



Escherichia coli İzolatlarında Fosfomisin Duyarlılığının Çeşitli Yöntemler ile Saptanması

Determination of Fosfomycin Susceptibility in *Escherichia coli* Isolates by Various Methods

Duygu ÖCAL¹([iD](#)), Ayşe Hande TÜRK¹([iD](#)), Elif Sude LALE²([iD](#)), Zişan BAYANSAR²([iD](#)), Zeynep MARGÜN²([iD](#)), Cansu NAMLI²([iD](#)), Zeynep RİFAİOĞLU²([iD](#)), Ömer Can YÜCEL²([iD](#)), Beyza DOĞANAY ERDOĞAN³([iD](#))

¹ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

² Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dönem 4 Öğrencileri, Ankara, Türkiye

³ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Makale atfı: Öcal D, Türk AH, Lale ES, Bayansar Z, Margün Z, Namlı C ve arkadaşları *Escherichia coli* izolatlarında fosfomisin duyarlılığının çeşitli yöntemler ile saptanması. FLORA 2022;27(1):94-102.

ÖZ

Giriş: Geniş spektrumlu aktivitesi ve güvenlik profili nedeniyle fosfomisin, komplike olmayan idrar yolu infeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla birinci basamak antibiyotik olarak kullanılır. Ayrıca merkezi sinir sistemi, kemik ve eklemler, akciğer, yumuşak doku infeksiyonları gibi çeşitli infeksiyonlarda ve sepsiste de tedavi seçeneklerinden biridir. *Escherichia coli* bu tür infeksiyonlarda da sıklıkla etken olarak karşımıza çıkmaktadır ve toplumdaki kazanılmış üriner sistem infeksiyonlarının %80'den fazlasından sorumludur. Fosfomisin etkinliğini değerlendirmek için hızlı ve kolay uygulanabilir bir testin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmanın amacı klinik izolatlardan elde edilmiş *E. coli* izolatlarında fosfomisin duyarlılığının çeşitli yöntemlerle saptanması, bu yöntemlerin kullanım kolaylığı, duyarlılık, özgüllük açısından değerlendirilmesidir.

Materyal ve Metod: Çalışmaya Kasım 2020-Nisan 2021 tarihleri arasında kliniklerden gönderilen çeşitli kültürlerinden elde edilen 175 *E. coli* izolatı dahil edilmiştir. İzolatların fosfomisin duyarlılıklarının saptanmasında agar dilüsyon, disk difüzyon yöntemi, fosfomisin diskleri ile tüpte makrodilüsyon yöntemi ve hızlı fosfomisin/*E. coli* NP testi kullanılmıştır.

Bulgular: *E. coli* izolatlarının 169 (%97)'ü agar dilüsyon ile, 165 (%94)'i disk difüzyon test (DDT) ile, 165 (%94)'i fosfomisin diskleri kullanarak tüpte makrodilüsyon yöntemiyle, 167 (%95)'i hızlı fosfomisin/*E. coli* NP testi ile fosfomisin duyarlı olarak saptanmıştır. Agar dilüsyon ile $MİK_{50} = 1 \mu\text{g/mL}$, $MİK_{90} = 32 \mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiştir. Agar dilüsyon referans yöntem olarak ele alındığında; DDT, fosfomisin diskleri kullanarak tüpte makrodilüsyon yöntemi, hızlı fosfomisin/*E. coli* NP testinin duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla %100 ve %98.8, %100 ve %97.6, %100 ve %97.6'dır.

Sonuç: Fosfomisin kullanımını arttıkça, duyarlılık testleriyle ilgili çalışmaların artması beklenmektedir. Aktivitesine ilişkin çok çeşitli rapora rağmen, fosfomisin'in daha geniş klinik kullanımı, duyarlılık testlerinin yapılmasındaki zorluk nedeniyle engellenmektedir. Laboratuvarlar hızlı, kolay uygulanabilir ve değerlendirilebilir antimikrobiyal duyarlılık testlerine ihtiyaç duymaktadır. Bu anlamda altın standart yöntem olan agar dilüsyon rutin laboratuvar uygulamaları için çok geçerli bir seçenek olmamaktadır. Disk difüzyon test rutinde daha uygulanabilir bir test olmakla birlikte hızlı fosfomisin/*E. coli* NP testi gerek hızı, gerek kolay uygulanabilirliği bakımından gelecek vadedilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Fosfomisin; *Escherichia coli*; Duyarlılık testleri; Agar dilüsyon

ABSTRACT

Determination of Fosfomycin Susceptibility in Escherichia coli Isolates by Various MethodsDuygu ÖCAL¹, Ayşe Hande TÜRK¹, Elif Sude LALE², Zişan BAYANSAR², Zeynep MARGÜN², Cansu NAMLI², Zeynep RİFAİOĞLU², Ömer Can YÜCEL², Beyza DOĞANAY ERDOĞAN³¹Department of Clinic Microbiology, Ankara University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey² 4th Semester Students, Ankara University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey³ Department of Biostatistics, Ankara University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey

Introduction: Because of its broad-spectrum activity and its safety profile, fosfomycin is often used as a first-line antibiotic for treating uncomplicated urinary tract infections. It is also one of the treatment options in various infections such as central nervous system, bone and joints, lung, soft tissue infections and sepsis. *Escherichia coli* is frequently encountered as a causative agent in such infections and is responsible for more than 80% of community-acquired urinary tract infections. There is a need to develop a fast and easily applicable test to evaluate the efficacy of fosfomycin. The aim of this study is to determine the susceptibility of fosfomycin in *Escherichia coli* isolates obtained from clinical isolates by various methods and to evaluate these methods in terms of ease of use, sensitivity, and specificity.

Materials and Methods: A total 175 *E. coli* isolates obtained from various cultures sent from clinics between November 2020 and April 2021 were included in the study. Agar dilution, disc diffusion method, in-tube macrodilution method with fosfomycin discs and rapid fosfomycin/*E. coli* NP test was used for determining fosfomycin susceptibility of isolates.

Results: 169 (97%) of *E. coli* isolates were by agar dilution, 165 (94%) by disc diffusion test (DDT), 165 (94%) by macrodilution tube using fosfomycin discs, 167 (95%) fast fosfomycin/*E. coli* NP test was found to be susceptible to fosfomycin. With agar dilution, MIC₅₀= 1 µg/mL, MIC₉₀= 32 µg/mL were determined. Considering the agar dilution as a reference method; the sensitivity and specificity of the DDT, macrodilution tube method using fosfomycin discs, rapid fosfomycin/*E. coli* test were 100% and 98.8%, 100% and 97.6%, 100% and 97.6%, respectively.

Conclusion: As fosfomycin use increases, the demand for susceptibility testing of this agent is expected to rise. Despite numerous reports of its activity, broader clinical use of fosfomycin is hindered by the difficulty in performing susceptibility testing. Therefore, it is imperative to implement the best method to deliver reliable results in a timely manner. Laboratories need rapid, easily applicable and evaluable antimicrobial susceptibility tests. In this sense, the gold-standard method of agar dilution is not a valid option for many clinical laboratories. Although DDT is a more applicable test routinely, rapid fosfomycin/*E. coli* NP test is promising both in terms of speed and ease of application

Key Words: Fosfomycin; *Escherichia coli*; Susceptibility testing; Agar dilution

GİRİŞ

Çoklu ilaca dirençli patojenlerin yayılması, bunların sebep olduğu infeksiyonların tedavisini çok zor bir hale getirmiştir ve bu infeksiyonlarda kullanılan antibiyotik tedavisinin yeniden düzenlenmesini gerekli kılmıştır. Sonuç olarak fosfomisin gibi eski antibiyotiklere yönelim olmuştur. Fosfomisin bakterisidal etkili, düşük moleküler ağırlığa sahip, hücre duvar sentezini inhibe eden, geniş spektruma sahip bir antibiyotiktir. Fosfomisinin oral ve intravenöz formunun olması, oral formunun tek doz olarak kullanılabilmesi ve buna bağlı olarak hasta uyumunun iyi olması, diğer antimikrobiyal ajanlarla çapraz direncin az olması, şu an için çok yüksek olmayan direnç oranları, tolerabilitesinin yüksek olması, yan etkilerinin az olması nede-

niyle uygun infeksiyonlarda tercih edilebilecek bir ajan olarak karşımıza çıkmaktadır^[1]. Fosfomisin merkezi sinir sistemi, kemik ve eklemler, akciğer, yumuşak doku infeksiyonları, sepsis, akut piyelonefrit ve komplike üriner sistem infeksiyonlarının (ÜSE) tedavisinde kullanılmaktadır^[2,3].

Enterobacterales ailesinin üyelerinden biri olan *Escherichia coli* çeşitli infeksiyonlarda sıklıkla etken olarak karşımıza çıkmaktadır ve kan kültürü örnekleri, apse ve doku, idrar gibi örneklerden sıklıkla izole edilmektedir^[4-6]. *E. coli* toplumdan kazanılmış ÜSE'lerin %80'den fazlasından sorumludur. ÜSE %12.9 prevalansı ile hastane kaynaklı infeksiyonlar arasında da dördüncü sırada yer almakta ve üçteikisi kateterlerle ilişkilendirilmektedir^[1,7,8]. *E. coli*, geniş spektrumlu β-laktamazların

(ESBL'ler) üretimiyle sefalosporinlere karşı artan bir direnç oranı sergiler, ancak sıklıkla fosfomisine duyarlı kalır^[9]. Bununla birlikte, günümüzde düşük olan *E. coli*'deki fosfomisin direnç oranı, artan klinik kullanım sonucunda artabilir.

Fosfomisin, toplumdaki ÜSE için ampirik bir tedavi olarak kullanıldığından ve ayrıca ciddi infeksiyonlar için de sıklıkla kullanılmaya başlandığından, etkinliğini değerlendirmek için değerlendirimi kolay ve hızlı testlere ihtiyaç vardır^[10,11]. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ve Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) tarafından antimikrobiyal duyarlılığının saptanmasında agar dilüsyon ve disk difüzyon testi (DDT) onaylanmıştır. Fosfomisin duyarlılığının belirlenmesinde kullanılan standart referans tekniği, 18 ± 2 saat süre gerektiren ve rutinde uygulaması zor bir teknik olan agar dilüsyonuna dayanmaktadır^[12,13]. Disk difüzyon ve gradient test yöntemi gibi antimikrobiyal duyarlılık saptanmasında rutinde sıklıkla kullanılan diğer teknikler de kullanılabilir, ancak bu yöntemlerin de sonuç verme süresi için de en az 18 saat gerekmektedir. Hızlı fosfomisin/*E. coli* NP testi; minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerini vermeyen, sadece duyarlı/dirençli olarak sonuç veren, kolay, hızlı (yaklaşık iki saat) ve karbonhidrat hidrolizine dayalı bir yöntemdir^[14]. Disklerin kullanıldığı tüpte makrodilüsyon yöntemi agar dilüsyon yöntemine göre daha kolay bir yöntem olmakla birlikte inkübasyon için yine 18-24 saat gereksinim olmaktadır.

Bu çalışmanın amacı klinik izolatlardan elde edilmiş *E. coli* izolatlarında fosfomisin duyarlılığının çeşitli yöntemlerle saptanması; bu yöntemlerin duyarlılık, özgüllük, hız ve kullanıcı dostu olmaları yönünden değerlendirilmesi; sonuçların rutin laboratuvar uygulamalarına katkıda bulunmasıdır.

MATERYAL ve METOD

I. İzolatların Elde Edilmesi ve Tanımlanması

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Kasım 2020-Nisan 2021 tarihleri arasında kliniklerden gönderilen çeşitli kültürlerden elde edilen 175 *E. coli* izolatı çalışmaya dahil edilmiştir.

II. Fosfomisin Duyarlılığının Araştırılması

a. Agar Dilüsyon Yöntemiyle Fosfomisin Minimum İnhibitör Konsantrasyon Değerinin Saptanması

Fosfomisin duyarlılığının saptanmasında referans yöntem olarak agar dilüsyon yöntemi kullanılmıştır^[12,13]. Fosfomisin toz antibiyotigi (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılarak, çalışılacak dilüsyon aralıklarına göre farklı konsantrasyonlarda fosfomisin solüsyonu hazırlanmıştır. Mueller Hinton Agar besiyerine son konsantrasyonu 25 mg/L olacak şekilde glukoz-6-fosfat eklenmiştir. Her bir plağa 1 kısım fosfomisin solüsyonu, 9 kısım erimiş agar konularak, seri dilüsyonlar halinde fosfomisin agar besiyeri hazırlanmıştır. Besiyerlerinde bulunan fosfomisin miktarı sırasıyla 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0.5 µg/mL ve 0.25 µg/mL olacaktır.

Çeşitli klinik örneklerden elde edilmiş ve stok halinde gliserollü buyyon içinde saklanmış *E. coli* türleri kanlı agar besiyerine ekim yapılmıştır. Bakterilerin taze kültürlerinden 0.5 McFarland (1×10^8) standardında bakteri solüsyonu hazırlanmış, son bakteri süspansiyonu 10^4 cfu kob/mL olacak şekilde sulandırım işlemi yapılmış ve hazırlanan süspansiyondan agar besiyerlerine ekim yapılmıştır. Plaklar 24 saat 35°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Kolonilerin yoğun zon olarak gözle görülebilmesi üreme olarak değerlendirilmiştir. Fosfomisin agar dilüsyon MİK ≤ 32 µg/mL olanlar duyarlı olarak kabul edilmiştir^[13]. Çalışmada kalite kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanılmıştır.

b. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Testiyle Fosfomisin Duyarlılığının Saptanması

Bakterilerin taze kültürlerinden 0.5 McFarland (1×10^8) standardında bakteri solüsyonu hazırlanmıştır. Fosfomisin (200 µg) diski kullanılarak Kirby-Bauer DDT ile fosfomisin duyarlılığı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde EUCAST 2020 kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda ölçülen zon çapı ≥ 24 mm olan izolatlar duyarlı olarak kabul edilmiş ve zon içindeki üremeler dikkate alınmamıştır^[13].

c. Fosfomisin Diskleri Kullanarak Tüpte Makrodilüsyon Yöntemi İle Fosfomisin Duyarlılığının Saptanması

Tüplerde fosfomisin dilüsyonlarının hazırlanması

İlk tüpe 2400 µl, diğerlerine 1200'er µl katyon eklenmiş Mueller-Hinton sıvı besiyeri II (MHB-II) eklenmiştir. İlk tüpe 3 adet fosfomisin (200 µg) diski atılarak 4-8 saat beklenmiştir. Bu tüpteki fosfomisin yoğunluğu 256 µg/mL olarak kabul edilmiş ve seri dilüsyon hazırlanmıştır (256 µg/mL, 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL ve 2 µg/mL, 1 µg/mL ve 0.5 µg/mL).

Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması ve Testin Uygulanışı

Bakterilerin taze kültürlerinden 0.5 McFarland (1×10^8) standardında bakteri solüsyonu hazırlanacaktır. Son bakteri süspansiyonu 5×10^5 kob/mL olacak şekilde sulandırım işlemi yapılacak ve 1200'er µl fosfomisin içeren tüplere eklenecektir. Bakteri solüsyonları eklendikten sonra antibiyotik konsantrasyonları (128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL ve 1 µg/mL, 0.5 µg/mL ve 0.25 µg/mL). Tüpler 24 saat 35° C'de inkübasyona bırakılmıştır. Üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak değerlendirilmiştir ve MİK <32µg/mL olanlar duyarlı olarak kabul edilmiştir^[13]. Çalışmada kalite kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanılmıştır.

d. Hızlı fosfomisin/*E. coli* Np Testinin Hazırlanması ve Fosfomisin Duyarlılığının Saptanması

Test için solüsyonların hazırlanması

Bu test için Nordman ve arkadaşlarının yönteminden yararlanılmıştır. Fosfomisin stok solüsyonu hazırlanmıştır (40 mg/mL). Fosfomisin içermeyen (solüsyon A) ve içeren (solüsyon B) iki solüsyon hazırlanmıştır. Solüsyon A [(distile suda %2.5 MHB-II), %0.005 fenol red (indikatör), %1 glikoz, pH 7.5)], 4°C'de 1 hafta, -20°C'de bir yıla kadar saklanabilir. Solüsyon çalışma için kullanılmadan önce etüvde ($35 \pm 2^\circ\text{C}$) bekletilmiştir. Solüsyon A'ya fosfomisin (son konsantrasyonu 40 µg/mL) ve glikoz-6 fosfat (son konsantrasyonu 25 µg/mL) eklenip, solüsyon B elde edilmiştir^[14].

Bakteri İnokulumlarının Hazırlanması

Bakterilerin taze kültürlerinden 3-3.5 McFarland standardında bakteri solüsyonları hazırlanmıştır.

Steril 96 kuyucuklu mikropakta her izolat için bir kuyucuğa 150 µl solüsyon A, bir kuyucuğa 150 µl solüsyon B eklenmiştir. Kuyucukların üzerine bakteri solüsyonundan 50 µl eklenmiştir. 35° C'lik etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İki saat sonra renk açısından değerlendirilmiştir. Solüsyon A ve solüsyon B'deki turuncudan sarıya renk değişimi gösteren izolat fosfomisin dirençli olarak değerlendirilmiştir. Solüsyon A'da sarı renk değişimi, solüsyon B'de turuncu renk gösteren izolat fosfomisin duyarlı olarak kabul edilmiştir. Her izolat için deney üç kez tekrar edilmiştir. Şekil 1'de izolatların hızlı fosfomisin/*E. coli* NP testi ile değerlendirmesi görülmektedir.

A1-A4: 150 µl solüsyon A'nın içine 50 µl %0.9'luk steril serum fizyolojik çözeltisi eklenmiştir.

B1, C1 ve D1: 150 µl solüsyon B ve 50 µl 3 Mc Farland standardında hazırlanmış NK

B2, C2 ve D2: 150 µl solüsyon A ve 50 µl 3 Mc Farland standardında hazırlanmış NK

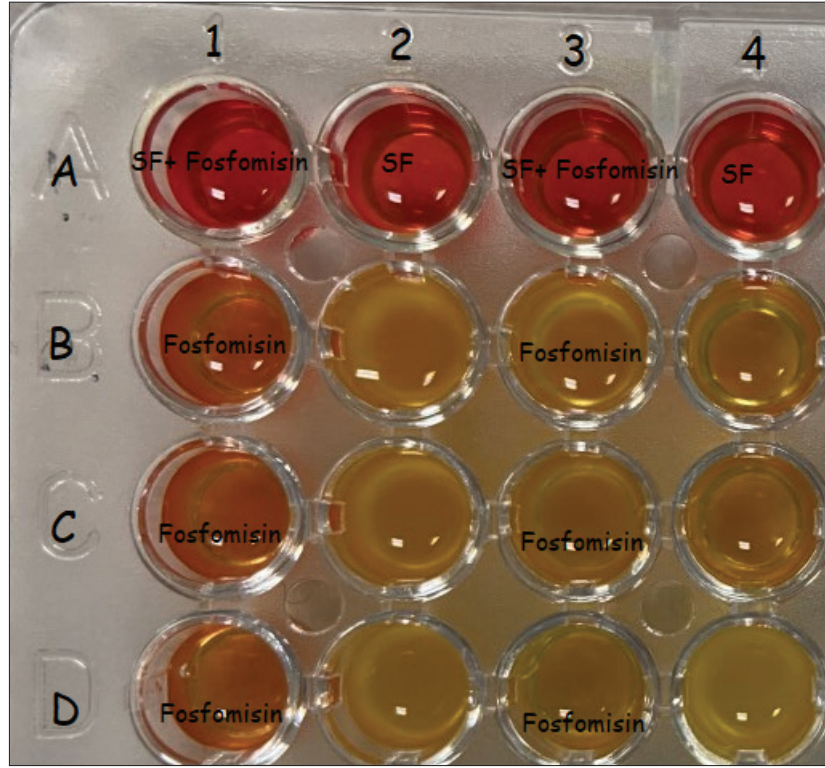
B3,C3 ve D3: 150 µl solüsyon B ve 50 µl 3 Mc Farland standardında hazırlanmış 2 no'lu izolat

B4, C4 ve D4: 150 µl solüsyon A ve 50 µl 3 Mc Farland standardında hazırlanmış 2 no'lu izolat

NK (Negatif kontrol *E. coli* ATCC 25922) ve 2 no'lu izolatın fosfomisin duyarlılığı araştırılmıştır. NK fosfomisin içermeyen solüsyonlarda üremiş (renk sarıya dönmüş), fosfomisin içeren solüsyonlarda ürememiştir (renk turuncuya dönmüş), 2 no'lu izolat fosfomisin içeren ve içermeyen solüsyonlarda üremiştir (renk sarıya dönmüş) ve izolat dirençli olarak yorumlanmıştır.

Örneklem Büyüklüğü

Örneklem büyüklüğünün belirlenmesi için hızlı fosfomisin/*E. coli* NP testi ve makrodilüsyon testlerinin agar dilüsyon testi sonucuna göre duyarlılığının belirlenmesi temel alınmıştır. Çalışma için gerekli örneklem büyüklüğü, Bujang ve Adnan tarafından oluşturulan tablolar yardımıyla belirlen-



Şekil 1. Hızlı fosfomisin/*E. coli* NP testinin değerlendirimi.

miştir^[15]. Bu tablolar, istenen tip I hata, güç ve etki büyüklüğüne göre, Güç Analizi ve Örneklem Büyüklüğü (PASS) yazılımı kullanılarak duyarlılık ve seçicilik testinin formülasyonundan türetilmiştir^[15,16]. Buna göre, %30 prevalans için %70 duyarlılık düzeyininin yokluk hipotezi %50 duyarlılığa karşı %80 istatistiksel güç düzeyinde testinde toplam 163 kişinin yeterli olacağı belirlenmiştir. Yaklaşık %5 veri kaybı gözetilerek, çalışmaya toplamda 175 izolat dahil edilmiştir.

İstatistiksel Değerlendirme

Nicel veriler ortalama \pm standart sapma [ortanca (minimum-maksimum)] ile, nitel veriler ise frekans ve yüzde (n, %) ile özetlenmiştir. Agar dilüsyon ile tüpte makro dilüsyon yöntemleri ile saptanan MİK değerleri Wilcoxon test ile karşılaştırılmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Diğer yöntemlerin altın standart yöntem olan agar dilüsyona göre tanısal doğruluklarının belirlenmesinde duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif ve negatif prediktif değerler kullanılmıştır.

BULGULAR

İzolatların Tanımlanması

Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Kasım 2020-Nisan 2021 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden gönderilen 152 (%87) idrar kültürü, 14 (%8) yara/doku kültürü, 7 (%4) kan kültürü ve 2 (%1) balgam kültüründen toplam 175 *E. coli* izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. Laboratuvara gelen örneklerin 87 (%50)'si pediatri bölümlerinden, 55 (%31)'i cerrahi bölümlerden ve 33 (%19)'ü dahili bölümlerdendir.

Fosfomisin Duyarlılığının Saptanması

Agar dilüsyon yöntemiyle *E. coli* örneklerinin 169 (%97)'u fosfomisin duyarlı, 6 (%3)'sü dirençli olarak saptanmıştır. Agar dilüsyon ile $MİK_{50} = 1\mu\text{g/ml}$ $MİK_{90} = 32\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edilmiştir. *E. coli* izolatlarının agar dilüsyon yöntemiyle saptanan fosfomisin MİK değerlerinin örneklere göre dağılımı Tablo 1'de izlenmektedir.

DDT ile değerlendirildiğinde, *E. coli* izolatlarının 165 (%94)'ü fosfomisin duyarlı, 10 (%6)'u dirençli olarak saptanmıştır. Üç idrar örneğinden,

Tablo 1. *E. coli* izolatlarının agar dilüsyon yöntemi ile saptanan fosfomisin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin örneklerle göre dağılımı

	Fosfomisin MİK değerleri										
	0.25 µg/ml n (%)	0.5 µg/ml n (%)	1 µg/ml n (%)	2 µg/ml n (%)	4 µg/ml n (%)	8 µg/ml n (%)	16 µg/ml n (%)	32 µg/ml n (%)	64 µg/ml n (%)	128 µg/ml n (%)	
İdrar kültürü n= 152 (%87)	6 (%3)	30 (%17)	46 (%26)	43 (%25)	7 (%4)	8 (%5)	3 (%2)	4 (%2)	3 (%2)	2 (%1)	
Yara/doku kültürü n= 14 (%8)	-	5 (%3)	3 (%2)	2 (%1)	2 (%1)	1 (%0.5)	1 (%0.5)	-	-	-	
Kan kültürü n= 7 (%4)	-	1 (%0.5)	2 (%1)	1 (%0.5)	3 (%2)	-	-	-	-	-	
Balgam kültürü n= 2 (%1)	-	-	-	-	-	-	-	1 (%0.5)	-	-	
Toplam 175 (%100)	6 (%3)	36 (%21)	51 (%29)	46 (%26)	12 (%7)	9 (%5)	4 (%2)	5 (%3)	4 (%2)	2 (%1)	

bir balgam örneğinden elde edilmiş *E. coli* izolatı agar dilüsyon yöntemi duyarlı, DDT yöntemiyle dirençli saptanmıştır. Ayrıca bir izolatta (MİK= 8 µg/mL) zon içinde üremeler saptanmış, izolatın zon çapı (26 mm) EUCAST rehberine göre duyarlı saptandığı için duyarlı olarak kabul edilmiştir.

Fosfomisin diskleri kullanarak tüpte makrodilüsyon yöntemiyle fosfomisin duyarlılığı incelendiğinde 165 (%94)'i fosfomisin duyarlı, 10 (%6)'u dirençli olarak saptanmıştır. Bu yöntemle MİK₅₀= 2 µg/mL değeri MİK₉₀= 64 µg/mL değeri olarak tespit edilmiştir. Agar dilüsyon ile duyarlı olarak saptanan dört idrar örneğinden elde edilmiş *E. coli* izolatı, bu yöntemle dirençli olarak saptanmıştır, agar dilüsyon ile dirençli saptanan ve bu yöntem ile duyarlı saptanan izolat olmamıştır. Fosfomisin duyarlı izolatlar MİK değerleri açısından incelendiğinde, agar dilüsyon ile fosfomisin diskleri kullanarak tüpte makrodilüsyon yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (sırasıyla 3 ± 5.8 [1(0.25-32)]; 5.8 ± 10.7 [2(1-64)]; p< 0.001). MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri agar dilüsyon yöntemi (MİK₅₀= 1 µg/mL değeri MİK₉₀= 32 µg/mL) ile karşılaştırıldığında; fosfomisin diskleri kullanarak tüpte makrodilüsyon yönteminde MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (p< 0.001).

Hızlı fosfomisin/*E. coli* NP testi ile fosfomisin duyarlılıkları araştırıldığında, izolatların 167 (%95)'si fosfomisin duyarlı, 8 (%5)'i dirençli olarak saptanmıştır. Agar dilüsyon yöntemiyle duyarlı saptanan iki izolat (biri idrar, biri balgam örneğinden izole edilmiş *E. coli* izolatı) hızlı fosfomisin/*E. coli* NP testi ile dirençli olarak bulunmuştur.

Kirby-Bauer disk difüzyon, fosfomisin diskleri kullanarak tüpte makrodilüsyon ve hızlı fosfomisin/*E. coli* NP yöntemlerinin agar dilüsyon ile karşılaştırıldığında farklılıklar, elde edilen duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değer sonuçları Tablo 2 ve Tablo 3'te verilmiştir

TARTIŞMA

Fosfomisin; *Streptomyces* spp. türlerinin fermentasyonu sonucu elde edilen fosfoenolpirivat analogudur. Düşük direnç oranlarına ek olarak fosfomisinin farmakokinetik ve farmakodinamik avantajları, düşük direnç oranları, geniş spektrumu, yüksek tolerabilitesi nedeniyle endikasyon

Tablo 2. Yöntemlerin agar dilüsyon ile karşılaştırılması

		Fosfomisin diskleriyle makrodilüsyon		Hızlı fosfomisin/ <i>E. coli</i> NP testi		Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi	
		Duyarlı n (%)	Dirençli n (%)	Duyarlı n (%)	Dirençli n (%)	Duyarlı n (%)	Dirençli n (%)
Agar Dilüsyon	Duyarlı n (%)	165 (%94.3)	4 (%2.2)	167 (%95.4)	2 (%1.1)	165 (%94.3)	4 (%2.2)
	Dirençli n (%)	-	6 (% 3.5)	-	6 (%3.5)	-	6 (% 3.5)

Tablo 3. Yöntemlerin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değerleri

	Hızlı fosfomisin/ <i>E. coli</i> NP testi	Fosfomisin diskleriyle tüpte makrodilüsyon	Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi
Duyarlılık	%100	%100	%100
Özgüllük	%98.8	%97.6	%97.6
PPD*	%75	%60	%60
NPD*	%100	%100	%100

*PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer. Değerler agar dilüsyon yöntemiyle karşılaştırılarak elde edilmiştir.

olan durumlarda güvenilir bir ajandır^[1].

Çalışmamız sonucunda daha önce yayınlanmış verilerle paralel olarak *E. coli* izolatlarında fosfomisin duyarlılık oranı (%97) yüksek olarak saptanmıştır^[9,17,18,19]. Agar dilüsyon yöntemini kullanarak, fosfomisin duyarlılık oranını Canve ve Göçmen %98.7, Liu ve arkadaşları %95.5 olarak bulmuştur^[9,19].

Fosfomisin aktivitesiyle ilgili çeşitli çok çalışma olmasına rağmen, duyarlılık testlerinin yapılmasındaki ve değerlendirilmesindeki zorluklar nedeniyle klinik kullanımı engellenmektedir^[10,11]. Fosfomisinle ilgili antimikrobiyal duyarlılık testlerinin uygulanması ve sonuçların değerlendirilmesiyle ilgili CLSI ve EUCAST arasında da farklılıklar bulunmaktadır^[12,13].

Hızlı fosfomisin/*E. coli* NP testi belirli bir fosfomisin konsantrasyonu varlığında (fosfomisin konsantrasyonu EUCAST 2020'de duyarlı olarak belirtilen MİK değerine göre belirlenmiştir) bakteri büyümesini (veya büyümenin yokluğunu) saptayan ve fosfomisine dirençli/duyarlı *E. coli*'nin hızlı tespitine (yaklaşık iki saat) izin veren, karbonhidrat hidrolizine dayalı sonuç veren kullanıcı dostu bir tekniktir. Testin avantajları çok hızlı sonuç vermesi, kolay uygulanmasıdır. Fosfomisin duyarlılık sonucunun sadece duyarlı/dirençli olarak elde edilmesi, MİK değerinin saptanamaması, çıplak

gözle değerlendirme sonucunda sınırda MİK değerlerinde sarı-turuncu renk değişikliklerinin çok net yorumlanamaması testin dezavantajlarından. Çalışmamızda hızlı fosfomisin/*E. coli* NP testinin duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 98.8 olarak saptanmıştır. Nordman ve arkadaşları 100 *E. coli* (n= 78 duyarlı, n= 22 dirençli) izolatında hızlı fosfomisin/*E. coli* NP testi ile fosfomisin duyarlılığını araştırmış ve bir izolat hariç (fosfomisin MİK= 1 µg/mL gösteren izolatı hızlı test dirençli olarak vermiştir) sonuçları agar dilüsyon ile uyumlu bulmuştur. Çalışmamızda da agar dilüsyon yöntemiyle duyarlı saptanan sadece iki izolat hızlı fosfomisin/*E. coli* NP testi ile dirençli olarak bulunmuştur. Ayrıca Nordman ve arkadaşları çalışmalarında testin duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olduğunu, hızlı sonuç verdiğini bunun yanında gözle değerlendirilmesinin bir dezavantaj olduğunu belirtmiştir^[14].

Disklerin kullanıldığı tüpte makrodilüsyon yöntemi agar dilüsyon yöntemine göre daha kolay bir yöntem olmakla birlikte inkübasyon süresinin uzunluğu dezavantajdır. Sonuçlar duyarlı/dirençli olarak değerlendirildiğinde agar dilüsyon ile uyumlu görünse de, MİK değerlerinde agar dilüsyon yöntemine göre uyumsuzluk söz konusudur. Agar dilüsyona göre MİK değerlerinin yüksek olması, atılan disklerin ilerleyen dilüsyon oranlarında çok

iyi dağılamaması sonucunda olabileceği düşünülmüştür. Fosfomisin duyarlılığının saptanmasında sıvı mikrodilüsyon yöntemleri EUCAST ve CLSI tarafından önerilmemektedir^[12,13].

DDT rutin laboratuvar uygulamalarında çok sık kullanılan bir antimikrobiyal duyarlılık saptama yöntemidir. Fosfomisin duyarlılığının saptanmasında da çok tercih edilen bir yöntem olması ve kolay uygulanması testin avantajları arasında yer almaktadır. On sekiz-yirmi dört saatlik uzun inkübasyon süresi ve fosfomisin diski etrafındaki inhibisyon zonu içinde *E. coli* kolonilerinin üremesi sonucunda değerlendirimin zor olması ise yöntemin dezavantajlarından. Duyarlılık saptanması *E. coli* klinik izolatlarının inhibisyon bölgesi içinde ortaya çıkan dağınık koloniler nedeniyle karmaşık olabilir^[20]. Bu mutantların altında yatan direnç mekanizması bildirilmemiştir ve bu kolonilerin inhibisyon bölgesi içindeki klinik önemi ve bu bulguların nasıl yorumlanması gerektiği belirsizlik mevcuttur^[20,21]. CLSI rehberinde zon içindeki kolonilerin değerlendirmesi hakkında bilgi bulunmamasıyla birlikte, EUCAST rehberi zon içinde üremelerin değerlendirmeye alınmamasını, dıştan zon ölçümünü ve zon çapına göre duyarlılık sonucu verilmesini önermektedir^[12,13]. Çalışmamızda da zon içinde üreme olan bir izolatın zon içindeki üremeler değerlendirmeye alınmamış ve izolat duyarlı olarak kabul edilmiştir. Yapılan bir çalışmada; 649 *E. coli* klinik izolatının fosfomisin duyarlılığı DDT ile araştırılmış ve sadece 5 (0.8%)'inde zon içinde üremeler izlenmiştir. Çalışmanın sonucunda zon içinde üreyen koloniler hesaba katılmadan, zon çapı ölçülerek duyarlılık sonucu verilebileceği belirtilmiştir^[22]. İdrarlardan elde edilen *E. coli* izolatlarında fosfomisin duyarlılığının, DDT ve agar mikrodilüsyon ile saptandığı bir çalışmada, iki yöntem arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir^[19]. Mojica ve arkadaşları DDT ve sıvı mikrodilüsyon yöntemlerini agar dilüsyon yöntemiyle CLSI ve EUCAST rehberleri kullanarak karşılaştırmıştır. Çalışmada en iyi sonucun DDT yönteminin EUCAST ile değerlendirilmesiyle elde edildiği belirtilmiştir^[23]. de Cueto ve arkadaşları agar dilüsyonu altın standart yöntem olarak kullandıkları çalışmalarında; *E. coli* izolatlarında DDT, sıvı mikrodilüsyon yöntemleri arasında anlamlı farklılık saptamamıştır^[11]. Çalışmamızda agar

dilüsyon yöntemiyle duyarlı olarak sonuç verilen dört izolatta DDT ile dirençli olarak sonuç verilmiştir. Ancak testin duyarlılık (%100) ve özgüllüğü (%97.6) oldukça yüksek olarak saptanmıştır.

Fosfomisin duyarlılığının saptanmasında antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları terapötik kararlar için temeldir ve yöntemlerin doğru uygulanması ve yorumlanması çok önemlidir. Laboratuvarlar hızlı, kolay uygulanabilir ve değerlendirilebilir antimikrobiyal duyarlılık testlerine ihtiyaç duymaktadır. Bu anlamda altın standart yöntem rutin laboratuvar uygulamaları için çok geçerli bir seçenek olmamaktadır. Tüpte makrodilüsyon yönteminde saptanan MİK değerleriyle agar dilüsyonda saptanan MİK değerlerinde farklılık nedeniyle fosfomisin disklerinin kullanıldığı tüpte makrodilüsyon yöntemini duyarlılığın saptanması uygun bir yöntem değildir. DDT rutinde uzun inkübasyon süresinin yanında, kolay uygulanabilir bir test olmakla birlikte hızlı fosfomisin/*E. coli* NP testi gerek hızı, gerek uygulama kolaylığı bakımından gelecek vaat etmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

Çalışma için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu'ndan onay alındı (Karar No: 2021-İ4-247-21/8/04/2021)

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

YAZAR KATKISI

Anafikir/Planlama: DÖ, ESL, ZB, ZM, ZR, CN, ÖCY

Analiz/Yorum: DÖ, AHT, BDE

Veri sağlama: Tüm yazarlar

Yazım: DÖ, AHT, BDE

Gözden Geçirme ve Düzeltme: Tüm yazarlar

Onaylama: Tüm yazarlar

KAYNAKLAR

1. Öcal D. Fosfomisin. Genç Ö (ed). In: Güncel Mikrobiyoloji Çalışmaları. Akademisyen Yayınevi; Ankara, 2020:43-61.
2. Grabein B, Graninger W, Rodríguez Baño J, Dinh A, Liesenfeld D. Intravenous fosfomycin-back to the future. Systematic review and meta-analysis of the clinical literature. Clin Microbiol Infect 2017;23:363-72. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.12.005>

3. Kaye KS, Rice LB, Dane A, Stus V, Sagan O, Fedosiuk E, et al. Intravenous fosfomycin (ZTI-01) for the treatment of complicated urinary tract infections (cUTI) including acute pyelonephritis (AP): results from a multi-center, randomized, double-blind Phase 2/3 study in hospitalized adults (ZEUS). *Open Forum Infect Dis* 2017;4(Supplement 1):S528. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx163.1375>
4. Şay Coşkun US. Kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları ANKEM Derg 2018;32(2):45-52.
5. Şafak B, Kılınc O. 2010-2015 yılları arasında kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *Klimik* 2016;29(2):60-4.
6. Sönmez U, Atalay S, Ersan G, Şamlıoğlu P, Köse S. Pürülan olmayan deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında tigesiklinin etkinliğinin değerlendirilmesi. *Tepecik Eğitim Hast Derg* 2020;30(2):176-81.
7. Tandogdu Z, Wagenlehner FM. Global epidemiology of urinary tract infections. *Curr Opin Infect Dis* 2016;29(1):73-9. <https://doi.org/10.1097/QCO.000000000000228>
8. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med* 2014;370(13):1198-208. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1306801>
9. Liu HY, Lin HC, Lin YC, Yu SH, Wu WH, Lee YJ. Antimicrobial susceptibilities of urinary extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* to fosfomycin and nitrofurantoin in a teaching hospital in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2011;44(5):364-8. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2010.08.012>
10. Falagas ME, Kanellopoulou MD, Karageorgopoulos DE, Dimopoulos G, Rafailidis PI, Skarmoutsou ND, et al. Antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant Gram negative bacteria to fosfomycin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;27:439-43. <https://doi.org/10.1007/s10096-007-0456-4>
11. de Cueto M, Lopez L, Hernandez JR, Morillo C, Pascual A. In vitro activity of fosfomycin against extended-spectrum-β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: comparison of susceptibility testing procedures. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:368-70. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.368-370.2006>
12. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th edition CLSI supplement M100: M100-S30. Clinical and Laboratory Standards Institute, PA, USA (2020).
13. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version EUCAST 2020 (Version 10.0) 7.8.2021 Available from: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
14. Nordmann P, Poirel L, Muellera L. Rapid Detection of fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 2019; 57(1):e01531-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.01531-18>
15. Bujang MA, Adnan TH. Requirements for minimum sample size for sensitivity and specificity analysis. *J Clin Diagn Res* 2016;10(10):YE01-YE06. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/18129.8744>
16. Hintze J. PASS 11. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA; 2011
17. Cottell JL, Webber MA. Experiences in fosfomycin susceptibility testing and resistance mechanism determination in *Escherichia coli* from urinary tract infections in the UK. *J Med Microbiol* 2019;2:161-8. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000901>
18. Ny S, Edquist P, Dumpis U, Gröndahl Yli Hannuksela K, Hermes J, Kling AM, et al. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* from outpatient urinary tract infections in women in six European countries including Russia. *J Glob Antimicrob Resist* 2019;17:25-34. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.11.004>
19. Canver S, Göçmen J. İdrar kültürlerinden izole edilen siprofloksasin dirençli ve duyarlı *Escherichia coli* suşlarında fosfomisin trometamol duyarlılığı ve bu duyarlılığın disk difüzyon ve agar mikrodilüsyon yöntemleriyle karşılaştırmalı olarak in vitro araştırılması. *Kırıkkale Tıp Derg* 2008;10(1):8-14.
20. Kaase M, Szabados F, Anders A, Gatermann SG. Fosfomycin susceptibility in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from Germany. *J Clin Microbiol* 2014;52(6):1893-7. <https://doi.org/10.1128/JCM.03484-13>
21. Pasteran F, Lucero C, Rapoport M, Guerriero L, Barreiro I, Alborno E, et al. Tigecycline and intravenous fosfomycin zone breakpoints equivalent to the EUCAST MIC criteria for Enterobacteriaceae. *J Infect Dev Ctries* 2012;6(5):452-6. <https://doi.org/10.3855/jidc.2238>
22. Lucas AE, Ito R, Mustapha MM, McElheny CL, Mettus RT, Bowler SL, Kantz SF, Pacey MP, Pasculle AW, Cooper VS, Doi Y. Frequency and mechanisms of spontaneous fosfomycin nonsusceptibility observed upon disk diffusion testing of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2017;56(1):e01368-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01368-17>
23. Mojica MF, De La Cadena E, Hernández Gómez C, Correa A, Appel TM, Pallares CJ, et al. Performance of disk diffusion and broth microdilution for fosfomycin susceptibility testing of multidrug-resistant clinical isolates of Enterobacteriales and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Glob Antimicrob Resist* 2020;21:391-5. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.01.003>

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Dr. Duygu ÖCAL

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Ankara-Türkiye

E-posta: drduygunil@hotmail.com