

GRAM POZİTİF BAKTERİLERDE FENOTİPİK YÖNTEMLERDEN DİRENÇ MEKANİZMASINA

DR. BURÇİN ŞENER



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ AD

Fenotipik yöntemlerden direnç mekanizmasına

- Antibiyotik direnç mekanizmasını bilmek neden önemli ?
- "Yorumlu antibiyogram" ne demek ?

Antibiyotik duyarlılık test sonuçları

- Duyarlı
- Dirençli
- Orta derecede duyarlı

Tedavi bu sonuçlara göre düzenlendiğinde antibiyotiklere karşı direncin sıklıkla aynı mekanizma ile geliştiği gözardı edilmektedir.

Fenotipten genotipe "Yorumlu antibiyogram"

- Antibiyotikleri grup olarak ele alıp, altta yatan direnç mekanizmasını da gözönünde bulundurarak antibiyotik duyarlılık paternlerini incelemek ve rapor etmek
- Antibiyotik tedavisini yönlendirmede daha doğru ve başarılı



AKILCI TEDAVİ SEÇİMİ

Yorumlayarak okuma için:

- Bakterinin tür düzeyinde doğru tanımlanması
- Duyarlılık testlerinin standart bir yöntemle uygulanması
- Çok sayıda antibiyotiğin test edilmesi
- Sonuçların standart kriterlere göre yorumlanması,
gerekir.

Antibiyotik duyarlılık sonuçlarını okumada özellikle dikkat edilecekler

- Beklenmeyen direncin saptanması
- Belli patojenlerde dirençli mutantların seçimine yol açabilecek antibiyotiklerin bilinmesi
- Antibiyogramda indikatör ilaçların kullanılması

Gram pozitif bakterilerde beklenmeyen ve mutlaka doğrulanması gereken direnç örnekleri

- *S.aureus* : glikopeptid, linezolid, quinupristin/dalfopristin
- Koagülaz negatif stafilokoklar: vankomisin, linezolid
- *S.pneumoniae* : glikopeptid, linezolid, meropenem
- Grup A, B, C, G beta-hemolitik streptokok: penisilin, glikopeptid, linezolid
- Enterokok: ampisilinle birlikte quinupristin/dalfopristin; teikoplanin, linezolid

Dirençli mutantların seçimine yol açabilecek antibiyotikler

- Stafilokoklar: fusidik asit, rifampisin, florokinolonlar
- Eritromisin dirençli stafilokok: klindamisin
- *S.pneumoniae*: siprofloksasin

Mutasyon riski enfeksiyon bölgesindeki antibiyotik konsantrasyonuna göre değişir

İndikatör antibiyotikler

- Sadece kendine değil, aynı zamanda aynı gruptaki diğer antibiyotiklere de direnç oluşturan mekanizmayı saptamak için kullanılan antibiyotik

Bakteri	İndikatör (dirençli bulunan) ajan	Çıkarılan sonuç
Stafilokoklar	Sefoksitin/oksasilin	Tüm β -laktamlara dirençli
Stafilokoklar	Eritromisin	İndüklenebilir klindamisin direnci olasılığı
Stafilokoklar	Eritromisin ve klindamisin	Konstitütif MLS_B direnci
Pnömonokoklar	Oksasilin	Penisilin direnci olasılığı
<i>E. faecalis</i>	Ampisilin	Tür düzeyinde tanımlamada hata (<i>E. faecium</i> ?) veya nadiren kazanılmış direnç

Stafilokoklarda direnç fenotipinden genotipe

Stafilokoklarda β -laktam direnci:

- Penisilinaz
 - *mecA* \longrightarrow PPB2a \longrightarrow MRSA
 - β -laktamaz aşırı üretimi (BORSA)
-
- CLSI: Stafilokoklarda penisilin ve oksasilin (sefoksitin) duyarlılıklarının saptanması ile tüm β -laktam ajanlar için yorum yapılabilir

Stafilokoklarda β -laktam duyarlılığının saptanması

- Disk difüzyon:
 - 1 μ g oksasilin/30 μ g sefoksitin
 - Mueller Hinton agar
- Sıvı mikrodilüsyon:
 - 4 μ g/ml sefoksitin
 - Katyon ayarlı Mueller Hinton buyyon
- Agar dilüsyon:
 - 6 μ g/ml oksasilin
 - %4 NaCl içeren Mueller Hinton agar

33-35°C'de normal atmosferde inkübasyon

Stafilokoklarda β -laktam direnç fenotipleri

Mekanizma	Penisilin G Aminopenisilin	β -laktamaz inhibitörlü β -laktamlar	Penisilinaza dirençli penisilinler	Sefalosporinler Karbapenemler
Doğal	S	S	S	S
Penisilinaz	R	S	S	S
<i>mecA</i> geni (+) (MRSA)	R	R	R	R ^a
BORSA	R	S/R	R	S

^a Bu ajanlar in-vitro duyarlı gözükabilirler, ancak klinik tedavi sonuçları başarısız olduğu için "dirençli" olarak bildirilmelidirler

Örnek

antibiyogram:

PEN: R
AMP: R
AMC/CLAV: S
FOX: R
CEC: S
IMP: S
GEN: R
CIP: S
ERY: R
CLI: S
TET: R

Yorum:

Çoklu dirençli
MRSA →

Yorumlu rapor:

PEN: R
AMP: R
AMC/CLAV: R
FOX: R
CEC: R
IMP: R
GEN: R
CIP: S
ERY: R
CLI: ?
TET: R

Stafilokoklarda direnç fenotipinden genotipe

Stafilokoklarda **glikopeptidlere** azalmış duyarlılık

- İlk kez 1997'de Japonya'da, daha sonra Avrupa ve ABD'de vankomisine duyarlılığı azalmış (MİK 8 µg/ml) *S. aureus* suşları → VISA/GISA
- 2002 ABD VRSA suşları

Stafilokoklarda glikopeptid duyarlılığının saptanması

- Disk difüzyon VISA saptanması için yeterli değil !
 - Vankomisin agar tarama: 6 µg/ml vankomisin içeren BHIA^a
 - Konfirmasyon: MİK sonucu
 - Mikrodilüsyon
 - Agar dilüsyon
 - E-test
- } 24 saat inkübasyon
35°C

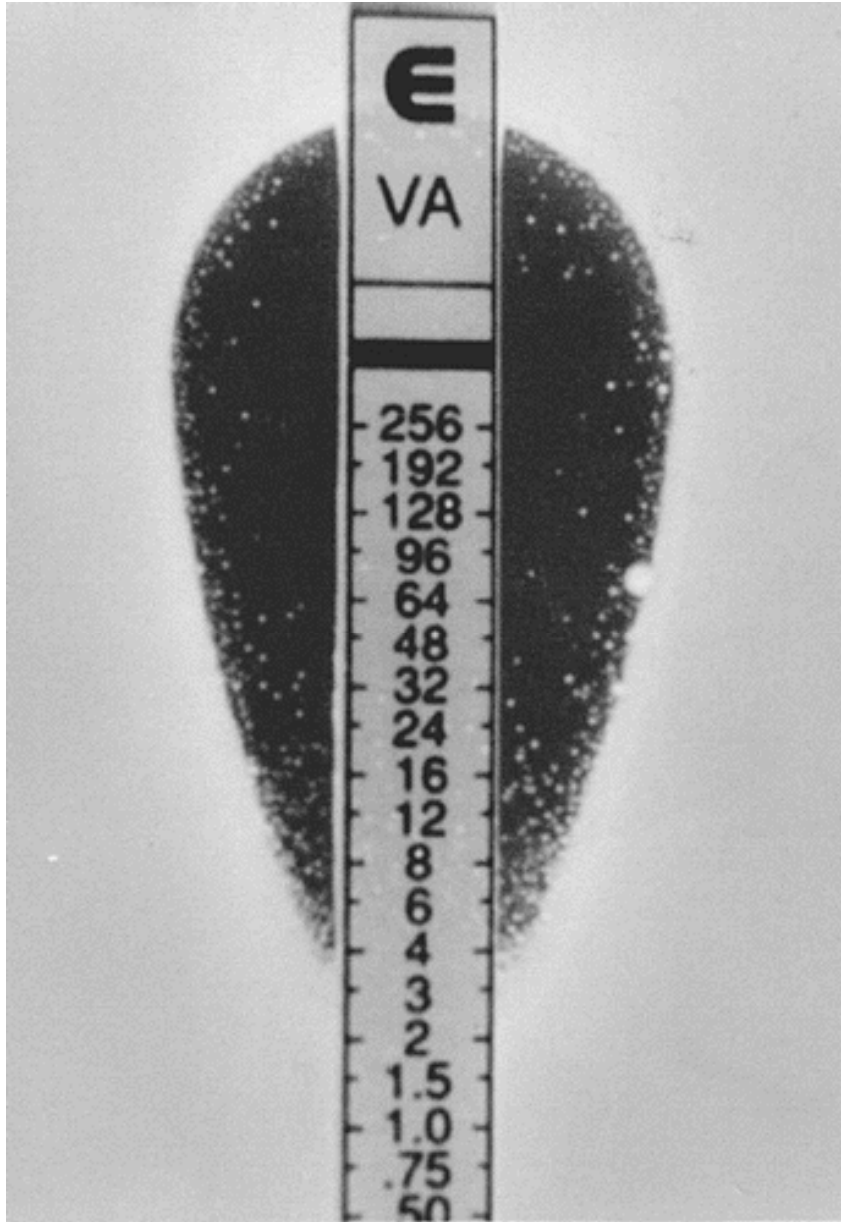
^a Beyin kalp infüzyon agar (Vankomisin MİK 4 µg/ml olanlar üremeyebilir !)

VISA - hVISA - VRSA

- Vankomisin MIC 4-8 $\mu\text{g/ml}$: VISA
 - Vankomisin MIC ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$: VRSA
- } CLSI 2009
- hVISA: MIC'e göre vankomisin duyarlı olan bazı suşların içinde ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ vankomisin içeren BHIA'da üreyebilen bir subpopülasyon varlığı
 - PAP (*population analysis profile*) ile saptanır

VISA

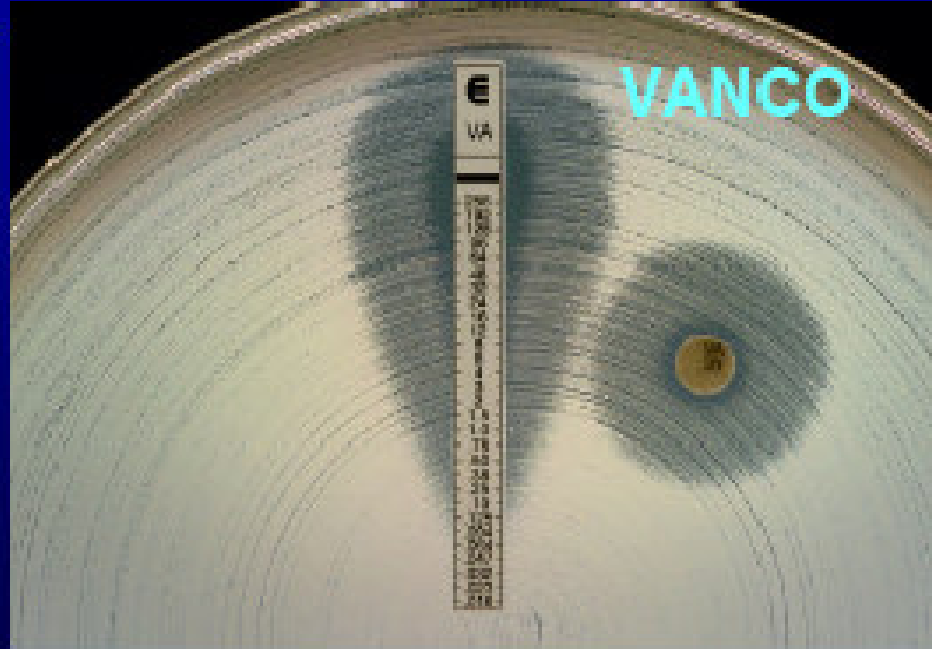
- VISA-VRSA şüpheli izolat:
 - Klindamisin, daptomisin, linezolid, kinupristin/dalfopristin, rifampin, TMP-SXT mutlaka test edilmeli
- hVISA:
 - **Popülasyon analizi:** altın standart
 - E-test: Büyük inokulum (McFarland 2), 48 saat *
 - Makro E-test**
 - Vankomisin ve teikoplanin MIC $\geq 8\mu\text{g/ml}$
 - Teikoplanin MIC $\geq 12\mu\text{g/ml}$
 - %1.5-2 yanlış (+)



Mu50 makro E-test: Dirençli kolonilerin zon içi üremesi

VRSA 2nd Case

From CDC Lab



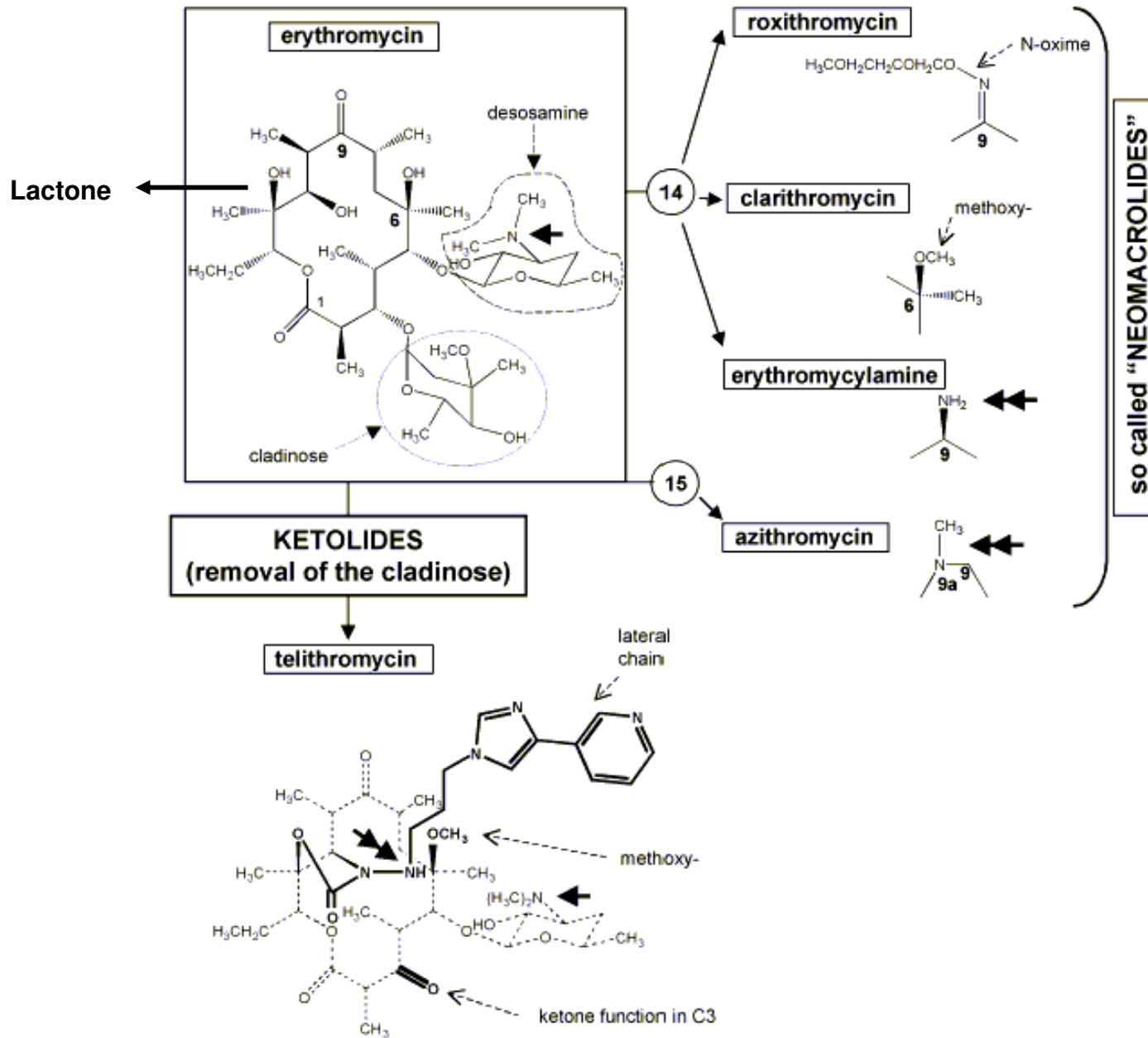
- Vankomisin disk testinde *vanA* geni taşıyan VRSA izolatları belirlenebilir.
- İnhibisyon zonu gözlenmeyen izolatların tür düzeyinde tanıların doğrulanması gerekir.

Stafilokoklarda direnç fenotipinden genotipe

Stafilokoklarda *MLS grubu* ajanlara direnç (Makrolid, linkozamid, streptogramin)

- Hedef bölgede modifikasyon:
 - 23S rRNA'daki adeninin metillenmesi (*erm* metilaz)
 - *erm* geni: indüklenebilir veya yapısal
- Antibiyotiğin inaktivasyonu:
 - Asetiltransferaz, hidrolaz, nükleotidiltransferaz
- İlacın aktif pompalanması:
 - *msr* geni

► 14 / 15 ATOMS



Ribozomal metilasyon

erm genleri



erm methyl transferazlar



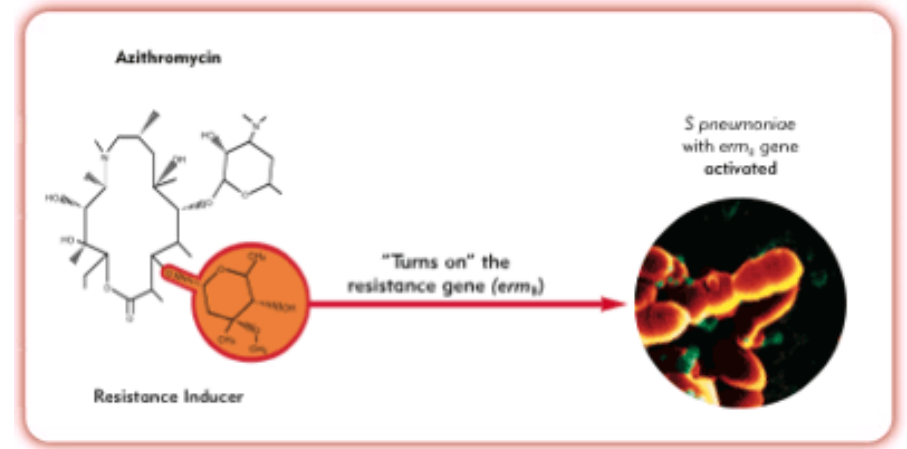
A2058'in metilasyonu/dimetilasyonu



MLS grubu ile hidrojen bağı oluşumu engellenir



MLS_B grubuna çapraz direnç



- MLS_B direnci:

- Konstitütif: $cMLS_B$ → yüksek düzey, çapraz direnç (*Tüm MLS grubu ajanlara direnç*)
- İndüklenebilir: $iMLS_B$ → düşük düzey makrolid direnci, klindamisin duyarlılığı (?)
 - -14 ve -15 üyeli makrolidlerde bulunan "kladinoz" halkası indükler
 - Ketolidlerde "kladinoz" yok → indüklenme yok

- **Stafilokok:**

- *msr* (A) genleri → ATP-bağımlı bir pompa
→ -14, -15 üyeli makrolidler, streptogramin B atılımı → **MS_B fenotipi**

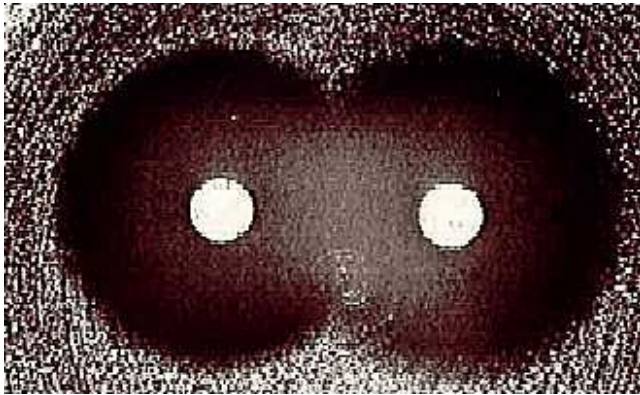
- (indüklenebilir), klindamisin'e duyarlı !!!

-14, -15 üyeli makrolidler
(streptogramin B indüklemez)

rRNA metilazların neden
olduğu dirençten daha
düşük düzeyde makrolid
direnci

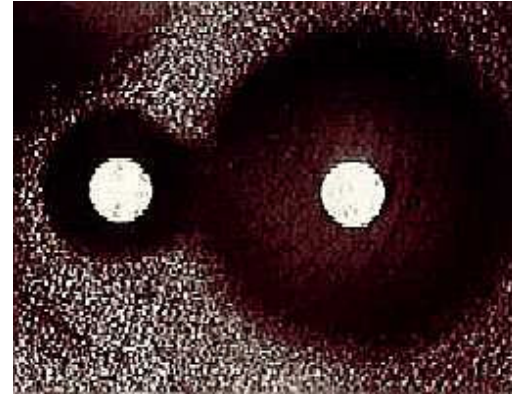
MLS_B direnç fenotiplerinin saptanması

- İndüklenebilir klindamisin direnci:
 - Disk difüzyon testi: D-zone test
 - Eritromisin dirençli, klindamisin duyarlı veya orta dirençli stafilokok suşları için
 - Eritromisin (15 µg) (ortada), klindamisin (2 µg), streptogramin B (25 µg) diskleri
 - Disk araları 15*-26 mm (CLSI)
 - Aynı çukurda 4 µg/ml eritromisin ve 0.5 µg/ml klindamisin (sıvı mikrodilüsyon yöntemi)



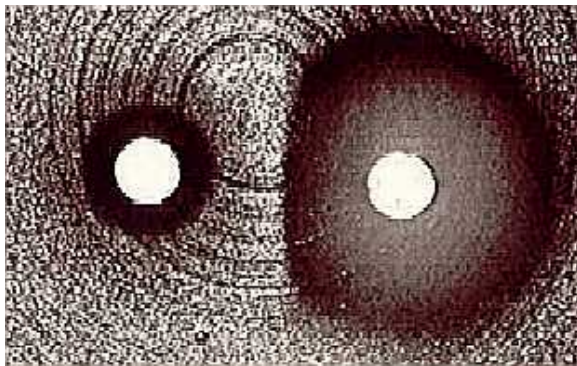
No resistance mechanisms detected.

Susceptible to **erythromycin** (and without further testing to all other macrolides) and **clindamycin**.

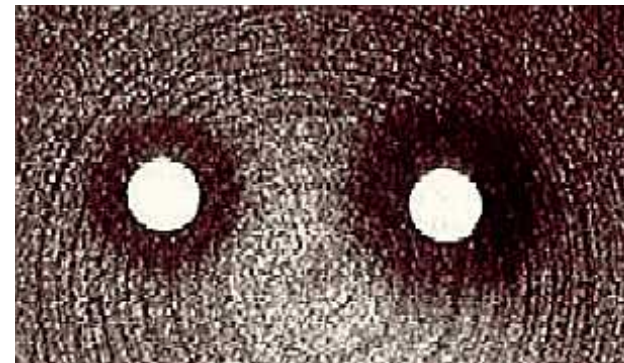


Efflux mediated erythromycin resistance.

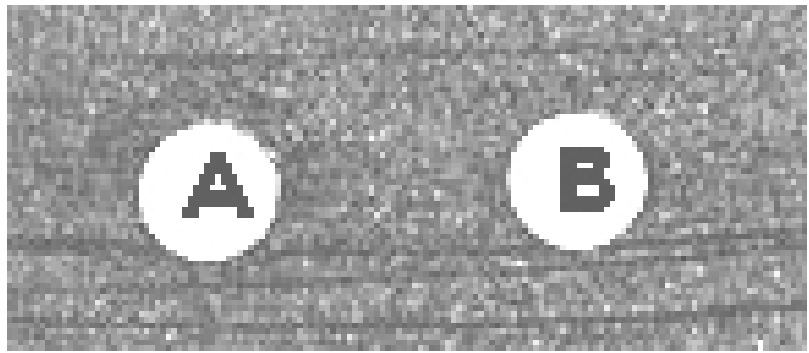
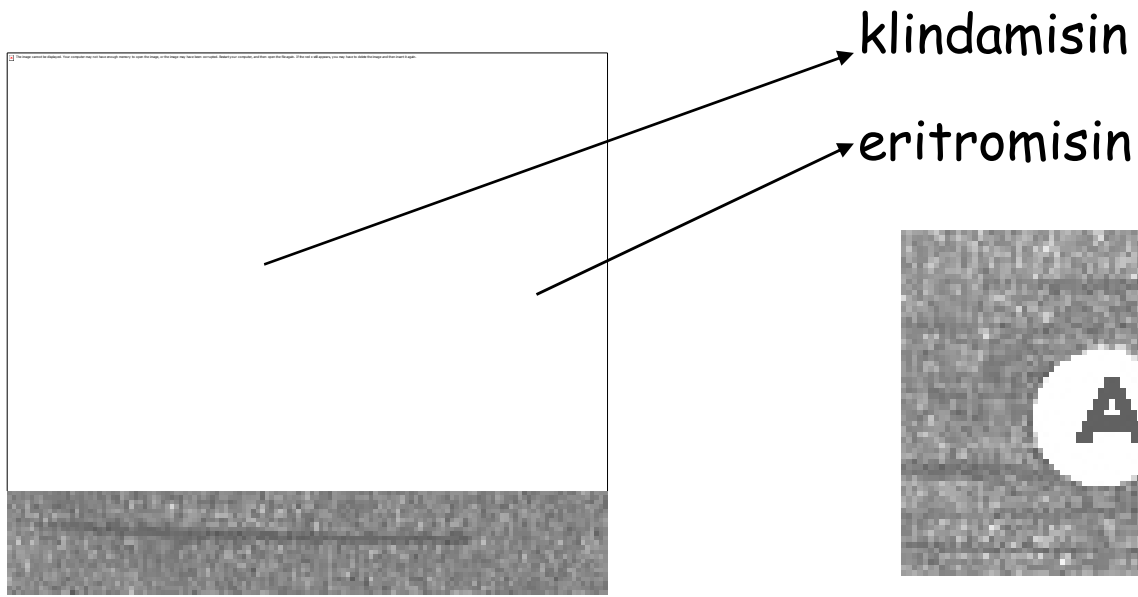
Resistant to **erythromycin** (and without further testing to all other macrolides) but **susceptible** to **clindamycin**.



Target site modification -- inducible resistance. Resistant to erythromycin (and without further testing resistant to all other macrolides) and clindamycin.

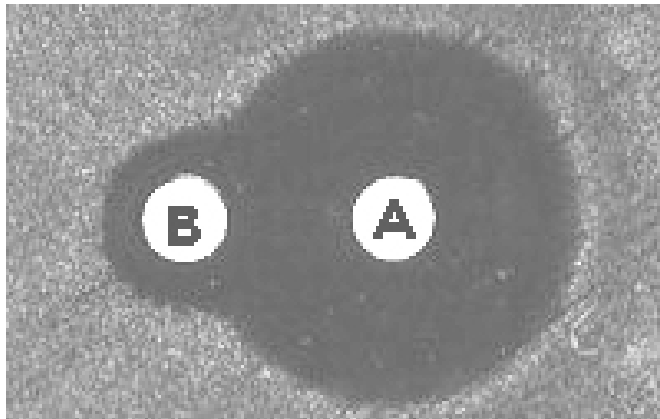


Target site modification -- constitutive resistance. Resistant to erythromycin (and without further testing resistant to all other macrolides) and clindamycin.



iMLS_B

cMLS_B



M fenotipi

İndüklenebilir klindamisin direnci var



Klindamisine dirençli olarak rapor edilir

veya



İzolatin klindamisin dirençli olduğu kabul edilmektedir ancak klindamisin bazı hastalarda yine de etkili olabilir, yakın tedavi izlemi gerekir

Stafilokoklarda MLS direnç fenotipleri

ERY	CLI	Q/D	Yorum	Yapılacak işlem ve rapor
S	S	S	Doğal duyarlı	Duyarlı
R	S	S	Dışa atım pompası veya iMLS _B	D zon testi yap D zon (+) ise "CLI dirençli "
R	R	S	cMLS _B	Makrolid ve linkozamidlere dirençli

Stafilokoklarda direnç fenotipinden genotipe

Stafilokoklarda aminoglikozidlere direnç

- Ribozomal hedeflerde deęişiklik
- İlacın hücreye girişi veya birikiminde azalma
- **Enzimatik direnç**
 - **Aminoglikozid Modifiye eden Enzimler (AME)**
 - N-acetyltransferase'lar (AAC)
 - O-phosphotransferase'lar (APH)
 - O-nucleotidyltransferase'lar (ANT)

- **AAC (6')-APH (2'')** → streptomisin dışı tüm AG'lere yüksek düzey direnç
- **ANT (4)** → neomisin, tobramisin, amikasin direnci
 - Plazmid kontrolünde → konjugasyon *mec* bölgesine → **AG dirençli MRSA suşları**

Stafilokoklarda aminoglikozid direnç fenotipleri

GEN	NET	TOB	AK	KAN	Yorum	Yapılacak işlem ve rapor
S	S	S	S	S	Doğal	Duyarlı
S	S	R	S	R	ANT(4')	KAN, TOB, AK dirençli
R	R/S	R/S	R/S	R/S	APH(2'')/ AAC(6')	Tüm AG'lere dirençli
S	S	S	S	R	APH(3')	KAN ve AK dirençli
R/r	R/r	R/r	R/r	R/r	Geçirgenlikte azalma	Tüm AG'lere düşük düzey dirençli

Pnömokoklarda direnç fenotipinden genotipe

Pnömokoklarda penisilin direnç
mekanizması

PBP yapısında değişiklik

Spontan kromozomal
mutasyon

"Mozaik gen"
oluşumu
Doğal transformasyon

- **pbp**: transpeptidaz, karboksipeptidaz
- *pbp1a*, *2b*, *2x*'de mutasyon → β -laktam direnci
- *pbp2b* ve *pbp2x*'de mutasyon

⊕ *pbp1a*'da mutasyon

Düşük düzey direnç

Yüksek düzey direnç



Dirençli Pnömonokoklar

- **Kromozomal genlerde mutasyon**

- Florokinolonlar
- Makrolidler
- Ketolidler
- TMP-SXT

- **Transformasyon** → **mozaik gen**

- β -laktamlar
- TMP

- **Direnç genlerinin kazanımı**

- Aminoglikozidler
- Kloramfenikol
- Makrolidler/Linkozamidler/
Streptograminler
- Tetrasiklinler

Replikasyonla
aktarılır

Konjugasyonla
aktarılır

Pnömokoklarda direnç fenotipinden genotipe

Pnömokoklarda β -laktam direnci

- Özellikle menenjit durumunda penisilin duyarlılığının saptanması önemli
 - 1 μ g/ml oksasilin diski ile tarama
 - BOS izolatlarında penisilin, sefotaksim/ seftriakson, meropenem, vankomisin MİK bakılmalı

Pnömonoklarda direnç fenotipinden genotipe

- Menenjit-dışı pnömokok izolatları:
 - Penisilin MİK ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$ (oktasilin zon ≥ 20 mm) \rightarrow ampisilin, sulbaktam-ampisilin, sefaklor, sefpodoksim, imipenem, lorakarbef ve meropenem duyarlı (Bu ajanların test edilmesine gerek yoktur)
 - Penisilin düşük veya yüksek düzey direnç saptandığında sefotaksim ve seftriakson MİK değerleri belirlenmeli

Pnömonoklarda direnç fenotipinden genotipe

Pnömonoklarda makrolid direnci

- Hedef bölgede modifikasyon:
 - 23S rRNA'daki adeninin metillenmesi (*erm* metilaz)
 - *erm* geni: indüklenebilir veya yapısal
- Aktif pompa ile atılım:
 - *mef* geni

Pnömokoklarda MLS direnç fenotipleri

ERY	CLI	Q/D	Yorum	Yapılacak işlem ve rapor
S	S	S	Doğal duyarlı	Duyarlı
R	S	S	Dışa atım pompası veya iMLS _B	D zon testi yap D zon (+) ise "CLI dirençli " (Henüz CLSI onayı yoktur)
R	R	S	cMLS _B /iMLS _B	Makrolid ve linkozamidlere dirençli

Streptokoklarda klindamisin de indükleyici olarak etki gösterebilir.

Enterokoklarda direnç fenotipinden genotipe

- Sefalosporinler, aminoglikozidler (yüksek düzey direnç taraması hariç) klindamisin, TMP-SMX in-vitro etkin gözükseler de klinik olarak enterokoklara etkisiz → duyarlı olarak rapor edilmemelidir.

Enterokoklarda β -laktam direnci

- *E. faecalis* : β -laktamaz (+)
- *E. faecium* : düşük β -laktam afinitesi olan PBP5 yapımı + PBP5'de mutasyonlar
- β -laktamaz (-), penisilin duyarlı \longrightarrow ampisilin duyarlı
- Ampisilin duyarlı $\not\rightarrow$ penisilin duyarlı

Enterokoklarda β -laktam direnç fenotipleri

E.faecalis

PEN	AMP /AMX	AMC	Herhangi bir sefalosporin	IMP/ MEM	Yorum	Yapılacak işlem ve rapor
r	S	S	S	S	Doğal	Sefalosporinlere dirençli
R	R	S	R/S	S	β -laktamaz (+)	PEN, AMP, sefalosporin dirençli
R	R	R	R	R	<i>E.faecium</i> ???	Tür düzeyinde tanı doğrulanmalı

Enterokoklarda β -laktam direnç fenotipleri

E.faecalis

PEN	AMP /AMX	AMC	Herhangi bir sefalosporin	IMP/ MEM	Yorum	Yapılacak işlem ve rapor
R	S	S	S	S	Doğal	Sefalosporinlere dirençli
R	R	R	S/R	R	PBP5 varlığına bağlı direnç	Tümü dirençli

Enterokoklarda **glikopeptid** direnci

- Duvar sentezi sırasında yeni bir peptidoglikan prekürsörünün oluşumuna bağlı
- Yeni prekürsörde D-Ala-D-Ala'nın yerini **D-Ala-D-Lac** alır (VanC fenotipinde **D-Ala-D-Ser** alır)

- **Kazanılmış direnç:**
 - VanA, VanB, VanD, VanE, VanG fenotipleri
- **Doğal direnç:**
 - VanC fenotipi
 - *E.gallinarum*, *E.casseliflavus*, *E.flavescens*

Enterokoklarda vankomisin direncinin saptanması

- Vankomisin agar tarama: 6 µg/ml vankomisin içeren BHIA (Beyin kalp infüzyon agar)
- Konfirmasyon: MİK sonucu
 - Mikrodilüsyon
 - Agar dilüsyon
 - E-test
- VanA ve VanB tipi direnci VanC'den ayırt etmek için hareket ve pigment yapımı test edilmelidir.

Enterokoklarda glikopeptid direnç fenotipleri

Fenotip	Vanko MİK	Teiko MİK	Ekspresyon	Kodlandığı yer	Konjugasyonla geçiş	Bulunduğu tür
VanA	64- >1024	16- 512	İndüklenebilir	Plazmid Transpozon	+	<i>E.faecalis</i> , <i>E.faecium</i> , <i>E.durans</i> , <i>E.gallinarum</i>
VanB	4- 1000	0.5-1	İndüklenebilir	Çoğunlukla kromozom	+	<i>E.faecium</i> , <i>E.faecalis</i>
VanC	2-32	≤0.5	Yapısal	Kromozom	-	<i>E.gallinarum</i> , <i>E.flavescens</i> , <i>E.casseliflavus</i>
VanD	64	4	Yapısal	Kromozom	-	<i>E.faecium</i> (çok nadir)
VanE	16	0.5	İndüklenebilir	Kromozom	-	<i>E.faecalis</i> (nadir)

Enterokoklarda **MLS** direnci

- *E. faecalis*:
 - Linkozamidler ve streptogramin A'ya doğal dirençli
 - Bakterinin tanımlanmasında bir kriter olarak kullanılabilir
- MLS direnç mekanizmaları:
 - Hedef modifikasyonu (indüklenebilir/yapısal)
 - Atım pompası
 - Antibiyotik inaktivasyonu

Enterokoklarda MLS direnç fenotipleri

E.faecalis

ERY	CLI	Q-D	Yorum	Yapılacak işlem ve rapor
S	S	R	Doğal	CLI ve Q-D dirençli
R	S	R	iMLS _B	Tümüne dirençli
R	R	R	cMLS _B	Tümüne dirençli
R/S	R/S	S	Tür düzeyinde tanımlama hatası	Eğer AMP de dirençli ise büyük olasılıkla <i>E.faecium</i>

Enterokoklarda MLS direnç fenotipleri

E.faecium

ERY	CLI	Q-D	Yorum	Yapılacak işlem ve rapor
S	S	S	Doğal	
R	S	S	iMLS _B	D zon testi. CLI zonunda indüklenme varsa, "iMLS _B (+), CLI dikkatli kullanılmalı"
R	R	S	cMLS _B	ERY, CLI dirençli
R/S	R/S	R	Tür düzeyinde tanımlama hatası, nadiren Q-D pompa ile atılım	Eğer AMP duyarlı ise büyük olasılıkla <i>E.faecalis</i>

Enterokoklarda aminoglikozid direnci

- Enterokoklar AG'lere doğal olarak düşük düzey dirençli
 - AG'lerin enterokokların hücre zarından geçişleri güç
- AG'lere yüksek düzey direnç (HLR) (MİK>1000 µg/ml) saptanması önemli
 - 120 µg/ml genta diski veya 500 µg/ml genta içeren tüp dilüsyon veya agar dilüsyonda üreme
 - HLR varsa, hücre duvarına etkili ajanlarla olan sinerjik etki engellenir !

Enterokoklarda aminoglikozid direnç fenotipleri

E.faecalis

GEN	NET	TOB	AK	KAN	NEO	Yorum
R	R	R	R	R	R	Doğal düşük düzey direnç
R	R	HLR	HLR	HLR	R	ANT(4')
HLR	R	HLR	R	HLR	R	APH(2'')/AAC(6')
R	R	R	R	HLR	HLR	APH(3')
R	R	R	HLR	HLR	HLR	APH(3')III

Enterokoklarda aminoglikozid direnç fenotipleri

E.faecium

GEN	NET	TOB	AK	KAN	NEO	Yorum
R	R	R	R	R	R	Kromozomal AAC(6'), yapısal
R	R	HLR	HLR	HLR	R	ANT(4')
R	R	R	R	HLR	HLR	APH(3')
R	R	R	HLR	HLR	HLR	APH(3')III