisilin ve daptomisin tarama duyarlılık overlay grafikleri

Şekil 16. Klinik örnekten izole edilen *S. aureus* suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, penisilin ve vankomisin tarama duyarlılık overlay grafikleri

Şekil 17. *E. faecalis* ATCC 29212 suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, vankomisin ve gentamisin tarama duyarlılık overlay grafikleri

Şekil 18. VRE pozitif *E. faecalis* suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, vankomisin ve linezolid tarama duyarlılık overlay grafikleri

Şekil 19. VRE pozitif *E. faecium* suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, vankomisin ve gentamisin tarama duyarlılık overlay grafikleri



EKLER

Ek 1. Sakarya Üniversitesi Etik Kurulu Onayı



ÖZET

Giriş ve Amaç: Bu çalışmada gram pozitif ve gram negatif bakterilerin in vitro antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla flow sitometri yöntemi kullanımı ve sonuç verme süresinin kısaltılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Altı standart suş ile 11 klinik izolat bu çalışmada incelenmiştir. Tüm suşların antibiyotik duyarlılıkları; VITEK 2 otomatize sistemi, sıvı mikrodilüsyon ve flow sitometrik yöntem ile test edilmiştir. Antibiyotik dilüsyonları güncel EUCAST kılavuzuna göre belirlenmiştir. Flow sitometrik analiz öncesi mikropilaktaki bakteri süspansiyonları, 120 rpm ve 35-37°C'de 2 saat inkübe edildikten sonra 100µl okuma tüplerine alınmıştır. Daha sonra her tüpe 10µl Syto 9 ve 10µl Propidium iodid boyası eklenerek karanlık ortamda 15 dk bekletilmiştir. Flow sitometrik analizde, üreme kontrol kuyucuğu ile antibiyotikli kuyucuklar FL1-H grafiğinde üstü üste getirilerek karşılaştırılmış ve antibiyotikli kuyucuklarda en az %55 oranında bakteri sayısında azalma duyarlılık kriteri olarak kabul edilmiştir.

Bulgular: Flow sitometrik yöntemle belirlenen antibiyotik duyarlılık ile BMD ve VITEK 2 sistemi arasında saptanan uyum oranları sırasıyla; iki *E. coli* suşu için (%92.3, %84.6), dört *K. pneumoniae* suşu için (%88.7, %81.8), iki *P. aeruginosa* suşu için (%73, %73), iki *A. baumannii complex* suşu için (%81.8, %81.8), iki *S. aureus* suşu için (%86.1, %81.2), üç *Enterococcus spp.* suşu için (%81.8, %88.8) olarak saptanmıştır.

Sonuç: Flow sitometrik yöntemle yapılan antibiyotik duyarlılık çalışmaları ile BMD ve VITEK 2 sistemi arasında yüksek düzeyde uyum saptanmıştır. Gram negatif bakterilerde gram pozitiflere göre flow sitometri ve diğer yöntemlerin uyumunun daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir. Antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuç verme süresini 12-14 saat kısaltmaktadır. Ancak henüz tüm laboratuvarlarda kullanılabilecek şekilde standardize edilememiştir. Antibiyotik duyarlılıklarının flow sitometri ile belirlenmesi konusunda daha detaylı ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Flow sitometri, antimikrobiyal duyarlılık, MİK, EUCAST

SUMMARY

Introduction and Aim: The aim of this study was to determine the in vitro antibiotic susceptibility of gram-positive and gram-negative bacteria by using flow cytometry method and to shorten the delivery time.

Material and Method: Six standard strains and 11 clinical isolates were examined in this study. Antibiotic susceptibility of all strains; was tested with VITEK 2 automated system, liquid microdilution and flow cytometric method. Antibiotic dilutions were determined according to the current EUCAST guidelines. Antibiotic dilutions were determined according to the current EUCAST guidelines. Prior to flow cytometric analysis, bacterial suspensions in the microplate were incubated at 120 rpm and 35-37 ° C for 2 hours. The suspension in each well was transferred to 100µl reading tubes. Then, 10 µl Syto 9 and 10 µl Propidium iodide dye were added to each tube and incubated for 15 minutes in dark. In flow cytometric analysis, growth control wells and antibiotic wells were compared by overlay on the FL1-H graph and a growth control wells in bacterial count of at least 55% in antibiotic wells was accepted as the sensitivity criterion.

Results: Antibiotic susceptibility determined by flow cytometric method with BMD and VITEK 2 system were found to be as follows; two *E. coli* strains (92.3%, 84.6%), four *K. pneumoniae* strains (88.7%, 81.8%), two *P. aeruginosa* strains (73%, 73%), two *A. baumannii complex* strains (81.8%, 81.8%), two *S. aureus* strains (86.1%, 81.2%), three *Enterococcus spp.* strain (81.8%, 88.8%).

Conclusion Antibiotic susceptibility studies with flow cytometric method showed a high level of agreement between BMD and VITEK 2 system. In gram negative bacteria, flow cytometry and other methods were found to be more compatible than gram positives. Antibiotic susceptibility tests shorten the delivery time of 12-14 hours. However, it has not yet been standardized to be used in all laboratories. More detailed and comprehensive studies are needed to determine antibiotic susceptibility by flow cytometry.

Keywords: Flow cytometry, antimicrobial susceptibility, MIC, EUCAST

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Antibiyotikler mikroorganizmaları öldüren ya da onların üremesini durduran biyolojik kaynaklı veya sentetik olarak elde edilen çok etkili biyoaktif maddelerdir (Saygı ve ark 2012). İlk olarak 1928 yılında İskoç bilim adamı Alexander Fleming tarafından penisilin keşfedilmiştir. Günümüzde tedavide kullanılan 50'den fazla antibiyotik türü bulunmaktadır (Acar ve ark 2015). Uygun ve doğru antibiyotik tedavisi birçok enfeksiyon hastalığında klinik seyir ve prognozu etkileyen en önemli faktördür. Tedaviden en fazla yarar elde edebilmenin temel koşulu doğru antibiyotiğin en hızlı sürede seçilmesidir. Doğru antibiyotik; etkene karşı etkinliği yüksek, etki spektrumu dar, ucuz, yan etkisi az ve uygulaması kolay olmalıdır (Ulusoy 1999). Akılcı antibiyotik kullanımı tüm dünyada önemli bir sorun haline gelmiştir. Bunun nedenleri arasında son yıllarda sağlık bakımı ile ilişkili/hastane enfeksiyonlarında artan antimikrobiyal ilaç direnci ve bu dirençli enfeksiyonların neden olduğu morbidite ve mortalitenin artmasıdır. Hayatı tehdit eden bu enfeksiyonların tedavisinde başvurulacak antibiyotik seçimi için antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yapılması gerekmektedir. Antimikrobiyal duyarlılık testleri etkene yönelik hızlı ve doğru sonuç vermelidir. Bu gibi nedenlerle günümüzde antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için sürenin kısaltılmasına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır (Puttaswamy et al. 2018).

Antibiyotik duyarlılık testlerinde genellikle difüzyon ve dilüsyon yöntemleri kullanılmaktadır. Difüzyon testleri, disk difüzyon ve gradient strip yöntemidir. Dilüsyon yöntemleri ise sıvı (broth) dilüsyon ve agar dilüsyondur. Bu yöntemlerde de bekleme süresi 18-24 saat arasında değişmektedir (Sümerkan 1996). Mortalite ve morbidite oranları açısından bu sürenin kısaltılması hayati öneme sahiptir. Bu nedenle son yıllarda, antibiyotik duyarlılıklarının daha hızlı belirlenmesi amacı ile flow sitometrisi, moleküler olarak direnç genlerinin belirlenmesi ve Matrix-assisted

laser desorption/ionization Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF) yöntemleri de kullanılmaya başlanmıştır.

Flow sitometri yöntemi, uzun yıllardır çeşitli hastalıkların tanı ve tedavisinin takibinde kullanılmaktadır. Ancak Tıbbi mikrobiyoloji alanında kullanımı yenidir. Son yıllarda mikrobiyoloji laboratuvarlarında antibiyotik duyarlılık çalışmalarında da kullanılmaya başlanmıştır. Konvansiyonel kültür yöntemleri ve antibiyotik duyarlılık testlerinin 24-48 saat gibi uzun bir zaman alması, tanı ve tedavi açısından önemli bir dezavantaj teşkil etmektedir. Flow sitometri yöntemi ile direk örnekten veya pozitif kültürden çalışılabilmekte ve test sonuçları 6-8 saat içerisinde alınabilmektedir. Literatürde, bu konu ile ilgili çok az sayıda çalışma mevcut olup, bunlarda az sayıda antibiyotik ve az sayıda bakteri türü için flow sitometri yöntemi kullanılmıştır. Bu uzmanlık tezi çalışmasında gram pozitif ve gram negatif bakterilerin in vitro antibiyotik duyarlılıklarının flow sitometri yöntemi kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 BAKTERİYEL DİRENÇ

Penisilin keşfedilmeden önce bile, dirençli bakteri suşları tespit edilmiştir (Davies and Davies 2010). Son 75 yılda antibiyotiklerin kullanılmasından bu yana, milyonlarca ton antibiyotik kullanılmıştır. Bu aşırı antibiyotik kullanımı, bakterileri enfeksiyonları tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere dirençli hale getirmiştir. Bakteriyel direncin hızlı evrimi β -laktamaz sınıfı antibiyotik grubunda oldukça bellidir. 1990'dan bu yana bu antibiyotikleri inaktive eden yaklaşık 1000 farklı dirençle ilişkili β -laktamaz tanımlanmıştır. Bu bakteriyel dirençler dünyaya yayılmıştır. Antibiyotiğe dirençli gonore enfeksiyonu, 1967 yılında Vietnam'da ortaya çıkmış, daha sonra Filipinler'e yayılmıştır ve ABD'de ilk olarak 2008'de rapor edilen New Delhi Metallo-Beta-Laktamaz (NDM) enzimleri dünyada yaygın olarak görülmektedir (Nordmann et al. 2011).

Kinolon grubu antibiyotik kullanımı yanlış ilaç kullanımına iyi bir örnek oluşturmuştur. Bu ilaçlar sentetiktir ve doğada bulunmazlar, ancak yaygın epidemik dirence neden oldukları, kullanılmaya başlandıktan 30 yıl sonra anlaşılmıştır (Zaman et al 2017). Daha spesifik olarak genom çalışmaları, MRSA direncinin oluşmasında kinolon direncinin sorumlu olduğunu göstermektedir (Levy 2007). Antibiyotik odaklı çalışmalarda, dirençli enfeksiyonların mevcut salgınlarını açıklamak için önemli gelişmeler elde edilmiştir (Zaman et al 2017).

Antibiyotik direncinin nedenleri karmaşıktır ve toplum düzeyinde insanların davranışlarından etkilenir. Bu direnç sorunu dünyadaki herkesi etkiler. İklim değişikliği ile benzerlikler belirgindir. Antibiyotik direncinin birçok farklı yönünü ve bu zorluğun üstesinden gelmek için gereken müdahaleleri tanımlamak için birçok çalışma yapılmıştır. Bununla birlikte, koordineli eylem, özellikle ulusal ve uluslararası düzeyde, özellikle siyasi düzeyde yoktur. Antibiyotikler benzeri

görülmemiş tıbbi ve toplumsal gelişmelerin yolunu açmıştır. Günümüzde sağlık sistemlerinin vazgeçilmezidir. Organ nakli, erken doğmuş bebeklerin tedavisi ve kanser kemoterapisi gibi modern tıptaki başarılar, bakteriyel enfeksiyonlara karşı elde edilen etkili tedaviler kadar başarılı değildir. Sadece birkaç yıl içinde, gerçek ve eşi benzeri görülmemiş küresel koordineli eylem kararları derhal alınmazsa; tıbbi, sosyal ve ekonomik olarak kötü sonuçlarla karşı karşıya kalabiliriz. Bakteriyel direncin önümüzdeki yıllarda daha büyük sorun teşkil etmesi ve buna bağlı ölümlerin artması beklenmektedir (Laxminarayan et al.2013).

2.2. ANTİBİYOTİKLER

Antibiyotikler, antik çağlardan beri kullanılmaktadır. Kökeni Yunancada karşı anlamına gelen “anti” ve yaşam anlamına gelen “bios” sözcüklerinden türetilmiştir. Sözlüklere göre de ‘Bitkilerde, özellikle küf mantarlarında bulunan ya da yapay olarak üretilen, bakteri ve diğer mikroorganizmaların gelişimini durduran ya da onları yok eden maddelerin ortak adıdır (Aktuğlu 1997, Tunçtan ve Buharalıoğlu 2005).

Günümüzde elliden fazla antibiyotik tedavide kullanılmaktadır. Gün geçtikçe tedavide kullanılan antibiyotik sayısı da artmaktadır. Başlıca antibiyotik grupları beta-laktamlar, aminoglikozidler, makrolidler, glikopeptidler, polimiksinler, kinolonlar, sülfanomidler, linkozamidler, tetrasiklinler olarak sayabiliriz (Tunçtan ve Buharalıoğlu 2005).

Penisilinler tıp tarihinde kullanılan en eski antibiyotiklerdir. Bakterisid etkiye sahip olup bakterinin hücre duvarını hedef alırlar. Hücre duvar sentezinde görevli olan penisilin bağlayıcı protein (PBP)’lere bağlanarak peptidoglikan sentezini engeller. Hücre duvar yapısını bozarak bakterinin ölümüne yol açarlar. Başlıca; doğal penisilinler, penisilinaza dirençli penisilinler, aminopenisilenler, karboksipenisilinler, üreidopenisilinler, beta-laktamaz inhibitörlüleri olarak ayrılırlar. Gram pozitif bakterilere, gram negatif bakterilere, anaerob bakterilere etkilidirler (Öncül 2002, Chambers 2001).

Sefalosporinler, Cephalosporicum acremonium isimli mantardan sefalosporin C’nin üretilmesi ile 1940’lı yıllarda keşfedilmiştir. Gelişen teknoloji ile farklı moleküler

yapılara ve özelliklere sahip beş kuşak sefalosporin bulunmaktadır. Penisilinler gibi bakterinin hücre duvarını hedef alarak bakterisid etki gösterirler. Birinci kuşak sefalosporinler gram pozitif bakterilere daha etkili iken, üçüncü kuşak sefalosporinler gram negatif bakterilere daha etkilidir. Dördüncü kuşak sefalosporinler ise hem birinci kuşak sefalosporinler ile hem de üçüncü kuşak sefalosporinler ile benzer etki gösterirler. Beşinci kuşak sefalosporinler metisilin dirençli stafilokok (MRSA) enfeksiyonlarında kullanılabilen tek beta laktam grubu antibiyotik olma özelliğini taşır (Öncül 2002, Chambers 2001).

Karbapenemler, etki spektrumu oldukça geniş olan, gram pozitif ve gram negatifler ile hem aeroplara hem de anaeroplara etkili antibiyotiklerdir. Diğer beta-laktam antibiyotikler gibi hücre duvarını hedeflerler. Klinikte oldukça fazla endikasyonda kullanılabilirler. Genişlemiş spektrumlu Beta-laktamaz (GSBL) üreten şuşlarda kullanılabilen beta-laktam grubu antibiyotiklerdir. MRSA enfeksiyonlarında, *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) enfeksiyonlarında kullanılmazlar (Öncül 2002, Mazioglu 2010).

Monobaktamlar, yapısındaki monosiklik çekirdekten dolayı diğer beta-laktamlardan ayrılır. Sadece gram negatif, aerop bakterilere etki gösterdiği için oldukça dar spektruma sahiptirler. En çok bilinen üyesi aztreonamdır. Gram negatif bakterilere PBP-3'e bağlanarak etki gösterir (Öncül 2002).

Florokinolonlar, nalidiksik asit türevi olan antibiyotiklerdir. Bakterideki DNA giraz (topoizomeraz II) ve topoizomeraz IV enzimini inhibe ederek bakterisid etki gösterirler. Klinik kullanımda 5 kuşak bulunmaktadır. Üçüncü kuşak florokinolonlar solunum yolu kinolonları olarak bilinirler. Dördüncü kuşak kinolonlar ise anaerop etkinliği olan kinolonlardır (Günel ve Erdem 2014).

Aminoglikozidler, ribozomun 50S alt birimine bağlanarak etki gösterirler. Multifaktöriyel etki göstererek bakterinin ölümüne yol açarlar. Aminoglikozidlerin en bilinen özelliklerinden biri ise nefrotoksik, ototoksik ve nörotoksik olmalarıdır. Oral kullanımı olmayan bu grup antibiyotikler bir çok enfeksiyon çeşidinde kullanılmaktadır. Aminoglikozidlerin başka bir antibiyotik ile kullanımı sinerjik etki elde etmek için sıkça tercih edilmektedir (Gilbert 1995, Mıstık 2000).

Makrolidler, *Saccharopolyspora erythraea* adlı bir mantardan elde edilmiştir ve bu antibiyotik grubunun ilk üyesi eritromisindir. Makrolidlerden eritromisin, klaritromisin, azitromisin, diritromisin ve telitromisin Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)'nden onaylı ve klinik kullanımda bulunan üyeleridir. Bakteriyel ribozomunun 50S alt ünitesindeki 23S ribozomal RNA (rRNA)'nın V bölgesine geri dönüşümlü olarak bağlanarak çoğunlukla bakteriyostatik etki gösteren antibiyotiklerdir. İntrastoplazmik enfeksiyonlara karşı etkili olduğundan en sık atipik pnömonilerde tercih edilirler (Özaras ve ark. 2002, Bayındır 2010).

Tetrasiklinler, ilk olarak *Streptomyces aureofaciens* adındaki toprak bakterisinden izole edilmiştir. Daha sonra yine bir toprak bakterisi olan *Streptomyces rimosus*'dan "terramycin" (5-hydroxytetracycline) izole edildi. Günümüzde en sık kullanılan antibiyotikler arasında bulunan bu grup antibiyotikler bakterinin 30S ribozomal alt birimine reversibl olarak bağlanırlar. Bir diğer önemli etki mekanizması ise eflux pompa inhibisyonudur. Bunların haricinde birçok etki mekanizması da çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Tetrasiklinlerin bir diğer önemli özelliği ise etki spektrumlarıdır. Geniş spektruma sahip tetrasiklin grubu antibiyotikler aerop, anaerop, gram pozitif, gram negatif bakterilere etkili olup, sıtma gibi bazı parazitlerin tedavisinde de kullanılmaktadır (Özaras ve ark. 2002, Agwuh and MacGowan 2006, Taşova 2010).

Glikopeptidlerin en bilinen iki üyesi vankomisin ve teikoplanindir. Bu grup antibiyotikler sıklığı artan gram pozitif bakterilerin enfeksiyonlarında sıkça kullanılmaktadır. Vankomisin 1956 yılında, teikoplanin ise 1978'de izole edilmiştir. Her iki antibiyotik de gram pozitif bakterilerin hücre duvarı sentezinde D-alanin- D-alanin yapısını bozarak peptidoglikan sentezini inhibe ederler ve bakterisid etki gösterirler. Vankomisin MRSA enfeksiyonlarında hayati öneme sahiptir. Bazı istisnalar haricinde gram negatif bakterilere etkisiz olan bu antibiyotiklere son yıllarda yeni bir üyesi olan daptomisin de katılmıştır (Çetinkaya ve Ünal 1997, Fekety 2000, Aygün 2010).

Sulfonamidler ve trimetoprim-sulfametoksazol, insanlarda ilk kullanılmaya başlanan sistemik etkili antibakteriyal ilaçlar sulfonamidlerdir. Bakteriye folik asit sentezini

bozarak etki eder. Daha sonraki yıllarda, bakterinin folik asit ve primidin sentezini bozan trimetoprim adında bir antibiyotik keşfedilmiştir. Trimetoprim ile sulfonamid üyesi sulfametoksazol kombinasyonunun (TMP-SMX) sinerjistik etkisi anlaşılmış ve kullanıma başlanmıştır. Günümüzde halen sıkça kullanılmaktadır (Özaras ve ark. 2002, Havlicchek and Stein 1999).

Polimiksinler A'dan E'ye kadar olan 5 gruptan oluşmaktadır. Bu grubun en önemli üyesi kolistindir. Kolistin 1940'li yılların sonlarında keşfedilmesine rağmen 1950-1980 yılları arasında böbrek üzerine olan toksik etkileri nedeni ile kullanımı bırakılmış bir antibiyotiktir. İlerleyen yıllarda antibakteriyel direnç sorununun büyümesiyle, özellikle *Acinetobacter spp*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) enfeksiyonlarında tek tedavi seçeneği haline gelmiştir. Kolistin bakteri hücre membranını hedef alarak bakterinin ölümüne neden olur (Öncül 2012, Akalın 2007).

Linkozamidler grubu antibiyotikler linkomisin ve klindamisin olup 1960'lı yıllarda keşfedilmişlerdir. Bakteri ribozomlarının 50S alt kısmına bağlanarak protein sentezini engellerler ve bakteriyostatik etkisi ile makrolidlerle benzerlik gösterirler (Özaras ve ark. 2002, Chambers 1998).

Oksazolidinonlar, sentetik olarak elde edilen yeni bir antimikrobiyal ilaç sınıfını oluştururlar. Bakterilerin ribozomlarına bağlanıp protein sentezini inhibe ederek stafilokok ve enterokoklara bakteriyostatik etki gösterirken, streptokoklara bakterisid etki gösterirler. Protein sentezi üzerine etkisini 50S ribozomal alt ünitesinde bulunan 23S ribozomal RNA (rRNA)'ya bağlanarak gösterirler. Vankomisine ve metisiline dirençli gram pozitif bakteri enfeksiyonlarında tercih edilirler. Hem intravenöz hem oral kullanımı bulunmaktadır (Acar ve ark.2015, Harmony and Kenneth 2003).

Streptograminler, ilk kez 1960 yılında keşfedilmiştir. Bu grubun bir üyesi olan kinupristin/dalfopristin yapısal olarak birbirinden farklı iki siklik peptid antibiyotiğin kombinasyonudur. Tip A (kinupristin) ve tip B (dalfopristin) peptidler ayrı ayrı bakteriyostatik etki gösterirlerken, uygun oranlarda (kinupristin/dalfopristin: 30/70) biraraya geldiklerinde bakterisidal etki oluştururlar. Bu etkilerini duyarlı oldukları bakterilerin ribozomlarındaki 50S ünitesinde protein sentezini engelleyerek gösterirler (Chambers 1998, Özaras ve ark. 2002).

2.3. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ

2.3.1 Manuel Antibiyotik Duyarlılık Testleri

2.3.1.1 Disk difüzyon testi metodu

Bu yöntemde, hastadan izole edilen bakteriyel numune, pamuklu eküvyon çubuğu kullanılarak taze bir Müller-Hinton besiyerine yayılır. Antibiyotik emdirilmiş diskler, bakteri süspansiyonu inoküle edilmiş besiyerinin yüzeyine aralıklarla yerleştirilir. Daha sonra 35-37°C'de 16-18 saatlik bir süre boyunca inkübe edilir (Reller et al. 2009). Diskin etrafındaki boşluk bölgesinin en geniş çapı ölçülür ve organizmanın test edilen antibiyotiklere karşı duyarlı, orta duyarlı veya dirençli olup olmadığını belirlemek için ABD'de kullanılan Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) veya Avrupa'da kullanılan European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) referans tablosuyla karşılaştırılır. Bu yöntem, tek bir agar üzerinde birden fazla ilacı veya ilaç konsantrasyonunu test edebilir, ancak hasta tedavisi için oldukça klinik öneme sahip olan minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerlerini belirleyemediğinden yalnızca kalitatif sonuçlar verir (Puttaswamy et al. 2018).

2.3.1.2 Gradient Difüzyon Testi (Etest)

Bu yöntemde belirli bir antibiyotik kademeli olarak azalan konsantrasyonlarının emdirildiği bir plastik şerit kullanılır. Test edilecek bakteri süspansiyonu önceden bir besiyerinin yüzeyine inoküle edilir. Daha sonra bu antibiyotikli şerit besiyerinin yüzeyine yerleştirilir. Yaygın olarak kullanılan bu yöntemin adı gradient difüzyon testi yöntemidir. Ayrıca antibiyotikli şerit inhibisyon bölgesinin okunmasına yardımcı olan bir yorumlayıcı ölçeğe sahiptir. İnhibisyon bölgesinin tanımlandığı ve MİK değerine karşılık gelen konsantrasyonun belirlendiği bu yöntemde şerit yerleştirildikten sonra yaklaşık 16-18 saat boyunca 35-37°C'de inkübe edilir. MİK, inhibisyon zonu ile antibiyotikli şeridin kesiştiği noktada şerit ölçeğinde yazan değer olarak kabul edilir (White et al. 1996). Bu yöntem, inhibisyon bölgesinin üst üste binmesini önlemek için birbirinden yeterli mesafeye yerleştirildiğinde besiyeri başına çoklu antibiyotiklerin etkisini test etmek için kullanılabilir. Bununla birlikte, besiyeri başına sadece bir organizma test edilebilir ve sonuçların elde edilmesi için geçen

süre, diğer agar difüzyon veya dilüsyon yöntemleriyle karşılaştırılabilir (Puttaswamy et al. 2018).

2.3.1.3 Broth Makro-Dilüsyon yöntemi

Bu yöntemde, her biri iki katına çıkarılan antibiyotik konsantrasyonları içeren tüpler kullanılır. Tüp başına kullanılan hacimler tipik olarak 1 ml veya daha yüksektir ve bu nedenle bir makro seyreltme yöntemi olarak kabul edilir (Ferraro 2000, Puttaswamy et al. 2018). İlgili bakteriler, besiyerinde tekli koloniler olacak şekilde izole edilir, broth içinde süspanse edilir, uygun şekilde seyreltilir ve CLSI tavsiyesine göre $\sim 5 \times 10^5$ CFU/ml nihai konsantrasyon elde etmek için her tüpe eklenir. Son durumda tüpler, farklı konsantrasyonlarda antibiyotik ve eşit oranda bakteri içerir. Bir pozitif kontrol tüpüyle (bakteri ve antibiyotiksiz broth), 24 saat veya daha uzun bir süre boyunca optimum bakteri üremesi için inkübe edilir. Bunları takiben, görsel olarak veya optik yöntemlerle bakteri üremesi gözlenir. Tüpte görünür bir bakteri üremesi gözlenmeyen her bir antibiyotiğin en düşük konsantrasyonu, MİK olarak belirlenir. Bu yöntem, verilen bir bakteri-antibiyotik kombinasyonu için MİK'in tanımlanmasında kolay ve anlaşılır bir yöntemdir, ancak emek ve malzemenin yoğun olması ve aynı zamanda, geniş bir patojen panelini test etmek için aynı anda birden fazla numune çalıştırılmasındaki zorluk nedeniyle zaman alıcıdır.

2.3.1.4 Broth Mikro-Dilüsyon yöntemi (BMD)

Bu yöntemde, broth makro-dilüsyon yöntemiyle aynı prensip kullanılır, ancak mikrolitre hacimlerle çalışılır. Bu kuyulardaki hacimler mikrolitre ölçeğindedir ($\sim 100 \mu\text{l}$) (Ferraro 2000, Puttaswamy 2018). Bu yöntemde kullanılan mikroplaklarda yatay olarak 12, dikey olarak 8 kuyucuk olmak üzere 96 kuyucuk bulunur. İşlem esnasında antibiyotik konsantrasyonları arasındaki fark her kuyucukta 2 kat azalarak devam eder. Minyatürleştirme ve küçük hacimler nedeniyle, birden fazla ilaç ve/veya bakteri aynı anda tek bir mikro plate üzerinde test edilebilir. Her platede tek bir antibiyotik için 12 bakteri 8 dilüsyon ile veya 8 bakteri 12 dilüsyon ile çalışılabilir. Başka bir deyişle tek bir bakteri için 12 antibiyotik 8 dilüsyon ile veya 8 antibiyotik 12 dilüsyon ile çalışılabilmektedir. Bununla birlikte, kuyucukların en azından 12-24 saatlik bir süre boyunca $35-37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmesi gerekir. Bu süreç

sonunda bulanıklık için ya görsel olarak ya da otomatik okuyucular kullanılarak mikrop plaklar okunur. Mikro-dilüsyon yöntemini kullanan ve yaygın olarak kullanılan bir otomatik sistem Micro-naut AST sistemidir. Burada her kuyucukta farklı konsantrasyonlarda kurutulmuş antibiyotikler bulunmaktadır. Bu kuyucuklara bakteriyel süspansiyonda eklendiğinde bu antibiyotikler çözünerek aktif hale gelirler. Bu plaklar 6-24 saatlik bir süre boyunca inkübe edilir ve bir fotometre kullanılarak okunur. Sonuçlar kesme noktaları (break point), MİK'ler veya her ikisinin kombinasyonu olarak yorumlanır ve raporlanır (Wellinghausen et al. 2007). Bu yöntemde kullanılan paneller özelleştirilebilir, önceden üretilebilir ve bu nedenle diğer antibiyotik duyarlılık testleri (ADT) metodolojilerini yönetme kabiliyetine sahip olmayan laboratuvarlarda hazır kullanım sağlar. Bununla birlikte, sonuçların elde edilmesi için geçen süre, mikrodilüsyon yöntemine kıyasla benzerdir.

2.3.1.5 Agar Dilüsyon yöntemi

Bu yöntem, belirli bir bakteriye karşı test edilecek antibiyotiğin doğrudan agar ortamına dahil edildiği eski bir yöntemdir. Bakteriler daha sonra agar plakasının yüzeyine son dilüsyon oranı 10^4 koloni oluşturan birim/colony-forming unit (KOB/CFU) olacak şekilde, tipik olarak 5-8 mm çapında inoküle edilir. Bu besiyerleri 16-20 saat veya daha uzun bir süre boyunca inkübe edilir ve bakterilerin üremesi beklenir (Ferraro 2000). Bakteri üremesi gözlenmeyen besiyerindeki en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak kabul edilir. Bu yöntemde besiyeri başına sadece bir antibiyotik konsantrasyonu test edilebilse de, tek bir besiyeri üzerinde 32-36 bakteri inoküle edebilen inokulum replikatörleri kullanılarak çoklu organizmalar test edilebilir. Bununla birlikte, bu yöntem hala MİK değerlerini belirlemek için manuel incelemeye ihtiyaç duyar ve bu nedenle, eğer inhibisyon zonu farkedilemezse, bazen yanlış yorumlanabilir. Ayrıca, agar dilüsyon yönteminde bazı antibiyotikler (örneğin Kolistin / Polimiksin, Sulfanomidler gibi) besiyerine yeterince yayılmadıkları için iyi sonuç vermezler (Puttaswamy et al. 2018).

2.3.2 Otomatize Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

2.3.2.1 VITEK 2® otomatize sistemi

Bu sistem ilk olarak 1970'lerde, izole hasta numunelerinden eş zamanlı olarak bakteriyel tanımlamayı ve ADT profillerini belirlemek için bioMérieux tarafından geliştirilmiştir. Piyasadaki mevcut sistemler, her ikisi de broth mikrodilüsyon tekniğini kullanan VITEK 2® compact ve VITEK 2® sistemleridir. Sistem, mikro kuyucuk içeren “ADT kartları” kullanmaktadır. Numuneleri aynı anda birden fazla kuyuya otomatik olarak doldurmak için bağlantıları olan bir karttır. Her kart 64 mikro kuyucuk içerir. Bu kuyucuklara, kuru besiyeri tozu ve farklı konsantrasyonlarda antibiyotikler eklenmiştir. Kart ayrıca, pozitif kontrol kuyusu olarak kullanılmak üzere yalnızca herhangi bir antibiyotik içermeyen kuru medium tozu olan bir oyuk içerir. Optik bir okuyucu tarafından kuyucuklar üreme olup olmadığı açısından taranır (Ligozzi et al. 2002). Bu tarama ışığın zayıflamasını ölçen bir tam otomatize sistemdir. Sistem algılama için optik yöntem kullandığından, kartlara yerleştirilmiş numunelerin saf mikrobiyal izolatlar olması şarttır. Besiyerindeki saf bir koloninin üreyen tüm kolonileri temsil ettiği varsayılarak, bu koloni salin çözeltisi (%0.45 NaCl) içinde süspanse edilir ve 10^8 CFU/ml veya bu sayıya denk gelen McFarland değeri, mikrobiyal konsantrasyon elde etmek üzere ayarlanır. Bu bakteriyel süspanسیون tüpü, bir ADT kartı ile birleştirilir, taranır ve VITEK® sistemine yerleştirilir. Süspanسیون, 5×10^5 CFU / ml elde etmek için otomatik olarak seyreltilir (bazı VITEK® sistemlerinde bu seyreltme işlemi manuel olarak yapılır), VITEK® kartlarına doldurulur, kapatılır ve cihaz içinde inkübe edilir. Cihaz, bakteriler için 18-24 saat ve maya için 36 saat boyunca her bir kuyucukta üremeyi periyodik olarak izler (Bachmaier and Autenrieth 1996). MİK değerleri, münferit kuyucuklarda üremenin veya ürememenin optik gözlemine dayanarak belirlenir ve farklı antibiyotikler için bir MİK tablosu ile yorumlanması (eğer bakteri türü biliniyorsa) sistem tarafından belirlenir ve raporlanır.

Bu sistem, kullanım kolaylığı ve el işçiliğinin azalması nedeniyle bakteriyel identifikasyon ve ADT'nin eşzamanlı olarak belirlenmesi için klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan otomatik sistemlerden biridir. Klinik iş akışına kolayca entegre edilebilir. Bununla birlikte, sistem optik algılama yöntemi

kullandığından, pozitif bir kültür numunesinin, VITEK® sistemi tarafından kullanılmadan önce saf koloniler elde etmek için 1-5 gün boyunca inkübe edilmiş besiyerindeki kolonilerin kullanılması gerekir. Bu nedenle, bu adımlar, pozitif numune tanımlandıktan sonra ADT sonuçları elde etmek için harcanan toplam süreye ilave olarak zaman tasarrufunu azaltır. VITEK® sisteminin kolistin duyarlılığı saptamasıyla ilgili şüpheler son yıllarda artmaktadır (Puttaswamy et al. 2018).

2.3.2.2 BD Phoenix™ otomatik duyarlılık test sistemi:

Bu sistem, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan ve ADT'nin belirlenmesi için Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan otomatik mikrodilüsyona dayalı bir sistemdir. Bu test, mikro kuyucuklu panellerde organizma üremesinin tespiti için redoks indikatörünü kullanır (Carroll et al. 2006). Her mikro kuyucuk, belirli bir konsantrasyonda antibiyotik içerir ve bakteriyel süspansiyon ilavesiyle sulandırılmış olur. Bu paneller bir süre boyunca inkübe edilir ve kromojenik veya florojenik substratlar kullanılarak mikrobiyal üreme için belirli aralıklarla taranır. Her panelde, hem identifikasyon hem de ADT bölümü bulunur. Panelin ADT bölümü 1 pozitif kontrol kuyusu dahil 84 mikro kuyucuktan oluşur.

BD Phoenix sistemi 99 ADT panelini okuyabilir. Duyarlı, dirençli veya yarı duyarlı şeklinde antibiyotik duyarlılığı verebilir. Antibiyotiklerin MİK değerini bildirmek için kullanılan bir dizi kural içeren özel bir uzman yazılım sistemine sahiptir. Bu sistemin mikroorganizma türüne bağlı olarak MİK değerleri elde etmesi 4-16 saat sürer (Puttaswamy et al. 2018). Otomasyonundan dolayı, sistem manuel sistemlerin sakıncalarını ortadan kaldırır ve kullanımı kolaydır. Bununla birlikte, bu sistem hala zaman alıcı bir etken olan ADT'nin belirlenmesi ve yorumlanması için saf izole edilmiş bakteri kültürü gerektirir.

2.3.2.3 Sensititre™

Sensititre™ sistemi de VITEK® ve Phoenix™ sistemlerine benzer olarak mikrodilüsyon yöntemine dayanan Thermo Fisher Scientific tarafından üretilen ve ticari olarak satılan bir üründür. Bakteri üremesinin gerçek tespiti için sonuçların manuel olarak okunması, yarı otomatik veya tam otomatik olarak özelleştirilebilir. Manuel yorumlama için kuyucuklar görsel olarak bulanıklığa göre değerlendirme

yapılır. Otomatik algılama için inkübasyon süresi boyunca organizma tarafından üretilen spesifik enzimlerin aktivitesini izlemek için floresans teknolojisi kullanılır. Üretilen enzimler florofor arasındaki bağı ayırır ve söndürücü substrat, floresan yaymak için floroforu serbest bırakır (Belak 2001). Floresans miktarı doğrudan organizmanın üremesiyle ilgilidir ve MİK değerlerini belirlemek için kullanılır. Tam otomatik sistem, ADT sonuçlarını verebilmek için 18-24 saat inkübasyon süresini beklemektedir. Ancak aynı anda birden fazla örneği işleyebilmesi iş verimini artırır.

2.3.2.4 Micro-scan walk away®

Bu sistem, broth mikrodilüsyon metoduna dayalı bakteriyel identifikasyon ve ADT için Beckman-Coulter tarafından otomatikleştirilmiş bir sistemdir. Bu sistemin, orta ve büyük ölçekli işlemler için 40 ve 96 örneği aynı anda çalışabilen modelleri mevcuttur. Kuyulardaki bakterilerin optik tespiti için fotosensörlerin ve renkli dönen bir lamba düzeneğinin kullanımına dayanan kolorimetrik okumaları kullanır (MicroScan WalkAway 1996). Diğer otomatize sistemlerle benzer şekilde, kuyucuklara bakteriyel süspansiyonun inoküle edilmesi ile yeniden sulandırılan ve ayrı ayrı oyuklarda üreme olup olmadığını belirlemek için inkübe edilen ortamlarla birlikte kurutulmuş farklı konsantrasyonlardaki antibiyotikler bulunur. Bu sistemdeki bakteriyel üremesinin tespiti için eşik konsantrasyonu 2×10^7 CFU/ml'dir (MicroScan WalkAway 1996).

Böylece, hızlı büyüyen organizmalar için ADT profilleri 4.5 ila 7 saat arasında belirlenirken, aynı zamanda yavaş üreyen organizmalar için 18 saate kadar sürebilir. Sistem, hem mikrobiyal tanımlama hem de ADT tespitini sağlayabilir. Aynı zamanda geleneksel ve özel panellerin aynı anda tek bir platformda işlenmesini sağlar. Otomatikleştirilmiş sistemler artık kullanım kolaylığı ve sorunsuz iş akışı nedeniyle klinik laboratuvarlarda rutin olarak kullanılmaktadır. Bu sistemler, belirsizliği manuel yöntemlere göre sonuç yorumlarından elimine eder ve numune kullanım sürelerini azaltır. Bununla birlikte, saf bakteriyel izolatlara ihtiyaç duydukları ve sonuçların yorumlanması için optik yöntemler kullandıkları için, antibiyotik duyarlılık profilleri elde etmek için tipik olarak manuel yöntemlerle aynı zamanda kullanılırlar. Bu nedenle, araştırmacılar tarafından MİK değerlerini belirlemek için harcanan süreyi önemli ölçüde kısaltmayı amaçlayan yeni antibiyotik duyarlılık

testleri elde etmek için yenilikçi teknikler araştırılmakta ve saf izolatların elde edilmesine olan bağımlılığı azaltmak için daha yeni yöntemler geliştirilmektedir (Puttaswamy et al. 2018).

2.3.3 Yeni kullanıma giren sistemler ve teknolojiler

Bu sistemler şu anda klinik laboratuvarlarda kullanılmak üzere ticarileşme sürecinde olan teknolojilerdir. Bu yöntemler daha hızlı ADT sonuçları elde etmek için örnek işlem sürelerini azaltmaya odaklanmaktadır. Bu metodolojilerin, avantajları ve dezavantajları bulunabilmektedir.

2.3.3.1 BacterioScan™ FLLS

Bu, ADT'nin erken belirlenmesi için ortaya çıkan teknolojilerden biridir ve ileri lazer ışık yayma teknolojisini (FLLS) kullanır. Bu sistem, sıvı numunelerindeki optik yoğunluk (OD) partiküllerin konsantrasyonunu ve aynı zamanda lazer ışınının yakınına dağılmış yoğunluğu ölçmek için bir lazer ışık kaynağı kullanır. FLLS kullanımı nedeniyle OD, ~10.000 CFU/ml'lik düşük bakteri konsantrasyonlarında sonuç verebilir. Bu sayede geleneksel yöntemlerden 2 logluk dereceye kadar daha düşük bir bakteri sayısında doğru olarak ölçüm yapabilir (Hayden et al. 2016). Sistem 16 örneğe kadar aynı anda çalıştırılabilir, doğru yoğunluk değişimi ölçümleri için her 3 dakikada bir ölçümler otomatik olarak yapılır. Bu sistem başlangıçta idrar tahlili için geliştirilmiştir. Şimdi ise antibiyotik duyarlılık testi için kullanılmak üzere adapte edilmiştir. Bu teknolojiyi kullanarak, sistem hızlı büyüyen mikroorganizmalar için yaklaşık 6 saat içinde sonuç verebilir. Yavaş büyüyen organizmalar için 18 saate kadar sürebilir.

Bu yöntem BMD ve VITEK® sistemleri ile karşılaştırılmıştır ve sonuç yorumlamaları konusunda yüksek oranda benzerliğe sahiptir. Mevcut mikrodilüsyon sistemlerinin yerini alma potansiyeline sahiptir ve problemlerin ya da markerlerin kullanımıyla sınırlı değildir. BacterioScan™ FLLS'nin ana dezavantajı, numunelerdeki canlı ve ölü bakterileri ayırt edememesidir ve bu nedenle okumalardan arka plan ve taban çizgisi bozulmalarını gidermek için iyi istatistiksel analiz ve matematiksel modelleme gerekli olacaktır (Puttaswamy et al. 2018).

2.3.3.2 Smarticles™ Technology

Bu yöntem, ticari bir ürün olarak (Roche, A.B.D.) tarafından geliştirilen ve antibiyotik duyarlılığını belirlemek için kullanılan, moleküler tanıya dayalı hızlı bir yöntemdir. Teknik, sentetik olarak tasarlanmış plazmidlerle birleştirilmiş belirli bakteriyel cinslere spesifik olarak bağlanabilen, kopyalanmayan bakteriyofajların içindeki DNA problemlerini kullanır. Bu plazmidler, ilaca dirençli bakterilerle temas ettiğinde aktive olan lusiferaz genini içerir (Opens Helix 2015). Lusiferaz aktivitesindeki artış, numunedeki bakteri sayısındaki artışla doğrudan ilgilidir. Bu yöntem farklı antibiyotik konsantrasyonlarına sahip bir antibiyotik duyarlılık panelinde kullanıldığında, MİK belirlenebilir. Bu yöntemin temel avantajı, antibiyotik duyarlılık panellerinin, bakteriyel izolasyon ihtiyacını atlayarak, doğrudan pozitif kan kültürü örneklerinden MİK belirlenmesi için kullanılabilmesidir. Geliştiriciler, Smarticles teknolojisini kullanarak 4 saatten daha kısa bir sürede antimikrobiyal duyarlılık sonucu verdiğini iddia etmektedir. Böylece hekimlerin hastalarına erken verilecek en iyi antibiyotik tedavisini seçmek için gerekli bilgiyi verebilmektedir (Puttaswamy et al. 2018).

2.3.3.3 Hızlandırılmış Pheno™ Sistemi

Bu sistem doğrudan hasta numunelerinden ADT'nin belirlenmesi için FDA tarafından onaylanan ilk sistemdir. Bu cihaz hızlandırılmış tanı amacıyla geliştirilmiş tam otomatik bir ADT sistemidir. Otomatik bir numune hazırlama aşaması bulunur, bu aşamada numune bir jel elektro-filtresinden geçirilir ve kan hücrelerini, kültür ortamını ve diğer kalıntıları ayırıp bakteri ve maya hücrelerini tutar (Chantell 2015). Saflaştırılmış mikrobiyal hücreler, immobilize edildikleri çok kanallı kasetlere sokulan kültür ortamına salınır. Bu kanalların her biri farklı konsantrasyonlarda farklı antibiyotikler içerir. Immobilizasyon noktasında, hücrelerin üremesini kaydetmek için zaman içerisinde her 10 dakikada bir hücrelerin görüntülenmesi için karanlık alanlı bir mikroskop kullanılır. Bu görüntüler daha sonra özel yazılımları kullanılarak analiz edilir ve MİK değerleri belirlenir. Bu otomatik sistem yaklaşık 7 saat içinde hem identifikasyon hem de ADT sonuçlarını verebilmektedir (Ferraro 2000). Bu sistem hızlıdır ve saf izolatlarla olan ihtiyacı ortadan kaldırarak pozitif kan kültürlerini doğrudan kullanabilir. Bu sayede önemli zaman tasarrufu sağlar.

Bununla birlikte, bu otomatik sistem mevcut haliyle bir seferde sadece bir numuneyi işlemekten geçirebilir ve bu nedenle klinik iş akışını yavaşlatabilir. Teknisyenin, bir sonraki numunenin girilmesinden önce raporlanacak ilk numunedeki sonuçları beklemesi gerekebilir, bundan dolayı hızlı ADT yapılan süre boyunca cihaz başka bir işlem için kullanılamaz.

2.3.3.4 LifeScale® Sistemi

Affinity Biosensors tarafından geliştirilen LifeScale® sistemi, üzerinde bakteri süspansiyonunun geçtiği mikro-konsolları kullanır. Hücreler rezonatörden geçtikçe, sensör titreşimi frekansı değişir, bu titreşimler sensör tarafından ölçülür ve bakterilerin biyokütlesiyle ilişkilendirilir. Bireysel biyokütle ve numune hacmi başına mikroorganizma sayısının (konsantrasyon) ölçülmesiyle, kişi bu mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılık sonucunu doğru bir şekilde belirleyebilir (Schneider et al. 2001). Herhangi bir antibiyotik içermeyen numunelerde, toplam biyokütle zamanla artacaktır. Kritik konsantrasyonlarda (MİK) veya üzerinde antibiyotik konsantrasyonları olan numunelerde ise toplam biyokütle ve ortalama mikrop kütlelerinde gözlenen bir kayıp olacaktır. Böylece, bu değerleri farklı zaman noktalarında karşılaştırarak, sistem belirli bir bakteri-antibiyotik kombinasyonu için direnç/duyarlılık profillerini belirleyebilecektir. Bu yöntem doğrudan pozitif kan kültürü örneklerinden ve bakteri konsantrasyonlarının 10^4 CFU/ml'nin üzerinde olduğu idrar örneklerinden sonuç almak için kullanılabilir. Elde edilen sonuçlar, bakterilerin ikiye katlanma zamanına doğrudan bağlıdır ve bu nedenle sonuçları elde etmek için geçen zaman değişebilir. Bölünme süresi 20-30 dakika olan hızlı büyüyen bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ~3-4 saat alırken, yavaş üreyen bakterilerde daha uzun sürebilir.

2.3.4 Gelecek teknolojiler

Bilimsel gelişmeler her alanda son hızla devam etmektedir. Gelişen teknoloji neticesinde hasta sonuçlarının daha iyi, daha hızlı ve daha doğru verilmesiyle daha iyi yaşam kalitesi sağlanır. Bu nedenle, mevcut teknolojileri iyileştirmek ve

hastalıkların daha iyi, daha güvenli ve daha hızlı teşhisi için yenilikçi metodolojiler geliştirmeye sürekli bir ihtiyaç vardır. Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenme sürelerini daha hızlı sonuçlandırmayı hedefleyen geliştirilmekte olan birkaç yeni yaklaşım bulunmaktadır. Klinik laboratuvar ortamına kolay entegrasyon için azaltılmış manuel numune işlemleri de hedeflenmektedir.

2.3.4.1 Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) konsolu:

AFM konsol yöntemi, konsolun düşük frekanslı dalgalanmalarını kullanarak bakterilerin gerçek zamanlı fiziksel aktivitesini karakterize eder. Antibiyotik duyarlılığı belirlenecek bakteriler konsolun yüzeyinde hareketsiz hale gelir. Daha sonra hareketleri konsol dalgalanmalarının genliğinde bir artışa neden olur. Bu dalgalanma, algılama haznesi sensörleri tarafından kaydedilir. Bakteriler, duyarlı oldukları antibiyotiklere maruz kaldıklarında aktiviteleri azalır, bu da konsol dalgalanmalarında bir karşılığa denk gelen bir azalmaya yol açar (Longo et al. 2013). Bu, bakterilerin duyarlı olduğu veya üzerindeki spesifik antibiyotik konsantrasyonlarını tanımlamak için kullanılabilir. Geliştiriciler bu paterni antibiyotikleri bakterilere 15 dakika içerisinde maruz bırakarak belirleyebilmişlerdir. Dirençli bakteriler, ya konsolide dalgalanmalarında bir artış ya da metabolik şok nedeniyle aktivitedeki ilk düşüşü ve ardından normal hücresel aktiviteye geri dönüşü gösterirken; duyarlı suşlar, aktivitelerinde bir azalma göstermiştir. Bu yaklaşım bir saat içinde hızlı büyüyen bakterilerin ADT profillerini belirleyebilir ve günümüzdeki en hızlı yöntemlerden biridir. Bu işlem kantitatif antibiyogramları geliştirmek için kullanılabilir. Bununla birlikte, bu umut vaat eden metodolojinin saf bakteri izolatlarına veya ön işleme tabi tutulması gerekebilmektedir. Çünkü doğrudan hasta numunelerinde diğer bakteri dışı hücrelerin varlığı bakteri immobilizasyonunu veya konsol dalgalanmalarını etkileyebilir.

2.3.4.2 Mikroakışkan agaroz kanalı (MAC) sistemi

Bu sistem, ADT'yi belirlemek için agaroz ortamında immobilize edilmiş bakteriler kullanır. Bakteriler sıvı agaroz ile karıştırılır ve daha sonra onları kanalın içinde hareketsiz hale getiren mikroakışkan kanala enjekte edilir. Broth ve antibiyotiklerin agaroz matrix içine yavaşça yayılması için bir kılcal kapak kullanılır. Bu matriksin bölümü mikroskop kullanılarak gerçek zamanlı olarak izlenir. Bu şekilde elde edilen tek bakteri zaman atlamalı görüntüler, farklı antibiyotik konsantrasyonları varlığında bakterilerin üremesini belirlemek için işlenir. Bu yöntem, 3 standart CLSI suşunun MİK değerlerini 3-4 saat içinde belirlemek için denenmiştir ve sonuçlar, MAC sistemi kullanılarak elde edilen MİK değerleri arasında CLSI standartlarımla iyi bir korelasyon sergilemiştir (Choi et al. 2013).

Bu yöntem, test edilen suşlar için hızlı olmasına rağmen, yöntem bakterilerin sayısının iki katına çıkma süresi ile sınırlıdır. Örneğin, *S. aureus*'a karşı florokinolon grubundan bir antibiyotik olan norfloksasin için 7 saat sürmüştür. Bu durumun nedeni ise *S. aureus*, MİK değerlerinin üzerindeki antibiyotik varlığında üreme hızı yavaşlama eğilimindedir. Bu nedenle, yavaş üreyen bakteriler için MİK değerleri potansiyel olarak 4 saatten daha uzun sürebilir. Ayrıca, bu yöntemin doğrudan hasta numunelerinden kullanılıp kullanılamayacağı veya saf mikrobiyal kültürleri izole etmek için ön işlem yapılması gerekip gerekmediği de açık değildir.

2.3.4.3 Yüzeyle geliştirilmiş raman spektroskopisi (SERS)

Bu yöntem, anodik alüminyum oksidin nano kanallarına gömülü iki boyutlu altıgen olarak paketlenmiş gümüş nano parçacıklara dayanan bir Yüzeyle Geliştirilmiş Raman Spektrumu (SERS) substratı kullanır. Bu yöntem antibiyotiklere karşı bakteriyel MİK'in belirlenmesi için SERS spektroskopik biyobelirteçlerini tanımlayabilir. Numunedeki bakteriler belirli bir konsantrasyonda bir antibiyotik varlığına duyarlı olduğunda, SERS paterni zamanla genlikte azalırken, dirençli suşlar spektral paternlerinde önemli bir değişiklik göstermez. Geliştiriciler, *S. aureus* için oxacillin ve *E. coli* için imipenem'in spektral düzenindeki değişikliğini 2 saat içinde göstermişlerdir (Liu et al.2016). Ayrıca, antibiyotiğin etkisiz olarak kabul

edilebileceği ve altında duyarlı oldukları düşünölen spektral sinyal oranlarının kırılma değerini belirlemişlerdir.

Bu kırılma noktası değeri, MİK değerlerini belirlemek için de kullanılmıştır ve standart broth dilüsyon yöntemi ile majör hata olmadan iyi korelasyon göstermiştir. Antibiyotik tedavi protokollerini ve metodolojisini optimize ederek, tedavi süresini bir saate kadar azaltabilirler. Bununla birlikte, hali hazırda tanımlanmış olan kesme noktası değer, yalnızca seçilen bakteri-antibiyotik kombinasyonlarına dayanmaktadır ve klinik olarak ilgili bakteri ile yapılan yeni çalışmaların, ya yeni bir kesme noktası belirlemek ya da mevcut kesme noktası değerlerinin tüm durumlar için geçerli olduğunu tespit etmesi gerekmektedir. Bu yöntem, ADT tayini için hasta numunelerinden ADT sonuçlarını elde etmek için geçen süreyi geciktiren saf bakteri kültürleri gerektirmektedir.

2.3.4.4 FAS testi (Hızlı ADT yöntemi)

Bu işlem, kanal içindeki bakterileri yakalayarak, bunların görüntülerini kaydetmek ve antibiyotiklerin tek tek hücreler üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla mikroskopik görüntüleme ile hücre üremesini izlemek için mikroakışkan kanalları kullanır. Üreme hızı hesaplamaları, referans sıralarında (herhangi bir antibiyotik içermeyen) ve tedavi sıralarında (farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren) her bir hücre tuzağı için yapılır. Üreme hızını referans popölasyona göre ortalayarak ve normalleştirerek, antibiyotiklerin bakteri popölasyonlarına yanıtını tespit edebilirler (Baltekin et al. 2017). Bu yöntem, Üriner Sistem Enfeksiyonları (İYE) için yaygın olarak kullanılan dokuz farklı antibiyotiğe göre ADT *E. coli* duyarlılığını belirlemek için kullanılmıştır. 30 dakika içinde direnci saptamak için metodu yüksek özgülöklö klinik izolatlara genişletebilmektedir. Bununla birlikte, bakteriler arasında üreme paternleri gözlemlediklerinden, ADT için geçen zaman bakterilerin sayısının iki katına çıkma esasına bağlıdır ve dolayısıyla yavaş büyüyen bakteriler için bu süre yüksek olabilmektedir. Bu yöntem, ADT için hastaların doğrudan idrar örneklerini kullanabilmekte, ancak diğer vücut sıvıları için saf kültürlere ihtiyaç duyabilmektedir.

2.3.4.5 İzotermal mikro kalorimetri (IMC)

IMC, bakteri üremesini veya bakterinin olmamasını belirlemek için süspansiyondaki belirli bir bakteriyel numunenin ısı akış hızını ölçer. Üretilen ısı, süspansiyondaki reaksiyon hızıyla orantılı olduğundan, antibiyotiklerin bakteriler üzerindeki etkisini belirlemek ve ardından MİK'i belirlemek için antibiyotik varlığında veya yokluğunda bakteriyel süspansiyonun elde ettiği ısı parmak izleri kullanılır (Von Ah et al. 2009). MİK belirleme dışında, bu yöntem ayrıca antibiyotiğin bakteriler üzerindeki bakteriyostatik ve bakterisid etkilerini ayırt etmek için de kullanılabilir. Elde edilen ısı eğrileri, üremenin başlangıcında bir gecikme meydana getirirse, doğal bakteriyostatik olarak adlandırılırlar. Tespit edilebilir bir ısı akışı, belirli bir bakteri konsantrasyonunda antibiyotiğin etkisizliğini ifade eden önemli bir ısı sinyali üretmek için yeterli sayıda bakteri bulunduğunu gösterir. Bu yöntem bakterilerde ısı akışı ve antibiyotik ısı eğrilerinin kombinasyonuna dayanarak, aynı zamanda antibiyotiğin hücre duvarı sentezi, DNA veya protein sentezi inhibitörleri gibi farklı etki modlarına göre gruplandırılabilir. Yeni antibiyotiklerin belirlenmesinde ve sınıflandırılmasında ve ilaçların keşfedilmesinde potansiyel olarak yararlı bir araç olabileceği belirtilmiştir. Bununla birlikte, MİK sonuçlarını elde etmek için geçen zaman ~24 saattir ve bu nedenle daha hızlı ADT sonuçları gerekliyse avantajlı olmayabilir. Örnekte başlangıçta düşük sayıda bakteri sayısı nedeniyle ısı üretiminin başlangıcında gecikmeler olabilir ve bu durum etki şekli veya MİK tayininin yanlış yorumlanmasına yol açabilir.

2.3.4.5 Mikroakışkan elektrik empedans spektroskopisi (m-EIS) sistemi

Bu yöntem bakteri ve antibiyotik içeren süspansiyonun kapasitansındaki değişimi belirlemek için geniş bir frekans aralığında empedans ölçümleri kullanır. Bir Alternatif Akım (AA) elektrik alanı varlığında, özel olarak tasarlanmış mikroakışkan kanallarında bulunan bakteriler, membranları boyunca yük depolayabilir ve bu nedenle kapasitörler olarak işlev görebilir. Kanaldaki bakteri sayısının artmasıyla, süspansiyonun kapasitansının arttığı belirtilirken, bakterilerin ölmesiyle (antibiyotiklerin MİK değerlerinin üstünde olması durumunda), membran potansiyellerini yitirdikleri ve bunun sonucunda süspansiyonun kapasitansını azalttığı belirtilmiştir. Sonuç olarak, bakteri antibiyotik içeren süspansiyonun

kapasitansı düşecektir. Bu, elektrik sinyallerinde bir azalma olarak görülebilir. Bu nedenle, zaman içinde veya sinyalde bir azalma gözlemlendiğinde sinyalde herhangi bir değişiklik görülmeyen antibiyotik konsantrasyonu, bunların MİK'leri olarak kabul edilir. Sistem, bakterilerin iki katına çıkma süresi ile sınırlı olan bakteriyel üremeyi görmek için beklemek zorunda olmadığından, ancak antibiyotiklerin varlığında bakteriyel ölümü tespit etmesi gerektiğinden, daha hızlı ADT profillerine yol açabilir (<4 saat) (Puttaswamy et al. 2012). Yöntem ayrıca antibiyotiklerin numuneler üzerindeki bakterisid ve bakteriyostatik etkilerini ayırt edebilir ve saf izolatlarla ihtiyaç duymadan doğrudan numunelerden yapılabilir. Bu sistemde henüz az sayıda standart bakteri suşları çalışılmıştır ve deneme aşamasındadır. Zaman kazanımını belirlemek için klinik izolatlar ile ileri testler ve metodun otomasyonu gerekmektedir.

2.4 FLOW SİTOMETRİ (FCM)

2.4.1 Flow sitometri tarihi

İlk otomatik hücre sayacı Moldavan tarafından geliştirilmiştir ve bu cihaz, ışık değişimine göre boyanmış hücrelerin geçişini kaydeden ve bunu bir fotoelektrik dedektör ile sağlayan optik bir mikroskop altına monte edilmiş bir kılcal borudan oluşmaktadır (Errante et al. 2015). Bir parçacığın bir iğnenin içinden geçmesinden kaynaklanan voltaj değişimini temel alan bir hücre sayacı geliştirmiş; daha sonra, diferansiyel hücre tespiti için bir mikroflorimetrik tarayıcı kullanarak tekniğin tespit kapasitesini artırmıştır (Errante et al. 2015). Tekniğin evrimi numunelerin bir ışık kaynağı tarafından tespit edildiği bir kılcal kanal boyunca sıvı akışındaki (kılıf sıvısı) hücrelerin geçişine dayanan bir akış kanalı geliştirdiğinde elde edilmiştir (Errante et al 2015). Otomatik hücre sayacı teknolojisini kullanarak, mavi ve kırmızı ışık için gözle görülür ışık ve dedektörler kullanarak, hücrelerin ayrılması başarılı (kırmızı boyanmış (eritrositler), mavi boyanmış (lökositler)) ve ilk diferansiyel hematoloji sayacını geliştirmiştir (Errante et al. 2015). Daha sonra Katmentsky, hücre süspansiyonunun bir mikroskop lamı içinde bir kanaldan geçtiği ve hücre DNA'nın boyutunu ve miktarını ölçebilen bir cihaz olan Hızlı Hücre Spektrofotometresini (RSC) icat etmiştir. Bu yeni prosedür, kanser hücrelerinin araştırılması için önemli olan DNA miktarına dayalı hücre sayımı kapasitesini

artırmıştır (Kamentsky et al.1965). Van Dilla ve arkadaşları tarafından oluşturulan akış kanalını kullanarak ortogonal konfigürasyona sahip ilk flow sitometri tanımlanmış ve DNA kantitasyonunda floresan yoğunluğu ve ploidi arasındaki ilişki gösterilmiştir. G0/G1, S ve G2M (Van Dilla, hücre devresi fazlarını tarif etmek için) histogramlar oluşturulmuştur (Van Dilla et al. 1967). Bu keşif normal ve malign hücre döngüsü çalışması bilgisini artırmıştır. İki yıl sonra Dittrich ve Gohde flow sitometrisi ile analiz edilen hücrelerde DNA etiketlemesi için etidyum bromür kullanmış ve hücre döngüsü çalışmasına katkıda bulunmuşlardır (Dittrich and Göhde 1969). Lökosit esteraz ve lökosit peroksidazın tespitinde kullanılan enzim substratları tarafından yayılan ışık saçılımını ve farklı dalga boylarını tanımlayabilen ilk flow sitometresi 1974 yılında ticari hale getirilmiştir. Daha sonra Gratzner, hücre döngüsü fazlarının çalışmasında bromodeoksiüridin (BrdU) ve monoklonal antikolar kullanmıştır (Gratzner et al. 1975). Loken ve ark 1977'de, flow sitometrisindeki sinyalleri, floresan izotiyosiyanat (FITC) ve tetramethylrhodamine (RD) ayırt etmek için elektronik kompensasyon kullanarak tek bir lazer ışınıyla aynı anda iki hücre yüzey antijenini ölçmüşlerdir (Loken et al. 1977). Bu gelişme flow sitometrisi teknolojisi için ileri atılmış bir adımdır. İmmünohistokimyasal çalışmalar ile sınırlı olmadan, insan T hücresi alt gruplarını yüzey antijenlerine göre ve B hücre fenotiplemesini tanımlamak için monoklonal antikoların kullanılabilceği gösterilmiştir (Hoffman et al. 1980, Hardy et al. 1982). Son yıllarda, teknolojik gelişmeler, akademik çalışmalar, devlet kurumları ve araştırma departmanı için mevcut, laboratuvar rutinde kullanılmak üzere temel özelliklere sahip daha küçük cihazların ve daha hassas olan parçacıkların farklı özelliklerini ölçebilen daha karmaşık cihazların geliştirilmesine yol açmıştır. Bu gelişme aşamalarında, reaktiflerin ve florokromların kullanım amacı ve sayısı artmıştır. Flow sitometri teknolojisi böylece, tek tek hücrelerden kantitatif ve kalitatif bilgi ararken etkili, doğru ve kesin bilgiler verebilecek hale getirilmiştir. (Waller et al. 2001).

2.4.2 Flow Sitometri Çalışma Prensipleri

Flow sitometri, hidrodinamik, optik, elektronik ve hesaplamalı bir sistem kullanarak tek tek parçacıkları veya hücreleri analiz eden bir araçtır (Tung et al. 2007). Sürekli akış halinde parçacıkları ve hücreleri bir hidrodinamik odaklama odasına (akış

hücre) iten bir hava pompasını içerir; konik şekli nedeniyle parçacıkların veya hücrelerin çaplarını 250 kronluk bir kılcal kanalın içine ve kanal ağzına doğru yerleştirilmesini ortalama 10 m/s hızında akım ile zorlar. Bu, parçacıkları veya hücreleri, tek tek analiz edilecek olan kılcal kanalda tek tek hizalar (Errante et al. 2015). Karakterizasyon için, her partikülün, monokromatik emisyonu sahip, düşük sinyal-gürültü oranı, yüksek spektral saflıkta olan ve kararlı olan lazer gibi bir ışık kaynağı tarafından uyarılması gerekir (Pozarowski et al.2006). Sırayla, ışık kaynağı, ışığı yayan ve fotoelektrik transdüserlerin saçılan ışık sinyallerini elektrik sinyallerine dönüştüren hizalanmış her parçacığı uyarır (Marti et al. 2001). Işık, hücrenin morfolojik ve yapısal özelliklerine göre dağılır; frontal veya ileri saçılma forward scatter (FSC), hücre büyüklüğü ile ilişkilidir ve yan saçılma side scatter (SSC) olarak adlandırılan ortogonal veya yan saçılma, sitoplazmik granülerliğe bağlıdır (Salzman 2001). Hücreler florokrom konjuge monoklonal antikorlara sahip olduğundan, lazer uyarımı, spesifik antikorların floresan özelliklerine göre ışık yayımı ile sonuçlanır. Kesişim alanının (hücre-lazer) yakınındaki bir dizi mercekle, dağınık ışığı toplar ve ışık sinyalini PMT (fotomultiplier tüp) tarafından yakalanan dağınık ışık veya floresan ışığın miktarıyla orantılı elektrik sinyallerine dönüştüren PMT'ye gönderir (Tung et al. 2007). Bu ışık sinyallerinin seçilmesi ve toplanması, gelen ışığın belirli dalga boylarını bloke eden ve sadece istenen dalga boyundaki ışığı geçiren optik filtreler tarafından gerçekleştirilir (Wood 2006). Hem verilen dalga boyunu yansıtan hem de başkalarının geçmesine izin veren (dikroik ayna veya filtre) veya istenmeyen dalga boylarını (bariyer) emen farklı filtre tipleri vardır. Bazı filtreler daha uzun dalga boylarının veya daha kısa dalga boylarının (uzun geçiş/LP) geçmesine ve yansıtmasına izin verir ya da engellenmesini sağlar. Bazı filtreler de daha kısa dalga boylarının (kısa geçiş/SP) geçmesine ve yansıtmasına izin verir veya engellenmesini sağlar (Marti et al. 2001). PMT tarafından üretilen elektrik sinyalleri, dijital olarak, hücre boyutu (FSC), hücrenin granülülitesi (SSC), yeşil floresan (FL1), turuncu floresan (FL2), kırmızı floresan (FL3) gibi parametreleri eşzamanlı olarak çevirebilen, özel bir yazılıma sahip olan flow sitometrisine bağlı bir bilgisayarda dijital olarak dönüştürülür (Green and Wachsmann-Hogiu 2015, Herzenberg et al. 2006).

Bazı akış sitometreleri düşük güçlü hava soğutmalı argon lazeri ile donatılmıştır, dört rengi veya daha fazla rengi analiz edebilir. Seçilen hücrelerin bir süspansiyonda fiziksel olarak ayrılmasını (ayırma) gerçekleştirir, yüksek güçlü su soğutmalı ve hava soğutmalı lazerlerle donatılır ve bu sayede aynı anda 18 renge kadar algılayabilir (Baumgarth ve Roederer 2000).

Çoğunlukla flow sitometri cihazlarının lazerleri, hava veya su ile soğutulabilecek sabit, tek renkli, yüksek güçlü bir ışık kaynağı kullanır. En çok kullanılan ışık kaynağı, Fluorescein isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE), piperidin chlorophyll protein cyanine dye (PerCP), CyCrome, propidium iodide (PI), 7-Aminoactinomycin D (7-AAD), annexin V, etidyum bromür, akridin orange, pironin Y, floo-3 ve rhodamin gibi florokromları uyaran 488 nm'de emisyonu sahip düşük yoğunluklu (10-15 mW) hava soğutmalı argon lazeridir (Herzenberg 2002). Helyum-neon lazer (He-Ne) 633 nm emisyonu sahiptir ve florokromları Hoechst, mithramycin ve allophycocyanini uyarmak için kullanılır (Pozarowski et al. 2013). Flow sitometrisindeki temel bir bileşen akış odasıdır (akış hücresi). En çok kullanılan akış hücresi, lazer hücresi işleminde bir kuvars ucuna sahip olan kuvars-duyusudur (Zhu and Ozcan 2015). Kısa algılama, düşük hızlı bir hemodinamik akış haznesinin düşük sinyal/gürültü oranına sahiptir ve çapı 76 veya 100 µm olan deliklere sahip olabilir. Hücre sıralama cihazlarında kullanılırlar. Hızlı kuvars, düşük sinyal/gürültü oranına ve numunelerin yüksek hızlı hücre sınıflandırma cihazlarında kullanılan sıralama algısı tipinden daha hızlı geçişine sahiptir. Lazeri hava soğutmalı veya soğutulmuş lazerlerdir. Hipersort algılama kuvarısı, düşük sinyal/gürültü oranına, daha yüksek geçiş hızına ve yüksek akış basıncı altındaki hassasiyeti arttırmak için bir lense sahiptir (Nunez 2001).

2.4.3 Flow Sitometrinin Mikrobiyolojide Kullanımı

Flow sitometri tekniklerinin mikrobiyolojiye yönelik uygulamaları, yeni geliştirilen floresan boyalardan kaynaklanmaktadır. Steen grubu tarafından 1979'da bir ark lambasına dayalı cihazın geliştirilmesi, bakterilerin temel araştırması için FCM'nin

kullanılmasını sağlamıştır (Steen 1986, Steen and Lindmo 1979). Akış kanalının tasarımı ve dağılık ışığın tespitinde foto-çoğaltıcı tüplerin kullanılması ile FCM mikroorganizmaları incelemek için oldukça uygun hale gelmiştir (Allman et al. 1992, Boye and Steen 1983). Boye ve Steen'in 1983 yılında geliştirdiği ümit verici cihazlar, 1990'larda mikrobiyolojide önemli hale gelmiştir (Boye and Lobner-Olesen 1990). Mikrobiyolojide kullanılan ticari flow sitometrilerin çoğu David Lloyd tarafından geliştirilmiştir. 1990'ların son yıllarında, FCM'nin mikrobiyoloji alanındaki uygulamaları önemli ölçüde artmıştır (Lloyd 1993). Yirmi birinci yüzyılın başlarından itibaren flow sitometrisi medikal mikrobiyolojinin dışında da sıkça kullanılmaya başlanmıştır (Robinson 2018). Bu alanlar gıda mikrobiyolojisi, su mikrobiyolojisi gibi alanlarda hızlı bir şekilde sonuç alması gibi nedenlerden dolayı tercih sebebi olmuştur.

2.4.4 Antimikrobiyal Etki ve Duyarlılık Testlerinin Flow Sitometri yöntemi ile Çalışılması

FCM'nin prokaryotlardaki antimikrobiyal ajanların etkilerini incelemek için kullanıldığı ilk deneyler 1980'lerin başında yapılmıştır (Hutter and Oldiges 1980, Steen et al. 1982, Steen et al. 1990). FCM' nin florokromlarla kombinasyon halinde geliştirilmesi, mikrobiyal popülasyonlar içindeki bireysel canlılığın ve fonksiyonel kapasitenin (membran potansiyeli ve metabolik yollar) değerlendirilmesine izin vermiştir. Bu gelişmeler, araştırmacıların FCM uygulamaları içinde duyarlılık testi yapma olasılığını keşfetmelerini sağlamıştır. Ayrıca, bu tekniğin rutin duyarlılık testi için klinik laboratuvarlarda kullanılması önerilmiştir. Çünkü bu yaklaşımın sadece birkaç saat içinde güvenilir bir şekilde antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarını verebileceği öngörülmüştür.

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakterilerin in vitro duyarlılık testlerini gerçekleştirmek için standart yöntemler bulunmaktadır (Ferraro and Jorgensen 1995). Niteliksel ve/veya niceliksel sonuçlar, inhibisyon bölgesinin veya MİK'in büyüklüğüne göre verilir. MİK tabanlı broth mikrodilüsyon sistemlerinin otomasyonuna rağmen, antimikrobiyal aktivitenin ölçülmesinden önce 18-24 saatlik bir inkübasyon süresi gerekir. Son zamanlarda, florojenik, türbidometrik ve kolorimetrik teknoloji duyarlılık testlerini 4-6 saate kadar indirebilmiştir (Doern et al.

1994, Ferraro and Jorgensen 1995, Puttaswamy et al. 2012). Bununla birlikte, bakteriyel inokulum miktarı ölçülmedikçe, yalnızca bakteriyostatik etki, yani MİK genellikle klinik laboratuvarlar tarafından test edilir. Antimikrobiyal ilaçların bakterisid etkisini gösteren minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK) nadiren belirlenir. MBK ölçümü, bakteri kültürü dilüsyonlarını ve alt kültürleri içeren, genellikle CFU olarak ifade edilen bakteri sayımlarının hesaplanmasını gerektirir. Ek olarak, ne MİK ne de MBK tespitleri bakteri popülasyonlarının heterojenliğini dikkate almaz. Benzer şekilde, antimikrobiyal aktiviteye dayanan farmakodinamik veriler sunan postanibiyotik ve önleyici konsantrasyon etkilerini de yorucu ve zaman alıcı olduklarından klinik laboratuvarlarda nadiren belirlenmektedir (Fuursted 1995, Lorian et al. 1989) . FCM'nin, bazı metabolik parametreler (membran potansiyeli, hücre büyüklüğü ve DNA miktarı) üzerindeki etkisinden dolayı, antimikrobiyal ajanların bakteriyel hücreler üzerindeki fizyolojik etkilerini incelemek için çok faydalı olduğu kanıtlanmıştır. Ek olarak, FCM, bakterisid veya bakteriyostatik etki açısından sonuçlar sunan antimikrobiyal duyarlılık testi için güvenilir bir yaklaşım olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (Gant et al 1993, Martinez et al 1982, Walberg et al. 1997).

2.4.4.1 Bakteriyel antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi

FCM de floresans boyalar kullanılarak, süspansiyon içindeki hücrelerin ışık saçılımını ve hücresel içeriklerin veya metabolik aktivitenin floresansını ölçer. Bu nedenle, antimikrobiyal ajanların aktivitesi, hücre şeklindeki ve floresanstaki değişiklikler açısından da tarif edilebilir (Pore 1994, Walberg et al. 1996, Walberg et al. 1997). Bu anlamda, ışık saçılımının, etki mekanizmalarına bakılmaksızın, antimikrobiyal etkilerin yararlı bir parametresi olduğu gösterilmiştir (Mason et al 1994, Gant et al. 1993).

Flow sitometri, tek tek hücreleri analiz eder, böylece örnek heterojenliğinin belirlenmesine izin verir (Muller and Davey 2009). Canlılık, tek bir hücrenin bir özelliği olduğu için, bunun gibi bir yaklaşım, anlamlı sonuçların elde edilmesi için şarttır. Ancak FCM'de mikroskopinin aksine saniyede binlerce hücre analiz edilebilir. Buradaki temel prensip; flow sitometredeki ölçüm noktasında hücre akımı bir veya daha fazla ışık kaynağından (lazerler ve ark lambaları) bir ışık demeti ile

kesilir, ışık dağılır, bunun sonucunda hücrelerden floresan yayılır ve yayılan ışık dalga boyuna göre ayrılabilir (Davey 2011). Floresan problemlerin uyumlu (spektral olarak farklı) kokteyllerinin özenli seçimi ile hücrelerin alt popülasyonlarını ilgilendiren, özelliklere göre ayıran floresan boyaların alımını ölçmek için multiparametrik ölçümler kullanılabilir. Canlılık ölçümleri söz konusu olduğunda bu metabolik aktivitenin, membran enerjilendirilmesinin, RNA ve/veya DNA içeriğinin, membran geçirgenliği gibi özelliklerin ölçülmesini içermektedir. Tek bir hücre seviyesindeki bu hızlı analiz, çoklu hücre özelliklerinin dağılımını belirleyerek, "maksimum yaşayabilirlik" ten ölüme ve potansiyel olarak bozulmaya kadar olan bir spektrumda karakterize edilebilen hücrelerin alt popülasyonlarının tanımlanmasına izin vermektedir. İşlem prensip olarak basit olmasına rağmen, mikrobiyal canlılık ölçümleri için akış sitometrisinin daha geniş kullanımını sınırlayan iki kısıtlayıcı bloğu vardır. Bunlardan biri flow sitometreye erişimin zorluğu, diğeri ise erişimin sonrasında olan zorluklardır. Birincisi, literatürde tarif edilen floresan boya seçimi, konsantrasyon, boyama süresi, vb. gibi büyük olasılıkların çeşitliliğidir. Bunun nedeni tek bir boya veya boyama yönteminin tüm organizmalar için uygun bulunmadığının tespit edilmesiyle geniş seçeneğin ortaya çıkmasıdır (Davey et al.2004). Birçok seçeneğe sahip olmak bir fayda olabilirken, aynı zamanda karışıklık ortaya çıkarabilir. Bununla birlikte, analiz edilen her bir hücre için çeşitli canlılık ile ilgili parametrelerin denenmesine izin vermek için çoklu boyalar birlikte kullanılabilir. Çoklu boyalar, tek bir boya ile elde edilebilecek veya gerçekten bir besiyeri yüzeyinde üremenin varlığı veya yokluğu ile elde edilebilecek fizyolojik değişikliklerden daha eksiksiz bir resim sağlayacaktır. Canlı bir hücrenin, rodamin 123 ya da fluorescein diacetate ile boyandığında floresan olması beklenir ancak propidyum iyodür veya DiBAC₄ ile boyanmaz (Assunção et al. 2006).

Bu, bakterilerin ve canlılık durumlarının eşzamanlı olarak saptanmasına izin vermiştir. Daha yakın zamanda, birkaç farklı fizyolojik durum olmuştur. SBYR green, PI, etidyum bromür ve DiBAC₄'ün kombinasyonları kullanılarak *Pseudomonas* türleri flow sitometrik yöntemlerle çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Assunção et al. 2006, Nielsen et al. 2009). Burada gösterilen bakteriler normal enerji metabolizmasına sahip bozulmamış hücreler, enerjilendirilmemiş hücreler,

depolarize edilmiş hücreler ve geçirgenleştirilmiş hücrelerdir. Numuneye reaktiflerin eklenmesinin ardından, genellikle analizden toplam sayı ve yaşayabilir sayılarını ayrı ayrı (ve dolayısıyla yaşayabilirlik yüzdesini) sağlamak için inkübe edilirler ve sonra analiz edilirler. Ticari bir ürün olan BacLight, FungaLight ve maya canlılık kiti (Invitrogen) gibi canlı/ölü hücrelerin saptanmasını sağlayan önceden karıştırılmış veya bireysel boyaların bulunduğu kitlerdir. Örneğin, BacLight, Syto 9'u (tüm hücreleri yeşil lekeleyen) ve ayrıca PI'yi (sadece hücre ölümüne neden olacak kadar zarar görmüş zarları olan hücrelere girer) içerir. Böylece, yeşil floresans sinyalinden bir toplam hücre sayımı ve kırmızı floresans sinyalinden ölü bir hücre sayımı elde edilebilir ve böylece canlılık yüzdesinin kolayca saptanması sağlanır (Davey 2011). Spesifik boyama desenleri, Gram negatif organizmaların dış zarının geçirgenleştirilmesi gibi ara hasarlarla ilişkilendirilmiştir (Berney et al 2007). BacLight'ın öncelikle bakteriler için tasarlanmasına rağmen, *Saccharomyces cerevisiae* ile çalıştığı da bildirilmiştir (Zhang and Fang 2004). Bazı flow sitometri üreticileri ayrıca mikrobiyal canlılığı izlemek amacıyla kitler de üretmektedir; örneğin, Becton Dickinson hücre canlılığı kiti, tüm hücreleri lekelemek için tiazol orange ve ölü hücreleri boyamak için PI içerir. Bu yaklaşım, yakın zamanda, konakçı hücrenin parçalanmasının ardından hücre içi *Campylobacter jejuni*'nin canlılığını numaralandırmak ve canlılığını belirlemek için kullanılmıştır (Novik et al 2010).

Dikkate alınması gereken ikinci sınırlayıcı faktör, kitlerin veya bireysel floresan boyaların kullanılmasından bağımsız olarak, bazı yöntem geliştirme veya protokol ayarlarının gerekli olmasıdır. Bu ayarlar özellikle mikroorganizmalar arasındaki yapısal farklılıklardan ve özellikle laboratuvarında yetişemediğimiz bilgi eksikliğimizden dolayıdır. Floresan boyalar hedeflerine ulaşamadıkça istediğimiz gibi çalışmazlar ve hücre duvarlarının, dış membranlarının ve aktif iyon pompalarının karmaşıklığı bunu önleyebilir. Bundan dolayı negatif boyama sonuçlarının hatalı yorumlanmasına yol açar. Bu durum FCM ile yeni çalışmaya başlayanlara, daha önce yapılmış çalışmalardan denenen metotlar, protokoller, belirli flow sitometri donanımı, belirli flow sitometri yazılımı gibi tecrübelerinin aktarılmasıyla telafi edilebilir. Kontrollerin hazırlanması genellikle basittir, ancak çevresel veya stresli numunelerin nihayetinde analiz edileceği durumlarda, beklenen

ölüm modlarına dikkat edilmelidir. Kontrol canlı örnekleri genellikle %100'e yakın canlılığın beklendiği üstel veya erken-durağan-faz kültürlerinden toplanır. Ölü kontrol örnekleri ısıtma işlemi, etanol vb. ilave edilerek elde edilebilir (Davey 2011).

Daha fazla zaman alan protokol geliştirmenin ikinci aşamasıdır. Burada, yayınlanmış bir yöntem mevcut flow sitometri ve ilgilenilen belirli organizmalar ile çalışmak için ayarlanmalıdır. Eğer protokol, canlı ve ölü kontrol numuneleri arasında iyi bir ayırım yapmazsa (ve bilinen canlılıkta karışık numunelerle anlamlı sonuçlar), o zaman deneme yanılma yoluyla ayarlanması gerekir. Genel yaklaşım floresan konsantrasyonunun veya boyama koşullarının, kontroller arasındaki ayırımı artırmak için değiştirilmiş olmasıdır. Alternatif olarak hücrelerin ön işleme tabi tutulması gerekebilir (örneğin, EDTA, Gram-negatif hücre duvarının dış zarını geçirgenleştirmek için kullanılabilir, floresan boya alımını iyileştirir; bir karbon kaynağının eklenmesi olabilir). Bu protokol geliştirme ve optimizasyonun yinelemeli süreci flow sitometride acemi olanlar için oldukça zorlayıcı olabilir.

İster mikroorganizmaları ister makroorganizmaları tartışıyor olsak da, canlı ve öldürülmüş hücreleri ayırt etmek, canlı olan ve yakın zamanda doğal nedenlerden ölenler arasında olanları ayırt etmekten genellikle daha kolaydır. Floresan boyanma durumunda, kontrol canlı ve ölü numuneler açıkça ayrılabilirken, çevresel stresler genellikle heterojen popülasyonlara neden olur, bazı hücreler orta derecede canlılık floresan alımını gösterir (Berney et al 2007, Davey and Hexley 2011). Bir hücre popülasyonu strese maruz kaldığında, stresin büyüklüğüne bağlı olarak, bazı hücrelerin öldürüldüğü, diğerlerinin zarar gördüğü, ancak bazılarının bir fenotipik değişiklik göstermediği gözlemlenebilir. Bu durum heterojen bir tepki olabilir (Kaprelyants 1996). Son zamanlarda, hücreler stres altındayken iyi karakterize edilmiş ökaryotik laboratuvar organizmaları için bile, PI'nin stresin uygulanması sırasında veya hemen membran hasarının oluşması sonrasında hücrelere girebileceği, ancak kısa bir iyileşme süresinin ardından PI hücrelere giremeyeceği şekilde onarıldığı gösterilmiştir (Davey and Hexley 2011).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. ETİK KURUL ONAYI

Çalışmamızın etik kurul onayı; Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulu'ndan, 02.10.2017 tarihli imza ile alınmıştır (Ek 1).

3.2. SUŞLARIN SEÇİMİ

Laboratuvarımız kültür koleksiyonunda bulunan standart bakteri suşlarından, *Escherichia coli* ATCC 25922™, *Klebsiella pneumoniae* 700603™, *Pseudomonas aeruginosa* 27853™, *Enterococcus faecalis* 29212™, *Staphylococcus aureus* 29213™, *Streptococcus pneumoniae* 49619™ suşları ile kan, idrar, balgam vb. gibi klinik örneklerden izole edilen bakteri suşları çalışmaya dahil edilmiştir. Üç adet *Klebsiella pneumoniae* suşu (NDM-1, KPC, OXA-48 pozitif birer izolat), 2 adet *Acinetobacter spp.* (2 adet *A. baumannii* complex), 2 adet *Enterococcus spp.* (*E.faecalis*-VRE pozitif, *E.faecium*-VRE pozitif), 1'er adet *Escherichia coli* (GSBL pozitif), *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (MRSA pozitif) ve *Pseudomonas aeruginosa* olmak üzere toplam 11 klinik izolat incelenmiştir. Klinik izolatlar kütle spektrometresi (VITEK MS, BioMérieux, Fransa) ile identifiye edilmiştir. *Klebsiella pneumoniae* suşlarında karbapenem direnç genleri GeneXpert CARBA-R kiti (Cepheid, A.B.D) ile belirlenmiştir.

3.3 BAKTERİ SÜSPANSİYONLARININ HAZIRLANMASI

Tüm bakteri suşları %5 koyun kanlı agar plaklarına ekildi ve 37°C'de 18 saat inkübe edildi. Her bakteri için tek düşen kolonilerden fotometrik yöntem kullanılarak (DensiCHEK plus, BioMérieux, Fransa) 0.5 Mc Farland yoğunluğunda bakteriyel süspansiyonlar hazırlanmıştır.

3.4 ANTİBİYOTİK DUYARLILIK ÇALIŞMALARI

3.4.1 VITEK® 2 otomatize sistemi ile antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

Laboratuvarımızın günlük rutin çalışmaları sırasında antibiyotik duyarlılık testleri için VITEK® 2 (BioMérieux, Fransa) otomatize sistemi kullanılmaktadır. Hazırlanan bakteriyel süspansiyonları VITEK® 2 AST kartlarından gram negatif enterik bakteriler için AST 327, gram negatif non-fermantatif bakteriler için AST 326 (bu kart GSBL pozitif enterik bakteriler için de kullanılmıştır) antibiyotik duyarlılık kartları kullanılırken, gram pozitif bakterilerden stafilokoklar için GP AST 96, enterokoklar için AST 640, streptokoklar için ise AST ST-03 antibiyotik duyarlılık kartları kullanılmıştır. Antibiyotik duyarlılık sonuçları ertesi gün VITEK® 2 cihazı tarafından otomatik olarak belirlenmiş ve kayıt altına alınmıştır.

3.4.2 Broth mikro dilüsyon yöntemi ile MİK değerlerinin belirlenmesi

Kullanıma hazır antibiyotikli mikropklara (Sensititre, Thermo Scientific™ A.B.D) hazırlanan bakteri süspansiyonları üretici firmanın önerileri doğrultusunda eklenmiştir. Antibiyotikli mikropklarda antibiyotik konsantrasyonları European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) klinik sınır değerlerini kapsayacak şekilde seçildi (EUCAST 2019). Daha sonra fotometrik yöntemle (Densichek plus, Biomerieux, Fransa) 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri solusyonu, son konsantrasyonu 5×10^5 CFU/mL olacak şekilde dilüe edildi ve kuyucuklara eklendi. İnkübasyon sonunda (35-37°C de 16-18 saat) gözle bulanıklığın yani üremenin görülmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu, minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) olarak saptandı (EUCAST 2019). Steril mikropklarda kontrol için antibiyotiksiz (pozitif kontrol) ve sterilite kontrolü için bakteri içermeyen (negatif kontrol) kuyucukları bulunmaktadır.

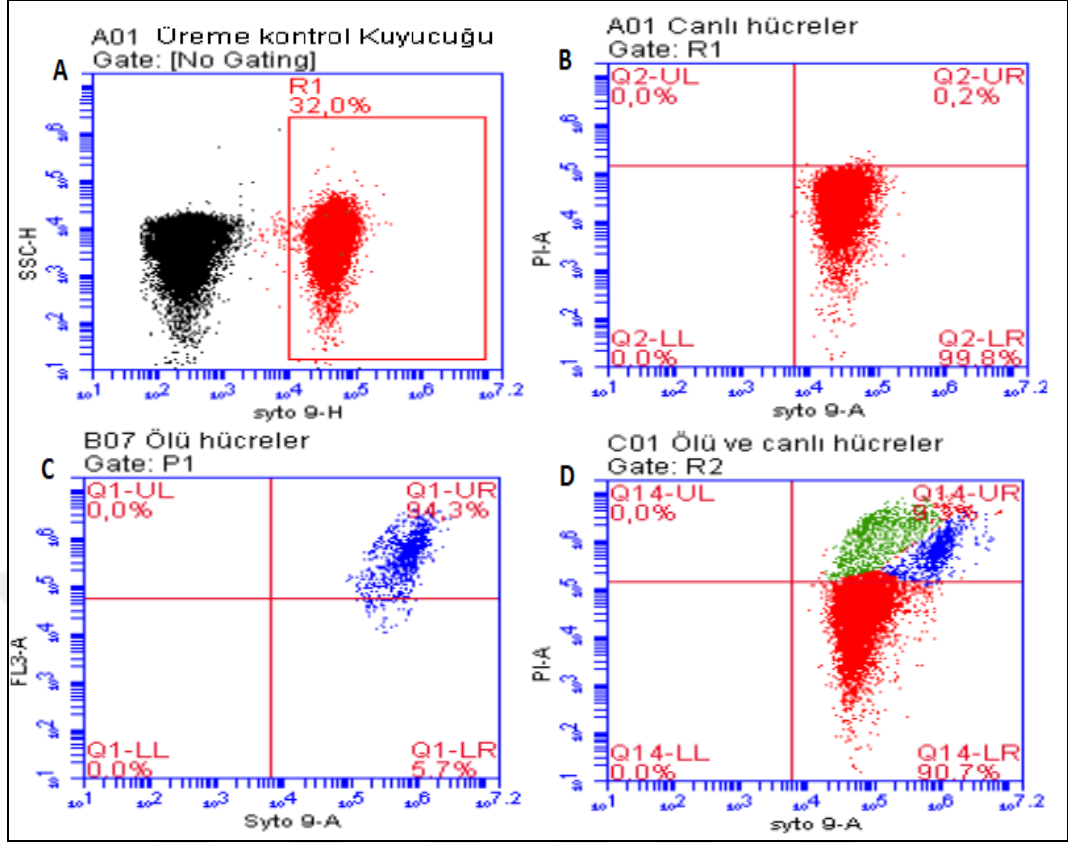
3.4.3 Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla flow sitometrik yöntemin optimizasyonu ve bu yöntemle antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

3.4.3.1 Optimizasyon çalışmaları

Yaptığımız literatür taramaları sonucunda çalışmalarımızda kullanılmak üzere canlı ve ölü bakterileri boyama özelliği olan Syto 9 ve sadece ölü bakterileri boyama

özelliği olan PI boyası seçilmiştir (Berney et al. 2007). İlk deneme çalışmalarında antibiyotik ile öldürölmüş bakteriler, etanol ile öldürölmüş bakteriler ve canlı bakteriler kullanılmıştır. Steril distile su ve boyasız bakteri süspansiyonları okutularak boyasız bakterilerin otofloresan düzeyleri saptanmaya çalışıldı. Bu ön çalışmalardan sonra bakterilerin 0.5 McFarland ayarı yapıldı ve belli oranlarda dilüe edildi. Ölü ve canlı bakteriler, tek başlarına veya belirli oranlarda karıştılarak Syto 9 ve PI ile boyandı. Bu sayede hem Syto 9 boyasının en net görüntülerinin FL-1 kanalında floresan yaydığını hem de PI boyasının en net görüntülerinin FL-3 kanalında floresan yaydığı net olarak görölmüştür. Syto 9 boyası, PI boyası ile birlikte kullanıldığında FL-1 (yeşil floresan) kanalında 10 kata kadar daha fazla floresan ışımaya yaptığı görölmüştür.

Boyanmış bakteri süspansiyonları okutulduğunda SSC-H/FL-H(Syto9-H) dot blot grafiğinde boyanan bakteriler FL-1 kanalında x^4 ve daha fazla ışımaya yaydığı belirlenmiştir. Bunun sonucunda x^4 üzerine kapılama işlemi yapılmıştır. Kapılanan bu alan daha sonra FL3-A/FL1-A dot blot grafiğinde görüntölenmiştir. Bu sayede ölü ve canlı hücrelerin birbirinden ayrılması hedeflenmiştir. Flow sitometride çalıştığımız suşlar için her bakterinin Syto 9 ve PI için farklı miktarda floresan verdiğini saptadık. Doğal olarak bakterilerin karakteristik özellikleri ve boyanma paternleri farklı olduğundan, her bakteri türü için ayrı ayrı kapılama yapılarak yöntem optimize edilmiştir.



Şekil 1. Flow sitometrik yöntemin optimizasyon çalışmalarında yapılan kapılama işlemi ile canlı ve ölü hücrelerin dot blot grafik görüntüleri. **A:** SSC-H/FL1-H(Syto 9-H) kanalında floresan boyalarla boyanmış hücrelerin dot blot grafiğinde kapılama işlemi, **B:** Kapılama işlemi yapılan hücrelerin FL3-A(PI-A)/FL1-A(Syto9-A) kanalında canlı hücrelerin dot blot grafiği görüntüsü **C:** FL3-A(PI-A)/FL1-A(Syto9-A) kanalında ölü hücrelerin dot blot grafiği görüntüsü **D:** Bakteri hücrelerinin antibiyotik ile maruziyeti sonrası FL3-A(PI-A)/FL1-A(Syto9-A) kanalında canlı hücrelerin (kırmızı), ölü hücrelerin (mavi), hasarlanmış hücrelerin (yeşil) dot blot grafiği görüntüsü

Değişik konsantrasyonlarda boyalar kullanılarak optimizasyon çalışmaları sürdürülmüştür. Bu aşamada, yüksek konsantrasyonda floresan boya kullanmanın otofloresan ışımalara yol açarak flow sitometride yanlış görüntülere neden olduğu belirlenmiştir. Düşük konsantrasyonda ise mevcut bakterilerin bir kısmının boyanmadığı belirlenmiştir.

Okutulan tüpteki bakteri sayısı eğer çok fazla sayıda ise boya miktarını artırmamıza rağmen bakterinin antibiyotik duyarlılığını belirlemek için kaliteli dot blot görüntüleri elde edilememiştir. Bakterilerin sayısının 0,5 Mc Farlanda göre 10-100 kat daha az sayıda olmasının daha iyi dot blot görüntüleri oluşturduğunu saptadık. Bu

bakteri sayısı uluslararası kılavuzlarda sıvı mikrodilüsyon testlerindeki bakteri sayısına benzemektedir. Bakteri süspansiyonları okutulurken bir okuma tüpünden diğer okuma tüpüne geçmeden önce 3 kez steril distile su ile yıkama yapılmıştır.

Çalışmamızda kullanılan flow sitometri cihazında istenilen hacim, partikül/bakteri sayısı, süre gibi farklı seçeneklerde okumalar yapılabilmektedir. Yapılan deneme çalışmaları ve literatür taramaları doğrultusunda kapıladığımız alana düşen partikül/bakteri sayısı üst sınırı 10,000 veya okutma tüpündeki bakteri süspansiyonun tümü bitene kadar okutulacak şekilde belirlenmiş olup, tüm antibiyotik duyarlılık testlerinde bu kriterler kullanılmıştır (Nuding and Zabel 2013, Kilic et al. 2016). Bazı bakterilerde 2 saatlik inkübasyon sonrası 10,000 bakteri sayısı sınırına ulaşamadığı görülmüştür. Bunun sebebinin flow sitometri teknolojisinden ve boya almış bakterilerin hepsini okuyamamasından kaynaklandığı tespit edilmiştir.

Boyaların flow sitometri için kullanıma hazır oranda sulandırıldıktan sonra ışıktan korunsun ve +4-8°C’ de saklansa bile 2 hafta sürenin sonunda floresan özelliklerinin kaybolduğu görülmüştür. Bu nedenle her çalışmadan önce -20°C’de alikotlanmış kullanıma hazır boyalar kullanılmıştır. Oda ısısına gelmeden daha sıcak iken çalışılan örneklerin floresan ışımalarının daha az olduğu görülmüştür. Bu nedenle bakteri süspansiyonları etüvden çıkarıldıktan sonra oda ısısına gelene kadar 10-15 dakika beklenmesi gerektiği tespit edilmiştir. Syto 9 ve PI boyaalarının bakterileri boyama süresi literatür taramalarında farklı çalışmalarda 5-15 dakika arasında değişen inkübasyon sürelerinde kullanılmıştır.(Stiefel et al. 2018, Buyschaert et al. 2016). Bu çalışmada optimizasyon çalışmalarında ise en az 10 dakika olarak tespit edilmiş olup optimum süre 15 dakika olarak belirlenmiştir.

Literatür taramalarında bakteri süspansiyonlarının 35-37°C’ de inkübasyon süresi 2 saat olarak ve çalkalama hızı 120 rpm olarak belirlenmiştir (Costa-de-Oliveira et al. 2017,

[https://patents.google.com/patent/US9290790B2/en?q=\(US+Patent+n%E2%97%A6+9%2c290%2c790+B2\)](https://patents.google.com/patent/US9290790B2/en?q=(US+Patent+n%E2%97%A6+9%2c290%2c790+B2)). (Erişim Tarihi: 18 Ekim 2019)

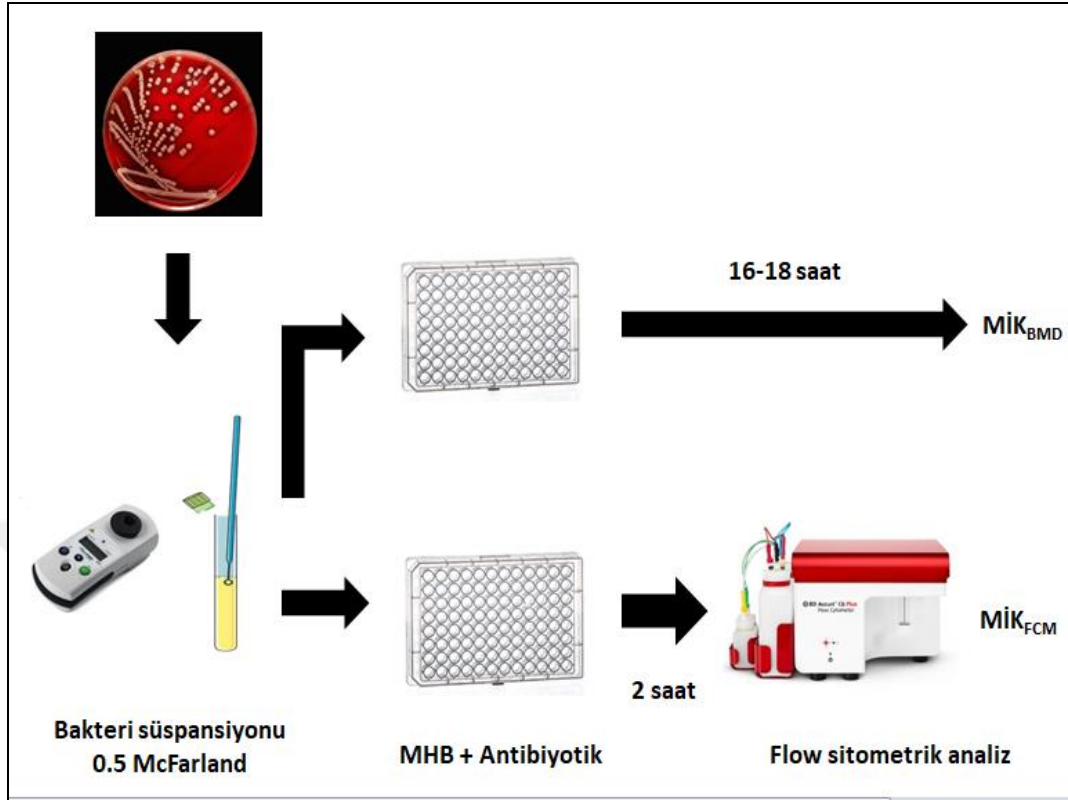
3.4.3.2 Flow sitometrik yöntem ile antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

Flow sitometrik çalışmalar, mikrobiyolojik incelemeler için uygun olan ve 0.5µm büyüklükteki partikül ölçümlerini de yapabilen Accuri C6 flow sitometri cihazı (Beckton Dickonson, A.B.D) ile yapılmıştır. Mikrodilüsyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık testi çalışılabilen kullanıma hazır 96 kuyucuklu mikroplaterler (Sensititre, Thermo Scientific™ A.B.D) kullanılmıştır. Bu antibiyotik duyarlılık panellerinde toplam 96 kuyucuk bulunmaktadır. Her kuyucukta farklı antibiyotik konsantrasyonları bulunmaktadır. Her mikroplakta pozitif ve negatif kontrol kuyucukları bulunmaktadır. Bakteri süspansiyonları üretici firmanın talimatlarına uygun olarak hazırlanmıştır. Streptokoklar için at kanlı Müller Hinton broth kullanılmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonları mikroplaklara aktarıldıktan sonra bu mikroplaklar, 120 rpm de çalkalanacak şekilde 35-37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir (Oliveira et al. 2017). İnkübasyon süresinin sonunda bakteri süspansiyonları mikroplaktaki kuyucuklardan 100 µl okuma tüplerine alınmıştır.

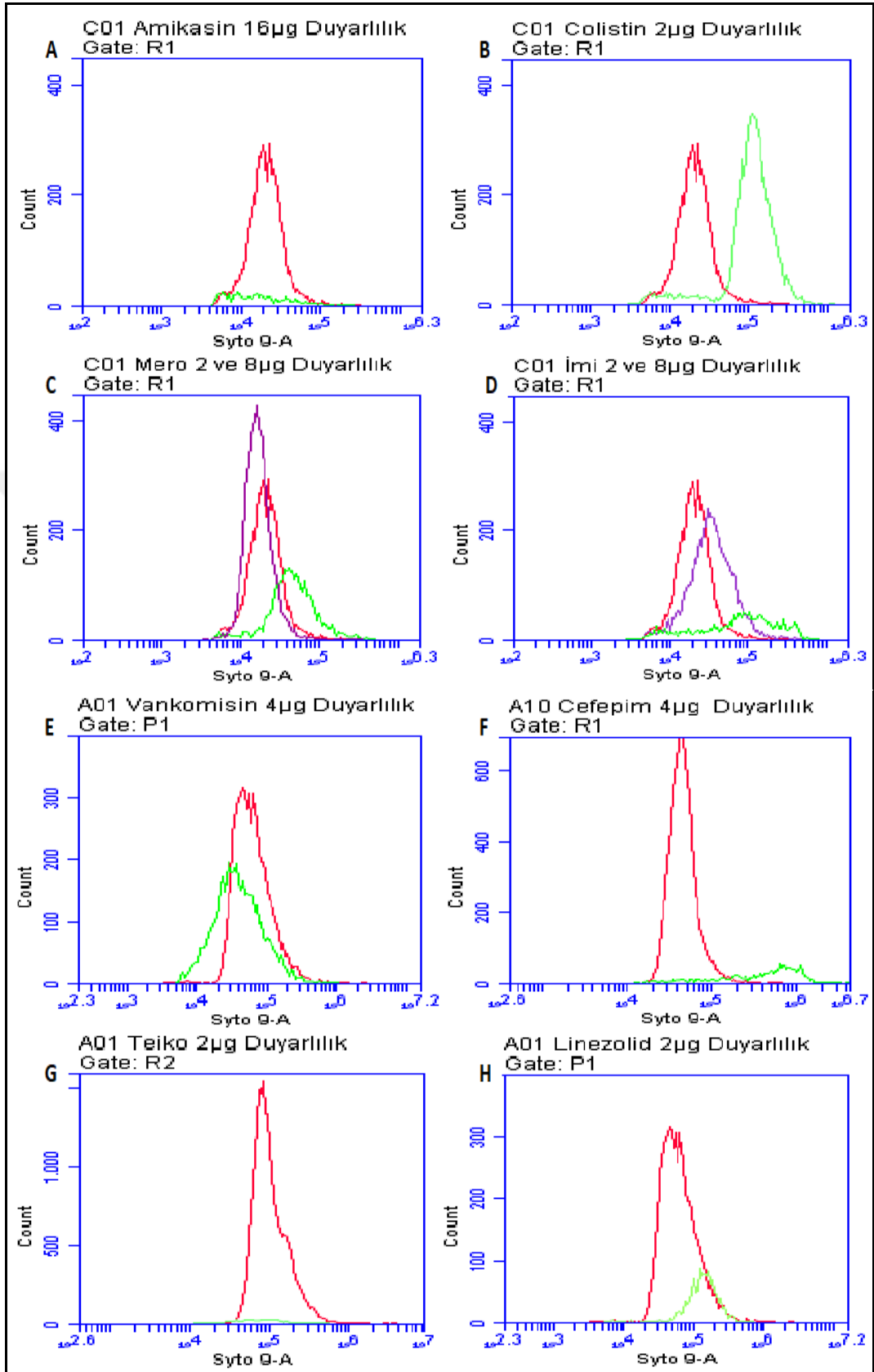
Flow sitometrik yöntem ile duyarlılıkları test edilecek olan antibiyotiklerin dilüsyonları güncel EUCAST kılavuzunda yer alan break point noktalarına uygun olacak şekilde seçilerek kullanılmıştır. EUCAST bu break point noktalarına göre bakterilerin ilgili antibiyotiklere duyarlı (S), dirençli (R) veya artmış doza duyarlı (I) olarak belirlemektedir. EUCAST'ın bazı bakterilerde bazı antibiyotikler için bir tane break point noktası vardır. Bu durumlarda break point noktası ve bir üst antibiyotik konsantrasyonu içeren dilüsyonu çalışmaya dahil edilmiştir. Oda sıcaklığına gelmesi için bir müddet (10-15 dk) bekletildikten sonra her tüp için 10 µl (150 µM/ml) Syto 9 boyası (Thermo Fisher, A.B.D), 10 µl (400 µg/ml) PI boyası (Thermo Fisher, A.B.D) eklenmiştir. Karanlık ortamda 15 dk inkübasyonda bekletilerek bakterilerin boyanması sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra flow sitometri ile okuma aşamasına geçilmiştir.

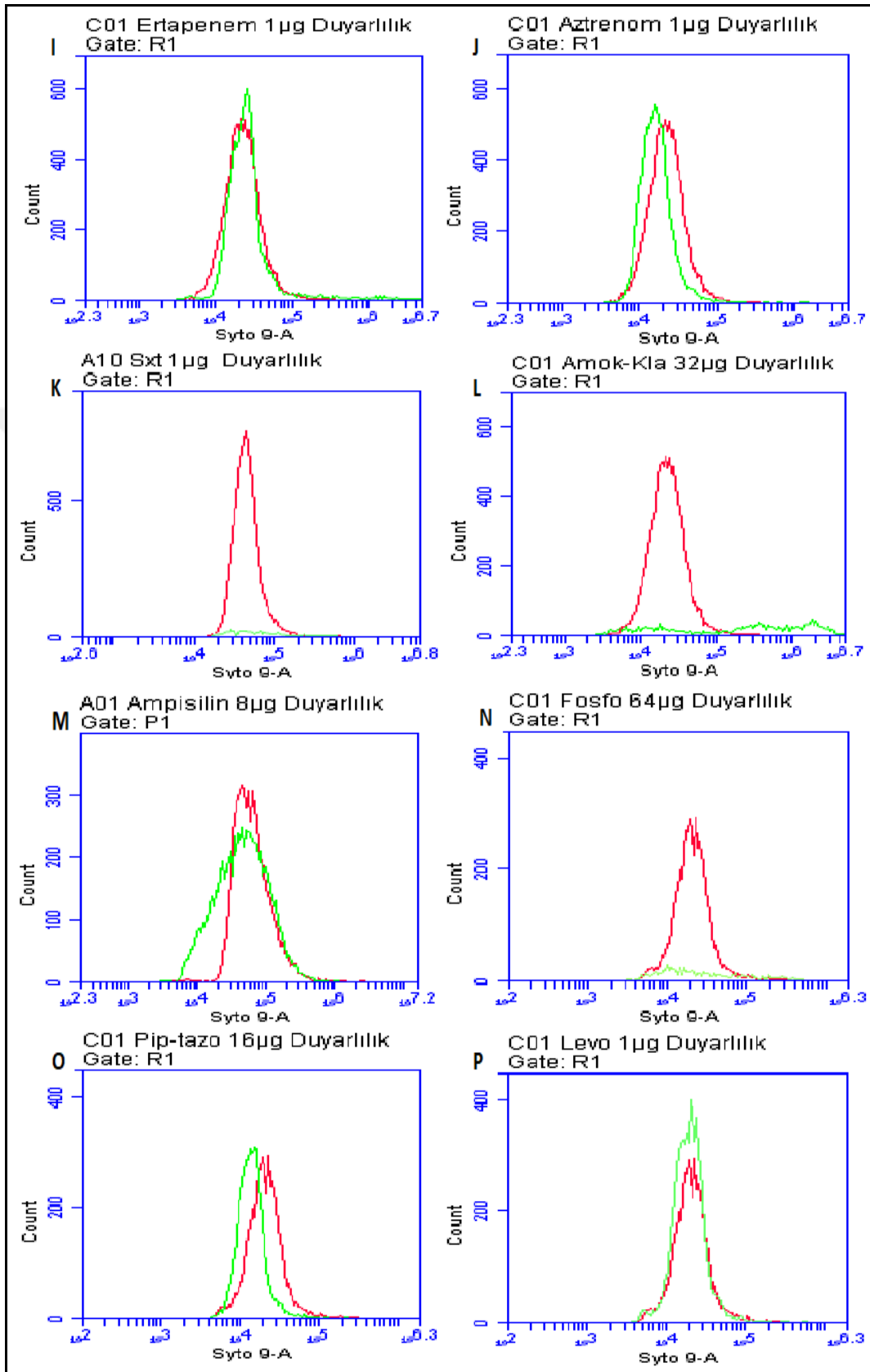
Floresan boyalar için kullanılan uyarma/emisyon maksimum Syto 9 için 480/520 nm ve propidyum iyodür için 500/640 nm olarak ayarlanmıştır. SSC-H/FL1-H kanallarında dot blot olarak bakteri solüsyonları okutulmuştur. Threshold ayarı FL1 kanalında eşik değeri 50 olarak ayarlanmıştır. İlk önce mikroplakta bulunan kontrol kuyucuğu okutulmuştur. Bu kuyucuk pozitif kontrol olarak kullanılmış olup, kapılama işlemi bu okumadan çıkan dot blot görüntüsüne göre yapılmıştır. Kapılama

yapılan alanda kontrol kuyucuğu ile antibiyotik içeren kuyucuklar FL1-H grafiğinde üstü üste getirilerek (overlay) karşılaştırılmıştır. Bu veriler CFlow plus programı ile analiz edilmiştir. FL1-H grafiği Syto 9 boyanan tüm bakterilerin sayısını göstermektedir. PI boyası ise sadece ölü bakterilerin sayısını göstermektedir. Şekil 3.'te de görüleceği üzere kontrol kuyucuğu ile benzer grafik oluşturan (benzer sayıda boyanan bakteri hücresi içeren) antibiyotik dilüsyonu dirençli olarak kabul edilmiştir. Kontrol kuyucuğunun en az %50-55'inden daha az bakteri içeren ve/veya farklı bir grafik paterni oluşturan antibiyotik dilüsyonu duyarlı olarak kabul edildi. EUCAST break point noktalarından düşük olan antibiyotik dozuna dirençli iken yüksek antibiyotik dozuna duyarlı bulunanlar ise artmış doza duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Tüm suşlar bu kriterlere göre duyarlı, artmış doza duyarlı veya dirençli olarak kayıt altına alınmıştır. GSBL tespiti için sadece 3.kuşak sefalosporin içeren kuyucuk ile 3.kuşak sefalosporin+beta laktamaz inhibitörü içeren kuyucuk overlay grafiği ile karşılaştırılarak belirlenmiştir (Ramos et al. 2012, Nuding and Zabel 2013).



Şekil 2. Flow sitometrik yöntem ve BMD ile bakterilerin antibiyotik MiK değerlerinin tespit edilmesinin şematize edilmiş hali





Şekil 3. Flow sitometrik yöntem ile antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde kullanılan overlay grafik görüntüleri. (**Kırmızı Pik:** Kontrol Kuyucuğu, **Yeşil Pik:** Antibiyotikli kuyucuk) **A:** Amikasin 16µg/ml duyarlılık durmunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Duyarlı **B:** Kolistin 2µg/ml duyarlılık durmunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Dirençli **C:** Meropenem 2 ve 8µg/ml duyarlılık durmunun overlay grafiği ile gösterilmesi. (**Mor Pik:** Meropenem 2µg/ml Kuyucuğu) **Sonuç:** Dirençli **D:** İmipenem 2 ve 8µg/ml duyarlılık durmunun overlay grafiği ile gösterilmesi. (**Mor Pik:** İmipenem 2µg/ml Kuyucuğu) **Sonuç:** Artmış doza duyarlı **E:** Vankomisin 4µg/ml duyarlılık durmunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Dirençli **F:** Sefepim 4µg/ml duyarlılık durmunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Duyarlı **G:** Teikoplanin 2µg/ml duyarlılık durmunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Duyarlı **H:** Linezolid 2µg/ml duyarlılık durmunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Duyarlı **I:** Ertapenem 1µg/ml duyarlılık durmunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Dirençli **J:** Aztreonam 1µg/ml duyarlılık durmunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Dirençli **K:** Trimetoprim/Sülfametaksazol 1µg/ml duyarlılık durmunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Duyarlı **L:** Amoksisilin/Klavulanik asit 32µg/ml duyarlılık durmunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Duyarlı **M:** Ampisilin 8µg/ml duyarlılık durmunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Dirençli **N:** Fosfomisin 64µg/ml duyarlılık durmunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Duyarlı **O:** Piperasilin/Tazobaktam 16µg/ml duyarlılık durmunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Dirençli **P:** Levofloksasin 1µg/ml duyarlılık durmunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Dirençli

4.BULGULAR

4.1. BAKTERİLERİN DUYARLILIK SONUÇLARI

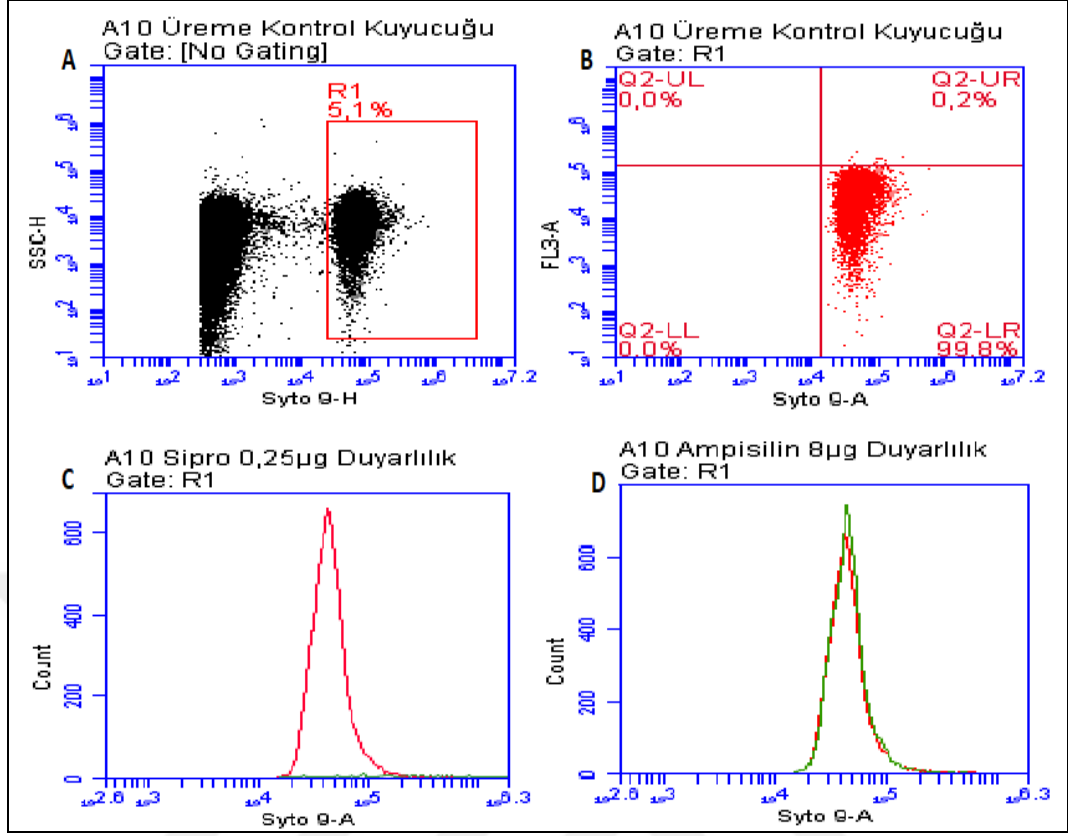
4.1.1 *Escherichia coli* suşlarının duyarlılık sonuçları

Escherichia coli 25922 ATCC suşu için saptanan antibiyotik duyarlılık sonuçları incelendiğinde; flow sitometrik yöntem ve otomatize sistemlerden BMD yöntemi arasında %100, VITEK 2 sistemi arasında %92,3 (sadece amokisisilin/klavulanik asit uyumsuz) uyum olduğu görülmüştür. Bu suşun beklenen EUCAST breakpoint değerleri arasında %94,1 uyum bulunmuştur. Bu standart suş için 3 farklı yöntemle elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 1.'de sunulmuştur. Ayrıca flow sitometrik yöntemle yapılan antibiyotik duyarlılık testi için örnek grafikler (kontrol, kapılama, duyarlı ve dirençli antibiyotikler) Şekil 4.'te gösterilmiştir.

Tablo 1. *E. coli* 25922 nolu ATCC suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 ve EUCAST önerisi ile beklenen duyarlılıklarının karşılaştırılması

Antibiyotikler	Flow sitometri (2 saat inkübasyon sonrası)			BMD	VITEK 2	EUCAST Beklenen MİK
	EUCAST (mg/L)	Bakteri sayısı	Sonuç	MİK Sonuç	MİK Sonuç	
Üreme Kontrol		10000				
Ampisilin	4	10000	R	8< R	32< R	2-8
	8	10000				
Amoksisilin/Klavulanik asit*	16	368	S	8 S	32< R	2-8
	32	241				
Seftazidim	1	1438	S	<0,5 S	< 0,12 S	0,06-0,5
	4	739				
Sefepim	1	1432	S	<1 S	-	0,016-0,125
	4	265				
Seftazidim/ Klavulanik** asit veya Sefoksitin	1	740	S	<0,25/4 S	< 4 S	2-8
	4	575				
Amikasin	8	486	S	<8 S	< 2 S	0,5-4
	16	454				
Gentamisin	2	585	S	4 I	< 1 S	0,25-1
	4	521				
Piperasilin/Tazobaktam***	8	1351	S	<4/4 S	< 4 S	1-4
	16	1176				
Meropenem	2	489	S	< 0,12 S	< 0,25 S	0,008-0,006
	4	466				
İmipenem	2	309	S	<1 S	< 0,25 S	0,06-0,25
	8	226S				
Ertapenem	0,5	442	S	<0,12 S	< 0,12 S	0,004-0,016
	1	285				
Trimetoprim/Sülfametoksazol****	2	486	S	<2/38 S	< 20 S	0,5
	4	376				
Fosfomisin	32	52	S	<32 S	< 16 S	0,5-2
	64	37				
Aztreonam	1	958	S	< 1 S	-	0,06-0,25
	4	1149				
Levofloksasin	0,5	481	S	< 0,5 S	-	0,008-0,06
	1	286				
Siprofloksasinsasin	0,5	546	S	<0,25 S	< 0,2 S	0,004-0,016
	1	478				
Tigesiklin	1	690	S	<0,5 S	-	0,03-0,25
	2	635				

R: Dirençli S:Duyarlı I:Artmış doza duyarlı*: Amoksisilin dozu, **: seftazidim dozu, ***: piperasilin dozu ****: Trimetoprim dozu



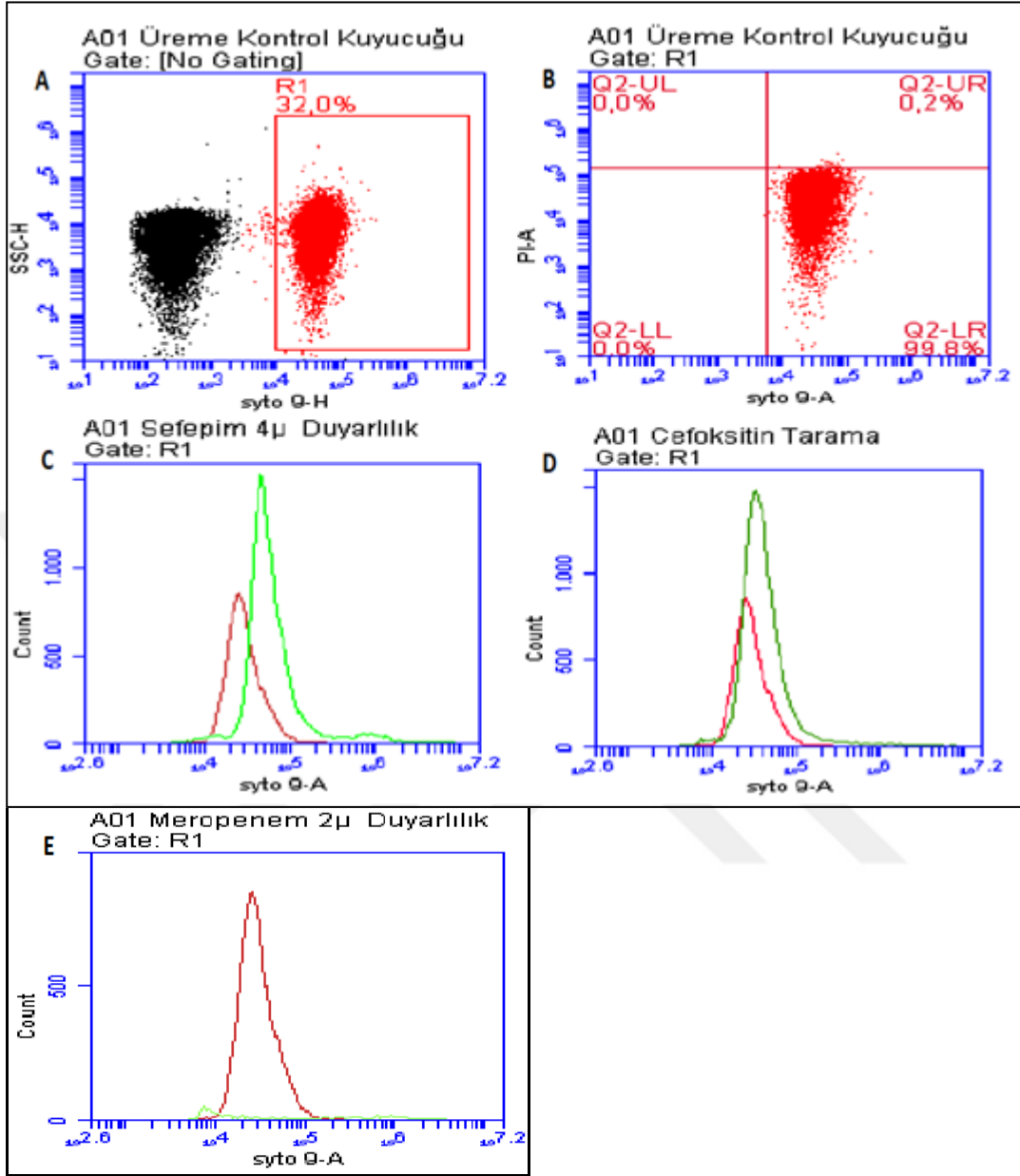
Şekil 4. *Escherichia coli* 25922 nolu ATCC suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, siprofloksasin ve ampisilin duyarlılık overlay grafikleri (**Kırmızı Pik:** Üreme Kontrol Kuyucuğu, **Yeşil Pik:** Antibiyotikli Kuyucuk) **A:** SSC-H/FL1-H(Syto 9-H) kanalında floresan boyalarla boyanmış hücrelerin dot blot grafiğinde kapılama işlemi, **B:** Kapılama işlemi yapılan hücrelerin FL3-A(PI-A)/FL1-A(Syto9-A) kanalında dot blot grafiği görüntüsü **C:** Siprofloksasin 1µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Duyarlı **D:** Ampisilin 8µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi **Sonuç:** Dirençli

Klinik örnekten izole edilen *Escherichia coli* suşu için saptanan antibiyotik duyarlılık sonuçları incelendiğinde; flow sitometrik yöntem ve otomatize sistemlerden BMD yöntemi arasında %100, VITEK 2 sistemi arasında %84.6 uyum olduğu görülmüştür. Bu klinik izolatu flow sitometrik yöntem ve BMD GSBL negatif saptarken, VITEK 2 GSBL pozitif saptamıştır. VITEK 2 cihazında kullanılan AST kartında amoksisilin/klavulanik asit fiziksel olarak bulunmamaktadır. Bu antibiyotik ile ilgili dirençli/duyarlı ayrımı diğer antibiyotik duyarlılıklarından çıkarsama yapılarak belirlenmektedir. Bu standart suş için elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 2.'de sunulmuştur. Ayrıca flow sitometrik yöntemle yapılan antibiyotik duyarlılık testi için örnek grafikler (kontrol, kapılama, duyarlı ve dirençli antibiyotikler) Şekil 5.'te gösterilmiştir.

Tablo 2. *E. coli* GSBL pozitif klinik suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 duyarlılıklarının karşılaştırılması

Antibiyotikler	Flow sitometri (2 saat inkübasyon sonrası)			BMD	VITEK 2
	EUCAST (mg/L)	Bakteri sayısı	Sonuç	MİK Sonuç	MİK Sonuç
Üreme Kontrol		10.000			
Ampisilin	4	10.000	R	8< R	32 ≤ R
	8	10.000			
Amoksisilin/Klavulanik asit*	16	10.000	I	32/4 I	R
	32	4.568			
Seftazidim	1	10.000	R	32 R	32 R
	4	10.000			
Sefepim	1	10.000	R	4< R	-
	4	10.000			
Seftazidim/ Klavulanik** asit veya Sefoksitin	1	10.000	Negatif	Negatif	Pozitif
	4	10.000			
Amikasin	8	1.430	S	<8 S	< 2 S
	16	1.055			
Gentamisin	2	1.369	S	< 2 S	< 1 S
	4	1.257			
Piperasilin/Tazobaktam***	8	2.191	S	<4/4 S	< 4 S
	16	2.235			
Meropenem	2	761	S	< 0,12 S	0,5 S
	4	171			
İmipenem	2	127	S	<1 S	1 S
	8	74			
Ertapenem	0,5	560	S	<0,12 S	4 R
	1	221			
Trimetoprim/Sülfametoksazol****	2	10.000	R	4/76 < R	320 < R
	4	10.000			
Fosfomisin	32	80	S	<32 S	< 16 S
	64	56			
Aztreonam	1	10.000	R	4 < R	-
	4	10.000			
Levofloksasin	0,5	1.175	S	< 0,5 S	-
	1	905			
Siprofloksasinsasin	0,5	1.259	S	<0,25 S	< 0,2 S
	1	1.189			
Tigesiklin	1	1.170	S	<0,25 S	-
	2	1305			

R: Dirençli **S:**Duyarlı **I:**Artmış doza duyarlı *****: Amoksisilin dozu, ******: Seftazidim dozu, *******: Piperasilin dozu ********: Trimetoprim dozu - : VITEK 2 AST kartlarında bulunmayan antibiyotikler



Şekil 5. Klinik örnekten izole edilen GSBL pozitif *E. coli* suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, sefoksitin tarama, sefepim ve meropenem duyarlılık overlay grafikleri (**Kırmızı Pik:** Üreme Kontrol Kuyucuğu, **Yeşil Pik:** Antibiyotikli Kuyucuk) **A:** Klinik Örnekten izole edilen *Escherichia coli* suşunun SSC-H/FL1-H(Syto 9-H) kanalında floresan boyalarla boyanmış hücrelerin dot blot grafiğinde kapılama işlemi, **B:** Kapılama işlemi yapılan hücrelerin FL3-A(PI-A)/FL1-A(Syto9-A) kanalında hücrelerin dot blot grafiği görüntüsü **C:** Sefoksitin tarama (GSBL tarama) duyarlılık durmunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** GSBL Negatif **D:** Sefepim 4µg/ml duyarlılık durmunun overlay grafiği ile gösterilmesi **Sonuç:** Dirençli **E:** Meropenem 2µg/ml duyarlılık durmunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Duyarlı

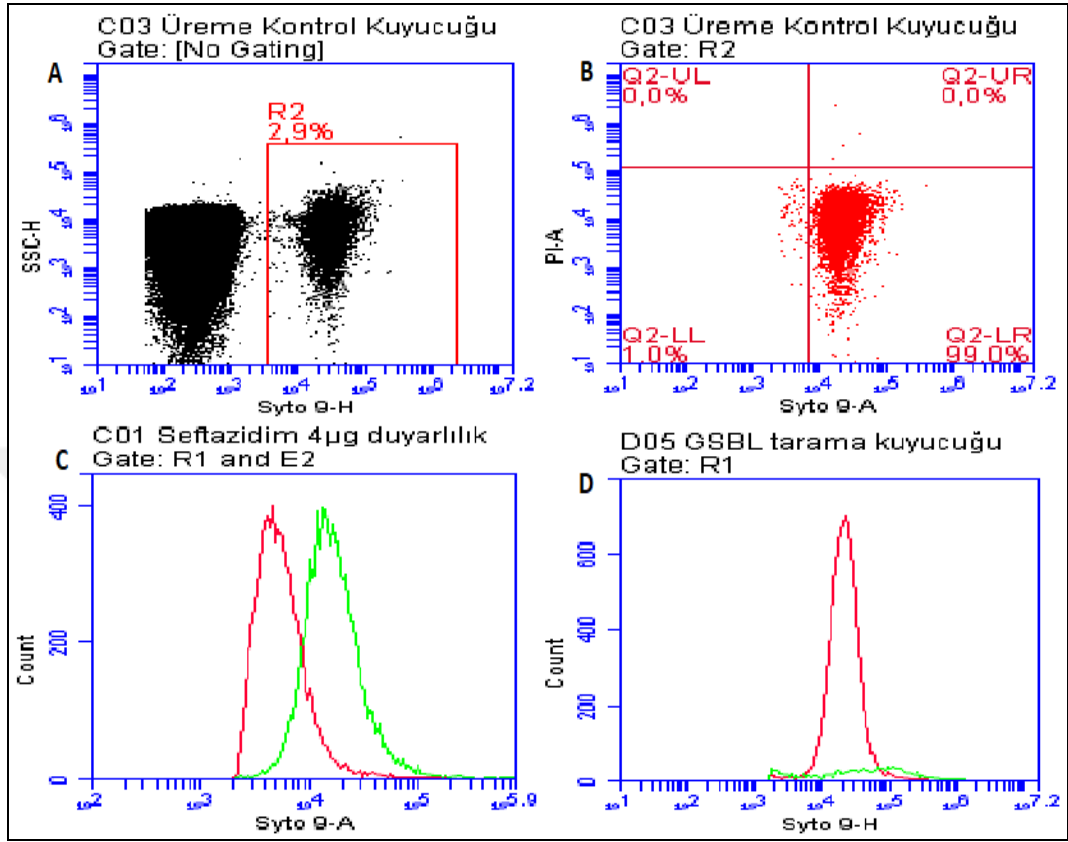
4.1.2. *Klebsiella pneumoniae* suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

Klebsiella pneumoniae 700603 ATCC suşu için saptanan antibiyotik duyarlılık sonuçları incelendiğinde; flow sitometrik yöntem ile otomatize sistemlerden BMD yöntemi arasında 2 antibiyotiğin (Seftazidim/Klavulanik asit veya Sefoksitin ve Gentamisin), VITEK 2 sistemi arasında 5 antibiyotiğin (Seftazidim/Klavulanik asit veya Sefoksitin, Amoksisilin/Klavulanik asit, Piperasilin/Tazobaktam, Siprofloksasin ve Fosfomisin) duyarlılıklarında uyum olmadığı belirlenmiştir. Flow sitometrik yöntem ve otomatize sistemlerden BMD yöntemi arasında %88.8, VITEK 2 sistemi arasında %76.9 uyum olduğu görülmüştür. Bu suşun antibiyotik duyarlılık paternleri EUCAST kriterlerine göre GSBL olarak belirtilmiş ve flow sitometri yönteminde uygulanan kriterler ile GSBL olarak saptanmıştır. Bu standart suş için elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 3.'te sunulmuştur. Ayrıca flow sitometrik yöntemle yapılan antibiyotik duyarlılık testi için örnek grafikler (kontrol, kapılama, duyarlı ve dirençli antibiyotikler) Şekil 6.'da gösterilmiştir.

Tablo 3. *K. pneumoniae* 700603 ATCC suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 ve EUCAST önerisi ile beklenen duyarlılıklarının karşılaştırılması

Antibiyotikler	Flow sitometri (2 saat inkübasyon sonrası)			BMD	VITEK 2	EUCAST Beklenen MİK
	EUCAST (mg/L)	Bakteri sayısı	Sonuç	MİK Sonuç	MİK Sonuç	
Üreme Kontrol		9007				
Ampisilin	4	9521	R	8< R	32 < R	
	8	9215				
Amoksisilin/Klavulanik asit*	16	1896	S	< 32/4 S	32 < R	
	32	1982				
Seftazidim	1	9231	R	32 R	64 < R	
	4	9377				
Sefepim	1	9256	R	4< R	-	
	4	8963				
Seftazidim/ Klavulanik** asit veya Sefoksitin	1	1325	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
	4	1241				
Amikasin	8	840	S	<8 S	< 2 S	-
	16	373				
Gentamisin	2	9176	R	< 2 S	8 R	-
	4	5258				
Piperasilin/Tazobaktam***	8	1924	S	<4/4 S	32 R	8-32
	16	1626				
Meropenem	2	1628	S	< 0,12 S	< 0,25 S	-
	4	888				
İmipenem	2	1204	S	<1 S	0,5 S	-
	8	985				
Ertapenem	0,5	1411	S	<0,12 S	< 0,12 S	-
	1	1240				
Trimetoprim/Sülfametoksazol****	2	2530	S	4/76 < R	< 20 S	-
	4	2125				
Fosfomisin	32	2583	S	<32 S	256< R	-
	64	1313				
Aztreonam	1	9137	R	4 < R	-	-
	4	9267				
Levofloksasin	0,5	1575	S	< 0,5 S	-	-
	1	1305				
Siprofloksasinsasin	0,5	1645	S	<0,25 S	0,5 S	-
	1	1523				
Tigesiklin	1	9222	S	<0,5 S	-	-
	2	6429				

R: Dirençli **S:**Duyarlı **I:**Artmış doza duyarlı *****: Amoksisilin dozu, ******: Seftazidim dozu, *******: Piperasilin dozu ********: Trimetoprim dozu - : VITEK 2 AST kartlarında ve EUCAST önerilerinde bulunmayan antibiyotikler



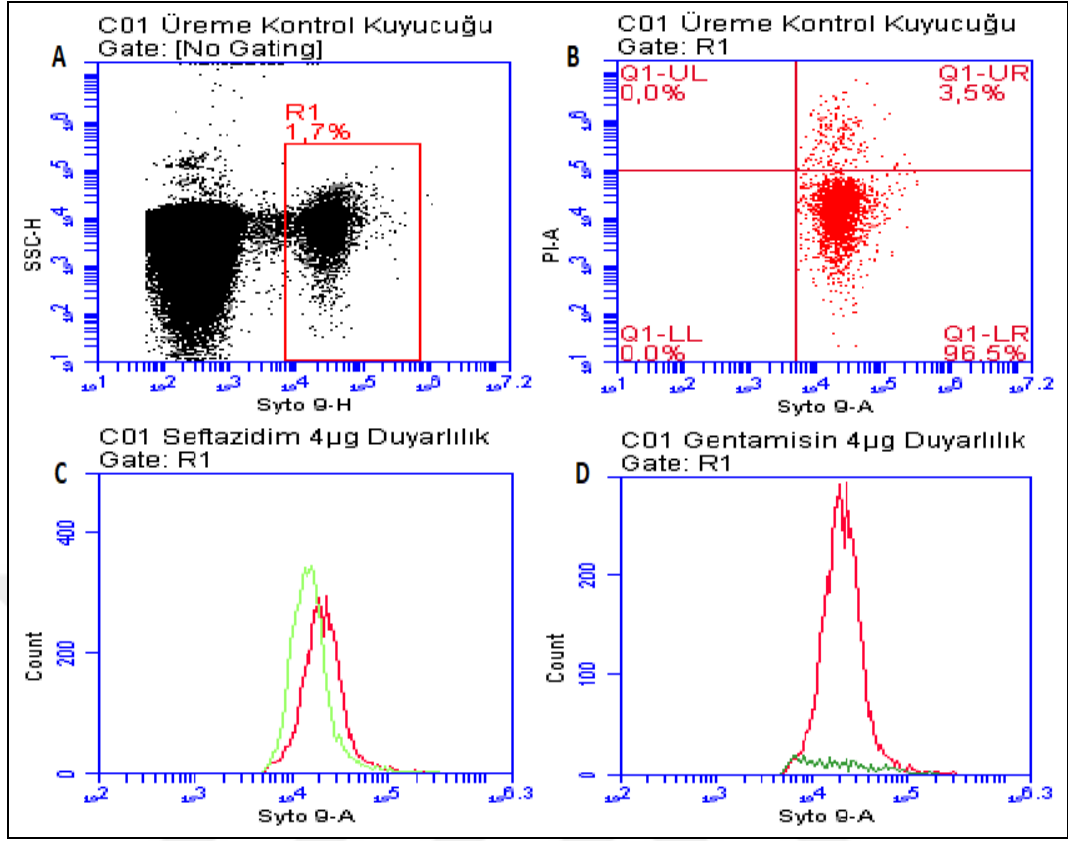
Şekil 6. *K. pneumoniae* 700603 ATCC suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, amikasin ve seftazidim duyarlılık overlay grafikleri (**Kırmızı Pik:** Üreme Kontrol Kuyucuğu, **Yeşil Pik:** Antibiyotikli Kuyucuk) **A:** *Klebsiella pneumoniae* 700603 nolu ATCC suşunun SSC-H/FL1-H(Syto 9-H) kanalında floresan boyalarla boyanmış hücrelerin dot blot grafiğinde kapılama işlemi, **B:** Kapılama işlemi yapılan hücrelerin FL3-A(PI-A)/FL1-A(Syto9-A) kanalında hücrelerin dot blot grafiği görüntüsü) **Sonuç:** Duyarlı **C:** Seftazidim 4µg/ml duyarlılık durmunun overlay grafiği ile gösterilmesi **Sonuç:** Dirençli **D:** Sefoksitin tarama (GSBL tarama) duyarlılık durmunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** GSBL Pozitif

Karbapenem direçli 3 *Klebsiella pneumoniae* suşunun tümü flow sitometrik yöntemle ertapeneme dirençli bulunmuştur. Meropenem karşı bir suş (OXA-48 pozitif) duyarlı, bir suş (NDM-1 pozitif) artmış doza duyarlı, bir suş (KPC pozitif) ise dirençli bulunmuştur. İmipenem karşı 2 suş (KPC pozitif, NDM-1 pozitif) yarı duyarlı bir suş (OXA-48 pozitif) ise duyarlı olarak bulunmuştur. KPC pozitif, NDM-1 pozitif, OXA-48 pozitif suşları için saptanan antibiyotik duyarlılık sonuçları incelendiğinde; flow sitometrik yöntem ve BMD yöntemi arasında sırasıyla % 88.8, %77.7, %100, VITEK 2 sistemi arasında % 92.5, %71.4, %85.7 uyum olduğu görülmüştür. Bu suşlar için elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 4., 5., 6.'da sunulmuştur. Ayrıca flow sitometrik yöntemle yapılan antibiyotik duyarlılık testi için örnek grafikler (kontrol, kapılama, duyarlı ve dirençli antibiyotikler) her bakteri için ayrı ayrı Şekil 7., 8., 9., 10.'da gösterilmiştir.

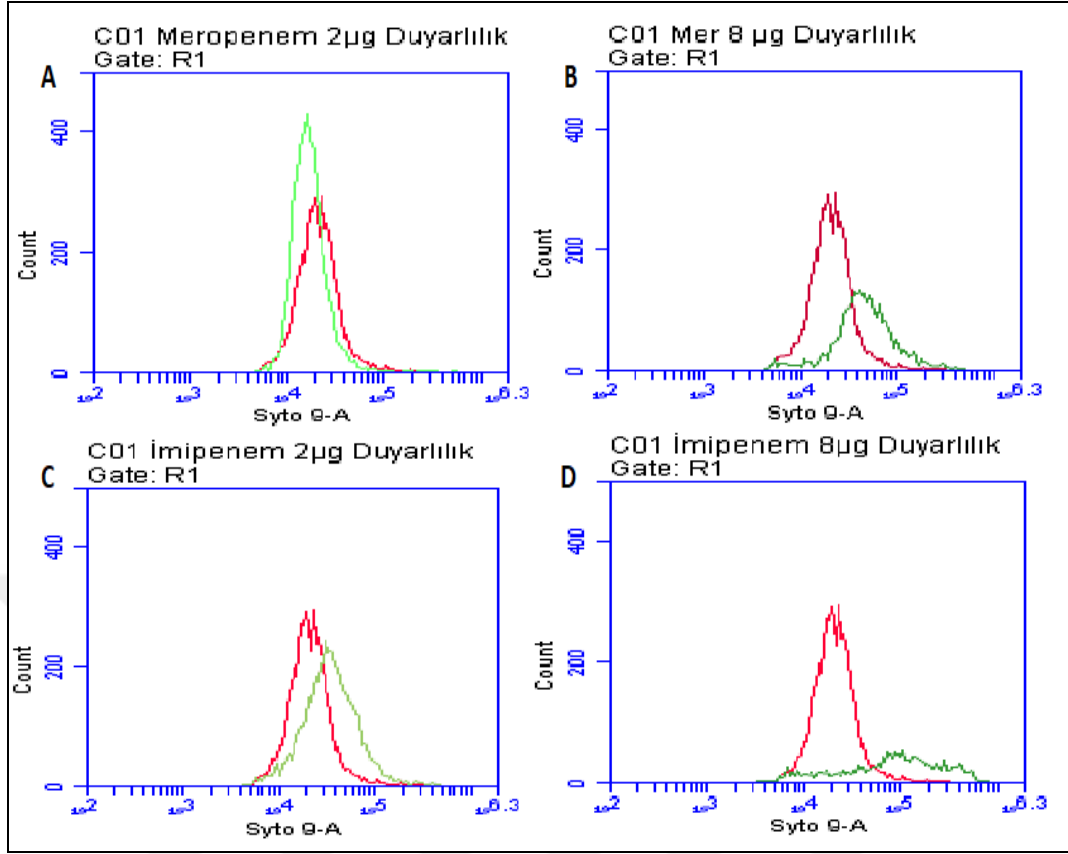
Tablo 4. KPC pozitif *K. pneumoniae* suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 duyarlılıklarının karşılaştırılması

Antibiyotik	Flow sitometri (2 saat inkübasyon sonrası)			BMD	VITEK 2
	EUCAST (mg/L)	Bakteri sayısı	Sonuç	MİK Sonuç	MİK Sonuç
Üreme kontrol		5108			
Ampisilin	4	6443	R	8 < R	32 < R
	8	6336			
Amoksisilin/Klavulanik asit*	16	5951	R	32 < R	32 < R
	32	5638			
Seftazidim	1	5833	R	32 < R	64 < R
	4	5816			
Sefepim	1	6557	R	4 < R	64 < R
	4	6454			
Seftazidim/Klavulanik asit** veya sefoksitin	1	6382	R	4 < R	64 < R
	4	7342			
Amikasin	8	642	S	< 8 S	< 2 S
	16	524			
Gentamisin	2	669	S	< 2 S	< 1 S
	4	545			
Piperasilin/Tazobaktam***	8	4556	R	16 < R	128 < R
	16	5051			
Meropenem	2	6064	R	8 < R	16 < R
	8	3084			
İmipenem	2	5370	I	8 < R	16 < R
	8	1851			
Ertapenem	0,5	6324	R	1 < R	8 < R
	1	2797			
Trimetoprim/Sülfametoksazol****	2	6258	R	4 < R	320 < R
	4	5808			
Fosfomisin	32	906	S	64 I	-
	64	736			
Aztreonam	1	6078	R	4 < R	-
	4	6279			
Levofloksasin	0,5	5668	R	1 < R	-
	1	6422			
Siprofloksasinsasin	0,5	5817	R	1 < R	4 < R
	1	6277			
Tigesiklin	1	1191	S	< 0,5 S	-
	2	1152			
Kolistin	2	6556	R	4 < R	16 < R
	4	6771			

R: Dirençli **S:**Duyarlı **I:**Artmış doza duyarlı *: Amoksisilin dozu, **: Seftazidim dozu, ***: Piperasilin dozu
****: Trimetoprim dozu, -: VITEK 2 AST kartlarında bulunmayan antibiyotikler



Şekil 7. KPC pozitif *K pneumoniae* suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, seftazidim ve gentamisin duyarlılık overlay grafikleri (**Kırmızı Pik:** Üreme Kontrol Kuyucuğu, **Yeşil Pik:** Antibiyotikli Kuyucuk) **A:** *Klebsiella pneumoniae* KPC suşunun SSC-H/FL1-H(Syto 9-H) kanalında floresan boyalarla boyanmış hücrelerin dot blot grafiğinde kapılama işlemi, **B:** Kapılama işlemi yapılan hücrelerin FL3-A(PI-A)/FL1-A(Syto9-A) kanalında hücrelerin dot blot grafiği görüntüsü **C:** Seftazidim 4µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi **Sonuç:** Dirençli **D:** Gentamisin 4µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Duyarlı

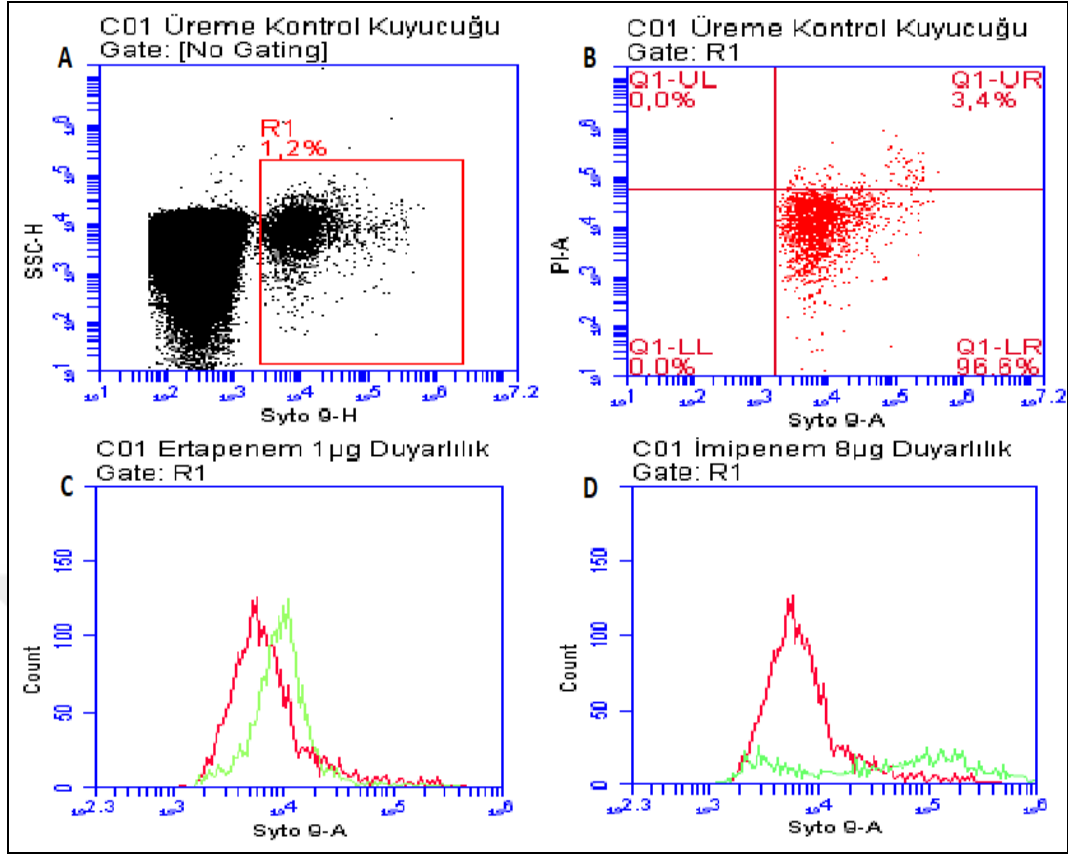


Şekil 8. KPC pozitif *K. pneumoniae* şuşunun flow sitometrik yöntem ile meropenem ve imipenem duyarlılık overlay grafikleri (**Kırmızı Pik:** Üreme Kontrol Kuyucuğu, **Yeşil Pik:** Antibiyotikli Kuyucuk) **A:** Meropenem 2 μ g/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Dirençli **B:** Meropenem 8 μ g/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Dirençli(Hücre sayısı azalmasına rağmen). **C:** İmipenem 2 μ g/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi **Sonuç:** Dirençli **D:** İmipenem 8 μ g/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Artmış doza duyarlı(Hücre sayısı anlamlı derecede azalmış)

Tablo 5. NDM-1 pozitif *K. pneumoniae* suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 duyarlılıklarının karşılaştırılması

Antibiyotik	Flow sitometri (2 saat inkübasyon sonrası)			BMD	VITEK 2
	EUCAST (mg/L)	Bakteri sayısı	Sonuç	MİK Sonuç	MİK Sonuç
Üreme kontrol		3206			
Ampisilin	4	3307	R	8 < R	32 < R
	8	3357			
Amoksisilin/Klavulanik asit*	16	2042	R	32 < R	32 < R
	32	2506			
Seftazidim	1	2518	R	32 < R	64 < R
	4	2395			
Sefepim	1	2541	R	4 < R	64 < R
	4	2555			
Seftazidim/Klavulanik asit** veya sefoksitin	1	4545	R	4 < R	64 < R
	4	3411			
Amikasin	8	1430	I	16 < R	64 < R
	16	1395			
Gentamisin	2	1101	I	4 < R	16 < R
	4	1117			
Piperasilin/Tazobaktam***	8	2018	R	16 < R	128 < R
	16	2075			
Meropenem	2	1769	I	8 < R	16 < R
	8	1225			
İmipenem	2	1452	I	8 < R	16 < R
	8	1330			
Ertapenem	0,5	2513	R	1 < R	8 < R
	1	2706			
Trimetoprim/Sülfametoksazol****	2	2371	R	4 < R	320 < R
	4	2566			
Fosfomisin	32	774	S	< 32 S	-
	64	845			
Aztreonam	1	3050	R	4 < R	-
	4	2993			
Levofloksasin	0,5	2501	R	1 < R	-
	1	2546			
Siprofloksasinsasin	0,5	3241	R	1 < R	4 < R
	1	3235			
Tigesiklin	1	1098	S	<0,5 S	-
	2	755			
Kolistin	2	865	S	< 2 S	2 S
	4	858			

R: Dirençli **S:**Duyarlı **I:**Artmış doza duyarlı *****: Amoksisilin dozu, ******: Seftazidim dozu, *******: Piperasilin dozu ********: Trimetoprim dozu, **-**: VITEK 2 AST kartlarında bulunmayan antibiyotikler

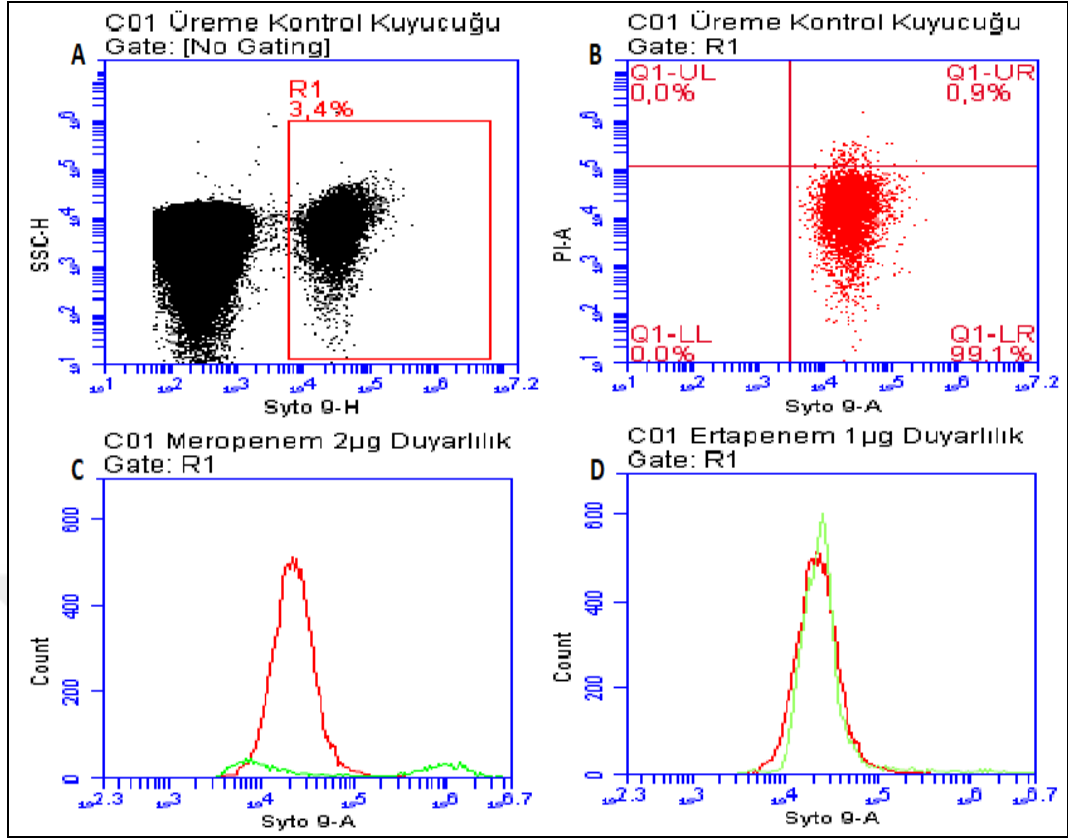


Şekil 9. NDM-1 pozitif *K. pneumoniae* suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, ertapenem ve imipenem duyarlılık overlay grafikleri (**Kırmızı Pik:** Üreme Kontrol Kuyucuğu, **Yeşil Pik:** Antibiyotikli Kuyucuk) **A:** *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 suşunun SSC-H/FL1-H(Syto 9-H) kanalında floresan boyalarla boyanmış hücrelerin dot blot grafiğinde kapılama işlemi, **B:** Kapılama işlemi yapılan hücrelerin FL3-A(PI-A)/FL1-A(Syto9-A) kanalında hücrelerin dot blot grafiği görüntüsü **C:** Ertapenem 1µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi **Sonuç:** **D:** : İmipenem 8µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Yarı Duyarlı

Tablo 6. OXA- 48 pozitif *K. pneumoniae* suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 duyarlılıklarının karşılaştırılması

Antibiyotik	Flow sitometri (2 saat inkübasyon sonrası)			BMD	VITEK 2
	EUCAST (mg/L)	Bakteri sayısı	Sonuç	MİK Sonuç	MİK Sonuç
Üreme kontrol		10000			
Ampisilin	4	10000	R	8 <	32 <
	8	10000		R	
Amoksisilin/Klavulanik asit*	16	3589	I	32	32<
	32	1875		I	
Seftazidim	1	10000	R	32 <	64 <
	4	10000		R	
Sefepim	1	10000	R	4<	64 <
	4	10000		R	
Seftazidim/Klavulanik asit** veya Sefoksitin Tarama	1	2089	Pozitif	Pozitif	Pozitif
	4	1748		Pozitif	
Amikasin	8	925	S	< 8	8
	16	895		S	
Gentamisin	2	10000	R	4 <	16 <
	4	10000		R	
Piperasilin/Tazobaktam***	8	10000	R	16 <	128<
	16	5819		R	
Meropenem	2	1621	S	1	16 <
	8	966		S	
İmipenem	2	1317	S	< 1	2
	8	803		S	
Ertapenem	0,5	10000	R	1 <	8 <
	1	10000		R	
Trimetoprim/Sülfametoksazol****	2	10000	R	4 <	320<
	4	10000		R	
Fosfomisin	32	10000	R	64 <	-
	64	10000		R	
Aztreonam	1	10000	R	4 <	-
	4	10000		R	
Levofloksasin	0,5	10000	R	1 <	-
	1	10000		R	
Siprofloksasinsasin	0,5	10000	R	1 <	4 <
	1	10000		R	
Tigesiklin	1	2873	S	< 0,5	-
	2	1476		S	
Kolistin	2	10000	R	4 <	16 <
	4	10000		R	

R: Dirençli **S:**Duyarlı **I:**Artmış doza duyarlı *****: Amoksisilin dozu, ******: Seftazidim dozu, *******: Piperasilin dozu
********: Trimetoprim dozu, - : VITEK 2 AST kartlarında bulunmayan antibiyotikler



Şekil 10. OXA-48 pozitif *Klebsiella pneumoniae* suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, meropenem ve ertapenem duyarlılık overlay grafikleri (**Kırmızı Pik:** Üreme Kontrol Kuyucuğu, **Yeşil Pik:** Antibiyotikli Kuyucuk) **A:** *Klebsiella pneumoniae* OXA-48 suşunun SSC-H/FL1-H(Syto 9-H) kanalında floresan boyalarla boyanmış hücrelerin dot blot grafiğinde kapılama işlemi, **B:** Kapılama işlemi yapılan hücrelerin FL3-A(PI-A)/FL1-A(Syto9-A) kanalında hücrelerin dot blot grafiği görüntüsü **C:** Meropenem 2µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Duyarlı **D:** : Ertapenem 1µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi **Sonuç:** Dirençli

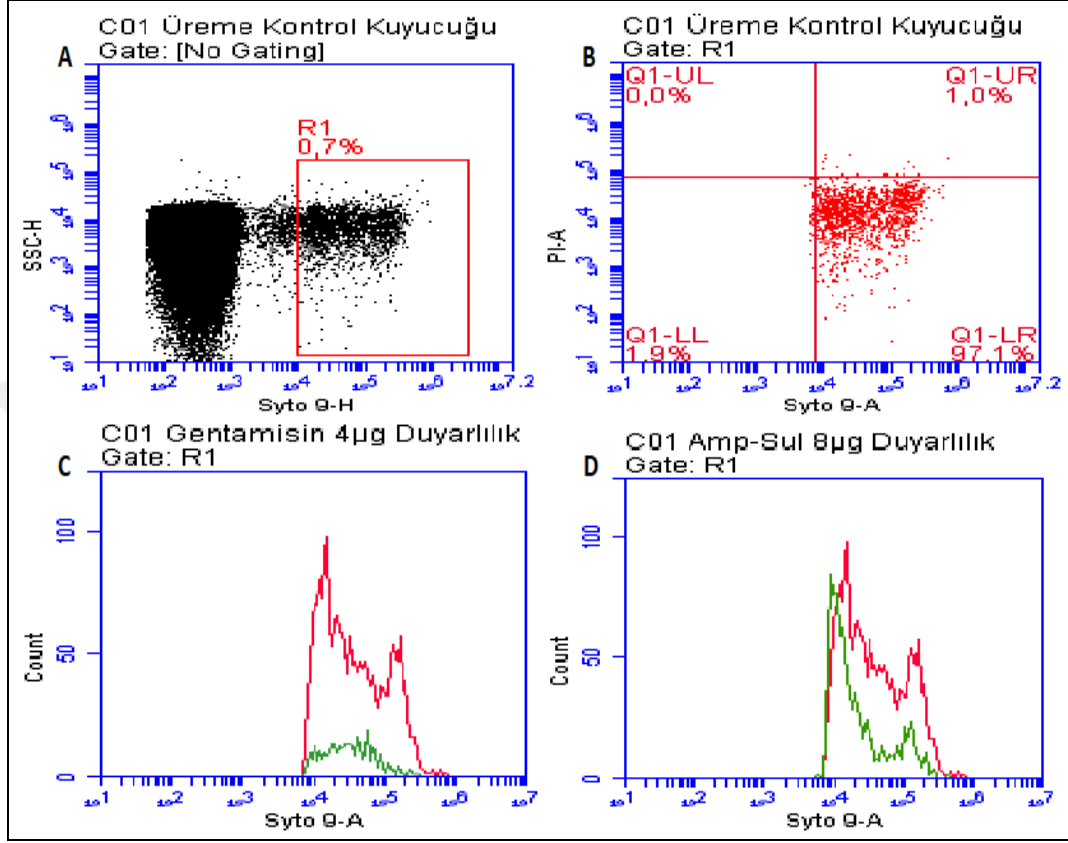
4.1.3. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları

Pseudomonas aeruginosa 27853 ATCC suşu saptanan antibiyotik duyarlılık sonuçları incelendiğinde; flow sitometrik yöntem ve otomatize sistemlerden VITEK 2 sistemi arasında %100, BMD yöntemi arasında %92,3 (sadece gentamisin uyumsuz) uyum olduğu görülmüştür. Bu suşun beklenen tüm antibiyotik duyarlılık paternleri EUCAST kriterleri ile %100 uyumlu bulunmuştur. Bu standart suş için elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 7.'de sunulmuştur. Ayrıca flow sitometrik yöntemle yapılan antibiyotik duyarlılık testi için örnek grafikler (kontrol, kapılama, duyarlı ve dirençli antibiyotikler) Şekil 10.'da gösterilmiştir.

Tablo 7. *P. aeruginosa* 27853 ATCC suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 ve EUCAST önerisi ile beklenen duyarlılıklarının karşılaştırılması

Antibiyotik	Flow sitometr (2 saat inkübasyon sonrası)			BMD	VITEK 2	EUCAST beklenen MİK
	EUCAST (mg/L)	Bakteri sayısı	Duyarlılık	MİK Sonuç	MİK Sonuç	
Üreme Kontrol		2026				
Seftazidim	8	365	S	< 1 S	2 S	1-4
	16	328				
Sefepim	8	395	S	4 S	2 S	0,5-4
	16	346				
Amikasin	8	430	S	< 4 S	< 2 S	1-4
	16	366				
Piperasilin	16	312	S	< 8 S	8 S	1-8
	32	166				
Gentamisin	4	418	S	2 < R	< 1 S	0,5-2
	8	323				
Piperasilin/Tazobaktam*	16	420	S	< 8 S	16 S	1-8
	32	358				
Meropenem	2	434	S	0,25 S	< 0,2 S	0,25-1
	8	366				
İmipenem	4	343	S	1 S	2 S	1-4
	8	354				
Aztreonam	1	659	S	4 S	4 S	2-8
	16	386				
Levofloksasin	1	407	S	< 0,5 S	1 S	0,5-4
	2	309				
Siprofloksasinsasin	0,5	343	S	0,25 S	< 0,25 S	0,25-1
	1	419				
Kolistin	2	28	S	< 2 S	< 0,5 S	0,5-4
	4	11				
Tobramisin	4	408	S	< 2 S	< 1 S	0,25-1
	8	386				
Ampisilin/Sulbaktam**	8	1286	R	16 < R	-	-
	16	1125				

R: Dirençli **S:**Duyarlı **I:**Artmış doza duyarlı *: Piperasilin dozu **: Ampisilin dozu, -: VITEK 2 AST kartlarında ve EUCAST önerilerinde bulunmayan antibiyotikler



Şekil 11. *P. aeruginosa* 27853 ATCC suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, gentamisin ve ampisilin/sulbaktam duyarlılık overlay grafikleri (**Kırmızı Pik:** Üreme Kontrol Kuyucuğu, **Yeşil Pik:** Antibiyotikli Kuyucuk) **A:** *Pseudomonas aeruginosa* 27853 ATCC suşunun SSC-H/FL1-H(Syto 9-H) kanalında floresan boyalarla boyanmış hücrelerin dot blot grafiğinde kapılama işlemi, **B:** Kapılama işlemi yapılan hücrelerin FL3-A(PI-A)/FL1-A(Syto9-A) kanalında hücrelerin dot blot grafiği görüntüsü **C:** Gentamisin 4µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Duyarlı **D:** Ampisilin/Sulbaktam 8µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi **Sonuç:** Dirençli

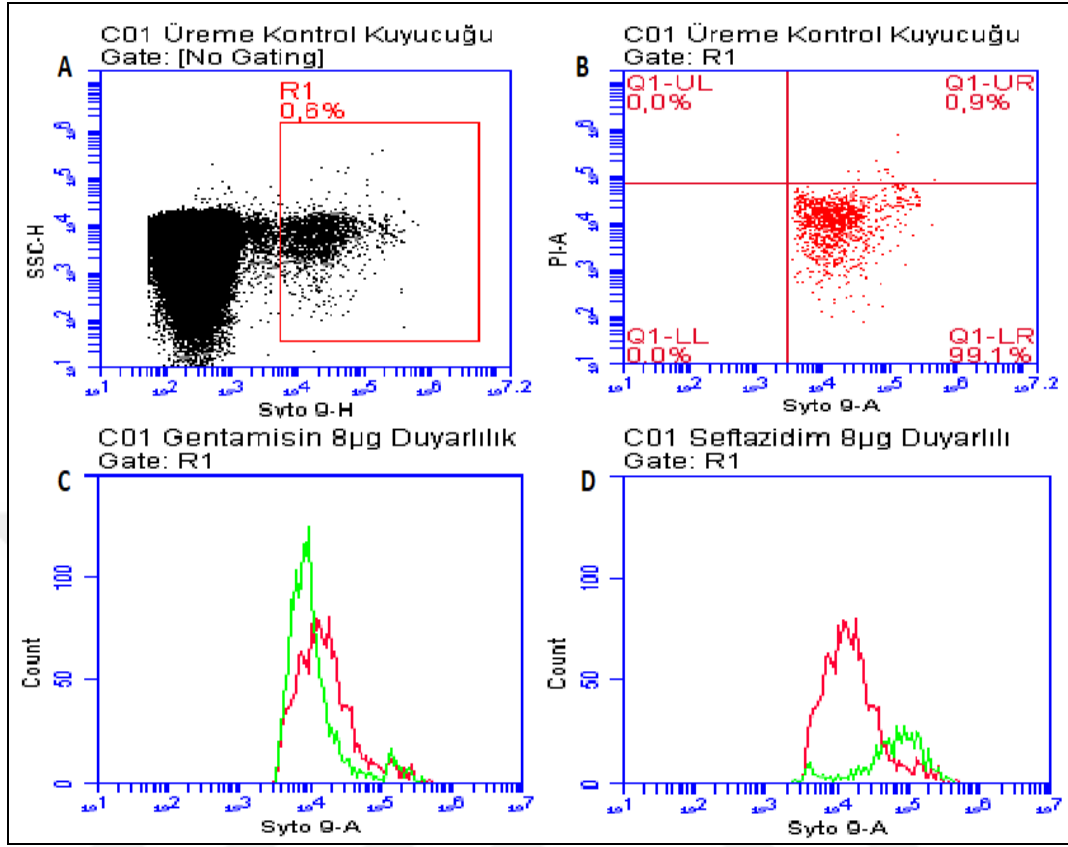
Klinik örnekten izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşunun saptanan antibiyotik duyarlılık sonuçları incelendiğinde; flow sitometrik yöntem ve otomatize sistemlerden VITEK 2 sistemi ve BMD yöntemi arasında %46.1 uyum olduğu görülmüştür. Flow sitometrik yöntem ile VITEK 2 sistemi ve BMD yöntemi arasında aynı 7 farklı antibiyotik (Seftazidim, Sefepim, Piperasilin, Piperasilin/Tazobaktam, Meropenem, İmipenem ve Aztreonam) uyumsuz olarak saptanmıştır. Bu suş için elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 8.'de

sunulmuştur. Ayrıca flow sitometrik yöntemle yapılan antibiyotik duyarlılık testi için örnek grafikler (kontrol, kapılama, duyarlı ve dirençli antibiyotikler) Şekil 12.'de gösterilmiştir.

Tablo 8. *P. aeruginosa* klinik suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 duyarlılıklarının karşılaştırılması

Antibiyotik	Flow sitometri (2 saat inkübasyon sonrası)			BMD	VITEK 2
	EUCAST (mg/L)	Bakteri sayısı	Sonuç	MİK Sonuç	MİK Sonuç
Üreme Kontrol		1751			
Seftazidim	8	718	S	16	64 <
	16	570		R	R
Sefepim	8	613	S	16	32 <
	16	504		R	R
Amikasin	8	1611	R	32	16
	16	1730		R	R
Gentamisin	4	1742	R	8 <	16 <
	8	1687		R	R
Piperasilin/Tazobaktam*	16	568	S	64	128 <
	32	676		R	R
Meropenem	2	1035	I	16	16 <
	8	568		R	R
İmipenem	4	916	I	16	16 <
	8	659		R	R
Aztreonam	1	1544	I	16 <	16 <
	16	662		R	R
Levofloksasin	1	1311	R	4 <	8 <
	2	1235		R	R
Siprofloksasinsasin	0,5	2219	R	2 <	4 <
	1	1906		R	R
Kolistin	2	612	S	< 2	< 0,5
	4	535		S	S
Tobramisin	4	1685	R	8 <	16 <
	8	1768		R	R
Piperasilin	16	628	S	64 <	128 <
	32	486		R	R

R: Dirençli **S:**Duyarlı **I:**Artmış doza duyarlı * : Piperasilin dozu, -: VITEK 2 AST kartlarında bulunmayan antibiyotikler



Şekil 12. *P. aeruginosa* 27853 ATCC suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, gentamisin ve seftazidim duyarlılık overlay grafikleri (**Kırmızı Pik:** Üreme Kontrol Kuyucuğu, **Yeşil Pik:** Antibiyotikli Kuyucuk) **A:** Klinik örnekten izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşunun SSC-H/FL1-H(Syto 9-H) kanalında floresan boyalarla boyanmış hücrelerin dot blot grafiğinde kapılama işlemi, **B:** Kapılama işlemi yapılan hücrelerin FL3-A(PI-A)/FL1-A(Syto9-A) kanalında hücrelerin dot blot grafiği görüntüsü **C:** Gentamisin 8µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Dirençli **D:** Seftazidim 8µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi **Sonuç:** Duyarlı

4.1.4. *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

Acinetobacter baumannii suşu (1 nolu) için saptanan antibiyotik duyarlılık sonuçları incelendiğinde; flow sitometrik yöntem ile VITEK 2 sistemi ve BMD yöntemi arasında imipenem duyarlılığı farklı saptanmıştır. Diğer antibiyotik duyarlılıkları benzer olduğu görülmüştür. İlk suş için BMD yöntemi ve VITEK 2 sisteminin uyum oranı %90.9'dir.

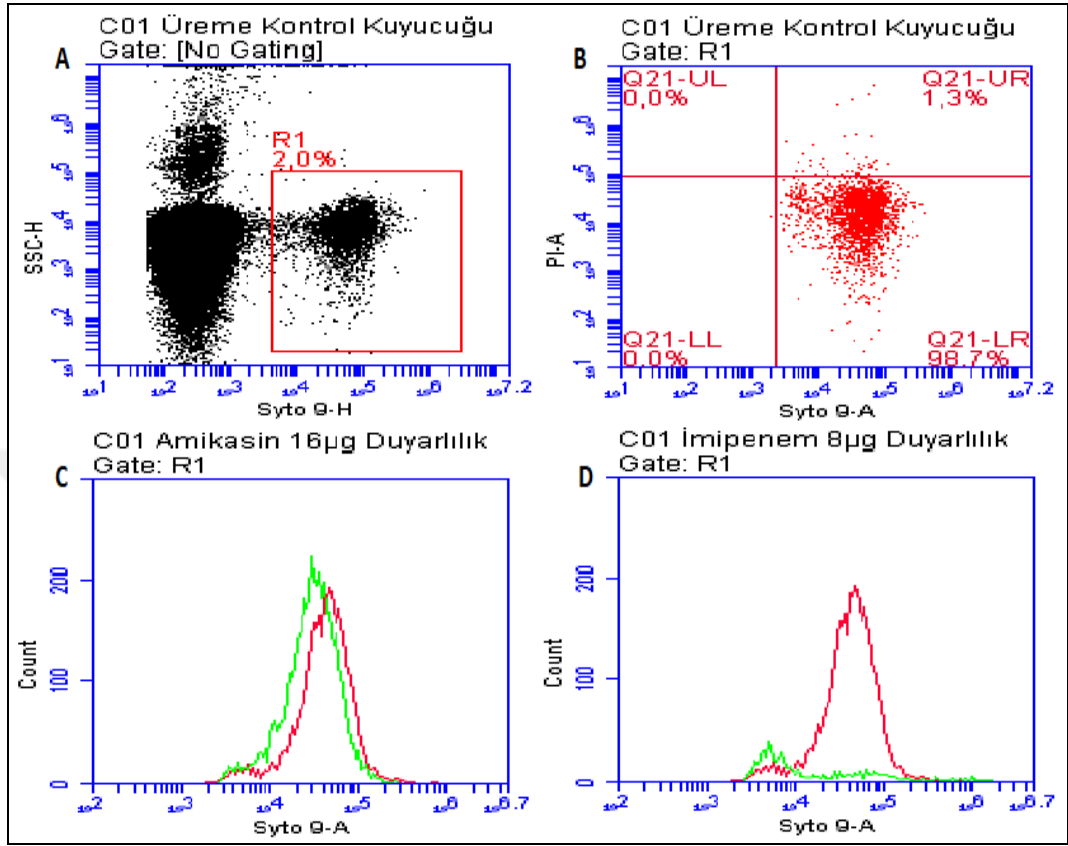
İki nolu suş için antibiyotik duyarlılık sonuçları incelendiğinde; flow sitometrik yöntem ile otomatize sistemler arasında imipenem, meropenem ve

Trimetoprim/Sülfametoksazol duyarlılığı hem VITEK 2 hem de BMD yöntemi ile uyumlu bulunmamıştır. Kolistinin ise sadece VITEK 2 ile uyumlu olmadığı saptanmıştır. İki nolu suş için VITEK 2 sistemi ile %72,7, BMD yöntemi ile %72.7 oranında uyum saptanmıştır. Bu suşların için elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 9. ve Tablo 10.'da sunulmuştur. Ayrıca flow sitometrik yöntemle yapılan antibiyotik duyarlılık testi için örnek grafikler (kontrol, kapılama, duyarlı ve dirençli antibiyotikler) Şekil 13. ve Şekil 14.'te gösterilmiştir.

Tablo 9. *A. baumannii complex* 1 nolu klinik suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 duyarlılıklarının karşılaştırılması

Antibiyotik	Flow sitometri (2 saat inkübasyon sonrası)			BMD	VITEK 2
	EUCAST (mg/L)	Bakteri Sayısı	Sonuç	MİK Sonuç	MİK Sonuç
Üreme Kontrol		4124			
Seftazidim	8	4585	R	32 < R	64 < R
	16	4638			
Amikasin	8	4508	R	32 < R	64 < R
	16	4641			
Gentamisin	4	4608	R	8 < R	8 R
	8	4499			
Netilmisin	4	4649	R	8 < R	32 < R
	8	4640			
Meropenem	2	4641	R	16 < R	16 < R
	8	2791			
İmipenem	2	5585	I	16 R	16 < R
	8	678			
Levofloksasin	0,5	4350	R	4 ≤ R	8 < R
	1	4580			
Siprofloksasinsasin	1	4638	R	2 < R	4 < R
	2	4660			
Kolistin	2	408	S	< 2 S	< 0,5 S
	4	651			
Tobramisin	4	4594	R	8 < R	16 < R
	8	3941			
Trimetoprim/Sülfametoksazol*	2	4552	R	4 < R	16 < R
	4	4567			

R: Dirençli S:Duyarlı I:Artmış doza duyarlı *: Trimetoprim dozu

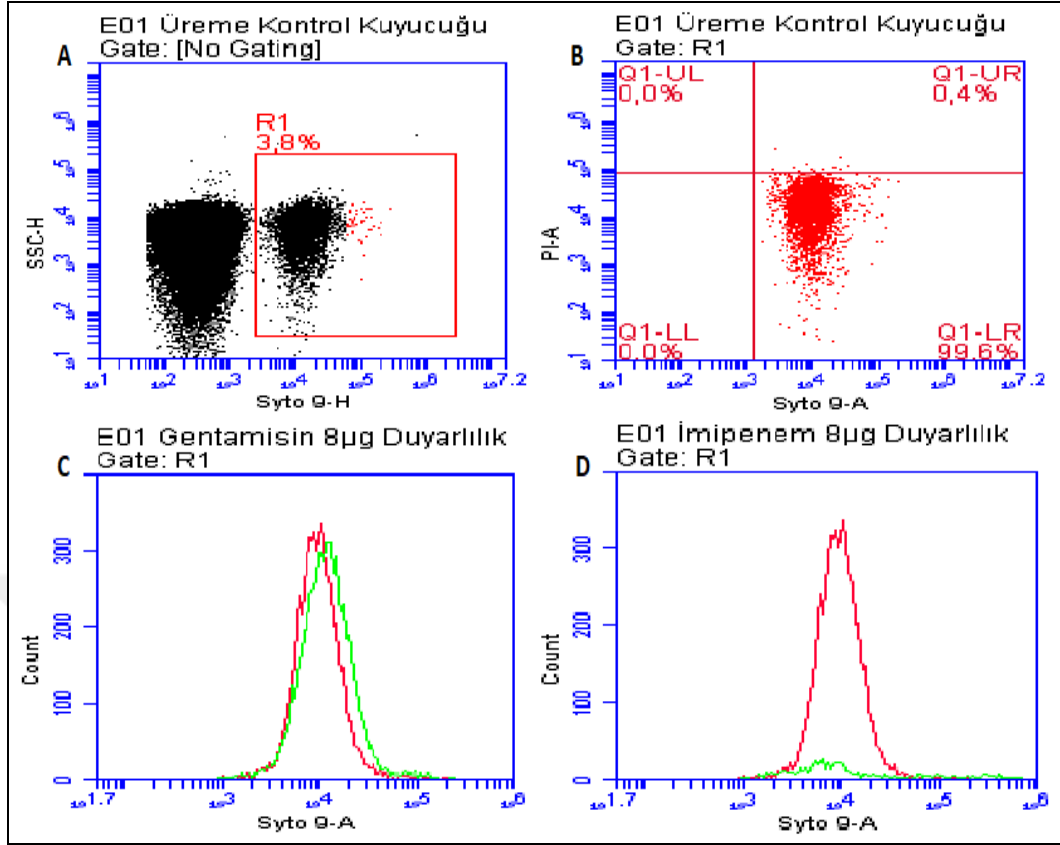


Şekil 13. *A. baumannii* complex 1 nolu klinik şuşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, amikasin ve imipenem duyarlılık overlay grafikleri (**Kırmızı Pik:** Üreme Kontrol Kuyucuğu, **Yeşil Pik:** Antibiyotikli Kuyucuk) **A:** Klinik örnekten izole edilen *Acinetobacter baumannii* 1 nolu klinik şuşunun SSC-H/FL1-H(Syto 9-H) kanalında floresan boyalarla boyanmış hücrelerin dot blot grafiğinde kapılama işlemi, **B:** Kapılama işlemi yapılan hücrelerin FL3-A(PI-A)/FL1-A(Syto9-A) kanalında hücrelerin dot blot grafiği görüntüsü **C:** Amikasin 16µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Dirençli **D:** İmipenem 8µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi **Sonuç:** Artmış doza duyarlı

Tablo 10. *A. baumannii complex 2* nolu klinik suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 duyarlılıklarının karşılaştırılması

Antibiyotik	Flow sitometri (2 saat inkübasyon sonrası)			BMD	VITEK 2
	EUCAST (mg/L)	Bakteri Sayısı	Sonuç	MİK Sonuç	MİK Sonuç
Üreme Kontrol		6439			
Seftazidim	8	6501	R	32 < R	64 < R
	16	5904			
Amikasin	8	6525	R	32 < R	64 < R
	16	4186			
Gentamisin	4	7008	R	8 < R	8 R
	8	6027			
Netilmisin	4	6301	R	8 < R	32 < R
	8	6635			
Meropenem	2	4214	I	16 R	16 < R
	8	2447			
İmipenem	2	5193	I	16 < R	16 < R
	8	662			
Levofloksasin	0,5	7025	R	4 < R	8 < R
	1	6387			
Siprofloksasinsasin	1	5868	R	2 < R	4 < R
	2	6036			
Kolistin	2	4743	R	4 R	<0,5 S
	4	2717			
Tobramisin	4	5902	R	8 < R	16 < R
	8	6326			
Trimetoprim/Sülfametoksazol*	2	5732	R	4 I	16 < R
	4	5338			

R: Dirençli S:Duyarlı I:Artmış doza duyarlı *: Trimetoprim dozu



Şekil 14. A. *baumannii* complex 2 nolu klinik suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, gentamisin ve imipenem duyarlılık overlay grafikleri (**Kırmızı Pik:** Üreme Kontrol Kuyucuğu, **Yeşil Pik:** Antibiyotikli Kuyucuk) **A:** Klinik örnekten izole edilen *Acinetobacter baumannii*(2) suşunun SSC-H/FL1-H(Syto 9-H) kanalında floresan boyalarla boyanmış hücrelerin dot blot grafiğinde kapılama işlemi, **B:** Kapılama işlemi yapılan hücrelerin FL3-A(PI-A)/FL1-A(Syto9-A) kanalında hücrelerin dot blot grafiği görüntüsü **C:** Gentamisin 8µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Dirençli **D:** İmipenem 8µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi **Sonuç:** Artmış doza duyarlı

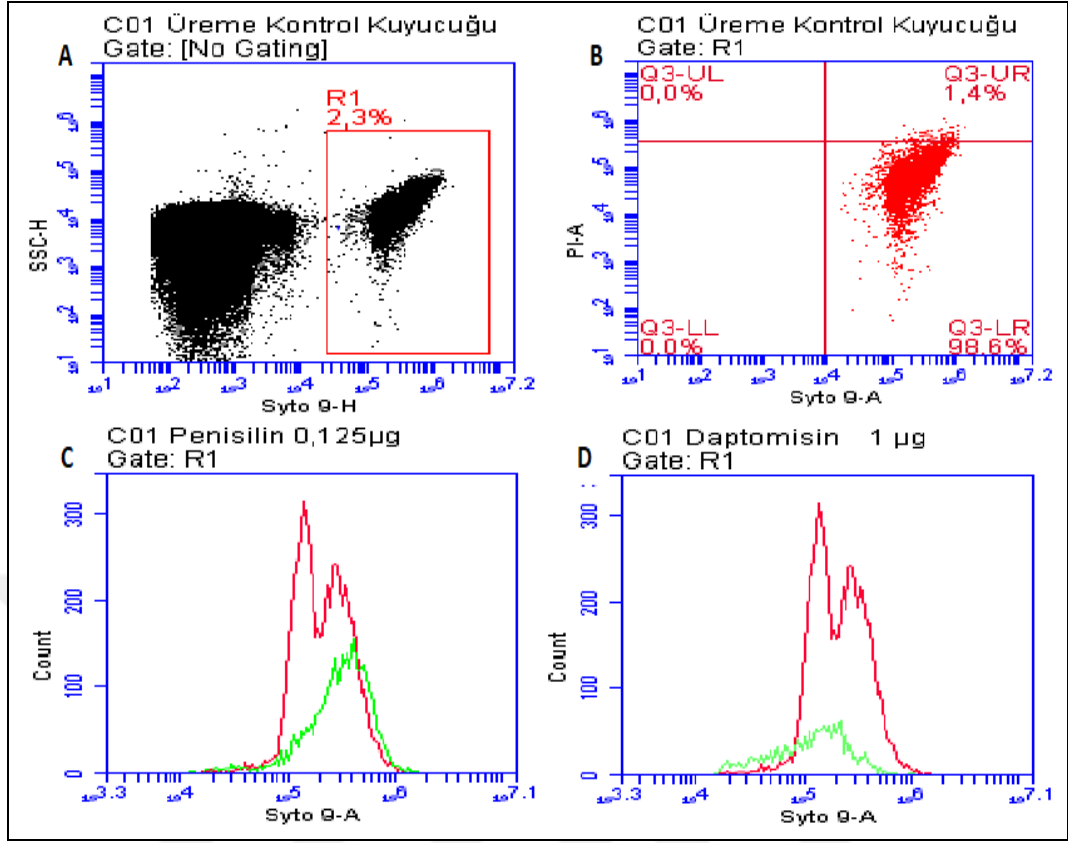
4.1.6. *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

Staphylococcus aureus 29213 ATCC suşu için saptanan antibiyotik duyarlılık sonuçları incelendiğinde; flow sitometrik yöntem ile BMD yöntemi ve VITEK 2 sistemi arasında amikasin ve gentamisin duyarlılığı dışında diğer antibiyotiklerin duyarlılık sonuçları benzer bulunmuştur. Flow sitometrik yöntem ile BMD yöntemi arasında %88,8, VITEK 2 sistemi arasında %88,2 oranında uyum saptanmıştır. Flow sitometri ile tespit edilen antibiyotik duyarlılıkları EUCAST MİK değer aralıkları ile %88,2 uyumlu bulunmuştur. Bu standart suş için elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 11.'de sunulmuştur. Ayrıca flow sitometrik yöntemle yapılan antibiyotik duyarlılık testi için örnek grafikler (kontrol, kapılama, duyarlı ve dirençli antibiyotikler) Şekil 15.'te gösterilmiştir.

Tablo 11. *S. aureus* 29213 ATCC suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 ve EUCAST önerisi ile beklenen duyarlılıklarının karşılaştırılması

Antibiyotik	Flow sitometri (2 saat inkübasyon sonrası)			BMD	VITEK 2	EUCAST beklenen MİK
	EUCAST (mg/L)	Bakteri sayısı	Sonuç	MİK Sonuç	MİK Sonuç	
Üreme Kontrol		7345				
Benzipenisilin	0,125	3664	S	0,5 < R	0,5< R	0,25-2
	0,250	2646				
Sefoksitin tarama	4	3080	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Gentamisin	1	3447	R	<1 S	<0,5 S	0,125-1
	2	3359				
Amikasin	8	3604	I	<4 S	-	1-4
	16	3019				
Levofloksasin	1	2449	S	<0,5 S	0,25 S	0,06-0,5
	2	2680				
Siprofloksasin	1	2156	S	<0,25 S	<0,5 S	0,125-0,5
	2	2089				
Moxifloksasin	0,25	2326	S	< 0,25 S	-	0,016-0,125
	0,5	2483				
Vankomisin	2	2045	S	1 S	1 S	0,5-2
	4	2091				
Teikoplanin	2	2861	S	< 1 S	4 R	0,25-1
	4	2930				
Linezolid	2	3320	S	< 2 S	2 S	1-4
	4	2639				
Daptomisin	1	1711	S	< 0,25 S	1 R	0,125-1
	2	1514				
Eritromisin	1	2903	S	< 0,5 S	1 S	0,25-1
	2	3021				
Tigesiklin	0,5	3048	S	< 0,25 S	< 0,12 S	0,03-0,25
	1	3140				
Trimetoprim/Sülfametoksazol*	2	3140	S	< 1 S	< 10 S	<0,5
	4	3103				
Tetrasiklin	1	2809	S	< 1 S	< 1 S	0,125-1
	2	2178				
Fosfomisin	32	3157	S	< 32 S	< 8 S	0,5-4
Klindamisin	0,25	2387	S	< 0,12 S	0,25 S	0,06-0,25
	0,5	2288				
İndüklenebilir Klindamisin Direnci	0,5	2374	Negatif	Negatif	Negatif	-

R: Dirençli **S:**Duyarlı **I:**Artmış doza duyarlı *: Trimetoprim dozu, -: VITEK 2 AST kartlarında ve EUCAST önerilerinde bulunmayan antibiyotikler



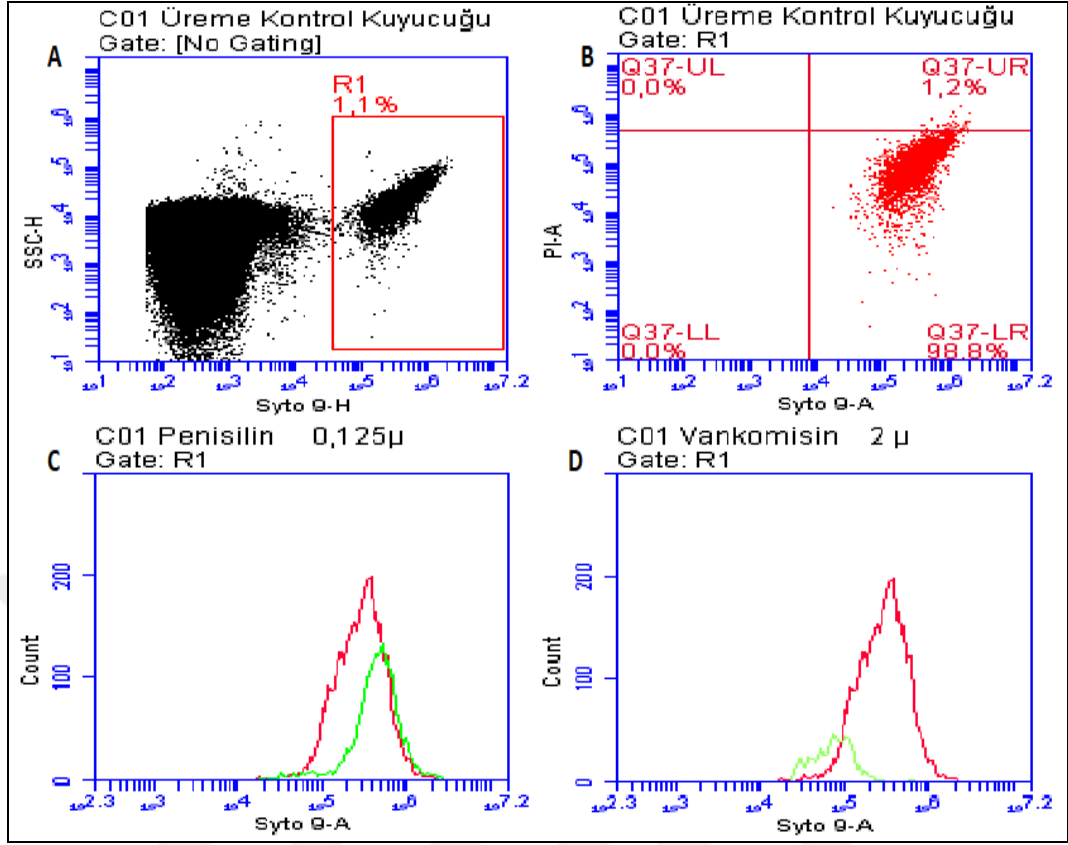
Şekil 15. *S. aureus* 29213 ATCC suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, penisilin ve daptomisin tarama duyarlılık overlay grafikleri (**Kırmızı Pik:** Üreme Kontrol Kuyucuğu, **Yeşil Pik:** Antibiyotikli Kuyucuk) **A:** *Staphylococcus aureus* 29213 ATCC suşunun SSC-H/FL1-H(Syto 9-H) kanalında floresan boyalarla boyanmış hücrelerin dot blot grafiğinde kapılama işlemi, **B:** Kapılama işlemi yapılan hücrelerin FL3-A(PI-A)/FL1-A(Syto9-A) kanalında hücrelerin dot blot grafiği görüntüsü **C:** Penisilin 0,125µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Dirençli **D:** Daptomisin 1µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi **Sonuç:** Duyarlı

Klinik örnekten izole edilen *Staphylococcus aureus* suşunun antibiyotik duyarlılık sonuçlarına göre BMD yöntemi ve VITEK 2 sistemine göre metisilin dirençli iken, flow sitometrik yöntemde metisilin duyarlı olarak saptanmıştır. BMD yöntemi ve VITEK 2 indüklenebilir klindamisin direncini pozitif olarak belirlerken flow sitometrik yöntemde negatif olarak belirlenmiştir. Flow sitometrik yöntem ile BMD yöntemi arasında % 88,8. VITEK 2 sistemi ile ise %80 oranında uyum saptanmıştır. Bu suş için elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 12.'de sunulmuştur. Ayrıca flow sitometrik yöntemle yapılan antibiyotik duyarlılık testi için örnek grafikler (kontrol, kapılama, duyarlı ve dirençli antibiyotikler) Şekil 16.'da gösterilmiştir.

Tablo 12. *S. aureus* klinik suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 duyarlılıklarının karşılaştırılması

Antibiyotik	Flow sitometri (2 saat inkübasyon sonrası)			BMD	VITEK 2
	EUCAST (mg/L)	Bakteri sayısı	Sonuç	MİK Sonuç	MİK Sonuç
Üreme Kontrol		4424			
Benzipenisilin	0,125	2344	R	0,12 < R	0,5 ≤ R
	0,250	1734			
Sefoksitin tarama	4	1501	Negatif	Pozitif	Pozitif
Gentamisin	1	1441	S	<1 S	<0,5 S
	2	1298			
Amikasin	8	1584	S	<4 S	-
	16	1545			
Levofloksasin	1	1432	S	<0,5 S	0,25 S
	2	1055			
Siprofloksasin	1	1485	S	<0,25 S	<0,5 S
	2	1298			
Moxifloksasin	0,25	1785	S	< 0,25 S	<0,25 S
	0,5	1349			
Vankomisin	2	788	S	1 S	1 S
	4	803			
Teikoplanin	2	781	S	< 1 S	S
	4	896			
Linezolid	2	1085	S	< 2 S	2 S
	4	886			
Daptomisin	1	614	S	< 0,25 S	< 1 S
	2	448			
Eritromisin	1	2270	R	2 < R	8 < R
	2	1005			
Tigesiklin	0,5	930	S	< 0,25 S	< 0,12 S
	1	956			
Trimetoprim/Sülfametoksazol*	2	1551	S	< 19 S	< 10 S
	4	1175			
Tetrasiklin	1	2704	R	2 < R	16 < R
	2	2179			
Fosfomisin	32	1121	S	< 32 S	-
Klindamisin	0,25	739	S	< 0,12 S	0,25 S
	0,5	746			
İndüklenebilir Klindamisin Direnci	0,5	1085	Negatif	Pozitif	Pozitif

R: Dirençli S:Duyarlı I:Artmış doza duyarlı *: Trimetoprim dozu, -: VITEK 2 AST kartlarında bulunmayan antibiyotikler



Şekil 16. Klinik örnekten izole edilen *S. aureus* suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, penisilin ve vankomisin tarama duyarlılık overlay grafikleri (**Kırmızı Pik:** Üreme Kontrol Kuyucuğu, **Yeşil Pik:** Antibiyotikli Kuyucuk) **A:** Klinik örnekten izole edilen *Staphylococcus aureus* suşunun SSC-H/FL1-H(Syto 9-H) kanalında floresan boyalarla boyanmış hücrelerin dot blot grafiğinde kapılama işlemi, **B:** Kapılama işlemi yapılan hücrelerin FL3-A(PI-A)/FL1-A(Syto9-A) kanalında hücrelerin dot blot grafiği görüntüsü **C:** Penisilin 0,125µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Dirençli **D:** Vankomisin 2µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi **Sonuç:** Duyarlı

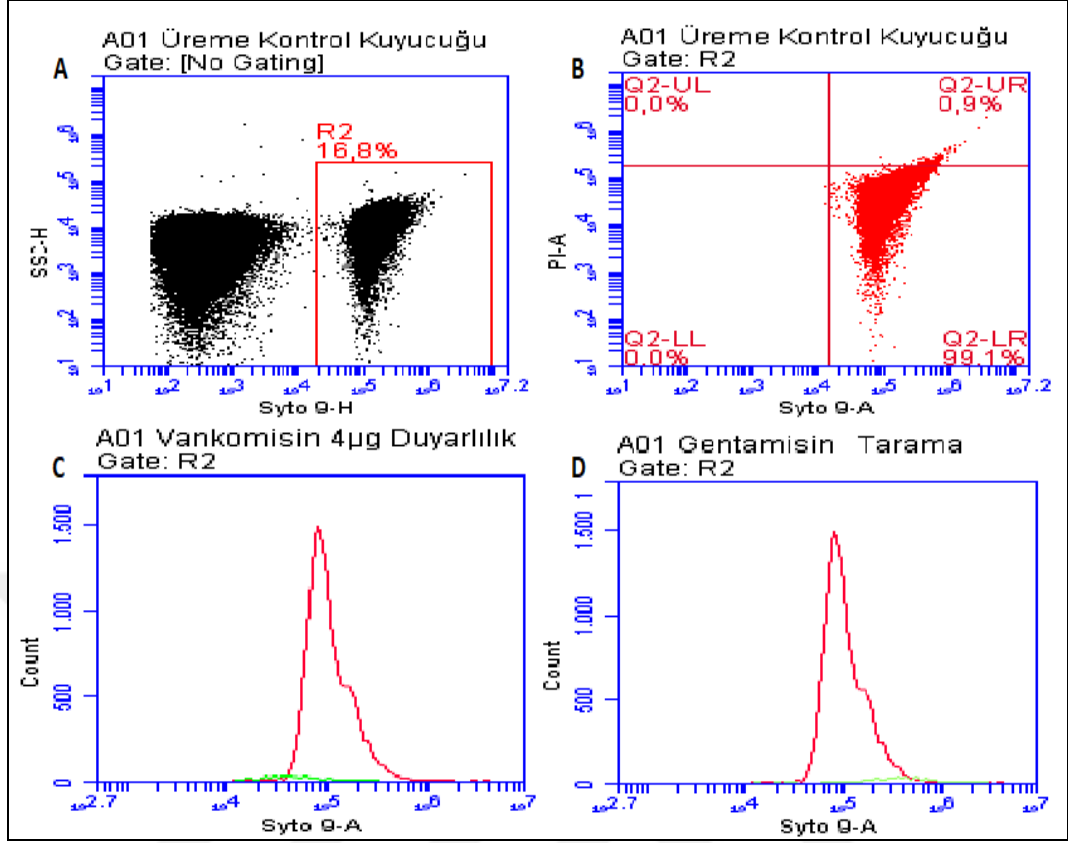
4.1.5 *Enterococcus spp.* suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

Enterococcus faecalis 29212 ATCC suşu için saptanan antibiyotik duyarlılık sonuçları incelendiğinde; flow sitometrik yöntem ile VITEK 2 sistemi ve BMD yöntemi arasında %100 uyum olduğu saptanmıştır. Bu suşun beklenen tüm antibiyotik duyarlılık paternleri EUCAST kriterleri ile %100 uyumlu bulunmuştur. Bu standart suş için elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 11.'de sunulmuştur. Ayrıca flow sitometrik yöntemle yapılan antibiyotik duyarlılık testi için örnek grafikler (kontrol, kapılama, duyarlı ve dirençli antibiyotikler) Şekil 17.'de gösterilmiştir.

Tablo 13. *E. faecalis* 29212 ATCC suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 ve EUCAST önerisi ile beklenen duyarlılıklarının karşılaştırılması

Antibiyotik	Flow sitometri (2 saat inkübasyon sonrası)			BMD	VITEK 2	EUCAST beklenen MİK
	EUCAST (mg/L)	Bakteri sayısı	Sonuç	MİK Sonuç	MİK Sonuç	
Üreme kontrol	-	10000	-			
Ampisilin	4	607	S	< 1 S	< 2 S	0,5- 2
	8	790				
Amoksisilin/Klavulanik asit*	4	725	S	< 8 S	S	-
	8	858				
Gentamisin Tarama	500	771	Negatif	Negatif	Negatif	-
Levofloksasin	4	1777	S	< 1 S	-	0,5-1
	8	1159				
Vankomisin	4	636	S	2 S	2 S	1-4
	8	747				
Linezolid	4	822	S	2 S	2 S	1-4
	8	695				
Teikoplanin	2	686	S	< 1 S	< 0,5 S	0,25-1
	4	665				
İmipenem	2	495	S	< 2 S	-	0,5-2
	4	652				
Trimetoprim/Sülfametoksazol**	0,25	2457	S	< 0,25 S	< 10 S	<0,5
	2	1706				
Tigesiklin	0,25	926	S	< 0,25 S	< 0,12 S	0,03-0,125
	0,5	864				
Siprofloksasin	4	985	S	<0,25 S	< 0,5 S	0,25-2
	8	956				

R: Dirençli S:Duyarlı I:Artmış doza duyarlı *:Amoksisilin dozu **: Trimetoprim dozu, -: VITEK 2 AST kartlarında ve EUCAST önerilerinde bulunmayan antibiyotikler



Şekil 17. *E. faecalis* ATCC 29212 suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, vankomisin ve gentamisin tarama duyarlılık overlay grafikleri (**Kırmızı Pik:** Üreme Kontrol Kuyucuğu, **Yeşil Pik:** Antibiyotikli Kuyucuk) **A:** *Enterococcus faecalis* 29212 ATCC suşunun SSC-H/FL1-H(Syto 9-H) kanalında floresan boyalarla boyanmış hücrelerin dot blot grafiğinde kapılama işlemi, **B:** Kapılama işlemi yapılan hücrelerin FL3-A(PI-A)/FL1-A(Syto9-A) kanalında hücrelerin dot blot grafiği görüntüsü **C:** Vankomisin 4µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Duyarlı **D:** Gentamisin Tarama(yüksek düzey aminoglikozid direnci) duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi **Sonuç:** Negatif

VRE pozitif *Enterococcus faecalis* suşu için saptanan antibiyotik duyarlılık sonuçları incelendiğinde; flow sitometrik yöntem ve otomatize sistemlerden BMD yöntemi arasında %77.7, VITEK 2 sistemi arasında %100 uyum olduğu görülmüştür. BMD sisteminde duyarlı bulunan imipenem ve amoksisilin/klavulanik asit flow sitometrik yöntem ile dirençli bulunmuştur.

VRE pozitif *Enterococcus faecium* suşu ise flow sitometrik yöntem ile test edilen antibiyotiklerin tümüne dirençli saptanmıştır. Bakterinin kontrol kuyucuğunda yeterli sayıya ulaşamadığı görülmüştür. VRE pozitif suşlar için elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 14. ve Tablo 15.'te sunulmuştur. Ayrıca flow

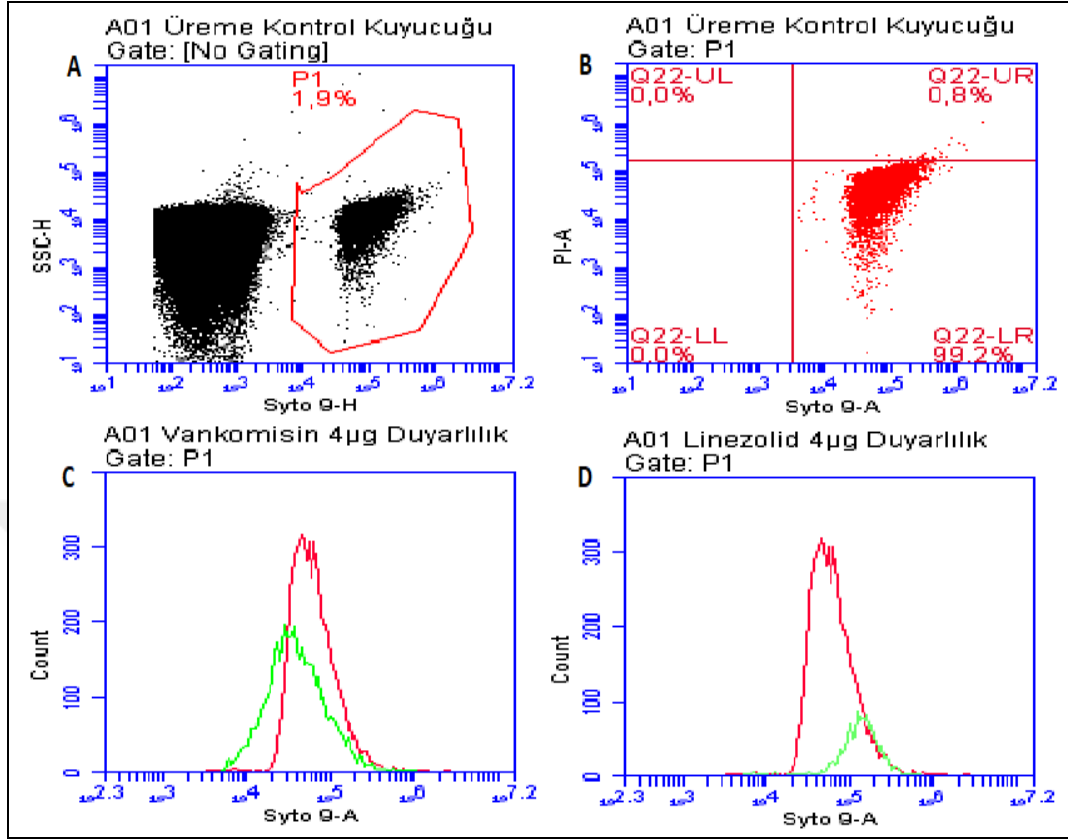
sitometrik yöntemle yapılan antibiyotik duyarlılık testi için örnek grafikler (kontrol, kapılama, duyarlı ve dirençli antibiyotikler) Şekil 18. ve Şekil 19.'da gösterilmiştir.

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619 ve klinik örnekten izole edilen iki suşta da at kanlı müller hinton besiyeri içeren kontrol kuyucuğunda yeterli sayıya ulaşamadığı görülmüş olup, flow sitometrik yöntem antibiyotik duyarlılık sonuçları belirlenememiştir.

Tablo 14. *E. faecalis* klinik örnekten izole edilen vankomisin dirençli suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK duyarlılıklarının karşılaştırılması

Antibiyotik	Flow sitometri (2 saat inkübasyon sonrası)			BMD	VITEK 2
	EUCAST (mg/L)	Bakteri Sayısı	Sonuç	MİK Sonuç	MİK Sonuç
Üreme Kontrol		6278			
Ampisilin	4	4201	R	8 < R	32 < R
	8	7923			
Amoksisilin/Klavulanik asit*	4	4121	R	< 2 S	R
	8	3891			
Gentamisin Tarama	500	3560	Pozitif	Pozitif	Pozitif
Levofloksasin	4	3243	R	4 < R	-
	8	2483			
Vankomisin	4	5070	R	32 < R	32 < R
	8	3316			
Linezolid	4	1336	S	2 S	2 S
	8	1255			
Teikoplanin	2	3022	R	18 < R	32 < R
	4	2535			
İmipenem	2	6246	R	< 2 S	-
	4	6767			
Trimetoprim/Sülfametoksazol**	0,25	7958	R	38 < R	80 R
	2	7452			
Tigesiklin	0,25	1309	S	< 0,2 S	< 0,12 S
	0,5	1504			
Siprofloksasin	4	3373	R	2 < R	8 < R
	8	4446			

R: Dirençli S:Duyarlı I:Artmış doza duyarlı *:Amoksisilin dozu **: Trimetoprim dozu, -: VITEK 2 AST kartlarında bulunmayan antibiyotikler

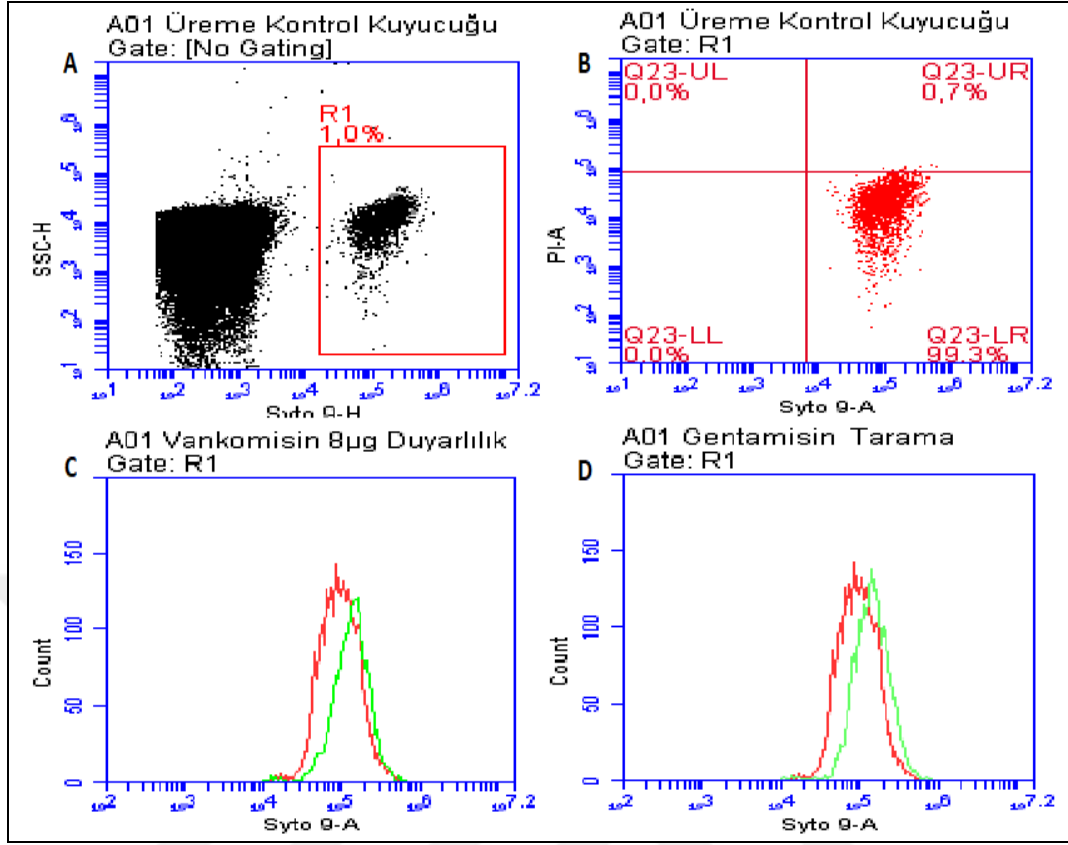


Şekil 18. VRE pozitif *E. faecalis* suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, vankomisin ve linezolid tarama duyarlılık overlay grafikleri (**Kırmızı Pik:** Üreme Kontrol Kuyucuğu, **Yeşil Pik:** Antibiyotikli Kuyucuk) **A:** VRE pozitif *Enterococcus faecalis* suşunun SSC-H/FL1-H(Syto 9-H) kanalında floresan boyalarla boyanmış hücrelerin dot blot grafiğinde kapılama işlemi, **B:** Kapılama işlemi yapılan hücrelerin FL3-A(PI-A)/FL1-A(Syto9-A) kanalında hücrelerin dot blot grafiği görüntüsü **C:** Vankomisin 4µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Dirençli **D:** Linezolid 4µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi **Sonuç:** Duyarlı

Tablo 15. *E. faecium* klinik örnekten izole edilen vankomisin dirençli suşunun Flow sitometri (antibiyotik dozları ve bakteri sayısı), BMD, VITEK 2 duyarlılıklarının karşılaştırılması

Antibiyotik	Flow sitometri (2 saat inkübasyon sonrası)			BMD	VITEK 2
	EUCAST (mg/L)	Bakteri sayısı	Sonuç	MİK Sonuç	MİK Sonuç
Üreme Kontrol		2690			
Ampisilin	4	2204	R	8 < R	32 < R
	8	2030			
Amoksisilin/Klavulanik asit*	4	2342	R	< 2 S	R
	8	2327			
Gentamisin Tarama		2186	Pozitif	Pozitif	Pozitif
Levofloksasin	4	2248	R	4 < R	-
	8	1921			
Vankomisin	4	1866	R	32 < R	32 < R
	8	1865			
Linezolid	4	1754	R	< 1 S	4 S
	8	1279			
Teikoplanin	2	1665	R	16 < R	32 < R
	4	1952			
İmipenem	2	2844	R	< 2 S	-
	4	2331			
Trimetoprim/Sülfametoksazol**	0,25	4300	R	38 < R	40 S
	2	4194			
Tigesiklin	0,25	1798	R	< 0,25 S	< 0,12 S
	0,5	1359			
Siprofloksasin	4	2601	R	2 < R	8 < R
	8	2498			

R: Dirençli S:Duyarlı I:Artmış doza duyarlı *:Amoksisilin dozu **: Trimetoprim dozu, -: VITEK 2 AST kartlarında bulunmayan antibiyotikler



Şekil 19. VRE pozitif *E. faecium* suşunun flow sitometrik yöntem ile üreme kontrol kuyucuğunun kapılama işleminin dot blot grafik görüntüleri, vankomisin ve gentamisin tarama duyarlılık overlay grafikleri (**Kırmızı Pik:** Üreme Kontrol Kuyucuğu, **Yeşil Pik:** Antibiyotikli Kuyucuk) **A:** VRE pozitif *Enterococcus faecium* suşunun SSC-H/FL1-H(Syto 9-H) kanalında floresan boyalarla boyanmış hücrelerin dot blot grafiğinde kapılama işlemi, **B:** Kapılama işlemi yapılan hücrelerin FL3-A(PI-A)/FL1-A(Syto9-A) kanalında hücrelerin dot blot grafiği görüntüsü **C:** Vankomisin 8µg/ml duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi. **Sonuç:** Dirençli **D:** Gentamisin Tarama(yüksek güzey aminoglikozid direnci) duyarlılık durumunun overlay grafiği ile gösterilmesi **Sonuç:** Pozitif

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda antibiyotiklere dirençli bakteriler önemli bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bakterilerin direnç geliştirmesinde uygunsuz antibiyotik kullanımının önemli bir paya sahip olduğu birçok farklı çalışmada gösterilmiştir (Hatipoğlu ve ark. 2018). Yoğun bakım üniteleri, palyatif bakım üniteleri gibi yerlerde antibiyotik kullanımı artmakta ve burada ortaya çıkan dirençli bakteriler, hastanelerde salgınlara neden olabilmektedir (Falagas and Kasiakou). Flow sitometrinin mikrobiyolojide kullanımı 30 yıl öncesine dayanmaktadır. Ancak son yıllarda çalışmalar yoğunlaşmış ve önemli gelişmeler yaşanmıştır. Bu tez çalışmasında, sık karşılaşılan enfeksiyon etkeni bazı bakterilerin flow sitometri ile antibiyotik duyarlılıklarının saptanması amaçlanmıştır. Bu sayede bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının saptanma süresinin 12-14 saat kısaltılması, katı besiyeri plağında ürettiği gün ile aynı gün içerisinde sonuç verilmesi ve antibiyotik tedavisinin erken yönlendirilmesinin sağlanması hedeflenmiştir.

Steen ve ark, 1980'li yılların başlarında β -laktam antibiyotiklerin *E. coli* üzerindeki etkisini araştırmışlardır (Steen et al 1982). Davies ve Hixson 1990'lı yılların sonunda enterokoklar üzerinde vankomisin direncini araştırmışlardır (Davies and Hixson 1998). Flow sitometri kullanılarak yapılan antibiyotik duyarlılık çalışmaları 2000'li yıllarda hız kazanmıştır. Yeni floresan boya kullanılmaya başlanması ve flow sitometri cihazlarında kullanılan lazer teknolojisinin gelişmesi ile antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarına ilgi artmıştır. Yeni floresan boyalardan bir tanesi olan PI; canlı hücreler tarafından hücre içine alınmayan bir boya olduğundan, antimikrobiyal ajanlar veya diğer bileşikler tarafından üretilen canlılık kaybının ölçümü mümkündür. Diğer bir ifade ile PI boyası, ölü ve hasarlı hücreleri boyamaktadır. Gant ve ark, PI' nin alımıyla *E. coli*'nin gentamisin, ampicilin, sefotaksim ve siprofloksasin gibi çeşitli antibiyotiklerin dış hücre zarının bütünlüğü üzerindeki

etkisini incelemiştir (Gant et al. 1993). Bu yöntem ile antibiyotiklerin *E. coli*'nin dış hücre zarının bütünlüğü üzerindeki etkileri incelenmiştir. Flow sitometrik çalışmalarda sık kullanılan boyalardan biri de Syto 9 boyasıdır. Syto 9, hem DNA'ları hem de RNA'ları boyama özelliğine sahip olup, Syto 9 boyası hem ölü hücreleri hemde canlı hücreleri boyamaktadır. Bu nedenle flow sitometrik yöntemle yapılan antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarında tek başına kullanılmamaktadır. Flow sitometrik yöntemle yapılan antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarında Syto 9 boyası ve PI boyası birçok çalışmada ölü/canlı/hasarlı hücre belirlemek amacıyla beraber kullanılmaktadır. İki boyanın bir araya getirildiği kullanıma hazır ticari bir ürün (LIVE/DEAD BacLight, Beckton Dickinson, A.B.D) birçok çalışmada kullanılmıştır. Bu çalışmada söz konusu hazır ticari ürün yerine Syto 9 ve PI boya ayrı ayrı kullanılmıştır. Literatürde flow sitometri ile yapılan az sayıdaki çalışmada DiBAC₄ ve fluorescein diacetate boya kullanılmıştır. Flow sitometri sayesinde floresan boya kullanarak sadece ölü/canlı olduğu hakkında bilgi sahibi olma imkanının yanı sıra bakterilerin şekilleri ve büyüklükleri ile de bilgi sahibi olunabilmektedir.

Antibiyotiklerin bakterilere etkisini gözlemleyebilmek için veya hücreler üzerinde bir etki yaratması için, hücrelerin bir logaritmik fazında olmaları gerekmektedir. Bakterilerin logaritmik fazına 1-2 saat inkübasyon sonrasında geçtiği birçok farklı çalışmada belirtilmiştir (Oliveira et al. 2017, Nuding and Zabel 2013). Literatürde bazı çalışmalarda zengin besiyeri kullanıldığında inkübasyon süresinin 15-20 dakikaya kısalabildiği gösterilmiştir (Broeren et al. 2013, Jindal et al. 2019). Bu çalışmada, literatürde mevcut çalışmalarda sıklıkla kullanılmış olan süre, bizim de optimizasyon çalışmalarımız neticesinde bakteri süspansiyonları antibiyotikli mikropakta 2 saat inkübe edilerek flow sitometrik analiz aşamasına geçilmiştir (Pina-Vaz et al. 2016, Mulrone et al. 2017). Literatürde bakteri süspansiyonları antibiyotikli mikropakta inkübasyonu öncesi sıvı besiyerinde 35 ±2 °C'de 40-60 dakika ön inkübasyon aşamasının yer aldığı çok az sayıda çalışma bulunmaktadır (Kılıç ve ark. 2016, Nuding and Zabel 2013). Bu tez çalışmasında da literatürdeki çalışmaların büyük bir kısmında olduğu gibi ön inkübasyon prosedürü kullanılmamıştır.

Bu çalışmada flow sitometrik yöntem ile antibiyotik duyarlılıkları araştırılan bazı bakterilerin (özellikle gram pozitif bakteriler ve *P. aeruginosa*) 2 saatlik inkübasyon süresinde yeterince üremediği saptanmıştır. Standart suşlardan *P. aeruginosa* 27853 ATCC ve *S. pneumoniae* ATCC haricinde 2 saatlik inkübasyon süresinde yeterli üremeler saptanmıştır. Bununla beraber flow sitometrik yöntem ile antibiyotik duyarlılıklarına bakılan suşlardan epidemiyolojik önemi olan dirençli klinik izolatların (KPC, NDM-1, OXA-48 Pozitif *K. pneumoniae*, MRSA ve VRE pozitif *Enterococcus spp.* gibi) 2 saatlik inkübasyon süresinde standart suşlara göre daha az sayıda saptanmıştır. Ancak klinik izolatlarda yetersiz üremelerin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda yapılan optimizasyon aşamalarında standart suşlar kullanılmıştır. Bundan dolayı özellikle klinik izolatlarda optimize edilen prosedür kullanılarak flow sitometrik yöntem ile antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde hatalar oluşabileceği görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda her bakteri türü için inkübasyon sürelerinin önemi ortaya çıkmış olup, daha sonraki çalışmalarda her bakteri türü için optimum inkübasyon süreleri belirlenmelidir. Bu inkübasyon süreleri belirlenirken flow sitometri yöntemi kazandırdığı hızlı sonuç verme avantajını ortadan kaldırmamalıdır.

Klasik yöntem olan BMD yöntemi ile antibiyotiklerin MİK değerleri belirlenebilmektedir. Ancak BMD yöntemi, referans yöntem olsa da gözle değerlendirilen, en az 16-18 saat inkübasyon gerektiren ve heterojen direncin belirlenemediği bir yöntemdir. Ayrıca bazı yayınlarda BMD yönteminin rölatif olarak MİK değerinin yüksek belirlenmesine yol açtığı belirtilmiştir (Pina-Vaz et al. 2016, Mulroney et al. 2017). Karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* günümüzde önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Karbapenem direncinin hızlı tespiti için literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Flow sitometri yöntemi de bu yöntemlerden biridir. Flow sitometrik yöntem, tüpteki/kuyucuktaki tüm bakteri hücrelerinin direnç fenotipini ölçer ve karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae*'nin fenotipik olarak heterojen dağılımını da gösterir. Mulroney ve ark. flow sitometri ile yaptıkları karbapenem direncini saptama çalışmalarında standart yöntem olan broth mikrodilüsyon ile kuvvetli korelasyon saptamışlardır (Mulroney et al. 2017). Silva ve ark, farklı karbapenem direnç genleri içeren 30 *Enterobacteriaceae* suşu üzerinde

yaptıkları çalışmada karbapenem direnç türünü tespit etmeyi amaçlamışlardır. Kombine disk yöntemine benzer şekilde farklı miktarlarda APBA, EDTA, kloksasilin, temocilin içeren tüpler ile meropenem 2 ve 8 µg/ml dozları çalışmada kullanılmıştır. Çalışmalarında sadece meropenem ile test edilenlere karşılık inhibitör madde içeren örneklerin farklı sonuçlar verdiğini ve karbapenem direnç fenotipinin belirlenmesinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Bu sayede enfeksiyonların yayılmasının önüne geçilebileceği düşünülmüştür (Silva et al. 2016). Bu çalışmada moleküler yöntem ile karbapenem direnç genleri gösterilmiş olan ve flow sitometrik yöntem ile analiz edilen 3 *K. pneumoniae* izolatının 3'ü de ertapenem dirençli, meropeneme 1 suş dirençli, bir suş artmış doza duyarlı, bir suş duyarlı, imipeneme 2 suş artmış doza duyarlı, bir suş duyarlı olarak bulunmuştur. Görüldüğü kadarı ile ertapenem, flow sitometrik yöntem ile karbapenem direncinin hızlıca tespitinde daha duyarlı bulunmuştur. Ancak sadece bu konuya odaklanan ve çok daha fazla sayıda izolatın test edildiği çalışmalara ihtiyaç vardır.

Karbapenem direnci günümüzde daha popüler olmasına rağmen GSBL pozitif *Enterobacteriaceae* ailesi önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Ramos ve ark. flow sitometri ile DİBAC₄ boyası kullanarak GSBL pozitif suşlar üzerine yaptıkları çalışmada 3. kuşak bir sefalosporine dirençli bakteri suşunun sefotaksim veya seftazidimin yanına klavulanik asit ekleyerek çalışmışlardır. Bu çalışmada sadece sefalosporin olan tüp ile sefalosporin+beta laktamaz inhibitörü içeren tüpü karşılaştırarak GSBL pozitif suşları saptayabildiklerini belirtmişlerdir. Bu yöntemin 3 ila 20 (en geç) saat arasında sonuç verebileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada flow sitometrik yöntem ile GSBL pozitif standart *K. pneumoniae* suşu VITEK 2 sistemi ile uyumlu olarak GSBL pozitifliği saptanabilmiştir. GSBL pozitif *E. coli* klinik izolatında ise flow sitometrik yöntem ile VITEK 2 sisteminin aksine GSBL negatif sonuç alınmıştır. Bu iki izolat ile elde edilen sonuçlarda net bir çıkarım yapmak mümkün değildir. Bu nedenle flow sitometrik yöntem ile GSBL pozitifliğinin araştırıldığı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada BMD ve VITEK 2 sisteminde yapılan antibiyotik duyarlılık çalışmalarının sonuçları her izolat ile ilgili tabloda sunulmuştur. Bu iki sistemin

kendi arasındaki uyum/uyumsuzluk durumu, bu çalışmanın amacı dışında kaldığından bu konuda detaylı değerlendirme yapılmamıştır.

Flow sitometrik yöntem ile gram pozitif bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarını belirleme konusunda literatürde sadece birkaç yayın bulunabilmiştir. (Nuding and Zabel 2013,

[https://patents.google.com/patent/US9290790B2/en?q=\(US+Patent+n%E2%97%A6+9%2c290%2c790+B2\)](https://patents.google.com/patent/US9290790B2/en?q=(US+Patent+n%E2%97%A6+9%2c290%2c790+B2)). (Erişim Tarihi: 18 Ekim 2019). Flow sitometrik yöntem,

gram pozitif bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde gram negatif bakterilerde olduğu kadar başarılı değildir. Bu tez çalışmasında *E. faecalis* ATCC 29212 ve *S. aureus* ATCC 29213 suşları dışında diğer yöntemlerle yüksek oranda uyum olmadığı saptanmıştır.

Flow sitometrik yöntemin gram pozitif bakteriler için optimizasyon çalışmalarında bu iki standart suş kullanılmıştır. Ancak *S. pneumoniae* suşlarının optimize edilen inkübasyon süresinde yeterince üremediği görülmüş olduğundan antibiyotik duyarlılık sonuçları belirlenememiştir. Ayrıca klinik örnekten izole edilen metisilin dirençli *S. aureus* suşunun metisiline dirençli olduğu optimize ettiğimiz yöntem ile tespit edilememiştir. Metisilin direnci dışında diğer antibiyotiklere uyum oranı yüksektir. Literatürde stafilokoklarda metisilin direncinin flow sitometrik yöntem ile araştırıldığı iki çalışmaya ulaşılmıştır. Bunlardan birinde hücresel depolarizasyonu gösteren DiBAC₄ floresan boyası ve Protein A'ya spesifik antikor kullanılmıştır. Bu çalışmada, 24 tane klinik MRSA izolatından 22 tanesinde metisilin direncinin başarılı şekilde gösterildiği rapor edilmiştir. Metisilin direnci saptanamayan 2 MRSA suşunda Protein A üretiminin olmadığından kaynaklandığını belirtmişlerdir.(Nuding and Zabel 2013). Diğer çalışmada ise 2 ve 4 µg/ml oksasilin ve fluorescein diacetate floresan boyası kullanılarak stafilokoklarda metisilin direncinin belirlenebildiği söylenmiştir. Ancak bu çalışma patent raporu olduğundan kaç izolattan kaçında metisilin direncinin saptanabildiği, diğer bir deyişle başarı oranı hakkında veri bulunmamaktadır.

([https://patents.google.com/patent/US9290790B2/en?q=\(US+Patent+n%E2%97%A6+9%2c290%2c790+B2\)](https://patents.google.com/patent/US9290790B2/en?q=(US+Patent+n%E2%97%A6+9%2c290%2c790+B2)). (Erişim Tarihi: 18 Ekim 2019). Ayrıca oksasilin kullanılmış olmasının da bazı metisilin dirençli stafilokok tiplerini saptayamadığı ve bunun önemli bir dezavantaj olduğu bilinmelidir. Gram pozitif bakterilerin

antibiyotik duyarlılıklarının flow sitometrik yöntem ile belirlenmesi konusunda daha detaylı ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Katı besiyerinde üreyen kolonilerden sıvı besiyerine pasaj alındıktan sonra antibiyotikli mikroplağa alınmadan önce bir süre inkübasyon aşamasının prosedüre eklenmesi ve/veya antibiyotikli mikroplaktaki inkübasyon süresinin uzatılması gibi modifikasyonların sonuca etkisi araştırılmalıdır.

Epidemiyolojik önemi olan direnç profillerinden birisi olan VRE klinik izolatları da bu çalışmada incelenmiştir. BMD yönteminde VRE pozitif bulunan iki enterokok (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*) izolatında vankomisin direnci flow sitometrik yöntem ve VITEK 2 sistemi ile doğru olarak saptanmıştır. Flow sitometrik yöntem ile VRE saptanmasına yönelik literatürde çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde vankomisin duyarlı *E. faecalis* suşları ile vankomisin dirençli *E. faecalis* ATCC 51299 suşu araştırılmıştır. Çalışmalarında vankomisin dirençli enterokok suşlarına doğrudan bağlanabilen Vancomycin@FL kitini kullanmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda en ideal VRE saptama oranının 1 µg/ml vankomisin dozunda olduğunu belirtmişlerdir. Ancak bu vankomisin dozu, EUCAST breakpoint noktası (4 µg/ml) ile uyumsuzdur. Flow sitometrik yöntemde enterokok suşu vankomisin dirençli olsa bile 24 µg/ml vankomisin dozunda ve daha yüksek dozlarda duyarlı suşlarla benzer görüntü/sonuç aldıklarını raporlamışlardır (Jarzembowski et al. 2010). Bu tez çalışmasında VRE pozitif suşların vankomisin dozu arttıkça daha az üreyebildiği saptanmış olup, vankomisin direnci BMD ve VITEK 2 ile uyumlu bulunmuştur.

Bu çalışmada, her suş ve her antibiyotik konsantrasyonu flow sitometri cihazında 3 defa okutulmuş ve tek tek analiz edilmiştir. Literatürde, bu çalışmada olduğu gibi çeşitli bakterilerin çok sayıda antibiyotiğe karşı duyarlılığının test edildiği çalışma nadirdir. Mevcut çalışmalar genellikle bir tür bakteriye veya belli antibiyotik gruplarına odaklanmıştır. Kullanılan boyalar, inkübasyon süreleri, flow sitometri cihaz ayarları ve analiz programı optimize edildikten sonra daha hızlı ve seri bir şekilde analizler yapılabilmektedir. Ancak tüm flow sitometri cihazları ile bu tip mikrobiyolojik analizler yapılamamaktadır. Örneğin genellikle hematolojik ve immünolojik hastalıkların tanısında kullanılan cihazlar için bakteriler küçük partiküller olduğundan bu cihazlarla mikrobiyolojik çalışmaların yapılması zordur (Standart

boncuklar kullanılarak yapılabilir). Dünyada mevcut flow sitometri cihazlarından bakteriler gibi küçük partikülleri okuyabilen cihazlar bu çalışmalara uygundur. Bu tip özelliklere sahip az sayıda cihaz bulunmakta olup, bunlar da genellikle endüstriyel amaçlı kullanılmaktadır.

Tüm antibiyotikler göz önüne alındığında flow sitometrik yöntemle yapılan antibiyotik duyarlılık çalışmaları ile BMD ve VITEK 2 sistemi arasında; iki *E. coli* suşu için yüksek düzeyde uyum (BMD %92.3, VITEK 2 %84,6), dört *K. pneumoniae* suşu için yüksek düzeyde uyum (BMD %88.7, VITEK 2 %81.8), iki *P. aeruginosa* suşu için yüksek düzeyde uyum (BMD %73, VITEK 2 %73), iki *A. baumannii complex* suşu için yüksek düzeyde uyum (BMD %81.8, VITEK 2 %81.8), iki *S. aureus* suşu için yüksek düzeyde uyum (BMD %86.1, VITEK 2 %81.2), üç *Enterococcus spp.* suşu için yüksek düzeyde uyum (BMD %81.8, VITEK 2 %88.8) saptanmıştır. Bu çalışmada flow sitometrik yöntem ile test edilen ve yeterli üreme görülen tüm suşların antibiyotik duyarlılıkları göz önüne alındığında, denenen toplam antibiyotik sayısı 364 olup BMD ile uyum 177/198 (%89.3), VITEK 2 ile uyum 139/166 (%83.7) saptanmıştır.

Bu çalışmanın sonucunda, flow sitometri yönteminin antibiyotik duyarlılık çalışmalarında kullanılabileceği ve bu yöntemin birçok avantajı olduğu tespit edilmiştir. En önemli avantajı olarak da antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuç verme süresini 12-14 saat kısaltması ve aynı gün içinde sonuç vermesidir. Bunun sonucunda tedavi erken yönlendirildiğinden; mortalite ve morbidite oranlarının düşmesi, hastanede yatış süresinin kısalması, hasta bakım maliyetlerinin düşmesi, hekimlerin iş yükünün azalması gibi yararlar sağlanacaktır. Özellikle epidemiyolojik öneme sahip direnç paternlerinin (Karbapenem direnci, MRSA ve VRE gibi) hızlı tespit edilebilmesi önemli bir avantajdır. Bunun dışında canlı, ölü ve hasarlı hücrelerin tespit edilmesi bu yöntem ile mümkün olduğundan heterojen direnç analizlerinde de yararlı olacaktır. Ayrıca direkt örnekte bulunan bakteri varlığını, sayısını ve bulunan bakterinin saf olup olmadığını saptayabilme özelliği bulunmaktadır. Ancak mevcut çalışmalarda görüldüğü üzere bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Yöntemin henüz tüm laboratuvarlarda kullanılabilecek şekilde standardize edilmiş olmaması ve tecrübeli personel gerektirmesi öne çıkan dezavantajları olarak söylenebilir. Bu

konuda çalışmalar yapıldıkça geliştirilecek uygun bilgisayar yazılım programlarının da desteği ile bu yöntem, rutin kullanıma girme potansiyeline sahiptir. Farklı marka flow sitometri cihazı ve farklı floresan boyalar ile daha fazla sayıda klinik bakteri izolatının test edilememiş olması bu çalışmanın kısıtlayıcı yönleridir.

Sonuç olarak;

Bu çalışmada olduğu gibi çok sayıda bakteri türü ve bunların güncel kılavuzlarda önerilen tüm antibiyotiklere karşı duyarlılığının test edildiği çalışmalar literatürde nadirdir. Flow sitometrik yöntemle yapılan antibiyotik duyarlılık çalışmaları ile BMD ve VITEK 2 sistemi arasında yüksek düzeyde uyum saptanmıştır. Gram negatif bakterilerde gram pozitif bakterilere göre flow sitometrik ve diğer yöntemlerin uyumunun daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir. Flow sitometrik yöntem antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuç verme süresini 12-14 saat kısaltmakta ve aynı gün içerisinde sonuç vermektedir. Hızlı sonuç verme yönü özellikle epidemiyolojik öneme sahip direnç paternlerinin (Karbapenem direnci, MRSA ve VRE gibi) erken tespit edilebilmesi açısından önemlidir. Ancak flow sitometri henüz tüm mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılabilir şekilde standardize edilmemiştir ve deneyimli personele ihtiyaç vardır. Flow sitometri ile yapılacak mikrobiyolojik çalışmalarda, amaca uygun floresan boya ve metod seçilmelidir. Antibiyotik duyarlılıklarının flow sitometrik yöntem ile belirlenmesi konusunda daha detaylı ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Acar M, Somer A, Salman N. (2015). Yeni antibiyotikler. Çocuk Dergisi, 15(3-4):99-103
- Agwuh KN, MacGowan A. (2006). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycyclines, J Antimicrob Chemother, 58(2):256-65.
- Akalın H. (2007). Kolistin. ANKEM Derg, 21(Ek2):26-8.
- Aktuğlu Y. (1997). Giriş ve Genel Bilgiler Ed: Aktuğlu Y. Pratikte antibiyotik kullanımı sempozyum dizisi. Yayın No: 1, s;11–53.
- Allman R, Hann AC, Manchee R, Lloyd D. (1992). Characterization of bacteria by multiparameter flow cytometry. J. Appl. Bacteriol, 73: 438– 44.
- Álvarez-Barrientos A, Arroyo J, Nombela RCC, Sánchez-Pérez M. (2000). Applications of flow cytometry to clinical microbiology. Clin Microbiol Rev, Apr; 13(2): 167–195.
- Assunção P, Antunes NT, Rosales RS, de la Fe C, Poveda C, Poveda JB, Davey HM. (2006). Flow cytometric method for the assessment of the MICs of antibacterial agents to Mycoplasma agalactiae. Cytometry, A 69A: 1071–6.
- Aygün G. (2002). Akılcı antibiyotik kullanımı ve erişkinde toplumdan edinilmiş enfeksiyonlar sempozyum dizisi no: 31, Kasım 2002; s. 39-54
- Bachmaier J, Autenrieth I (1998) Substantial equivalence determination decision summary; assay only template. Clinical Infectious Diseases, 16: 79-87.
- Baltekin O, Boucharin A, Tano E, Andersson DI, Elf J (2017) Antibiotic susceptibility testing in less than 30 min using direct single-cell imaging. Proceedings of the National Academy of Sciences, 20: 558.

- Barbesti S, Citterio S, Labra M, Baroni MD, Neri MG, Sgorbati S. (2000). Two and three-color fluorescence flow cytometric analysis of immunoidentified viable bacteria. *Cytometry*, 40: 214–8.
- Baumgarth N, Roederer M. (2000). A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J. immunol. methods*, Amsterdam, v. 243, n. 1, p. 77-97.
- Bayındır Y. (2010). 1986'dan 2010'a makrolidler. *ANKEM Derg*; 24 (Ek 2) :19-26
- Belak JM (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 48: 5-16.
- Benjamin Buyschaert, Bo Byloos, Natalie Leys, Rob Van Houdt, Nico Boon. Reevaluating multicolor flow cytometry to assess microbial viability. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100:9037–9051. DOI 10.1007/s00253-016-7837-5
- Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann HU, Egli T. (2007). Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight kit in combination with flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol*, 73: 3283–3290.
- Boye E, Lobner-Olesen A. (1990). Flow cytometry: illuminating microbiology. *New Biol*, 2:119–25.
- Boye E, Steen HE. (1983). Flow cytometry of bacteria: a promising tool in experimental and clinical microbiology. *J. Gen. Microbiol*, 129: 973– 980.
- Broeren MAC, Y. Maas, E. Retera, N. L. A. Arents.(2013). Antimicrobial susceptibility testing in 90 min by bacterial cell count monitoring. *Clin Microbiol Infect*, 19: 286–91.
- Carroll KC, Glanz BD, Borek AP, Burger C, Bhally HS, et al. (2006) Evaluation of the BD Phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology*, 44:3506-3509.

- Chambers HF. (1998). Chloramphenicol, tetracyclines, macrolides, clindamycin, & streptogramins. In: Basic & Clinical Pharmacology, Katzung BG (ed) 7th ed, Appleton & Lange, Connecticut, 743-751.
- Chambers HF. (2001). Antimicrobial Agents. Ed: Goodman LS, Gilman A. Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics 10th edition, pp; 1143-1169, The McGraw-Hill Company, USA.
- Chantell C (2015) Multiplexed automated digital microscopy for rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of bacteria and yeast directly from clinical samples. *Clinical Microbiology, Newsletter* 37:161-167.
- Choi J, Jung Y-G, Kim J, Kim S, Jung Y, et al. (2013) Rapid antibiotic susceptibility testing by tracking single cell growth in a microfluidic agarose channel system. *Lab on a Chip*, 13: 280-287
- Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. (2014). M100-S24.
- Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. (2015). M07-A10.
- Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. (2018). CLSI M100 ED28
- Comas J, Vives-Rego J. (1997). Assessment of the effects of gramicidin, formaldehyde, and surfactants on *Escherichia coli* by flow cytometry using nucleic acid and membrane potential dyes. *Cytometry*, 29: 58–64.
- Çetinkaya Y, Ünal S. (1997). Glikopeptid antibiyotikler. *Flora* 1997, 1(Ek:1): 3-14.
- Davey HM, Hexley P. (2011). Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. *Environ. Microbiol*, 13:163–71..
- Davey HM, Kell DB, Weichart DH, Kaprelyants AS. (2004). Estimation of microbial viability using flow cytometry. *Curr. Protoc. Cytom*, 11:11.3.1-11.3.21.

- Davey HM. (2011). Life, Death, and In-Between: Meanings and Methods in Microbiology Applied and Environmental Microbiology, Aug, 77 (16) 5571-6; DOI: 10.1128/AEM.00744-11.
- Davies D, Hixson C. (1998). Study of the effect of Ampicillin concentration and exposure time on E. coli using flow cytometry and the FAST-2 kit. Cytometry, 9(Suppl.):39
- Davies J, Davies D. (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev, 74: 417–433.
- Dittrich W, Göhde W. (1969). Impulse fluorometry of single cells in suspension. Z.Naturfosche B. São Paulo, Mar; v. 24, n. 3, p. 360-361,
- Doern GV, Vaoutour R, Gaudet M, Levy B. (1994). Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. J. Clin. Microbiol, 32:1757–62.
- Errante PR, Ebbing PCC, Rodrigues FSMR, Ferraz RRN, Silva NP. (2015) Flow cytometry: a literature review. Rev. Ciênc. Méd. Biol, Salvador, v. 14, n. 2, p. 211-224
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing EUCAST. (2019). Clinical breakpoints- bacteria (v 8.1).
- Falagas ME, Kasiakou SK. (2005). Kolistin : The revival of polymyxins for th of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infection. Clin Infect Dis, 40(9):1333-1341
- Fekety R. (2000). Vancomycin, teicoplanin, and the streptogramins: quinopristin and dalfopristin. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R(eds.). Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th edition, Philadelphia, Churchill Livingstone, 382-392.

- Ferraro MJ (2000). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, NCCLS 14: 13-19.
- Ferraro MJ, Jorgensen JH. (1995). Instrument-based antibacterial susceptibility testing, p. 1379–84. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 1st ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Fuursted K. (1995). Postantibiotic effect: with a highlight on its mechanism. *Antimicrob. Infect. Dis. Newsl*, 14: 21–4.
- Gant VA, Warnes G, Phillips I, Savidge GF. (1993). The application of flow cytometry to the study of bacterial responses to antibiotics. *J. Med. Microbiol*, 39: 147–54.
- Gilbert DN. (1995). Aminoglycosides. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th ed, New York: Churchill-Livingstone: 279-306
- Gratzner HG, Leif RC, Ingram DJ, Castro A. (1975) The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluorescent determination of DNA replication in single cells and chromosomes. *Exp. cell res*, New York, v. 95, n. 1, p. 88-94.
- Green R, Wachsmann-Hogiu S. (2015) Development, history, and future of automated cell counters. *Clin. lab. med*, Philadelphia, v. 35, n.1, p.1-10.
- Guatelli JC, Gingeras TR, Richman DD. (1989). Nucleic acid amplification in vitro: detection of sequences with low copy numbers and application to diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin. Microbiol. Rev*, 2: 217–226.
- Günel E, Erdem H. (2014). Kinolonlar. *İç Hastalıkları Dergisi*, 21: 69-85

- Hardy RR, Hayakawa K, Haaijman J, Herzenberg LA. (1982). B-cell subpopulations identifiable by two-color fluorescence analysis using a dual-laser FACS. *Ann N Y Acad Sci*, 399:112-121
- Harmony PG, Kenneth A. (2003). Pharmacology review: Newer antibiotics: Linezolid. *NeoReviews*, 4:128.
- Haugland RP. (1996). *Handbook of Fluorescent Probes And Research Chemicals*. Molecular Probes Inc. Eugene, Oreg.
- Havlichek DH, Stein GE. (1999). Sulfonamides. Yu VL, Merigan TC, Barriere SL (eds): *Antimicrobial Therapy and Vaccines*. Williams&Wilkins Company, Baltimore, 1999, s. 972-77.
- Hayden RT, Clinton LK, Hewitt C, Koyamatsu T, Sun Y, et al. (2016) Rapid antimicrobial susceptibility testing using forward laser light scatter technology. *Journal of clinical microbiology*, 54: 2701-2706.
- Herzenberg LA, Tung J, Moore WA, Herzenberg LA, Parks DR. (2006). Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nat. immunol.*, New York, v. 7, n. 7, p. 681-5.
- Herzenberg LA. (2002). The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin. chem.*, New York, v. 48, n. 10, p. 1819-1827.
- Hoffman RA, Kung PC, Hansen WP, Goldstein G. (1980). Simple and rapid measurement of human T lymphocytes and their subclasses in peripheral blood. *Proc Natl Acad Sci*, Aug;77(8):4914-4917.
- Hutter KJ, Oldiges H. (1980). Alterations of proliferating microorganisms by flow cytometric measurements after heavy metal intoxication. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 4: 57.
- Jarzembowski T, Jozwik A, Wisniewska K, Witkowski J. (2010) Flow Cytometry Approach Study of *Enterococcus faecalis* Vancomycin Resistance by

Detection of Vancomycin@FL Binding to the Bacterial Cells. *Curr Microbiol*, 61:407–0

Jepras RI, Carter J, Pearson SC, Paul FE, Wilkinson MJ. (1995). Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*, 61: 2696–701.

Jindal S, Thampy H, Day PJR, Kell DB. (2019). Very rapid flow cytometric assessment of antimicrobial susceptibility during the apparent lag phase of microbial (re)growth. *Microbiology*, Apr;165(4):439-454. doi: 10.1099/mic.0.000777. Epub 2019 Feb 11

Kamentsky LM, Melamed MR, Derman H. (1965). Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis. *Science*, 150:630–631.

Kaprelyants A, Kell DB. (1992). Rapid assessment of bacterial viability and vitality using rhodamine 123 and flow cytometry. *J. Appl. Bacteriol*, 72:410–422.

Kaprelyants AS, Mukamolova GV, Davey HM, Kell DB. (1996). Quantitative analysis of the physiological heterogeneity within starved cultures of *Micrococcus luteus* using flow cytometry and cell sorting. *Appl. Environ. Microbiol*, 62: 1311–6.

Kilic A, Dogan E, Kaya S, Oren S, Tok D, Ardic N, Baysallar M. (2016). Rapid Identification of *Klebsiella pneumoniae* by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and Detection of Meropenem Resistance by Flow Cytometric Assay. *J. Clin. Lab. Anal*, 30: 1191–7

Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED, Cars O. (2013). Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*, Dec;13(12):1057-98. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70318-9.

- Levy SB. (2007). Antibiotic Resistance: An Ecological Imbalance, in Ciba Foundation Symposium 207- Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread. Chadwick DJ, Goode J. John Wiley & Sons, Ltd. (ed): Chichester, UK. 1:1-14. 10.1002/9780470515358.ch1
- Ligozzi M, Bernini C, Bonora MG, de Fatima M, Zuliani J, et al. (2002) Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram positive cocci. *Journal of clinical microbiology*, 40: 1681-1686.
- Liu CY, Han YY, Shih PH, Lian WN, Wang HH, et al. (2016) Rapid bacterial antibiotic susceptibility test based on simple surfaceenhanced Raman spectroscopic biomarkers. *Scientific reports*, 6: 23375.
- Lloyd D. (1993). *Flow Cytometry in Microbiology*. Springer-Verlag, London, United Kingdom.
- Loken MR, Parks DR, Herzenberg LA. (1977). Two-color immunofluorescence using a fluorescence-activated cell sorter. *J. histochem. Cytochem*, Baltimore, July; v. 25, n. 7, p. 899-907,
- Longo G, Alonso-Sarduy L, Rio LM, Bizzini A, Trampuz A, et al. (2013). Rapid detection of bacterial resistance to antibiotics using AFM cantilevers as nanomechanical sensors. *Nature nanotechnology*, 8: 522.
- Lopez-Amoros R, Comas J, Vives-Rego J. (1995). Flow cytometric assesment of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* starvation survival in seawater using rhodamine 123, propidium iodide, and oxonol. *Appl. Environ. Microbiol*, 65: 2521–26.
- Lorian V, Ernst J, Amaral L. (1989). The post-antibiotic effect defined by bacterial morphology. *J. Antimicrob. Chemother*, 23: 485–91.
- Marti GE, Stetler-Stevenson M, Blessing JJ, Fleisher TA. (2001). Introduction to Flow Cytometry. *Seminars in Hematology*, 38(2):93-9.

- Martinez OV, Gratzner HG, Malinin TI, Ingram M. (1982). The effect of some beta-lactam antibiotics on *Escherichia coli* studied by flow cytometry. *Cytometry*, 3: 129–33.
- Mason DJ, Allman R, Stark JM, Lloyd D. (1994). Rapid estimation of bacterial antibiotic susceptibility with flow cytometry. *J. Microsc*, 176:8–16.
- Mason DJ, Lopez-Amoros R, Allman R, Stark JM, D. Lloyd. (1995). The ability of membrane potential dyes and calcafluor white to distinguish between viable and non-viable bacteria. *J. Appl. Bacteriol*, 78: 309–15.
- Mazıoğlu L. (2010). 1986'dan günümüze karbapenemler ANKEM Derg, 24 (Ek 2): 33-5
- Mıstık R. (2000). Aminoglikozid antibiyotikler ve günde tek doz kullanımları. *Klimik Dergisi*, 1 Cilt 13, Sayı: 2 s:43-5
- MicroScan WalkAway (1996) Substantial equivalence determination decision summary, assay only template. K041150
- Muller S, Davey H. (2009). Recent advances in the analysis of individual microbial cells. *Cytometry*, 75A: 83–5.
- Mulroney KT, Hall JM, Huang X, Turnbull E, Bzdyl NM, Chakera A, Naseer U, Corea EM, Ellington MJ, Hopkins KL, Wester AL, Ekelund O, Woodford N, Inglis TJJ. (2017). Rapid susceptibility profiling of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep* May 15;7(1):1903.
- Nielsen TH, Sjöholm OR, Sørensen J. (2009). Multiple physiological states of a *Pseudomonas fluorescens* DR54 biocontrol inoculant monitored by a new flow cytometry protocol. *FEMS Microbiol. Ecol*, 67: 479–90.
- Nordmann P, Naas T, Poirel L. (2011). Global spread of Carbapenemase producing

- Novik V, Hofreuter D, Galan JE. (2010). Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in its interaction with epithelial cells. *Infect. Immun*, 78: 3540–53.
- Nuding S, Lutz T Zabel. (2013). Detection, Identification and Susceptibility Testing of Bacteria by Flow Cytometry. *Bacteriol Parasitol S:5* <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9597.S5-005>
- Nunez R. (2001). Flow cytometry: principles and instrumentation. *Curr. issues mol. biol (Print)*., Wymondham, v. 3, n. 2 , p. 39-45.
- Oliveira CS, Teixeira-Santos R, Silva AP, Pinho E, Mergulhão P, Silva-Dias A, Marques N, Martins-Oliveira I, Rodrigues AG, Paiva JA, Cantón R and Pina-Vaz C (2017). Potential Impact of Flow Cytometry Antimicrobial Susceptibility Testing on the Clinical Management of Gram-Negative Bacteremia Using the FASTinov® Kit. *Front. Microbiol*, 8:2455. doi: 10.3389/fmicb.2017.02455
- Opens Helix I (2015) Roche gobbles Smarticles. *New Yorker*, 26: 186.
- Ordoñez JV, Wehman NM. (1993). Rapid flow cytometric antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus*. *Cytometry*, 14:811–818.
- Öncül O. (2002). Akılcı antibiyotik kullanımı ve erişkinde toplumdaki edinilmiş enfeksiyonlar sempozyum dizisi no: 31, Kasım, s. 23-38
- Öncül O. (2012). Kolistin: endikasyon ve klinik kullanımı. *ANKEM Derg*, 26(Ek 2):12-8
- Özaras R, Tabak F, Öztürk R. (2002). Antibiyotikler 3.akılcı antibiyotik kullanımı ve erişkinde toplumdaki edinilmiş enfeksiyonlar sempozyum dizisi no: 31, Kasım; s. 55-82
- Pina-Vaz C, Silva AP, Faria-Ramos I, Teixeira-Santos R, Moura D, Vieira TF, Sousa SF, Costa-de-Oliveira S, Cantón R, Rodrigues AG. (2016). A Flow

Cytometric and Computational Approaches to Carbapenems Affinity to the Different Types of Carbapenemases. *Front Microbiol* Aug 9;7:1259.

Pore RS. (1994). Antibiotic susceptibility testing by flow cytometry. *J. Antimicrob. Chemother.* 34: 613–627.

Pozarowski P, Holden E, Darzynkiewicz Z. (2013). Laser scanning cytometry: principles and applications-an update. *Methods mol. biol.*, Totowa, v. 931, p.187-212.

Puttaswamy S, Gupta SK, Regunath H, Smith LP, Sengupta S.(2018). A comprehensive review of the present and future antibiotic susceptibility testing (AST) systems. *Arch Clin Microbiol*, Vol No:9 Iss No:3:83

Puttaswamy S, Lee B, Amighi B, Chakraborty S, Sengupta S (2012) Novel electrical method for the rapid determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and assay of bactericidal/ bacteriostatic activity. *J Biosens Bioelectron*, S 2: 003.

Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases*, 49: 1749-55.

Robinson J. P. (2018). Overview of flow cytometry and microbiology. *Current Protocols in Cytometry*, 84, e37. doi: 10.1002/cpcy.37

Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavaleri M, Coenen S, Cohen J, Findlay D, Gyssens I, Heuer OE, Kahlmeter G, Kruse H, Laxminarayan R, Liébana E, López-Cerero L, MacGowan A, Martins M, Rodríguez-Baño J, Rolain JM, Segovia C, Sigauque B, Tacconelli E, Wellington E, Vila J. (2015). The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect*, 6: 22–9.

Salzman GC. (2001) Light scatter: detection and usage. *Curr. Protoc. Cytom.*, Chapter, v. 1, p. 1-13.

- Saygı Ş, Battal D., Özlen Şahin N. (2012) Çevre ve İnsan Sağlığı Yönünden İlaç Atıklarının Önemi, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 16, 82-90,.
- Schneider CB, Ken Harris, Peter Khera, Kaveri Strenn (2001) Steve Rapid Antimicrobial Susceptibility Tests by Mass Measurement on a 96-Well Plate. *Nature nanotechnology*, 18: 222.
- Silva AP, Faria-Ramos I, Ricardo E, Miranda IM, Espinar MJ, Costa-de-Oliveira S, Cantón R, Rodrigues AG, Pina-Vaz C. (2016). Rapid flow cytometry test for identification of different carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*, 60: 3824 –26. doi:10.1128/AAC.02947-15.
- Snoeck R, Schols D, Andrei G, Neyts J, de Clerck E. (1991). Antiviral activity of anti-cytomegalovirus agents (HPMPC, HPMPA) assessed by a flow cytometric method and DNA hybridization technique. *Antiviral Res.*, 16:1–9.
- Steen HB, Boye E, Skarstad K, Bloom B, Godal T, Mustafa S. (1982). Applications of flow cytometry on bacteria: cell cycle kinetics, drug effects, and quantitation of antibody binding. *Cytometry*, 2: 249–57.
- Steen HB, Boye E. (1981). Growth of Escherichia coli studied by dualparameter flow cytometry. *J. Bacteriol.*, 145:1091–4.
- Steen HB, Lindmo T. (1979). Flow cytometry: a high-resolution instrument for everyone. *Science*, 204:404.
- Steen HB, Skarstad K, Boye E. (1990). DNA measurements of bacteria, p. 519–526. In Z. Darzynkiewicz and H. Crissman (ed.), *Flow cytometry*. Academic Press, Ltd., London, United Kingdom.
- Steen HB. (1986). Simultaneous separate detection of low angle and large angle light scattering in an arc lamp-based flow cytometer. *Cytometry*, 7: 445–9.
- Stiefel P, Schmidt-Emrich S, Maniura-Weber K, Ren Q. (2018). Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and

propidium iodide. BMC Microbiol., Feb 18,15:36. doi: 10.1186/s12866-015-0376-x.

Suller MTE, Stark JM, Lloyd D. (1997). A flow cytometric study of antibiotic-induced damage and evaluation as rapid antibiotic susceptibility test for methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J. Antimicrob. Chemother., 40: 77–83.

Sümerkan B. (1996). Antibiyotik duyarlılık testleri ve standardizasyon. Flora, 1: 24-30

Swarts AJ, Hastings JW, Roberts RF, von Holy A. (1998). Flow cytometry demonstrates bacteriocin-induced injury to Listeria monocytogenes. Curr. Microbiol, 36: 266–70.

Taşova Y. (2010). Tetrasiklinden tigesikline. ANKEM Derg 2010;24(Ek 2):36-44

Tunçtan B, Buharalıoğlu K. (2005). Farmakoloji Terimleri Sözlüğü. Sendrom III Tıp Terimleri Sözlüğü, 3(2): 3-44.

Tung JW, Heydari K, Tirouvanziam R, Sahaf B, Parklar DR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. (2007) Modern flow cytometry: A practical approach. Clin Lab Med, 27:453-68.

Ulusoy S. (1999). Antibiyotikler. Solunum Sistemi Enfeksiyonları. Toraks Kitapları, s.125-63.

Van Dilla MA, Fulwyler MJ, Boone IU. (1967) Volume distribution and separation of normal human leucocytes. Exp. biol. med., Basel, June; v. 125, n. 2, p. 367-70,

Von Ah U, Wirz D, Daniels A (2009) Isothermal micro calorimetry– a new method for MIC determinations: results for 12 antibiotics and reference strains of E. coli and S. aureus. BMC microbiology, 9:106.

- Walberg M, Gaustad P, Steen HB. (1996). Rapid flow cytometric assessment of mecillinam and ampicillin bacterial susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.*, 37: 1063–1075.
- Walberg M, Gaustad P, Steen HB. (1997). Rapid discrimination of bacterial species with different ampicillin susceptibility levels by means of flow cytometry. *Cytometry*, 29: 267–272.
- Waller A, Pipkorn D, Sutton KL, Linderman JJ, Omann GM. (2001). Validation of flow cytometric competitive binding protocols and characterization of fluorescently labeled ligands. *Cytometry*, v. 45, n. 2, p. 102–114,
- Wellington N, Pietzcker T, Poppert S, Belak S, Fieser N, Bartel M, Essig A. (2007). Evaluation of the Merlin MICRONAUT system for rapid direct susceptibility testing of gram-positive cocci and gram negative bacilli from positive blood cultures. *Journal of clinical microbiology*, 45:789-795.
- White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. (1996). Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40: 1914-1918
- Wood B. (2006). 9-color and 10-color flow cytometry in the clinical laboratory. *Arch. pathol. lab. med.*, Chicago, v. 130, n. 5, p. 680-690.
- Zaman SB, Hussain MA, Nye R, Mehta V, Mamun KT, Hossain N.(2017). A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. *Cureus*, 9(6): e1403. DOI 10.7759/cureus.1403
- Zhang T, Fang HHP. (2004). Quantification of *Saccharomyces cerevisiae* viability using BacLight. *Biotechnol. Lett*, 26: 989–92.
- Zhu H, Ozcan A. (2015). Opto-fluidics based microscopy and flow cytometry on a cell phone for blood analysis. *Methods mol. Biol.* Totowa, n. 1256, p.171-190

EKLER

Ek 1. Sakarya Üniversitesi Etik Kurulu Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 26/10/2018-E.14122



T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı : 71522473/050.01.04/244
Konu : Girişimsel Olmayan Etik Kurul
Başvuru Dosyası Hk.

Sayın Prof. Dr. Mehmet KÖROĞLU
Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İlgi : 25.09.2018 tarihli 180 sayılı başvurunuz.

Destekleyicisi olduğunuz "Flow Sitometri Yöntemi İle Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi" isimli çalışmanın ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup; çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen şekilde etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına etik kurul üyelerince karar verilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof.Dr. Hasan Çetin EKERBİÇER
Etik Kurulu Başkanı

Yücel DEMİR
Etik Kurulu Sekr.

Güvenli Elektronik
İmzalı Aslı İle Aynıdır.
26...10.2018.

Evrakı Doğrulamak İçin : <http://193.140.253.232/envision.Sorgula/BelgeDogrulama.aspx?V=BENF4R1YN>

Fakülte Girişimsel Olmayan Etik Kurulu Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Hüseyin Hatipoğlu

Doğum yeri ve tarihi: Adana 27.11.1987

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Evli

Askerlik durumu: Yapıldı

İletişim adresi ve telefonu: Serdivan/Sakarya +90 505 314 42 29

Yabancı dili: İngilizce

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru)

2016-2019 Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık eğitimi

2014-2016 Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Eğitimi

2006-2012, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi

2002-2005, Gaziantep Vehbi Dinçerler Fen Lisesi

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru)

2012-2014, Dr.

2014- Araştırma Görevlisi Dr.

IV- Mesleki Deneyimi

2012-2014, Devlet Hizmet Yükümlülüğü kapsamında Güngören Toplum Sağlığı Merkezinde pratisyen doktorluk

2014-2016 Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Eğitimi

2016-2019 Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, uzmanlık eğitimi

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Viral Hepatitle Savaşım Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayımları:

Makaleler

- 1- Hüseyin Hatipoğlu, Mustafa Altındış Cinsel yolla bulaşan hastalıkların erkek infertilitesi ile ilişkisi Androloji Bul Sayı: 18-67–2016 S 269 - 74
- 2- H.Hatipoğlu,M.Köroğlu İnsan Bağırsak Mikrobiyomu ve İn Vivo Hayvan Modelleri Journal of BSHR 2017;1(Special Issue):148-156
- 3- S.Altındış, F.G.Aslan, R.Karagöz, M.B.İnci, H.Hatipoğlu, M.Altındış Birinci Basamakta Çalışan Hekimlerin Tüberküloz Tanı ve Tedavisinde Yaklaşımlarının ve Bilgi Düzeyinin Değerlendirilmesi Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi 2017, Cilt 2, Sayı 3, 23-30
- 4- Ölmez M, Hatipoğlu H, Uzun C, Demiray T, Köroğlu M, Altındış M. Akciğer Kanseri Hastada Nadir Bir Bakteriyemi Etkeni; Leclercia Adecarboxylata J Biotechnol and Strategic Health Res. 2018;2(1):46-9.
- 5- Huseyin Hatipoglu, I Kilbas, U Kilic, K Yilmaz, M Koroglu, M Altindis. Investigation of Kolistin and Sulbactam Combination Effectivity in Multi Drug Resistant Acinetobacter baumannii Strains with Diagonal Gradient Strip Test Method Clin. Lab. 2018;64:1875-1881

Posterler

1. O.aydemir,H.Hatipoğlu,E.Karakeçe,A.Şehitoğulları,Y.Aydemir,M.Koroglu, M.Altındış Pnömotoraksı olan hastada saptanan Rhizopus Microsporus enfeksiyonu 4.ulusal klinik mikrobiyoloji kongresi PS-253
2. Aydemir O, Hatipoglu H, Yilmaz K, Koroglu M, Kara I, Demiray T, Altindis M. A case of mitral and aortic valve endocarditis due to a rare microorganism: Abiotrophia defectiva. Mediterr J Infect Microb Antimicrob 2018;7:Sup 1 : PS-220
3. Ö Aydemir, H.A Terzi, E Karakeçe, Hüseyin Hatipoğlu, M Ölmez, M Köroğlu, M Altındış Sifiliz tanısında kullanılan dört serolojik yöntemin karşılaştırması xxxviii International Uluslararası Turkish Microbiology Congress PS-109

4. İmdat Kılbaş, Hüseyin Hatipoğlu, Ümit Kılıç, Elmas Pınar Kahraman, Mehmet Köroğlu, Mustafa Altındış. Karbapenem dirençli Acinetobacter spp. suşlarında kolistin/sulbaktam kombinasyonunun sinerjik etkinliğinin time-kill ve checkerboard yöntemi ile araştırılması. xxxviii International Uluslararası Turkish Microbiology Congress PS-98
5. Hatipoglu H, Kilbas İ, Kilic U, Yilmaz K, Koroglu M, Altindis M. Çoklu ilaca dirençli Acinetobacter baumannii suşlarında kolistin ve sulbaktamın sinerjik etkililiğinin gradient şerit test yöntemi ile araştırılması. Mediterr J Infect Microb Antimicrob 2018;7:Sup 1 : SS-17

Olgu sunumu

- 1- Ö.Aydemir H.Hatipoğlu, K.Yılmaz, M.Koroğlu, İ.Kara, T. Demiray Mitral and aortic valve endocarditis due to a rare microorganism: Abiotrophia defectiva and literature review Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi 2017;25(4):650-653

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı burslar:

Ödüller

Projeleri

Verdiği konferans ya da seminerler

Katıldığı paneller (panelist olarak)

VIII- Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve katıldığı eğitim seminerleri

- 1- TULSA Uzman Eğitim Programı, Samsun 2017 Eylül

Organizasyonunda katkıda bulunduğu bilimsel toplantılar

Diğer üyelikleri