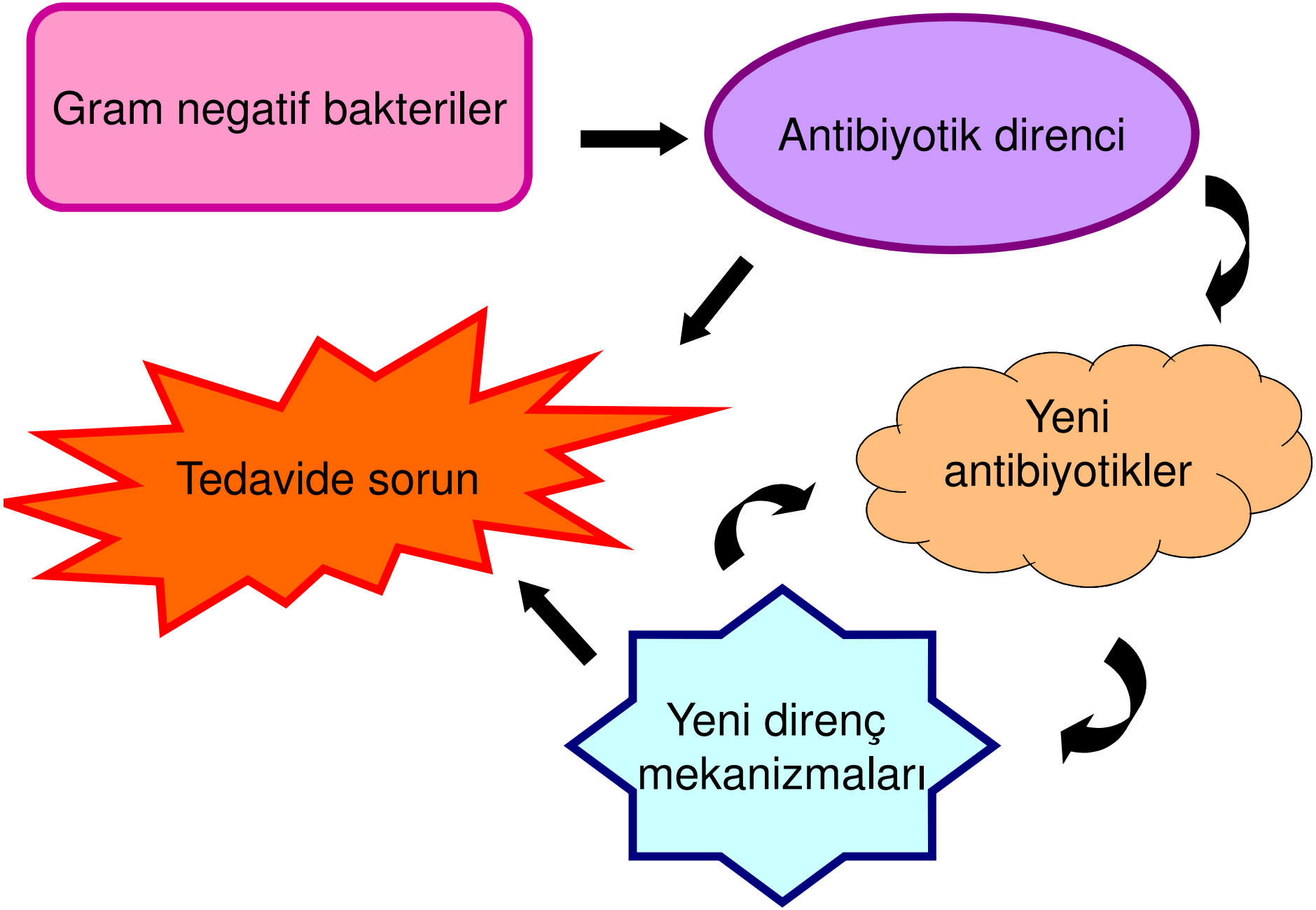
Gram Negatif Bakteriler

Fenotipik yöntemlerden direnç mekanizmasına: Beta-laktamlar, aminoglikozidler

Dr. Devrim Dündar

22 Mart 2010, Aydın


Gram negatif bakteriler
Antibiyotik direnci
Yeni antibiyotikler
Yeni direnç mekanizmaları
Tedavide sorun

- Direnç paternlerinin ve direnç mekanizmalarının bilinmesi, dirençli bakterilerle oluşan infeksiyonların tedavisinde yol gösterici olmaktadır

- Direnç mekanizmalarının belirlenmesinde moleküler yöntemler altın standart olmakla birlikte, bunların rutin laboratuvarlarda kullanımı mümkün değildir

- Günlük uygulamada kullanılan antibiyogramların uygun şekilde yorumlanarak, bazı kolay fenotipik testlerle desteklenmesi, direnç mekanizmaları hakkında bilgi verebilir

Tür düzeyinde doğru tanımlama

Doğal direnç durumunun bilinmesi

Yeterli sayı ve gruptan antibiyotikle çalışılması

İndikatör antibiyotikler

Direnç mekanizmalarının bilinmesi

Direnç mekanizmalarının belirlenip, uygun tedaviye başlanması

Gram negatif bakterilerin doğal direnç durumu

Mikroorganizma	Doğal dirençli olduğu antibiyotikler
Tüm *Enterobacteriaceae* üyeleri	Penisilin G, glikopeptitler, fusidik asit, makrolidler, klindamisin, linezolid, streptograminler, mupirosin
A.baumannii	Ampisilin, amoksisilin, birinci kuşak sefalosporinler
P.aeruginosa	Ampisilin, amoksisilin, amoksisilin/klavulanat, birinci ve ikinci kuşak sefalosporinler, sefotaksim, seftriakson,nalidiksik asit, trimetoprim
B.cepacia	Ampisilin, amoksisilin, birinci kuşak sefalosporinler, kolistin, aminoglikozitler
S.maltophilia	Tikarsilin/klavulanat hariç tüm beta-laktamlar, aminoglikozitler
Flavobacterium (Chryseobacterium, Myroides)	Ampisilin, amoksisilin, birinci kuşak sefalosporinler
Salmonella spp.	Sefuroksim (in-vitro etkili, in-vivo etkisiz)
Klebsiella spp., *Citrobacter diversus*	Ampisilin, amoksisilin, karbenisilin, tikarsilin
Enterobacter spp., *C.freundii*	Ampisilin, amoksisilin, amoksisilin/klavulanat, birinci kuşak sefalosporinler, sefoksitin
M.morganii	Ampisilin, amoksisilin, amoksisilin/klavulanat, birinci kuşak sefalosporinler, sefuroksim, kolistin, nitrofurantoin
Providencia spp.	Ampisilin, amoksisilin, amoksisilin/klavulanat, birinci kuşak sefalosporinler, sefuroksim, gentamisin, netilmisin, tobramsin, kolistin, nitrofurantoin
P.mirabilis	Kolistin, nitrofurantoin
P.vulgaris	Ampisilin, amoksisilin, sefuroksim, kolistin, nitrofurantoin
Serratia spp.	Ampisilin, amoksisilin, amoksisilin/klavulanat, birinci kuşak sefalosporinler, sefuroksim, kolistin
Y.enterocolitica	Ampisilin, amoksisilin, karbenisilin, tikarsilin, birinci kuşak sefalosporinler
C. jejuni/coli	Trimetoprim
H.influenzae	Penisilin G, eritromisin, klindamisin
M.catarrhalis	Trimetoprim

Livermore DM, Winstanley TG, Shanon KP. Interpretative reading:recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. J Antimicrob Chemother 2001;48(Suppl 1):87-102.

İndikatör antibiyotikler

Mikroorganizma	Dirençli olduğu antibiyotik	Yorum
Klebsiella spp., *E.coli*	Seftazidim veya sefpodoksim	ESBL olasılığı, sefamisin dışındaki sefalosporinlerden kaçınılmalı
Enterobacteriaceae	İkinci kuşak sefalosporinlerden biri	Güçlü bir beta-laktamaz olasılığı, birinci kuşak sefalosporinlerden kaçınılmalı
Enterobacteriaceae	Üçüncü kuşak sefalosporinlerden biri	Güçlü bir beta-laktamaz olasılığı, sefamisinler dışında birinci ve ikinci kuşak sefalosporinlerden kaçınılmalı
Enterobacteriaceae	Üreidopenisilinlerden biri	Penisilinaz olasılığı, amino ve karboksipenisilinlerden kaçınılmalı
Enterobacteriaceae	Beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarından biri	Kombinasyondaki penisiline de dirençli kabul edilir
H.influenzae	Sefaklor	Beta-laktamaz dışında bir mekanizma (ampisilinden daha iyi indikatör)
N.gonorrhoeae, H.influenzae	Nalidiksik asit	Florokinolonlara azalmış duyarlılık veya direnç

Livermore DM, Winstanley TG, Shanon KP. Interpretative reading:recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. J Antimicrob Chemother 2001;48(Suppl 1):87-102.

Enterik bakteriler test ve bildirimi için önerilen ilaç grupları

- **Grup A:** Birincil test ve bildirim
  - Ampisilin
  - Sefazolin, sefalotin
  - Gentamisin, tobramisin
- **Grup B:** Birincil test kısıtlı bildirim
  - Amikasin
  - Amok/klav. veya amp/sulb., pip/tazob., tik/klav.
  - Sefuroksim
  - Sefepim
  - Sefotetan, sefoksitin
  - Sefotaksim veya seftriakson
  - Siprofloksasin, levofloksasin
  - Ertapenem, imipenem, meropenem
  - Piperasilin
  - Trimetoprim/sulfametoksazol
- **Grup C:** Ek kısıtlı bildirim
  - Aztreonam, seftazidim
  - Kloramfenikol
  - Tetrasiklin
- **Grup U:** Sadece idrar için
  - Lomefloksasin veya norfloksasin veya ofloksasin
  - Nitrofurantoin
  - Sülsizoksazol
  - Trimetoprim

CLSI M100-S19

Salmonella ve *Shigella* spp.

- Dışkı izolatlarında sadece:
  - Ampisilin
  - Bir florokinolon
  - Trimetoprim/sulfametoksazol bildirilmeli

- *Salmonella* spp.nin barsak dışı izolatlarında ayrıca:
  - Kloramfenikol
  - Üçüncü kuşak sefalosporin

*Gerektiğinde 3.kuşak sefalosporinler

Salmonella ve *Shigella* spp.

- Barsak dışı izolatlarda:
- Nalidiksik asit
  - Nalidiksik asit direnci varsa florokinolonlara in vitro duyarlı bulunsa bile tedavi yanıtı alınamayabilir

Salmonella ve *Shigella* spp.

- **Aminoglikozidler, 1. ve 2. kuşak sefalosporinler ve sefamisinler** in-vitro duyarlı bulunsa bile "duyarlı" olarak bildirilmemeli
  - **Klinik olarak etkisiz**

P.aeruginosa test ve bildirimi için önerilen ilaç grupları

- **Grup A:** Birincil test ve bildirim
  - Seftazidim
  - Gentamisin, tobramisin
  - Piperasilin
- **Grup B:** Birincil test, kısıtlı bildirim
  - Amikasin
  - Aztreonam
  - Sefepim
  - Siprofloksasin, levofloksasin
  - İmipenem, meropenem
  - Piperasilin-tazobaktam, tikarsilin
- **Grup C:** Ek kısıtlı bildirim
- **Grup U:** Sadece idrar için
  - Lomefloksasin veya ofloksasin norfloksasin

CLSI M100-S19

Acinetobacter spp. test ve bildirimi için önerilen ilaç grupları

- **Grup A:** Birincil test ve bildirim
  - Ampisilin/sulbaktam
  - Seftazidim
  - Siprofloksasin, levofloksasin
  - İmipenem, meropenem
  - Gentamisin, tobramisin

- **Grup B:** Birincil test kısıtlı bildirim
  - Amikasin
  - Piperasilin/tazobaktam, tikarsilin/klavulanat
  - Sefepim
  - Sefotaksim, seftriakson
  - Doksisiklin/minosiklin/tetrasiklin
  - Piperasilin
  - Trimetoprim-sulfametoksazol

- **Grup C:** Ek kısıtlı bildirim
  - Polimiksin B, kolistin*

*MIC testleri için

CLSI M100-S19

Stenotrophomonas maltophilia test ve bildirimi için önerilen ilaç grupları

- **Grup A:** Birincil test ve bildirim
  - Trimetoprim/sulfametoksazol
- **Grup B:** Birincil test kısıtlı bildirim
  - Levofloksasin
  - Minosiklin
  - Seftazidim*
  - Kloramfenikol*
  - Tikarsilin/klavulanat*

*MIC testleri için

CLSI M100-S19

S.maltophilia

- Tüm aminoglikozidler, karbapenemler dirençli bildirilmeli !!

Burkholderia cepacia test ve bildirimi için önerilen ilaç grupları

- **Grup A:** Birincil test ve bildirim
  - Trimetoprim/sulfametoksazol
- **Grup B:** Birincil test kısıtlı bildirim
  - Seftazidim
  - Meropenem
  - Minosiklin
  - Kloramfenikol*
  - Levofloksasin*
  - Tikarsilin/klavulanat*

*MIC testleri için

CLSI M100-S19

Diğer nonfermentatif bakteriler *

- **Grup A:** Birincil test ve bildirim
  - Seftazidim
  - Gentamisin, tobramisin
  - Piperasilin
- **Grup B:** Birincil test kısıtlı bildirim
  - Amikasin
  - Aztreonam
  - Sefepim
  - Siprofloksasin, levofloksasin
  - İmipenem, meropenem
  - Piperasilin/tazobaktam, tikarsilin/klavulonat
  - Trimetoprim-sulfametoksazol
- **Grup C:** Ek kısıtlı bildirim
  - Sefotaksim, seftriakson
  - Kloramfenikol
- **Grup U:** Sadece idrar için
  - Lomefloksasin veya ofloksasin veya norfloksasin
  - Sülfizoksazol
  - Tetrasiklin

* *P.aeruginosa, Acinetobacter* spp., *B.cepacia, S.maltophilia* dışındaki nonfermentatif bakteriler dilüsyon yöntemi ile test edilmeli

CLSI M100-S19

Doğrulama gereken durumlar

Enterobacteriaceae	Karbapenemlere dirençli
Citrobacter freundii *Enterobacter* spp. *Serratia marcescens*	Ampisilin, sefazolin veya sefalotine duyarlı
Klebsiella spp. *Proteus vulgaris* *Providencia* spp.	Ampisiline duyarlı
Stenotrophomonas maltophilia	Karbapenemlere duyarlı
Herhangi bir mikroorganizma	Tüm ilaçlara dirençli

CLSI M100-S19

- Uzun süren tedaviler sırasında bazı bakterilerde bazı antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişebilir
  - *Enterobacter, Citrobacter, Serratia* spp.→ üçüncü kuşak sefalosporinler
  - *P.aeruginosa* → tüm antibiyotikler
- Tekrarlanan kültürlerde aynı bakteri izole edilse bile antibiyogram tekrarlanmalı

Gram negatif bakterilerde direnç

Beta-laktam direnci

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar

İndüklenebilir beta-laktamazlar

Karbapenemazlar

Aminoglikozid direnci

Kinolon direnci

Gram negatif bakterilerde beta-laktam direnci

Gram negatif bakterilerde beta-laktam direnci

- Gram negatif bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişiminden sorumlu başlıca mekanizma, beta-laktamaz üretimidir

- Çeşitli bakteriler tarafından üretilen 400'den fazla beta-laktamaz enzimine, her geçen gün yenileri eklenmekte

E.coli, P.mirabilis Salmonella, Shigella spp. beta-laktam direnç fenotipleri

AMP	AMC	TIC	T/K	PIP	P/T	CEF	FOX	CXM	CAZ	CTX, CRO	CPR, FEP	ATM	IMP MEM	Yorum	Sıklık	Yorum
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S*	Klasik	Sık	
R	S	R	S	r*	S	r	S	S	S	S	S	S	S	Penisilinaz (düşük)	Sık	ÜSİ hariç C1-R
R	r/R	R	r/R	R	r/R	R	S	S	S	S	S	S	S	Penisilinaz (yüksek)	Sık	“
R	R	r	R	R	R	R	R	R	R	r/R	S	r/R	S	AMP-C	Nadir	
R	Her***	R	Her	R	Her	R	S	R	R	R	R	R	S	ESBL	Nadir	ESBL testi(+)ise C2,3,4-R
R	Her	R	Her	R	Her	R	S	r	R	r	r	r	S	ESBL-seftazidimaz	Nadir	“
R	R	R	R	R	r/R	S	S	S	S	S	S	S	S	IRT****	???	
Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	R	!!!	!!!	Doğrula

**P.mirablis*’te düşük düzey IMP direnci olabilir
**Zon çapında azalma olmasına karşın duyarlı sınırlarda
***Her: Herhangi bir
****IRT: inhibitor-resisant

Livermore DM, Winstanley TG, Shanon KP. Interpretative reading:recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. J Antimicrob Chemother 2001;48(Suppl 1):87-102.

Klebsiella spp., *C.diversus* beta-laktam direnç fenotipleri

AMP	AMC	TIC	T/K	PIP	P/T	CEF	FOX	CXM	CAZ	CTX, CRO	CPR, FEP	ATM	IMP MEM	Yorum	Sıklık	Yorum
R	S	R	S	r	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Klasik/ Düşük SHV-1 /K1	Sık	Temo hariç pen.ler-R
R	r/R	R	Her	R	r/R	R	S	S	S	S	S	S	S	Penisilinaz (yüksek)	Sık	
R	Her	R	Her	R		R	S	R	R	R	R	R	S	ESBL	Sey.	ESBL testi(+)ise C2,3,4-R
R	Her	R	Her	R	Her	R	S	r	R	r	r	r	S	ESBL-seftazidimaz	Sey.	“
R	R	R	R	R	r/R	S	S	S	S	S	S	S	S	IRT	???	
R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S	K1 (yüsek) *K.oxytoca* için	Sey.	CTX-R ???CAZ
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	r/R	S	AmpC	Nadir	
Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	R	!!!	!!!	Doğrula

Livermore DM, Winstanley TG, Shanon KP. Interpretative reading:recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. J Antimicrob Chemother 2001;48(Suppl 1):87-102.

Enterobacter, C.freundii
beta-laktam direnç fenotipleri

AMP	AMC	TIC	T/K	PIP	P/T	CEF	FOX	CXM	CAZ	CTX, CRO	CPR, FEP	ATM	IMP MEM	Yorum	Sıklık	Yorum
R	R	S	S/r	S	S	R	R	S/r	S	S	S	S	S	Klasik indAmpC	Sık	C2,3 uyar
R	R	R	Her	R	S/r	R	R	S	S	S	S	S	S	Penisilinaz	Sık	C2-3 uyar
R	R	R	Her	R	S/r	R	R	R	R	R	R	R	S	ESBL	Nadir	C2,3,4-R
R	R	R	Her	R	S/r	R	R	r	R	r	R	r	S	ESBL-seftazidimaz	Nadir	C2,3,4-R
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	Derepresse AmpC	Sık	
Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	!!!	!!!	Doğrula

Livermore DM, Winstanley TG, Shanon KP. Interpretative reading:recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. J Antimicrob Chemother 2001;48(Suppl 1):87-102.

M.morganii, Providencia spp. beta-laktam direnç fenotipleri

AMP	AMC	TIC	T/K	PIP	P/T	CEF	FOX	CXM	CAZ	CTX, CRO	CPR, FEP	ATM	IMP MEM	Yorum	Sıklık	Yorum
R	R	S	S/r	S	S	R	r	R	S	S	S	S	S	Klasik	Sık	C2,3 uyar
R	R	R	S	R	S/r	R	r	R	S	S	S	S	S	Penisilinaz	Sık	C2,3 uyar
R	R	R	R	R	S	R	r	R	R	R	S	R	S	Derepresse AmpC	Sey.	
Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	R	!!!	!!!	Doğrula

Livermore DM, Winstanley TG, Shanon KP. Interpretative reading:recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. J Antimicrob Chemother 2001;48(Suppl 1):87-102.

P.vulgaris
beta-laktam direnç fenotipleri

AMP	AMC	TIC	T/K	PIP	P/T	CEF	FOX	CXM	CAZ	CTX, CRO	CPR, FEP	ATM	IMP MEM	Yorum	Sıklık	Yorum
R	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	Klasik	Sk	
R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	Penisilinaz	Sık	
R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	Derepresse Krom.β-lak.	Nadir	
Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	R	!!!	!!!	Doğrula

Livermore DM, Winstanley TG, Shanon KP. Interpretative reading:recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. J Antimicrob Chemother 2001;48(Suppl 1):87-102.

Serratia spp.
beta-laktam direnç fenotipleri

AMP	AMC	TIC	T/K	PIP	P/T	CEF	FOX	CXM	CAZ	CTX, CRO	CPR, FEP	ATM	IMP MEM	Yorum	Sıklık	Yorum
R	R	S	S	S	S	R	r	R	S	S	S	S	S	Klasik	Sık	C2,3 uyar
R	R	R	Her	R	Her	R	r	R	S	S	S	S	S	Penisilinaz	Sık	C2,3 uyar
R	R	R	R	R	r/R	R	r	R	S	R	S	R	S	Derepresse AmpC	Nadir	
Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	Her	R	!!!	!!!	Doğrula

Livermore DM, Winstanley TG, Shanon KP. Interpretative reading:recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. J Antimicrob Chemother 2001;48(Suppl 1):87-102.

Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)

ESBL

- Gram negatif bakteriler tarafından oluşturulan ve bazı geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotikleri etkisiz kılan enzimlerdir

ESBL neden önemli ?

- ESBL üreten bakteriler penisilinlere, sefalosporinlere ve aztreonama in vitro duyarlı görünseler bile in vivo etkili olmayabilirler

↓

Tedavide başarısızlık

ESBL üreten bakteriler genellikle çoğul dirençlidir

- Aminoglikozidler
- Florokinolonlar
- Trimetoprim/sulfametoksazol direnci sık

ESBL saptanması

- *K.pneumoniae, K.oxytoca, E.coli* ve *P.mirabilis**
- Tarama testleri (rutin antibiyogram)
- Doğrulama testleri

*Sadece bakteriyemi gibi ciddi infeksiyon etkeni ise

ESBL doğrulama testi yapılması gereken durumlar

	Disk difüzyon (mm)	MIC (µg/ml)
*Sefpodoksim	≤ 17 (≥21 duyarlı)**	≥ 4***
*Seftazidim	≤ 22 (≥18 duyarlı)	≥ 1
*Sefotaksim	≤ 27 (≥23 duyarlı)	≥ 1
Seftriakson	≤ 25 (≥21 duyarlı)	≥ 1
Aztreonam	≤ 27 (≥22 duyarlı)	≥ 1

**P.mirabilis* için uygun olan antibiyotikler

***P.mirabilis* için ≤ 22

****P.mirabilis* için ≥ 1 µg/ml

CLSI M100-S19

ESBL doğrulama testleri

-Disk difüzyon-

<u>Diskler</u>

- Seftazidim (30 µg)
- Sefotaksim (30 µg)
- Seftazidim-klavulanik asit (30/10 µg)
- Sefotaksim-klavulanik asit (30/10 µg)

- Zon çapının klavulanik asit ile test edildiğinde, tek başına test edilmesine göre ≥ 5mm artması

- İki kombinasyonun da kullanılması öneriliyor

CLSI M100-S19

ESBL doğrulama testleri
-MIC-

Antibiyotikler

- Seftazidim (0.25 - 128 µg/ml)
- Sefotaksim (0.25 - 64 µg/ml)
- Seftazidim-klavulanik asit (0.25/4 - 128/4 µg/ml)
- Sefotaksim-klavulanik asit (0.25/4 - 64/4 µg/ml)

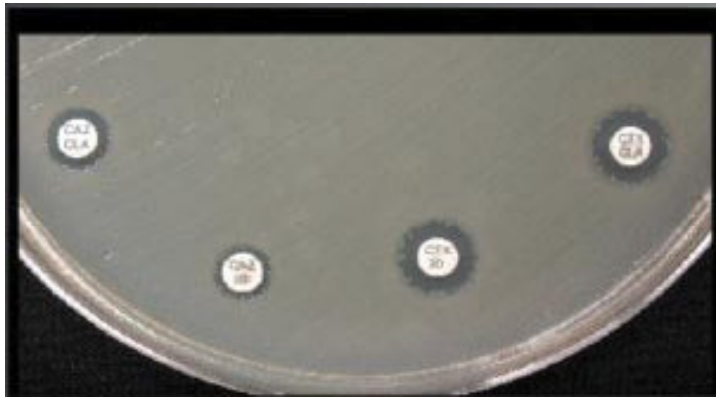
- MIC değerinin klavulanik asit ile test edildiğinde, tek başına test edilmesine göre ≥ 3 dilüsyon azalması

- İki kombinasyonun da kullanılması öneriliyor

CLSI M100-S19

ESBL doğrulama testleri

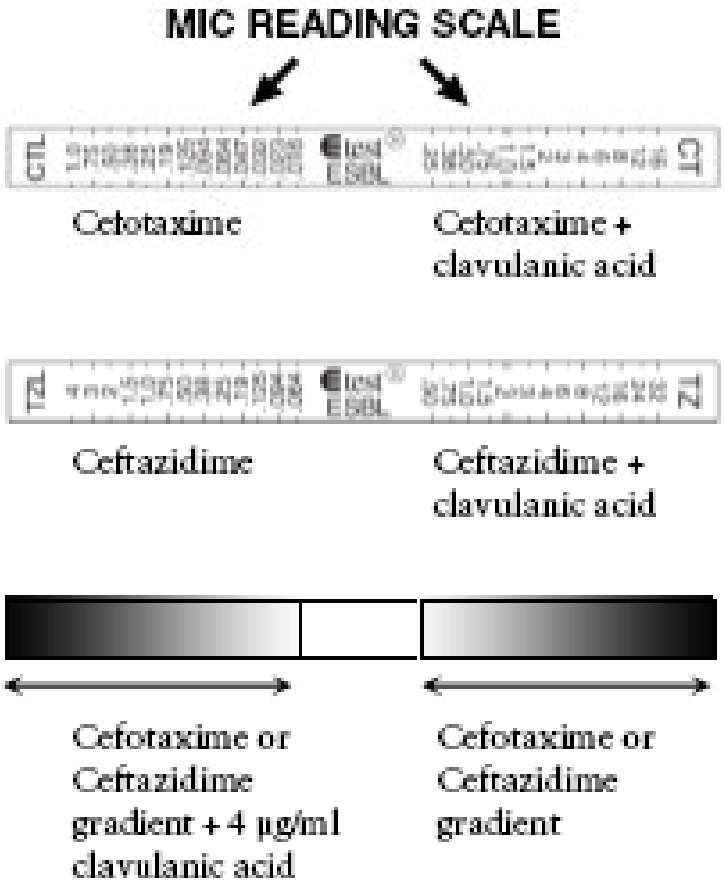
ESBL (+)



ESBL (-)

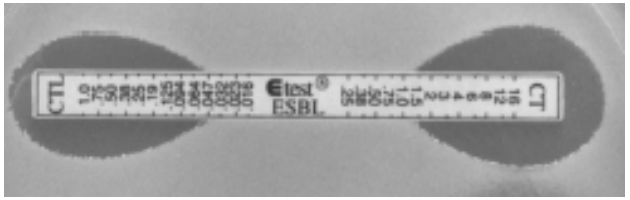
ESBL doğrulama testleri

-Etest-



ESBL doğrulama testleri
Etest-ESBL (+)

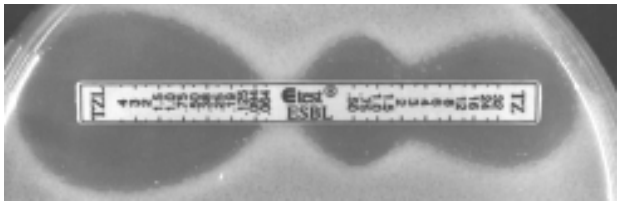
- Sefotaksim ≥0.5 ve sefotaksim/sefotaksim-klavulonat ≥8



- Seftazidim ≥1 ve seftazidim/seftazidim-klavulonat ≥8

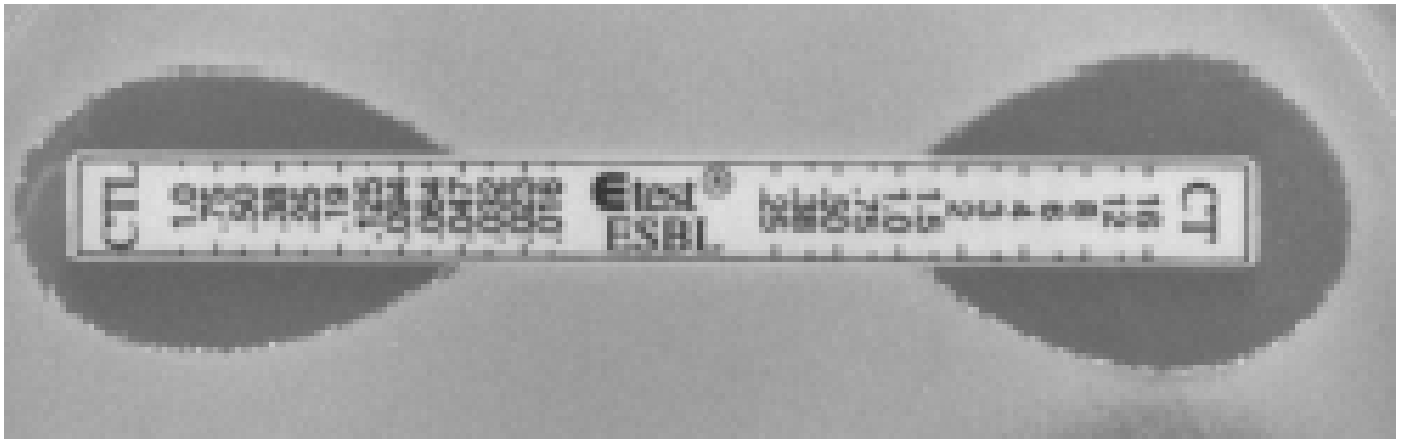
- Fantom zonu

- Sefotaksim veya seftazidim elipsinde deformasyon



ESBL doğrulama testleri

Etest-ESBL (+)



- Sefotaksim/sefotaksim-klavulonat = 1.5/0.047 = 32 (≥8) ESBL (+)

ESBL doğrulama testleri

-Etest-

<u>ESBL negatif</u>

- Sefotaksim <0.5 veya sefotaksim/sefotaksim-klavulonat <8
- Seftazidim <1 veya seftazidim/seftazidim-klavulonat <8

ESBL doğrulama testleri

-Etest-

- Sefotaksim >16 ve sefotaksim-klavulonat >1
- Seftazidim >32 ve seftazidim-klavulonat >4

- Değerlendirelemez (başka bir yöntem kullanılmalı)

ESBL doğrulama testleri

-Çift disk sinerji testi-

- Tüm laboratuvarlarda uygulanabilir
- Disk yerleşimlerine dikkat edilerek rutin antibiyograma dahil edilebilir
- Amoksisilin/klavulanik asit (AMC) diski ile bundan 2-3 cm uzaklıkta olacak şekilde aztreonam, seftazidim, sefotaksim diskleri yerleştirilir

ESBL doğrulama testleri
Çift disk sinerji testi-ESBL (+)

- Bu antibiyotiklerin inhibisyon zonlarının AMC diskine bakan tarafında genişleme olması veya

- Diskler arası bölgede bir inhibisyon alanının gözlenmesi

ESBL doğrulama testleri

-Çift disk sinerji testi-

- Pratik ama duyarlılığı %100 değil
- Diskler arası uzaklık standart değil
  - İnhibisyon zonu geniş olduğunda diskler arası mesafe arttırılmalı
  - İndüklenebilir beta-laktamazı (İBL) olan bakterilerde ESBL saptanamayabilir

ESBL saptanması

-Otomatize sistemler-

- Vitek 1
- Vitek 2
- MicroScan
- Phoenix

ESBL saptanması

-Otomatize sistemler-

- Üçüncü kuşak sefalosporinlerin klavulanik asit ve sulbaktamla kombinasyonları kullanılarak bakteri üremesi izlenmektedir

Doğrulama testinde ESBL'nin saptanamadığı durumlar

- Birden fazla ESBL
- ESBL + AmpC
- ESBL + porin mutasyonu

ESBL'nin klinik önemi ve sonuçların bildirilmesi

- ESBL üreten bakteriler **penisilinler, sefalosporinler ve aztreonama** in vitro duyarlı görünseler bile **"dirençli"** olarak bildirilmelidir

- ESBL üreten bakterilerin neden olduğu basit üriner sistem infeksiyonlarında bu ilaçlar kullanılabilir (idrarda yüksek konsantrasyon), ancak **sepsiste kullanılmamalıdır**

ESBL (+) olsa bile değiştirmeden bildirilecek sonuçlar

- Beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonları
- Sefamisinler (sefoksitin, sefotetan, sefmetazol)
- Karbapenemler

İndüklenebilir beta laktamazlar

İndüklenebilir beta laktamazlar

- Bush grup 1, Ambler grup C: AmpC beta-laktamazlar
- Normalde bakterilerde az miktarda sentezlenen AmpC enzimi, ortamda bulunan bir indükleyicinin etkisi ile çok daha fazla üretilir
- Bu indüksiyon geçicidir

İndüklenebilir beta laktamazlar

- Asıl sorun → 10^{-6}-10^{-8} oranında bakteri hücresi mutasyona uğrayıp beta-laktamazı sürekli üretir hale geçebilir (derepresyon)

- Bu dereprese mutantlar penisilin ve sefalosporinlerle tedavi sırasında seçilerek tedavi başarısızlıklarına neden olabilir

İndüklenebilir beta laktamazlar

Beta-laktamaz indüksiyon potansiyeli

- Sefamisinler
- Karbapenemler
- Klavulanik asit
- Sefalotin
- Sulbaktam
- Tazobaktam
- Aztreonam
- 3. ve 4.kuşak sefalosporinler

yüksek

↓

düşük

İndüklenebilir beta laktamaz üreten bakteriler

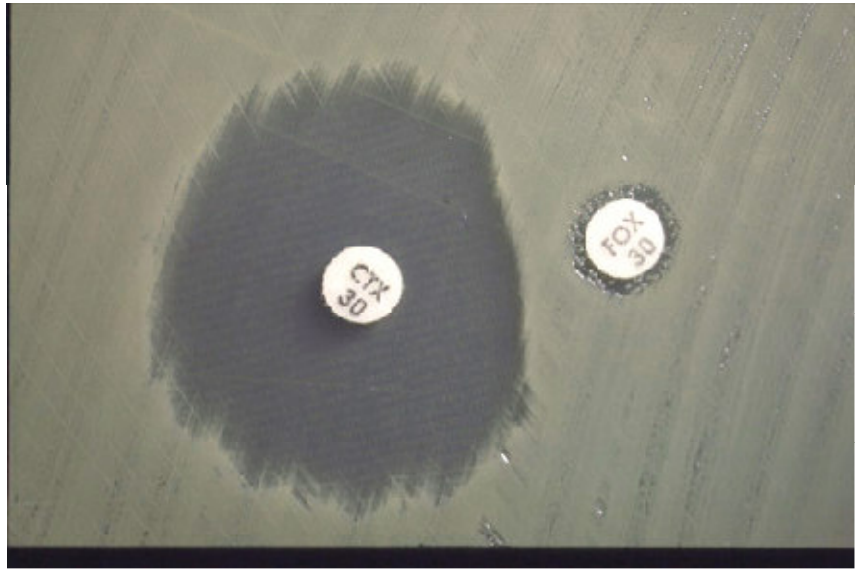
- *Enterobacter* spp.
- *Citrobacter freundii*
- *Serratia marcescens*
- *Morganella morganii*
- *Proteus vulgaris*
- *Providencia* spp.
- *Hafnia alvei*
- *Pseudomonas aeruginosa*

İBL saptanması

- Sefoksitin veya imipenem gibi güçlü bir indükleyicinin 1.5-2 cm uzağına aztreonam veya 3.kuşak sefalosporin konur

İBL saptanması

- Sefalosporin diskinin inhibisyon zonu, indükleyiciye bakan yüzde kesintiye uğramışsa İBL (+)



İndüklenebilir beta laktamazlar

- Rutin olarak test edilmesi önerilmiyor
  - Rutin antibiyograma uyarlanabilir
- Bu türlerle oluşan infeksiyonlarda penisilinler, 3.kuşak sefalosporinler ve aztreonam kullanımı sırasında direnç gelişebileceği bilinmeli
- Uzun süren tedavilerde antibiyogram 3-4 günde bir tekrarlanmalı

Karbapenemleri Hidrolize Eden Beta Laktamazlar (Karbapenemazlar)

Karbapenemazlar

- Metalo beta-lakamazlar (Ambler sınıf B)
- Ambler sınıf A karbapenemazlar
- Ambler sınıf D karbapenemazlar (OXA karbapenemazlar)

Walsh TR. Curr Opin Infect Dis 2008;21:367-71.

Gupta V. Expert Opin Investig Drugs 2008;17(2):131-43.

Metalo beta-lakamazlar (MBL)

- Karbapenemazlar içinde klinik önemi en fazla olanı

- *P.aeruginosa*,
- *Acinetobacter* spp. ve
- *Enterobacteriaceae* üyelerinde yaygın

- Aztreonam hariç tüm beta-laktamları hidrolize edebilirler

Walsh TR. Curr Opin Infect Dis 2008;21:367-71.

Franklin C ve ark. J Clin Microbiol 2006;44(9):3139-44.

Metalo beta-lakamazlar (MBL)

- Serin beta-laktamaz inhibitörleri (klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam) ile inhibe edilemezler
- Çinko iyonlarına ihtiyaç duyarlar
- EDTA ile inhibe edilirler
- MBL taşıyan mikroorganizmalar karbapenemlere duyarlı görünebilirler

Metalo beta-lakamazlar (MBL)

- IMP
- VIM
- SPM
- GIM
- SIM
- NDM

Sınıf A Karbapenemazlar

- **GES** (2,4,5,6)
  - *Enterobacteriaceae*
  - *P.aeruginosa*
- **KPC** (2-4)
  - *Enterobacteriaceae*
  - *P.aeruginosa* (nadir)

plazmid kökenli

- **SME**
- **IMI**
- **NMC-A**

kromozomal

OXA Karbapenemazlar (Oksasilinazlar)

- Sınıf D beta-laktamazlardır
- Çoğu kromozomal
- *Acinetobacter* spp.de sık
- Hidrolitik aktiviteleri MBL'dan düşük
- Eflüks veya geçirgenlik azalması gibi ek direnç mekanizmaları gerekli
- OXA-23, OXA-24, OXA-58 …

Walsh TR. Curr Opin Infect Dis 2008;21:367-71.

Karbapenemaz üreten bakterilerin saptanması

- Hangi bakteriler karbapenemaz üretimi açısından test edilmeli?
- Hangi yöntem kullanılmalı?
  - Standardize edilmiş spesifik bir test olmadığından, tanıda zorluklar var

Hangi bakteriler karbapenemaz üretimi açısından test edilmeli?

- Bakterinin türüne,
- Enzimin tipine,
- İlave direnç mekanizmalarının varlığına
  - Geçirgenlik azalması
  - Efflux
  - Diğer beta-laktamazlar

bağlı olarak değişik beta-laktam direnç fenotipleri olabilir

Miriagou V. ve ark. Clin Microbiol Infect 2010;16:112-122.

Bakteri türüne göre kabapenemazların dağılımı

Mikroorganizma	MBL (sınıf B)	Sınıf A (KPC-GES)	OXA (sınıf D)
Pseudomonas			
P.aerginosa	++	+	+
P.putida	+	+	
A.baumannii	+[a]		++
Acinetobacter spp.	+		+
Enterobacteriaceae			
K.pneumoniae	+[a]	++	+
E.coli	+	+	+
P.mirabilis	+		+
Providencia spp.	+		
K.oxytoca	+	+	
S.marcescens	+[a]	+	
Enterobacter spp.	+[a]	+	
C.freundii	+	+	
M.morganii	+		
S.enterica		+	
Raoultella spp.		+	

[a] Bazı bölgelerde endemik

Miriagou V. ve ark. Clin Microbiol Infect 2010;16:112-122.

Karbapenemaz üreten bakterilerin fenotipik özellikleri

Mikroorganizma	Enzim	AMP	TIC	TZP	CAZ	ATM	IMP	ETP
P.aeruginosa	MBL	-	R	R	R	S	R	-
	KPC	-	R	R	R	R	R	-
A.baumannii	MBL	R	R	R	R	S	I/R	-
	OXA	R	R	I	S	S	I/R	-
Enterobacteriaceae AmpC (-)	MBL	R	R	S/I	R	S	S/I/R	I/R
Enterobacteriaceae AmpC (+)	MBL	-	R	S/I	R	S	S/I/R	I/R
Enterobacteriaceae AmpC (-)	KPC/GES	R	R	R	I/R	R	S/I/R	I/R
Enterobacteriaceae AmpC (+)	KPC/GES	-	R	R	R	R	I/R	I/R
Enterobacteriaceae AmpC (-)	OXA-48	R	R	R	I/S	S	S/I	S/I

Miriagou V. ve ark. Clin Microbiol Infect 2010;16:112-122.

Karbapenemaz üreten bakterilerin fenotipik özellikleri

- Karbapenemaz üreten bir izolat en azından penisilinlere ve dar sektrumlu sefalosporinlere dirençli olmalı
- KPC/GES (Sınıf A) veya MBL varlığında genellikle geniş spetrumlu sefalosporinlere de direnç görülür

Hangi bakteriler karbapenemaz üretimi açısından test edilmeli?

- Bir karbapenem için
  - Disk difüzyonda zon çapında azalma veya
  - Yüksek MIC

saptandığında karbapenemaz varlığı açısından incelenmeli

- Karbapenemaz üreten bakterilerde karbapenem değerleri duyarlı sınırlarda olabilir !!!
  - *Enterobactericeae* üyeleri
  - MBL ve OXA karbapenemaz üreten *Acinetobacter* izolatları
  - MBL üreten *P.aeruginosa* (nadir)

- İnokulum miktarı
  - Özellike otomatize sistemlerde inokulum miktarının az olması ve heterojen üreme nedeni ile yalancı negatiflikler olabilir
- Sıvı mikrodilüsyon veya disk difüzyon yöntemleri daha güvenilir

Hangi bakteriler karbapenemaz üretimi açısından test edilmeli?

- Sefotaksim, seftriakson veya seftazidim antibiyotiklerinin bir veya bir kaçına dirençli olan,
- Kabapenem MIC'lerinde yükelme veya zon çaplarında daralma olan *Enterobacteriaceae* üyeleri, duyarlı grupta olsalar bile karbapenemaz oluşturuyor olabilirler
- Karbapenemlere duyarlı göründüğü halde karbapenemaz içeren *Enterobacteriaceae* üyeleri ile oluşan infeksiyonların tedavisinde karbapenemlerin etkinliği bilinmemektedir
- Bu izolatlarda MIC değerleri belirlenerek bildirilmeli, duyarlılık konusunda yorum yapılmamalıdır

CLSI M100-S19

Enterobacteriaceae üyelerinde karbapenemaz saptanmasında kullanılacak testler

- Tarama testi
  - Ertapenem ve meropenem disk difüzyon veya sıvı dilüsyon
- Fenotipik doğrulama testi
  - Modifiye Hodge testi

CLSI M100-S19

Karbapenemaz tarama testi
-Doğrulama testi yapılması gereken durumlar-

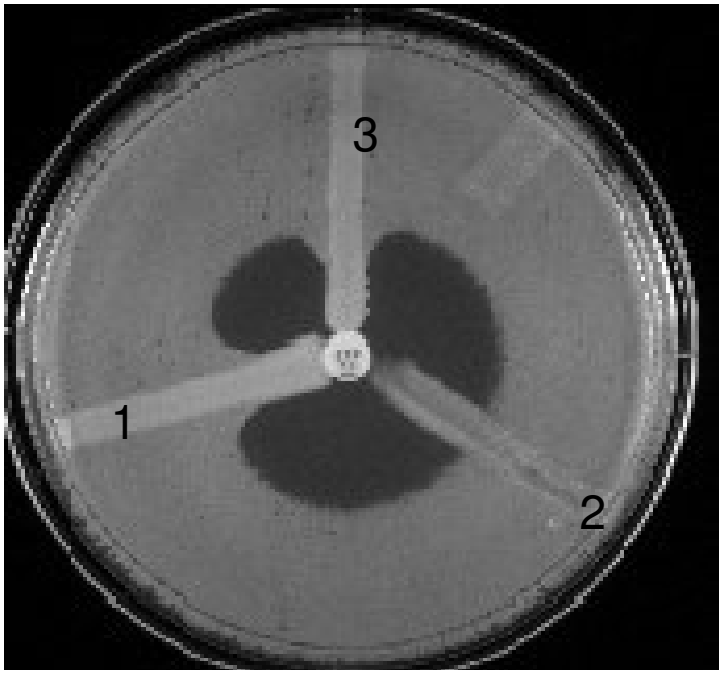
	Disk difüzyon (mm)	Sıvı dilüsyon (µg/ml)
Ertapenem	19-21	2
Meropenem	16-21	2-4
İmipenem	*	2-4

*İmipenem disk testi karbapenemaz taranmasında yetersiz

CLSI M100-S19

Modifiye Hodge Testi

- *E.coli* ATCC 25922 0.5 McFarland sandart suspansiyonu 1:10 oranında sulandırılarak MHA plağına yayılır
- Merkeze ertapenem veya meropenem diski yerleştirilir
- Test edilecek bakteri, diskin kenarından dışarı doğru en az 20-25 mm. olacak şekilde çizgi şeklinde ekilir
- 16-20 saat inkübasyon sonrasında bakteri çizgisi ile disk inhibisyon zonu arasında üreme artışı olması (yonca yaprağı görünümü), "karbapenemaz üretimi pozitif" olarak değerlendirilir



(1) *K.pneumoniae*ATCC BAA 1705, pozitif kontrol
(2) *K. pneumoniae*ATCC BAA 1706, negatif kontrol
(3) Klinik izolat, pozitif sonuç

CLSI M100-S19

Modifiye Hodge Testi

- *Proteus* spp., *Providencia* spp. ve *Morganella* spp.de karbapenemaz dışı mekanizmalar nedeni ile imipenem MIC'leri yüksek olabilir
- Karbapenemaz saptanmasında imipenem MIC tarama testinin değeri belirlenememiştir
- İmipenem tarama testi tüm *Enterobacteriaceae* üyelerinde iyi sonuç vermemektedir
- Önerilen tarama ve doğrulama testleri özellikle KPC tipi karbapenemazların saptanmasında >%90 duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir
- Düşük oranda MBL üretiminin saptanmasındaki etkinliği bilinmiyor
- Nonfermentatif gram negatif basillerdeki karbapenemaz üretiminin saptanmasındaki etkinliği bilinmiyor

CLSI M100-S19

Modifiye Hodge Testi

Eksiklikler

- KPC ve MBL enzimlerini tanıyabilir, ancak ikisini ayırt edemez
- Yalancı pozitiflik olabilir
- Zayıf karbapenemaz üreten bakterilerde yorumlama güç olabilir

MBL tanısı için spesifik testler -İnhibitör temelli testler-

- Aktif bölgelerinde çinko iyonu bulunan MBL enzimlerinin metal şelatörleri ile inaktive olmaları esasına dayanır

MBL tanısı için spesifik testler
-İnhibitör temelli testler-

MBL inhibitörleri

- EDTA,
- Tiyol bileşikleri
  - 2-merkaptopropionik asit,
  - Sodyum merkaptoasetik asit
- Dipikolinik asit gibi

ve

Bir karbapenem

- İmipenem
- Meropenem

ve / veya

Bir oksiminosefalosporin

- Seftazidim

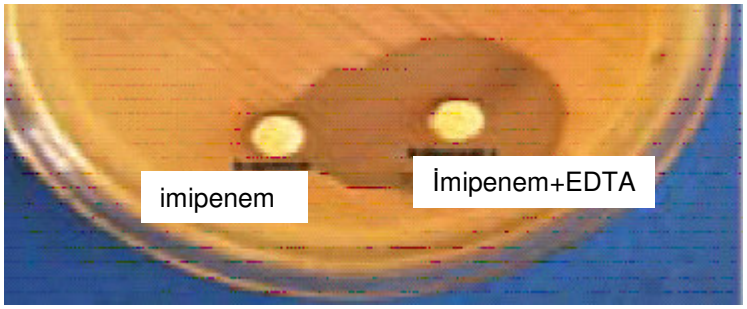
Ortama çinko eklenmesi testin duyarlılığını arttırır

MBL tanısı için spesifik testler -İnhibitör temelli testler-

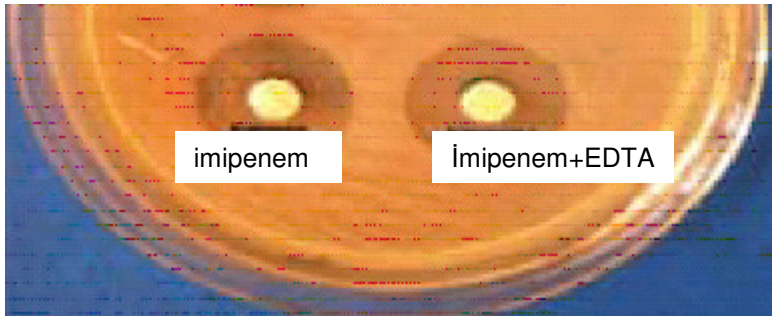
- İmipenem-EDTA kombine disk testi
- İmipenem-EDTA çift disk sinerji testi
- MBL etest

İmipenem-EDTA kombine disk testi

- MHA plağına 2 adet imipenem diski yerleştirilir
- Birinin üzerine 10µl EDTA solüsyonu eklenir
- 16-18 saat inkübasyon sonrasında EDTA'lı imipenem diskinin zon çapının, tek başına imipenem diskinin zon çapından 7 mm ve daha fazla olması "MBL pozitif" olarak değerlendirilir



MBL pozitif

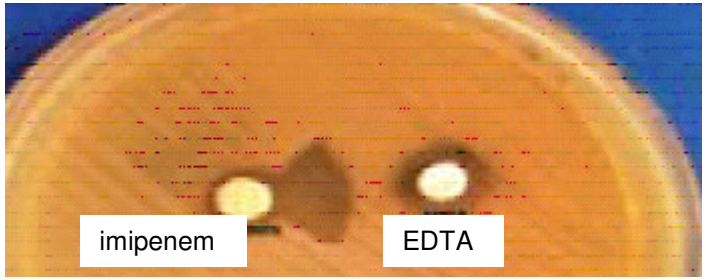


MBL negatif

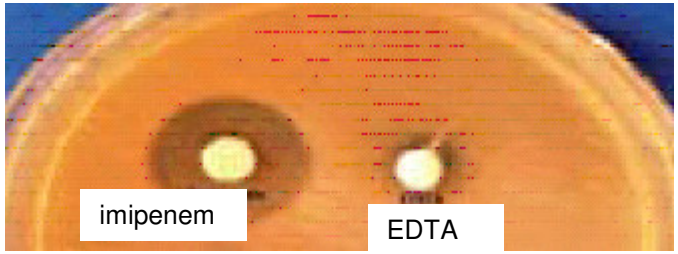
Behera B. ve ark. Indian J Med Microbiol 2008;26(3):233-37.

İmipenem-EDTA çift disk sinerji testi

- İmipenem diskinin yanına merkezden mekeze uzaklığı 20 mm olacak şekilde boş bir disk yerleştirilir
- Boş diske 10µl 0.5 M EDTA emdirilir
- 16-18 saat inkübasyon sonrasında imipenem diskinin EDTA diskine bakan tarafında zonda genişleme olması "MBL pozitif" olarak değerlendirilir



MBL pozitif



MBL negatif

Behera B. ve ark. Indian J Med Microbiol 2008;26(3):233-37.

MBL E-test

- Bir tarafında imipenem, diğer tarafında imipenem+ EDTA olan e-test stribi MHA plağına yerleştirilir
- 16-18 saat inkübasyon sonrasında IMP/ IMP-EDTA MIC oranı >8 veya >3 $\log_2$ dilüsyon olması MBL pozitifliğini gösterir

Behera B. ve ark. Indian J Med Microbiol 2008;26(3):233-37.

İnhibitör temelli testlerin eksiklikleri

- MBL inhibitörleri nonspesifik etki gösterir
  - Diğer bazı süreçleri de etkiler
    - *P.aeruginosa* dış membran geçirgenliği vb.

↓

Yalancı pozitiflik görülebilir

- Sonuçlar dikkatli yorumlanmalı ve referans yöntemle (spektrofotometrik ve moleküler yöntemler) doğrulanmalı

KPC tanısına yönelik testler

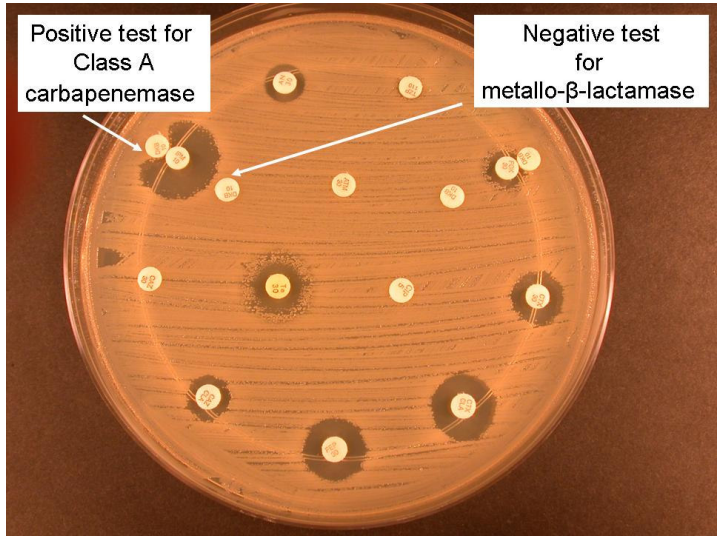
- Tris/EDTA disk testi
- İndirekt yöntem
- Boronik asit testi

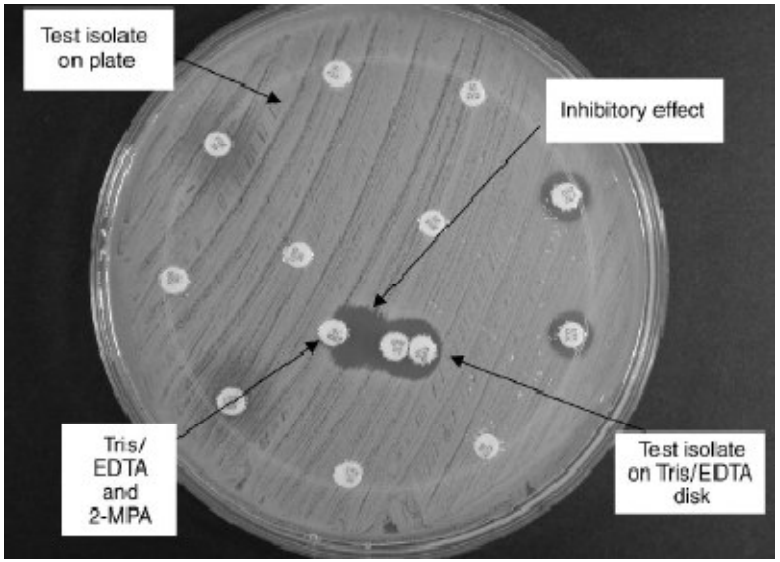
KPC tanısına yönelik testler

<u>Tris/EDTA disk testi</u>

- İmipenem diskinin yanına, üzerine bakteri inoküle edilmiş tris/EDTA diski konur
- Zonda çentik olması pozitif sonuç

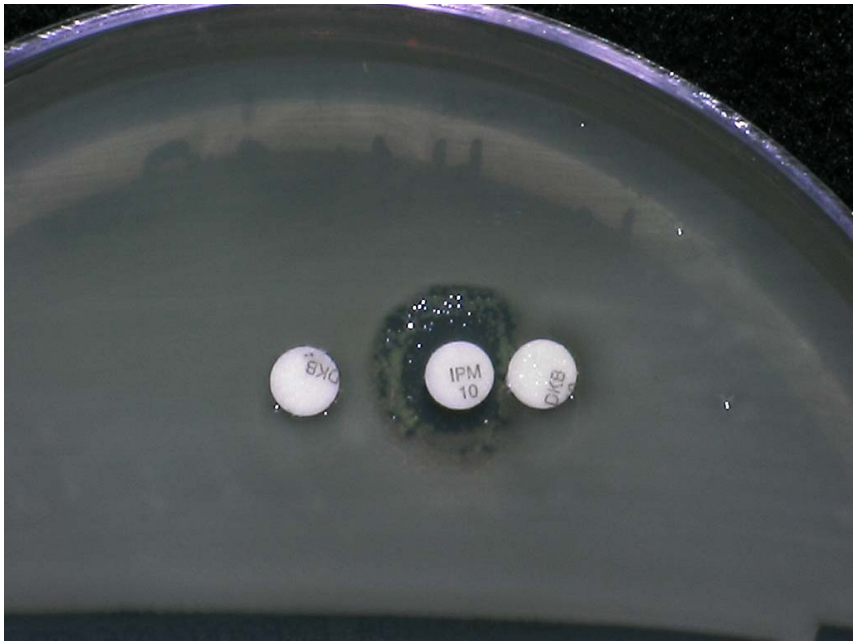
- Bakteri içermeyen ikinci bir tris/EDTA diski, imipenem diskinin uzağına konarak MBL varlığı da aynı anda test edilebilir



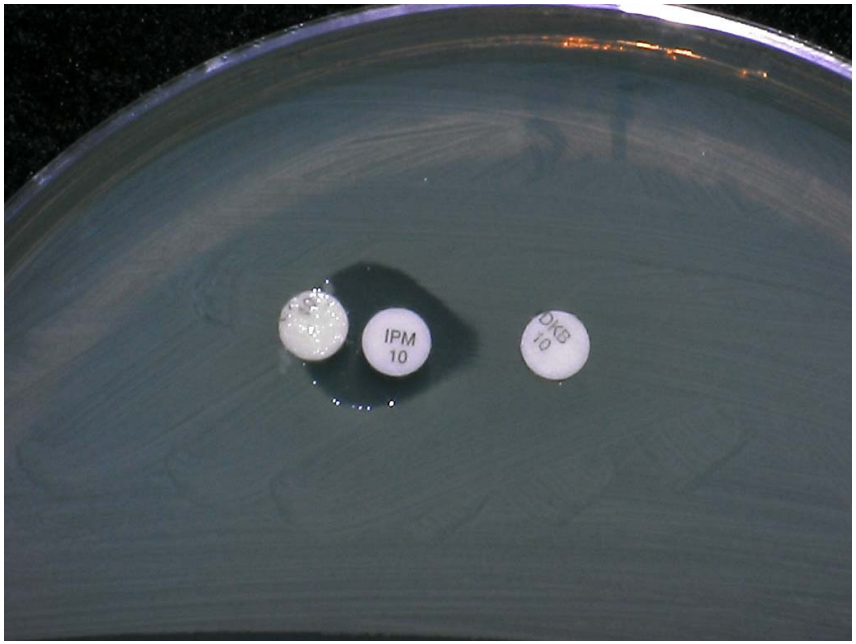


Moland ES. ve ark. Clin Microbiol Newslatter 2008;30(11):79-85.

Tris/EDTA disk testi



Sınıf A karbapenemaz (+)



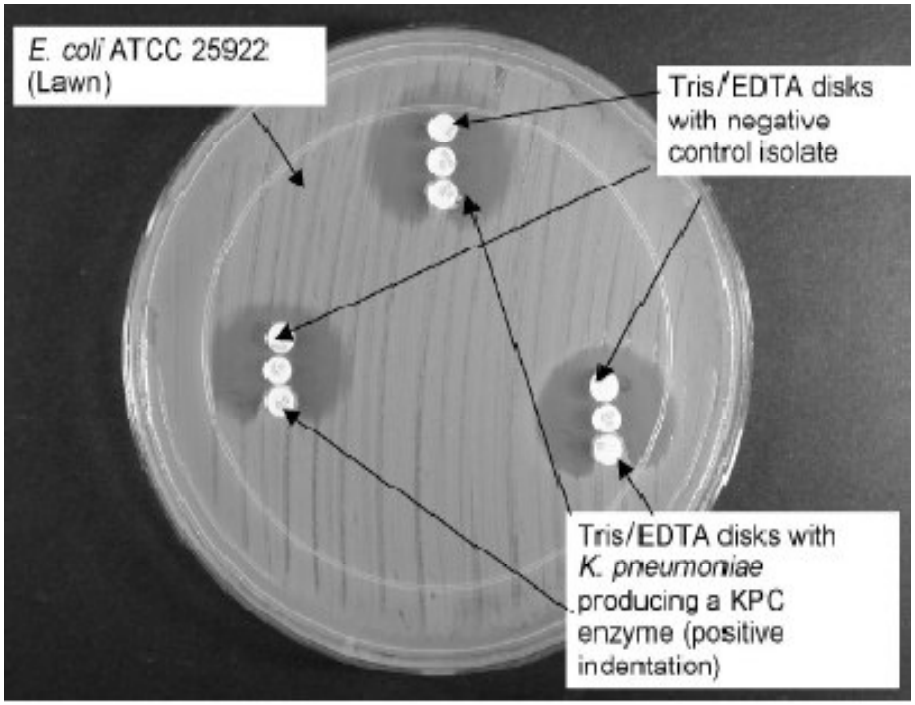
MBL (+)

Schreckenberger PC.

KPC tanısına yönelik testler

<u>İndirekt yöntem</u>

- *E.coli* ATCC 25922 plağa yayılır
- Karbapenem diskinin yanına, üzerine bakteri inoküle edilmiş tris/EDTA diski konur
- Zonda çentiklenme olması pozitif sonuç



Moland ES. ve ark. Clin Microbiol Newslatter 2008;30(11):79-85.

KPC tanısına yönelik testler

<u>Boronik asit testi</u>

- Boronik asidin inhibitör etkisine dayalı testlerdir
- İmipenem veya meropenem zon çapı ile boronik asitli karbapenem diskinin zon çapı arasında ≥ 4-7 mm fark olması

↓

Sınıf A karbapenemaz pozitif

Gram negatif bakterilerde aminoglikozid direnci

Aminoglikozidler

- Gram negatif bakterilerde aminoglikozid direnci genellikle aminoglikozidleri değiştiren enzimler aracılığı ile olmaktadır:
  - Aminoglikozid fosfotransferaz (APH)
  - Aminoglikozid asetiltransferaz (AAC)
  - Aminoglikozid nükleotiditransferaz (ANT)

Aminoglikozidler

- Bir aminoglikozid, birden fazla bölgede değişikliğe uğrayabilir
- Bir enzim, bir çok aminoglikozidi değişikliğe uğratabilir
- Aynı bakteride enzimlerin bir kaçı bir arada bulunabilir
  - Direnç mekanizmasının yorumlanmasını güçleştirir

Enterobacteriaecea ailesinde aminoglikozid direnç fenotipleri ve direnç mekanizmaları

GEN	NET	TOB	AMK	KAN	NEO	Yorum	Sıklık
S	S	S	S	S	S	Klasik	Sık
R	S	S	S	S	S	AAC(3)I	Nadir
R	R	R	S	R	S	AAC(3)II	Nadir
R	R	R	S	r*	R	AAC(3)IV	Nadir
S/r**	R	R	R	R	R	AAC(6’)	Nadir
R	S	R	S	R	S	ANT(2’)	Nadir
S	S	S	S	R	R	APH(3’)	Sık
r/R***	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	impermeabilite	Nadir

*Zon çapında azalma olmasına karşın duyarlı sınırlarda
**GEN bir komponenti aktif, ama in vivo kullanımı önerilmiyor.
***Tüm aminoglikozidlere düşük düzey direnç

Livermore DM, Winstanley TG, Shanon KP. Interpretative reading:recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. J Antimicrob Chemother 2001;48(Suppl 1):87-102.

Klebsiella spp.de aminoglikozid direnç fenotipleri ve direnç mekanizmaları

GEN	NET	TOB	AMK	KAN	NEO	Yorum	Sıklık
S	S	S	S	S	S	Klasik	Sık
R	S	S	S	S	S	AAC(3)I	Nadir
R	R	R	S	r	S	AAC(3)II	Seyrek/nadir
S/r	R	R	R	R	R	AAC(6')	Nadir
R	S	S	S	R	S	ANT(2')	Seyrek/nadir
S	S	S	S	R	R	APH(3')	Sık?
r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	İmpermeabilite	Nadir

Livermore DM, Winstanley TG, Shanon KP. Interpretative reading:recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. J Antimicrob Chemother 2001;48(Suppl 1):87-102.

Serratia spp.de aminoglikozid direnç fenotipleri ve direnç mekanizmaları

GEN	NET	TOB	AMK	KAN	NEO	Yorum	Sıklık
S	S	S	S	S	S	Klasik	Sık
R	S	S	S	S	S	AAC(3)I	Nadir
R	R	R	S	r	S	AAC(3)III	Nadir
S/r	R	R	R	R	R	AAC(6’)	Sık
R	S	R	S	R	S	ANT(2’)	Nadir
S	S	S	S	R	R	APH(3’)	Nadir
r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	impermeabilite	Nadir

Livermore DM, Winstanley TG, Shanon KP. Interpretative reading:recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. J Antimicrob Chemother 2001;48(Suppl 1):87-102.

Providencia stuartii'de aminoglikozid direnç fenotipleri ve direnç mekanizmaları

GEN	NET	TOB	AMK	KAN	NEO	Yorum	Sıklık
R	r	R	S	S	R	AAC(2')	Klasik
R	R	R	S	S	R	AAC(2')	Sık

Livermore DM, Winstanley TG, Shanon KP. Interpretative reading:recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. J Antimicrob Chemother 2001;48(Suppl 1):87-102.

*P.aeruginosa'*da aminoglikozid direnç fenotipleri ve direnç mekanizmaları

GEN	NET	TOB	AMK	KAN	NEO	Yorum	Sıklık
S	S	S	S	R	R	Klasik	Sık
R	S	S	S	R	R	AAC(3)I	Nadir
R	S	R	S	R	R	AAC(3)III	Nadir
S/r	R	R	R	R	R	AAC(6')	Nadir
R	R	R	S	R	R	AAC(6')II	Nadir
R	S	R	S	R	R	ANT(2')	Nadir
S	S	S	S	R	R	APH(3'	Sık
r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	impermeabilite	Nadir

Livermore DM, Winstanley TG, Shanon KP. Interpretative reading:recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. J Antimicrob Chemother 2001;48(Suppl 1):87-102.