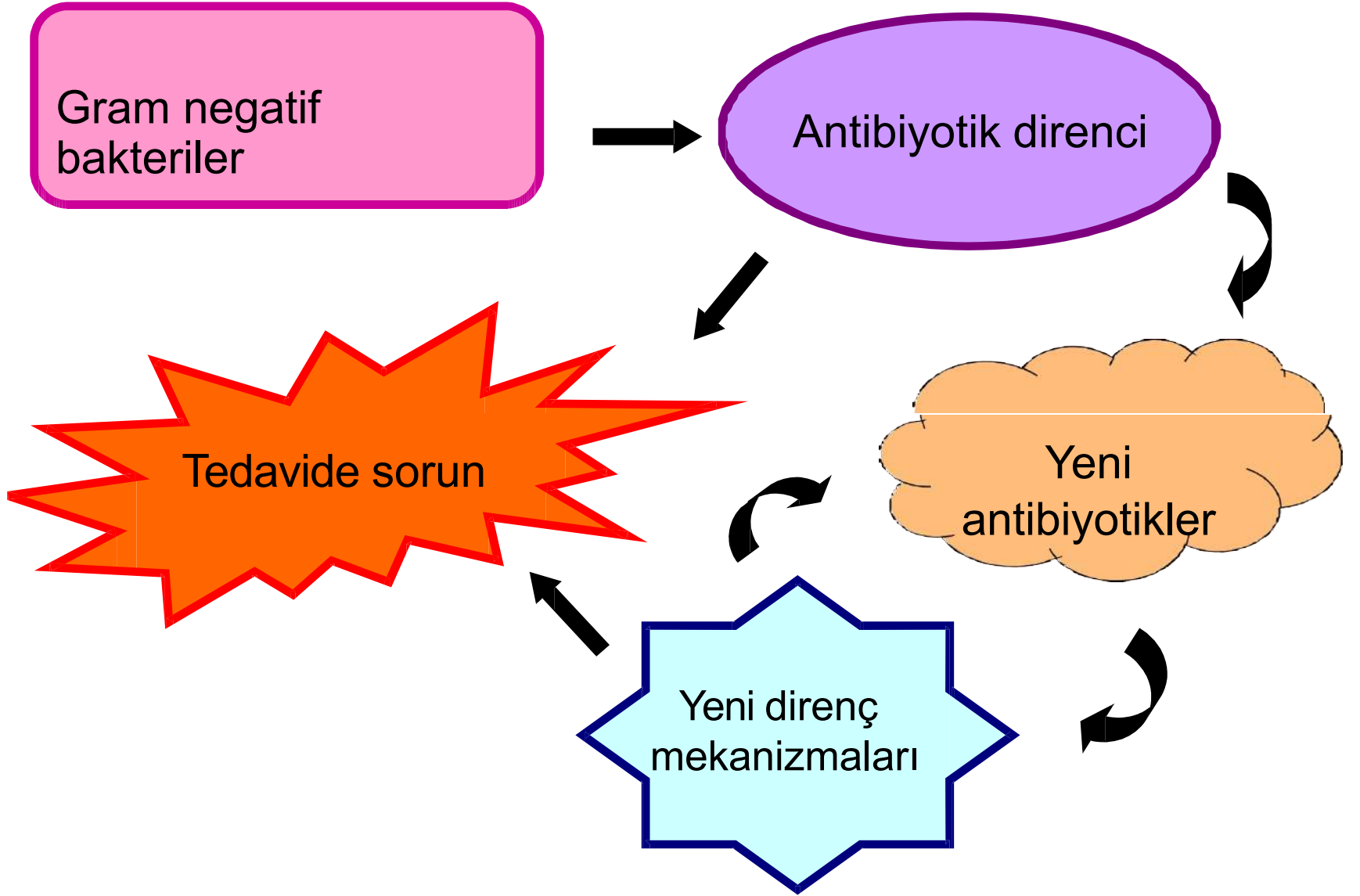


Dirençli Gram-Negatif Bakteri Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojik Tanısı

Doç. Dr. Yeliz Tanrıverdi Çaycı

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı



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

Direnç mekanizmalarının
bilinmesi

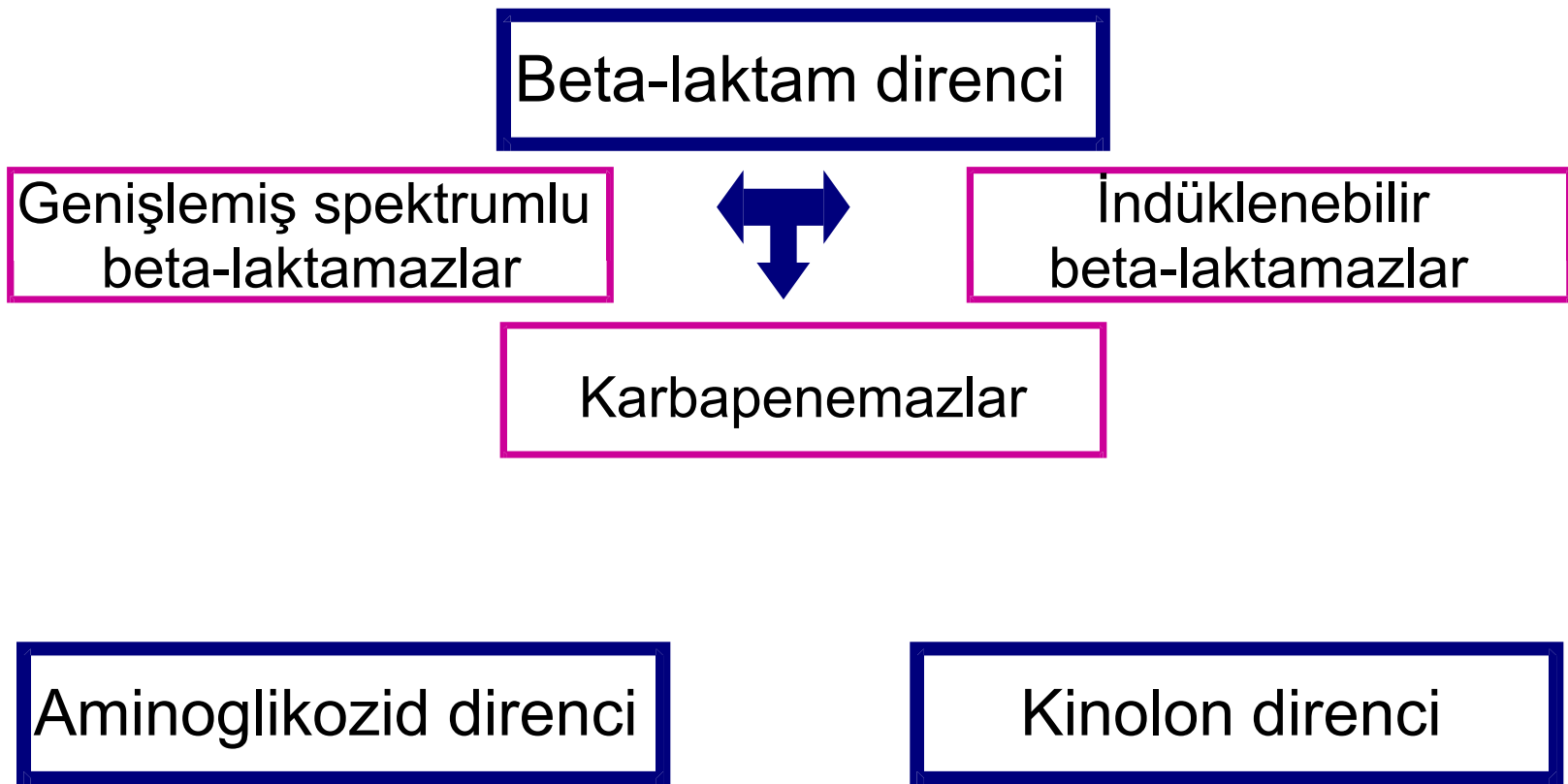
İndikatör
antibiyotikler

Direnç mekanizmalarının
belirlenip, uygun tedaviye
başlanması

Gram negatif bakterilerin doğal direnç durumu

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

Gram negatif bakterilerde direnç



Yöntemler

- **Fenotipik**
 - MİK belirleme
 - Disk diffüzyon
 - Otomatize sistemler
- **Genotipik**
 - Direnç geni veya genin ürünü
- **Uzman kuralları ("Expert rules")**

Rehberler

- CLSI: ABD
- EUCAST: Avrupa
- BSAC: İngiltere
- SRGA: İsveç
- NWGA: Norveç
- CRG: Hollanda
- DIN: Almanya

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters

Version 9.0, valid from 2019-01-01

This document should be cited as "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>."

Content	Page	Additional information
Notes	1	
Guidance on reading EUCAST Breakpoint Tables	3	
Information on technical uncertainty	4	
Changes	5	
Enterobacterales	10	
<i>Pseudomonas</i> spp.	15	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	19	Link to Guidance Document on <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Burkholderia cepacia</i> complex	-	Link to Guidance Document on <i>Burkholderia cepacia</i> complex
<i>Acinetobacter</i> spp.	20	
<i>Staphylococcus</i> spp.	24	
<i>Enterococcus</i> spp.	29	
Streptococcus groups A, B, C and G	34	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	39	
Viridans group streptococci	45	
<i>Haemophilus influenzae</i>	50	
<i>Moraxella catarrhalis</i>	55	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	59	
<i>Neisseria meningitidis</i>	63	
Gram-positive anaerobes	67	
<i>Clostridioides difficile</i>	72	
Gram-negative anaerobes	73	
<i>Helicobacter pylori</i>	77	
<i>Listeria monocytogenes</i>	78	
<i>Pasteurella multocida</i>	79	
<i>Campylobacter jejuni</i> and <i>coli</i>	81	
<i>Corynebacterium</i> spp.	82	
<i>Aerococcus sanguinicola</i> and <i>urinae</i>	84	
<i>Kingella kingae</i>	86	
<i>Aeromonas</i> spp.	88	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	90	
Topical agents	91	Link to Guidance Document on Topical Agents
PK-PD (Non-species related) breakpoints	92	
Dosages	96	
Expert Rules	-	Link to EUCAST Expert Rules
Detection of Resistance Mechanisms	-	Link to EUCAST Guidelines on Detection of Resistance Mechanisms
Antimicrobial susceptibility tests on groups of organisms or agents for which there are no EUCAST breakpoints	-	Link to Guidance Document on how to test and interpret results when there are no breakpoints

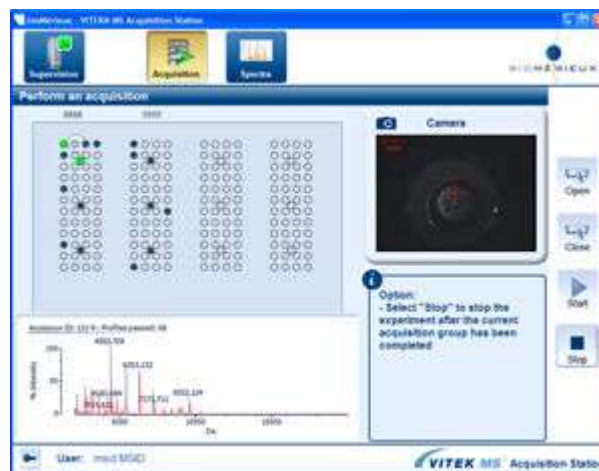
- Vitek



- BD Phoenix



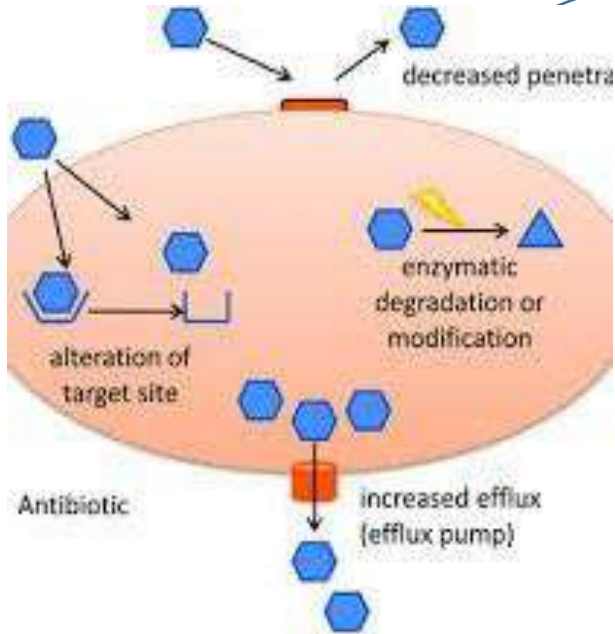
- Vitek MS



- Bruker Microflex LT MS



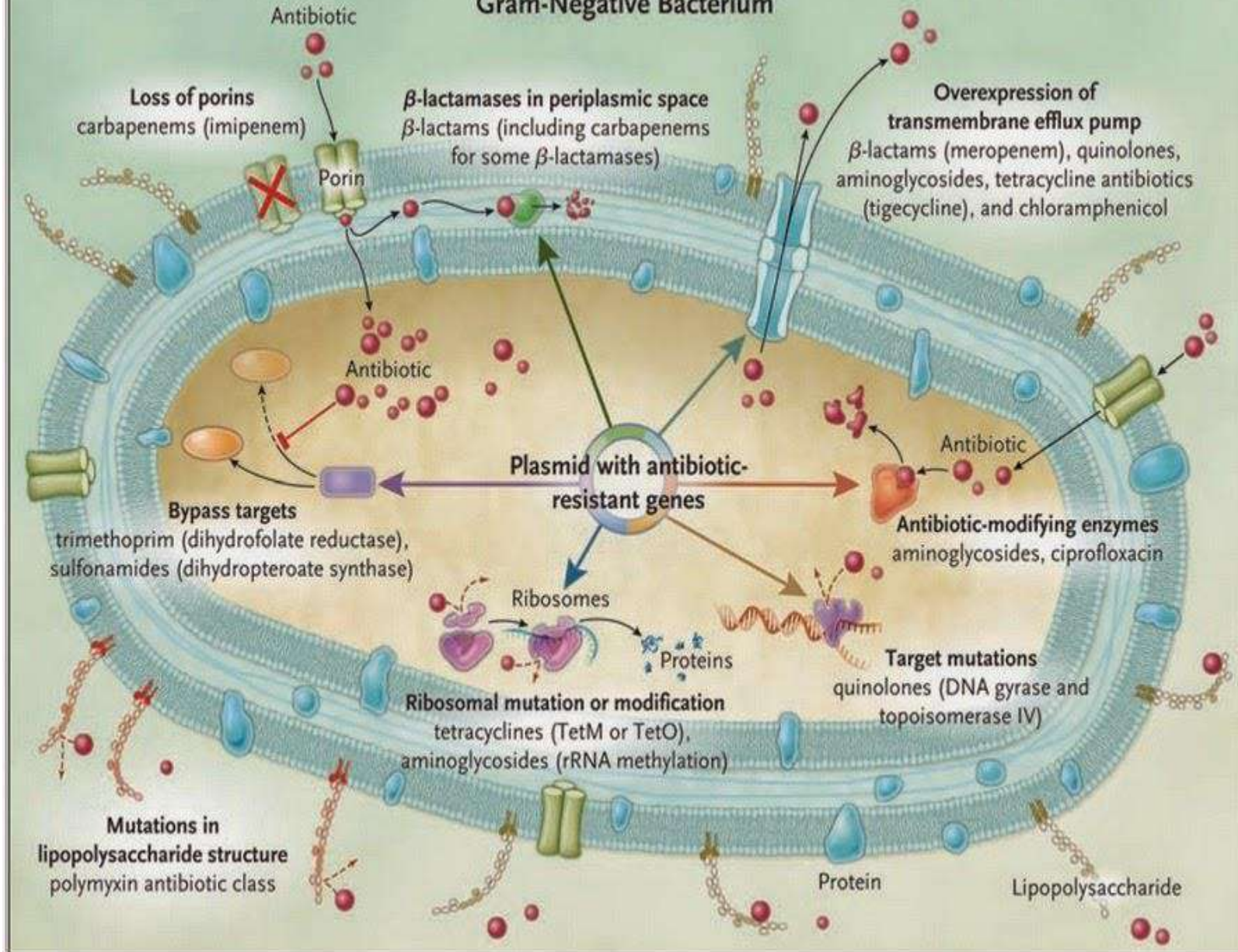
Gram negatif bakterilerde direnç



Direnç mekanizmaları

- Hedefte değişiklik
- Azalmış penentrasyon
- Enzimatik inaktivasyon
- Artmış dışa atım (efluks)

Gram-Negative Bacterium



Beta laktamazların sınıflandırılması

Fonksiyonel Sınıflama	Ambler Sınıflaması	Bush Sınıflaması	Örnekler
Serin beta laktamazlar	Sınıf A penisilinaz	2a, 2b, 2c	Geniş spektrumlu beta laktamazlar, TEM-1, TEM-2, SHV-1
		2be	Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL), TEM ve SHV
			Diğerleri BES-1, GES/IBC, PER-1, PER-2, SFO-1, TLA-1, VEB-1/2
		2br	TEM (TEM-30, TEM-31)
		2e	CTX
Serin beta laktamazlar	Sınıf A penisilinaz	2f	Karbapenemazlar: KPC-1, KPC-2, KPC-3, GES-1, GES-2
	Sınıf B Metallobetalaktamazlar	3a, 3b, 3c	Karbapenemazlar: IMP, VIM, NDM, SPM, SIM, GIM
		1	AmpC tipi: AAC-1, ACT-1, CFE-1, CMY, DHA-1, DHA-2, FOX, LAT, MIR-1, MOX-1, MOX-2
		2d	OXA'ların çoğu Diğer: OXA-23, OXA-27, OXA-40, OXA-48
			AVS-1

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar

- Penisilinler, 1-4. Kuşak sefalosporinler, monobaktamları hidrolize eden enzimlerdir (sefamisinler ve karbapenemler etkilenmez)
- ÇOĞU Beta-laktamaz inhibitörleri ile inaktive olurlar (Klavulanat/tazobaktam>sulbaktam)

GSBL Tanımlanması

İki basamaklıdır:

- 1 **Tarama:** İndikatör sefalosporinlerle (oksimino sefalosporinler; seftazidim, sefotaksim, sefpodoksim) duyarlılık testi
- 2 **Doğrulama:** Taramada şüpheli olanlara uygulanır
 - Beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlılık temellidir

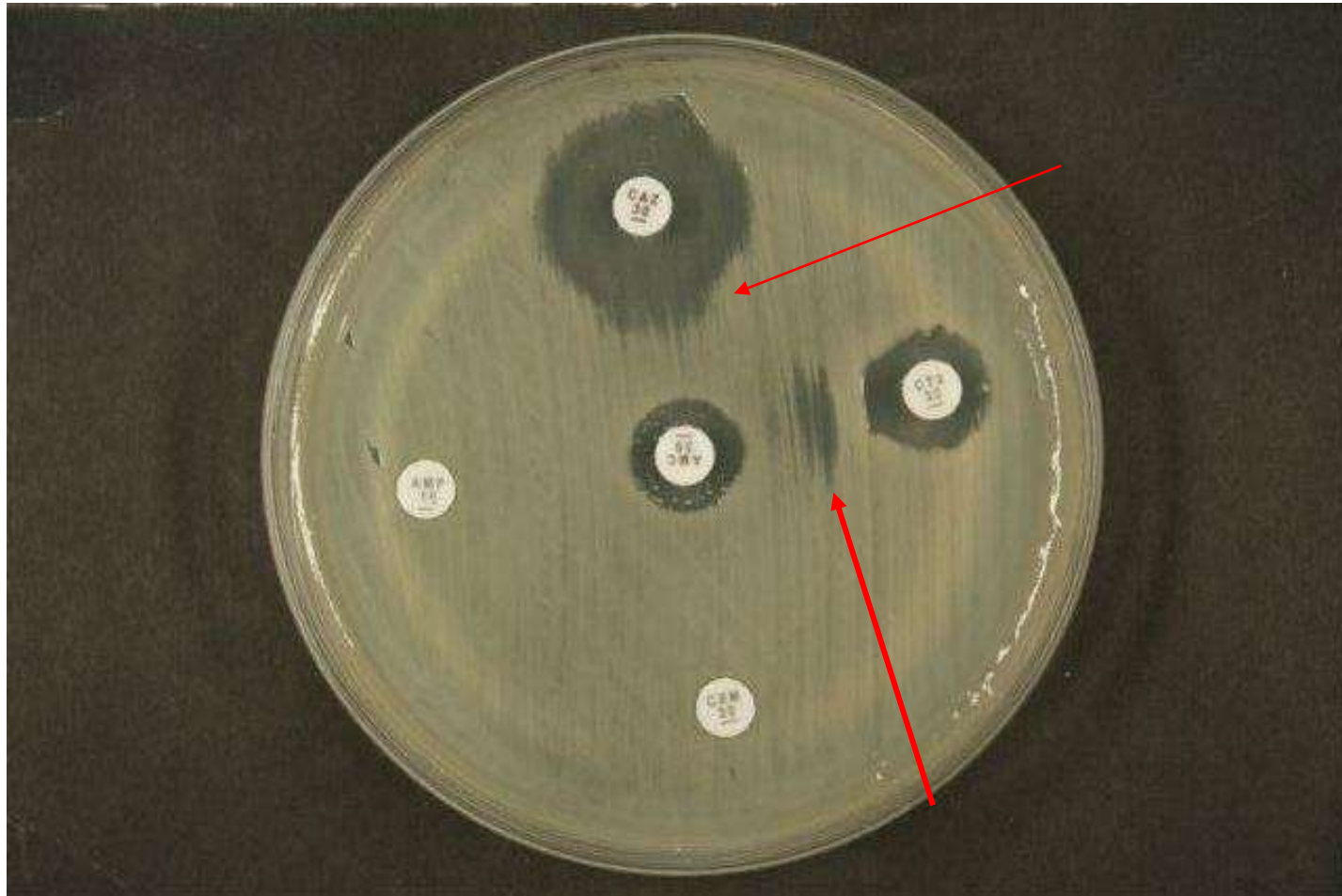
Table 2. ESBL confirmation methods for Enterobacteriaceae that are positive in the ESBL screening test (see Table 1). Group 1 Enterobacteriaceae (see Figure 1).

Method	Antimicrobial agent (disk content)	ESBL confirmation is positive if
ESBL gradient test	Cefotaxime +/- clavulanic acid	MIC ratio ≥ 8 or deformed ellipse present
	Ceftazidime +/- clavulanic acid	MIC ratio ≥ 8 or deformed ellipse present
Combination disk diffusion test (CDT)	Cefotaxime (30 μ g) +/- clavulanic acid (10 μ g)	≥ 5 mm increase in inhibition zone
	Ceftazidime (30 μ g) +/- clavulanic acid (10 μ g)	≥ 5 mm increase in inhibition zone
Broth microdilution	Cefotaxime +/- clavulanic acid (4 mg/L)	MIC ratio ≥ 8
	Ceftazidime +/- clavulanic acid (4 mg/L)	MIC ratio ≥ 8
	Cefepime +/- clavulanic acid (4 mg/L)	MIC ratio ≥ 8
Double disk synergy test (DDST)	Cefotaxime, ceftazidime and cefepime	Expansion of indicator cephalosporin inhibition zone towards amoxicillin-clavulanic acid disk

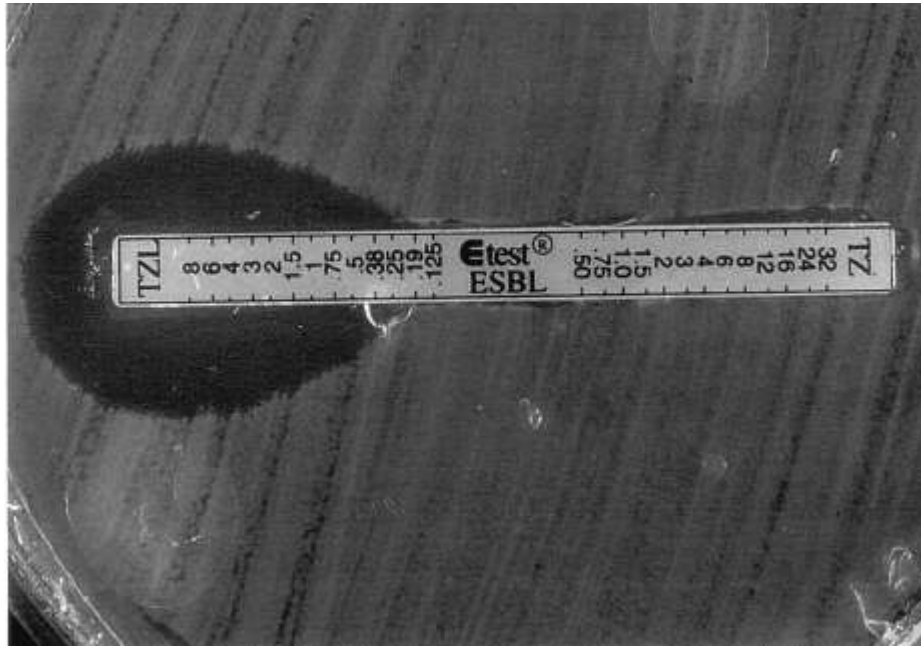
Kombinasyon diskleri: CAZ+ klav CTX+ Klav



Çift disk sinerji



GSBL için E Test



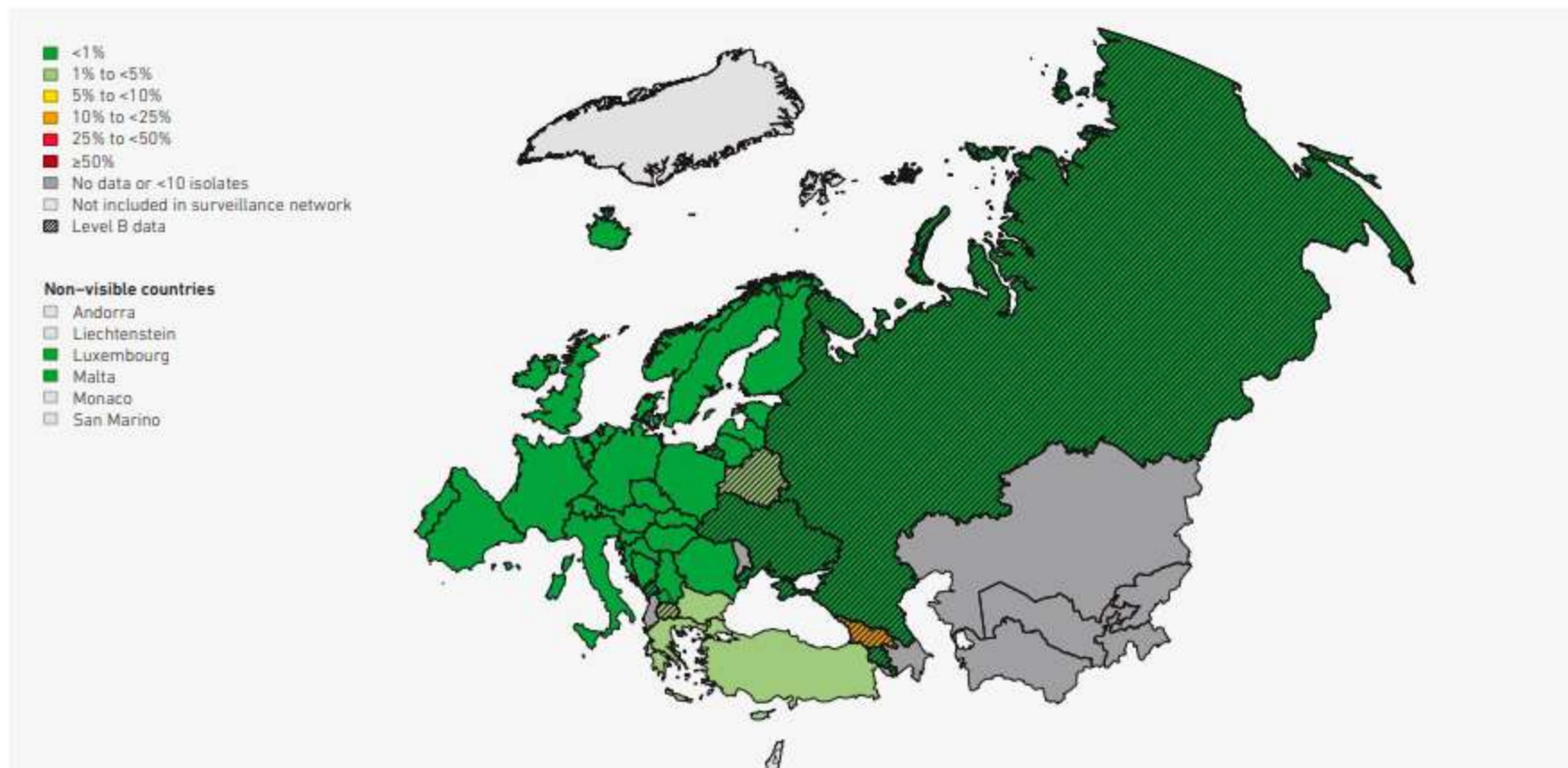


Fig. 2.3 Percentage of invasive *E. coli* isolates resistant to carbapenems in the European Region (EARS-Net and CAESAR), by country or area, 2018

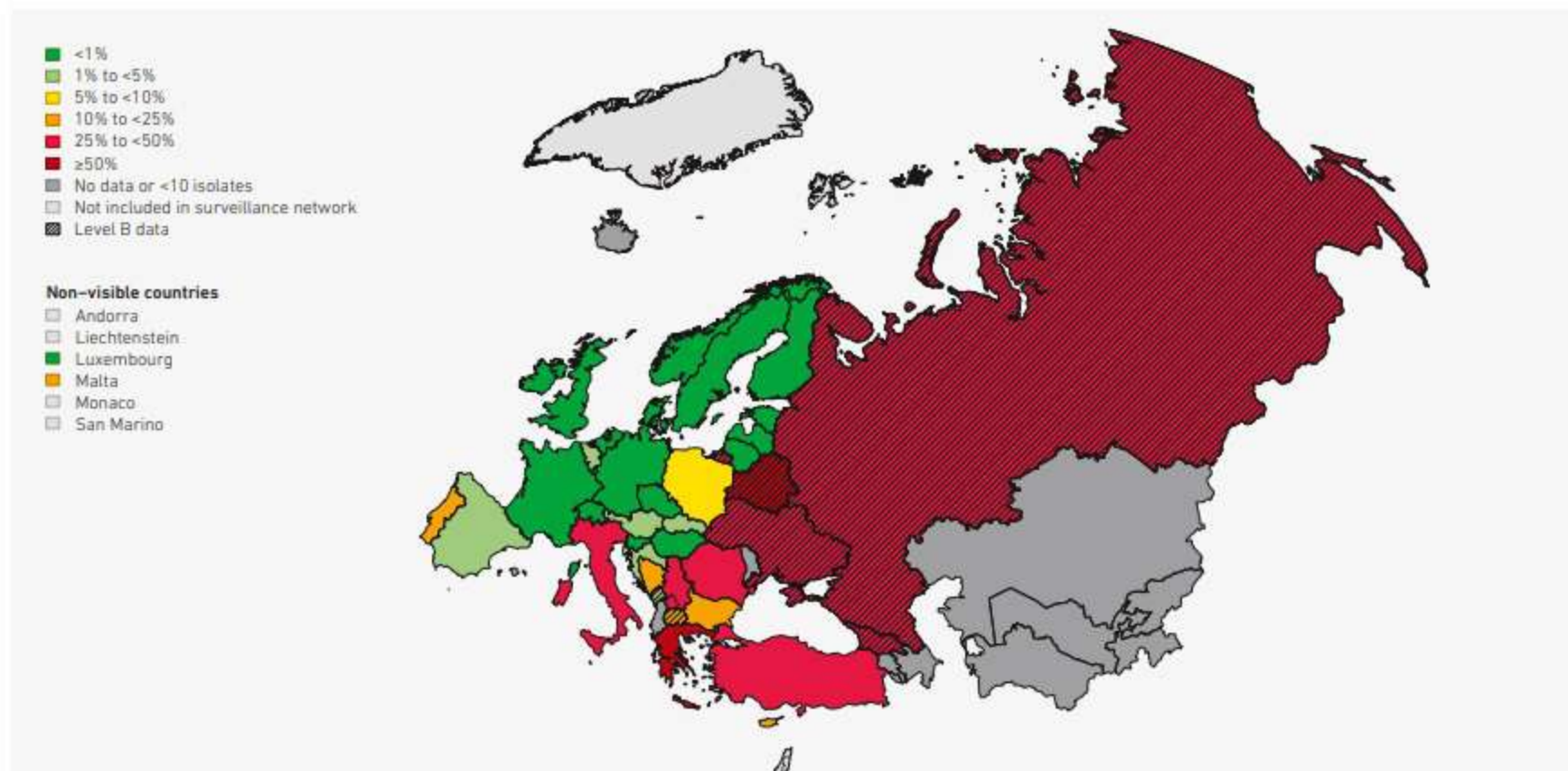


Fig. 2.5 Percentage of invasive *K. pneumoniae* isolates resistant to carbapenems in the European Region (EARS-Net and CAESAR), by country or area, 2018

Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*

Laurent Poirel,¹ Claire Héritier,¹ Venus Tolün,² and Patrice Nordmann^{1*}

¹Service de Bactériologie-Virologie, Université Paris XI, Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique/Hôpitaux de Paris, Faculté de Médecine Paris-Sud, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France, and ²Department of Microbiology, Istanbul Medical Faculty, Caba, Istanbul, Turkey

Received 20 March 2003/Returned for modification 7 July 2003/Accepted 22 September 2003

Klebsiella pneumoniae strain 11978 was isolated in Turkey in 2001 and was found to be resistant to all β -lactams, including carbapenems. Cloning and expression in *Escherichia coli* identified five β -lactamases, including two novel oxacillinases. The β -lactamase OXA-48 hydrolyzed imipenem at a high level and was remotely related (less than 46% amino acid identity) to the other oxacillinases. It hydrolyzed penicillins and imipenem but not expanded-spectrum cephalosporins. The *bla*_{OXA-48} gene was plasmid encoded and not associated with an integron, in contrast to most of the oxacillinase genes. An insertion sequence, IS1999, was found immediately upstream of *bla*_{OXA-48}. Another plasmid that encoded a second oxacillinase gene, *bla*_{OXA-47}, located inside a class 1 integron was identified in *K. pneumoniae* 11978. OXA-47 had a narrow spectrum of hydrolysis activity and did not hydrolyze ceftazidime or imipenem, as is found for the β -lactamase (OXA-1) to which it is related. In addition, β -lactamases TEM-1 and SHV-2a were expressed from the same *K. pneumoniae* isolate. Analysis of the outer membrane proteins of this isolate revealed that it lacked a porin of ca. 36 kDa. Thus, the high-level resistance to β -lactams of this clinical isolate resulted from peculiar β -lactamases and modification of outer membrane proteins.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy

NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Now in Turkey

Laurent Poirel, Melda Özdamar, Alain A. Ocampo-Sosa, Salih Türkoglu, Ufuk Guney Ozer and Patrice Nordmann
Antimicrob. Agents Chemother. 2012, 56(5):2784. DOI: 10.1128/AAC.00150-12.
 Published Ahead of Print 5 March 2012.

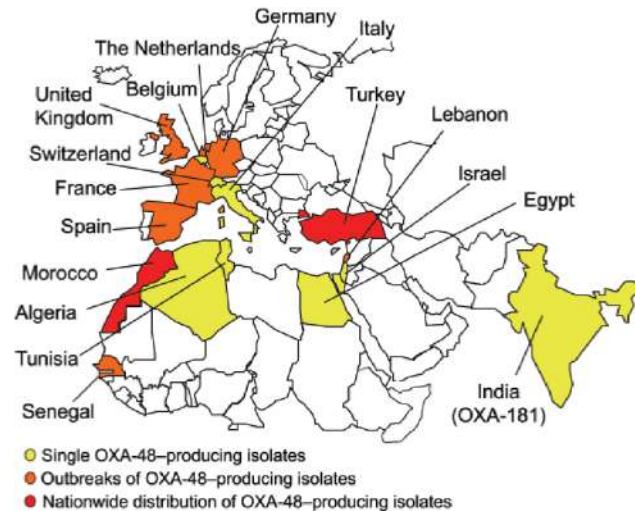


Figure 5. Geographic distribution of oxacillinase-48 (OXA-48) type producers.

Table 4

Rates of carbapenem-resistant *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. by country. The number of laboratories per country is given in brackets after the country name. The total number of laboratories is less than 165 because some of the laboratories did not provide prevalence data for all or some of the four groups of pathogens.

Country	CR <i>E. coli</i> (%)	CR <i>K. pneumoniae</i> (%)	CR <i>P. aeruginosa</i> (%)	CR <i>Acinetobacter</i> spp.(%)
Albania (2)	7.02	28.72	15.18	37.50
Bosnia and Herzegovina (4)	0.04	0.25	11.88	80.38
Bulgaria (8)	0.77	6.40	18.31	53.50
Croatia (6)	0.10	9.29	19.64	82.08
Czech Republic (5)	0.02	0.95	11.07	2.46
France (2)	0.51	4.11	30.12	11.19
Germany (9)	0.09	0.49	11.63	6.14
Greece (20)	1.66	33.39	29.52	65.90
Hungary (8)	0.00	0.93	24.51	51.65
Israel (7)	0.14	2.57	11.82	43.06
Italy (22)	0.29	17.14	15.80	47.65
Kosovo (1)	0.00	0.00	17.20	79.08
Poland (1)	0.00	0.23	11.81	30.56
Romania (9)	0.22	16.22	38.23	66.20
Serbia (13)	0.57	10.53	22.71	74.68
Spain (29)	0.13	4.90	14.02	24.04
Switzerland (1)	0.02	0.48	0.00	3.23
Turkey (12)	2.98	20.53	35.98	81.50

2018	Karbapenem Duyarlı	Karbapenem Dirençli
Acinetobacter sp.	18,81	81,19
Pseudomonas sp.	62,75	37,25
Escherichia coli	95,08	4,92
Klebsiella sp.	73,72	26,28

2019	Karbapenem Duyarlı	Karbapenem Dirençli
Acinetobacter sp.	18,32	81,68
Pseudomonas sp.	63,92	36,08
Escherichia coli	94,14	5,86
Klebsiella sp.	69,93	30,07

Karbapenemazlar

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

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

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

Karbapenemaz üreten bakterilerin saptanması

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

Bakteri türüne göre kabapenemazların dağılımı

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

^a Bazı bölgelerde endemik

Fenotipik yöntemler

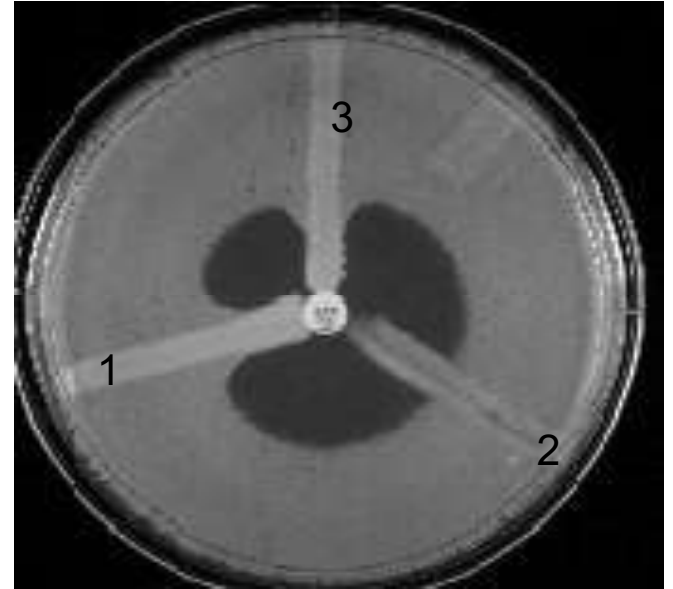
- Modifiye Hodge Testi
- Karbapenem İnaktivasyon metodu
- Kolorimetrik testler
- Çift disk sinerji testi
- Kombine disk difüzyon yöntemi
- Gradyent difüzyon Yöntemi

Genotipik Yöntemler

- Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- DNA probları
- Klonlama ve sekans analizi

Modifiye Hodge Testi

- *E.coli* ATCC 25922 0.5 McFarland standart 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

Modifiye Hodge Testi

- CLSI 2010 ✓
- CLSI 2018 ✗
 - mKIM ✓
 - CARBA NP ✓



- GSBL ve Amp C üretenlerde - porin mut. ve/veya efluks yanlış pozitif sonuç
- SME, OXA, bazı metallobetalaktamazlarda (NDM) yanlış negatif
- Düşük oranda MBL üretiminin saptanmasındaki etkinliği bilinmiyor

Karbapenem İnaktivasyon Metodu (KİM)

- Bakteri süspansiyonuna meropenem diski atılıp iki saat inkübe
- İki saatin sonunda süspansiyon içindeki disk alınır
- Karbapenem duyarlı standart suşun (*E.coli* ATCC 25922) yayıldığı MHA plağına konulur
- **Altı saatlik inkübasyon** sonrasında değerlendirildi
- Normalde *E.coli* suşunun etrafında inhibisyon zonu oluşması beklenirken, karbapenemaz varlığında
 - inaktive olan meropenem diski *E.coli* suşunda inhibisyon zonu oluşturmadı. Bu durumda KİM pozitif kabul edildi

RESEARCH ARTICLE

The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram-Negative Rods

Kim van der Zwaluw*, Angela de Haan, Gerlinde N. Pluister, Hester J. Bootsma, Albert J. de Neeling, Leo M. Schouls

Centre for Infectious Diseases Research, Diagnostics and Screening (IDS), National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands



- Modifiye KİM (mKİM)
 - Karbapenem dirençli *P. aeruginosa*
 - İnokulum miktarı artırılmış
- eKİM
 - EDTA eklenerek
 - MBL ayırımı
- KİMTriS
 - Tris-HCL tamponu
 - *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* spp.
- sKİM
 - İmipenem diski doğrudan koloniye sürülür

Carba NP testi

- Test biyokimyasal esasa dayanmakta
- Lizis edilmiş bakterilerin ortama saldığı enzimlerin pH değışimi incelenmekte
 - Fenol red
- Aynı gün sonuç
- Bir çok çalışma testi oldukça duyarlı ve spesifik bulmuş
 - EUCAST tarafından önerilmekte

Rapid Detection of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*

Patrice Nordmann, Laurent Poirel, and Laurent Dortet

To rapidly identify carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae*, we developed the Carba NP test. The test uses isolated bacterial colonies and is based on in vitro hydrolysis of a carbapenem, imipenem. It was 100% sensitive and specific compared with molecular-based techniques. This rapid (<2 hours), inexpensive technique may be implemented in any laboratory.

not confer obvious resistance levels to carbapenems. There is a need for laboratories to search for carbapenemase producers (9). Phenotype-based techniques for identifying in vitro production of carbapenemase, such as the modified Hodge test, are not highly sensitive and specific (2,8,10). Detection of metallo- β -lactamase producers (IMP, VIM, NDM) and of KPC producers may be based on the inhibitory properties of several molecules but requires additional expertise and time (usually an extra 24–48 hours) (2,8,11,12). Furthermore, no inhibitors are available for detecting OXA-48-type producers that are spreading rapidly, at least in northern Africa, the Middle East, and Europe (2). Molecular detection of carbapenemase genes remains costly and requires substantial expertise. Both the phenotype-based techniques and molecular tests are time-consuming (at least 12–24 hours) and are poorly adapted to the clinical need for isolating patients rapidly to prevent nosocomial outbreaks.

We developed a novel test, described here, based on



RAPIDEC
CARBA NP

Carba NP testi

- *A. baumannii* için önerilmemekte  CarbAcineto NP
- OXA-48 enzim üretenlerde ve mukoid suşlarda yalancı negatif sonuçlar
- Zayıf hidrolitik aktivitesi olanlarda renk değişimi çok az olabilir-yanlış negatif sonuç

Blue carba

- pH indikatörü
- Bromtimol mavisi



LETTER TO THE EDITOR

Blue-Carba, an Easy Biochemical Test for Detection of Diverse Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures

J. Pires, A. Novais, L. Peixe

REQUIMTE, Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal

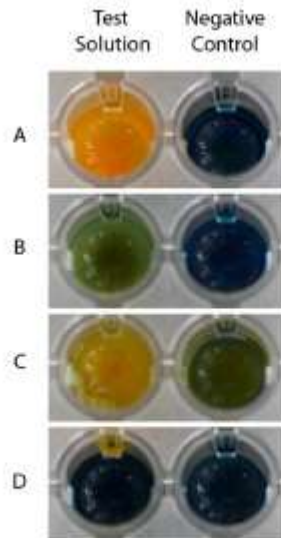
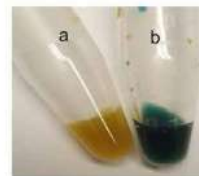
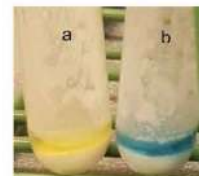


FIG 1 Representative results of the Blue-Carba test obtained from carbapenemase producers (A, B, and C) and non-carbapenemase producers (D) with test solution (left) and negative control solutions (right). (A) NDM-1-producing *E. coli*. (B) OXA-23-producing *A. baumannii*. (C) OXA-48-producing *K. pneumoniae*. (D) *E. coli* ATCC 25922. The images were taken after 2 hours of incubation.



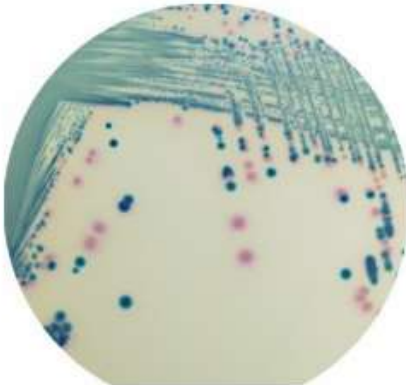
Manual Blue Carba



Rapid Carb Blue Kit

Kromojenik besiyeri

CHROMagar™ mSuperCARBA™

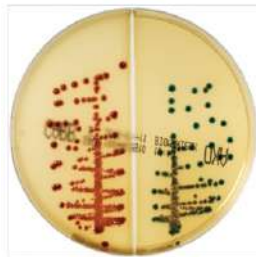


For Detection and isolation of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE)

Typical Appearance of microorganisms

CPE *E. coli* → dark pink to reddish
 CPE Coliforms → metallic blue
 CPO *Pseudomonas* → translucent, +/- natural pigmentation cream to green
 CPO *Acinetobacter* → Cream
 Other Gram negative CPO → colourless, natural pigmentation
 Non-CPO *E. coli*/ Coliforms → inhibited
 Other Gram (-) non-CPO → inhibited

Order References



CHROMID® CARBA SMART Agar

Complete CPE screening

Screen for all carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) in just one step with CHROMID® CARBA SMART selective chromogenic media bi-plate

- Smart association of media to screen for OXA-48 on one side and other CPE, notably KPC and NDM-1, on the other
- Easy to use with a single-step process
- Validated for both rectal swabs and stool specimens
- Incubation in 18/24 hours



Lateral-flow testleri

- İmmunokromatografik
- OXA-48-K-Se-T
- KPC-K-SeT
- NDM LFA
- Carba5- NDM, KPC, IMP, VIM-type, OXA-48

Ticari kitler

- + Kolay uygulanabilir
- - Pahalı
- - Yapılan çalışma sayısı az

NG-Test®
CARBA 5



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 artırır

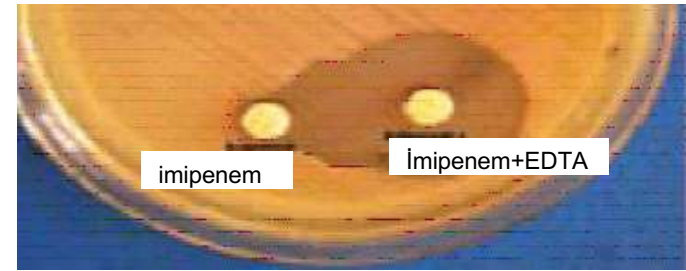
MBL tanısı için spesifik testler

-İnhibitör temelli testler-

- İmipenem-EDTA kombine disk testi
- İmipenem-EDTA çift disk sinerji testi
- MBL gradyen test

İmipenem-EDTA kombine disk testi

- MHA plağına 2 adet imipenem diski yerleştirilir
- Birinin üzerine 10 μ l 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



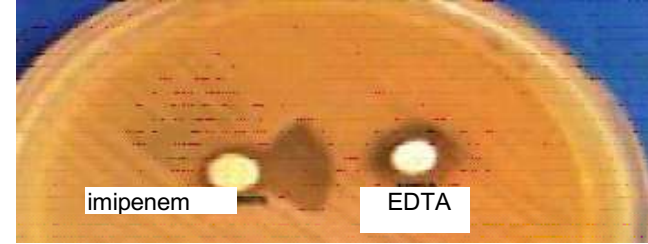
MBL pozitif



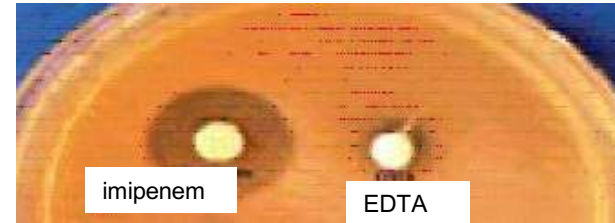
MBL negatif

İmipenem-EDTA çift disk sinerji testi

- İmipenem diskinin yanına merkezden mekeze uzaklığı 20 mm olacak şekilde boş bir disk yerleştirilir
- Boş diske 10 μ l 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

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 MİK oranı >8 veya $>3 \log_2$ dilüsyon olması MBL pozitifliğini gösterir



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

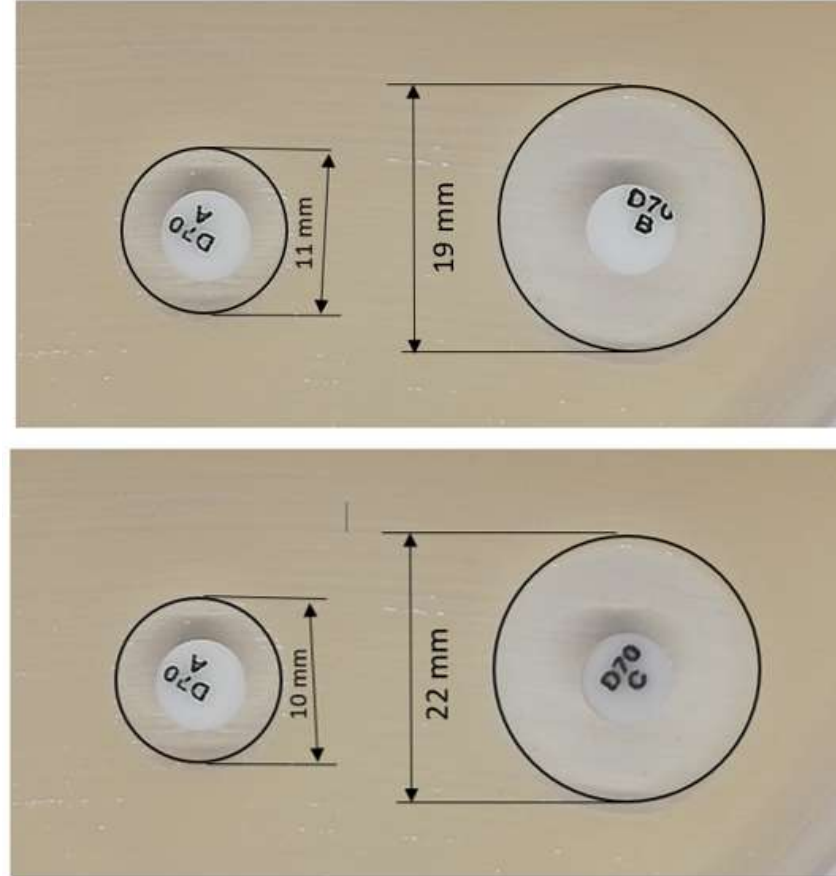


Yalancı pozitiflik görülebilir

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

MAST ID Mast disk

- İnhibitor/sinerji bazlı test
- Meropenem ve DPA, EDTA kombinasyonları disk difüzyon yöntemiyle inhibisyon zon çapı incelenir
- OXA karbapenemaz inhibitörü olarak temosillin zon çapı
- Zon çap farkları yorumlanarak karbapenemaz türü belirlenir
- Duyarlı ve spesifik test



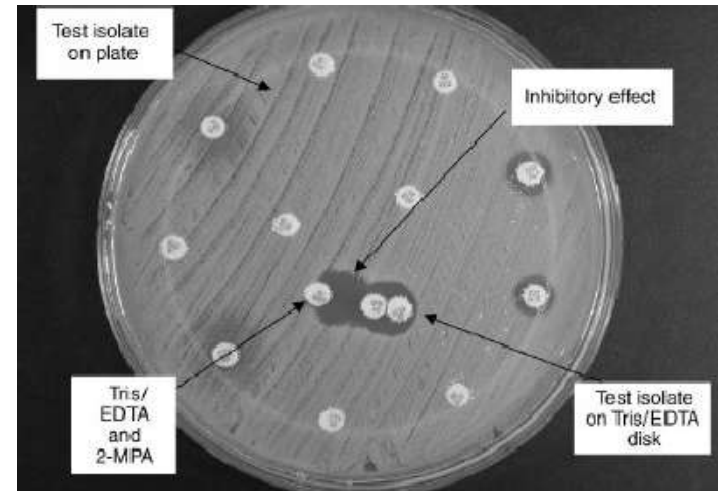
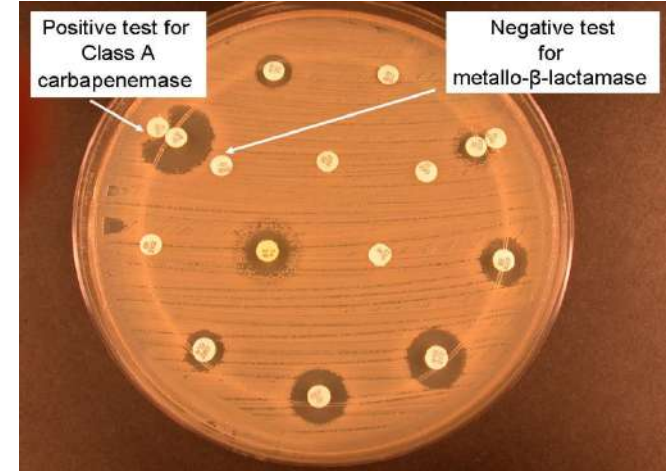
KPC tanısına yönelik testler

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

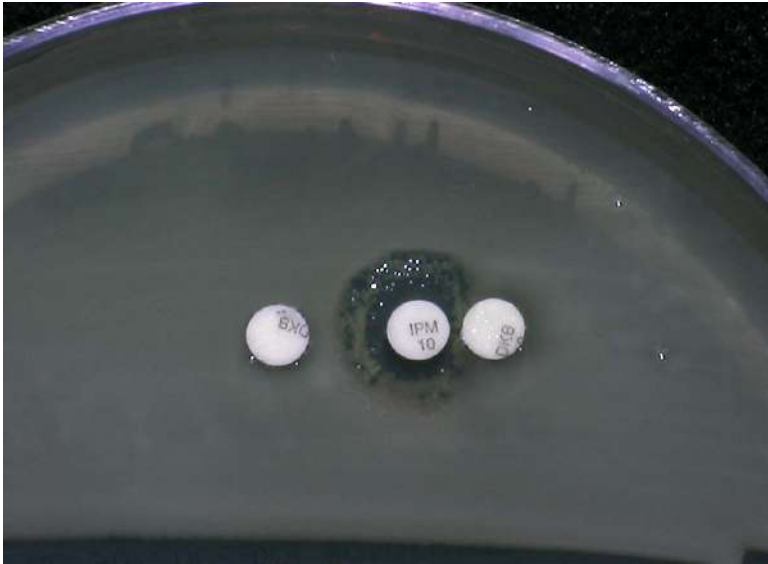
KPC tanısına yönelik testler

Tris/EDTA disk testi

- 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



Tris/EDTA disk testi



Sınıf A karbapenemaz (+)

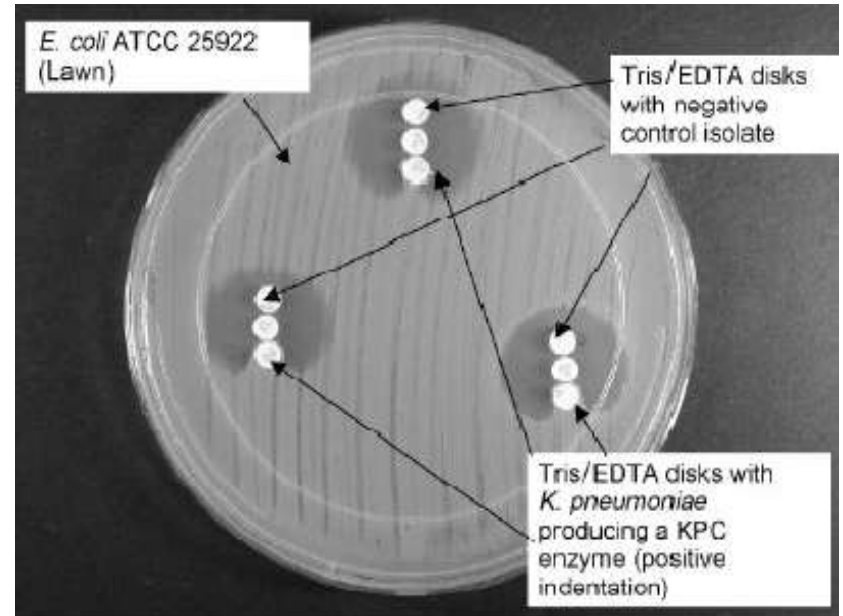


MBL (+)

KPC tanısına yönelik testler

İndirekt yöntem

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



KPC tanısına yönelik testler

Boronik asit testi

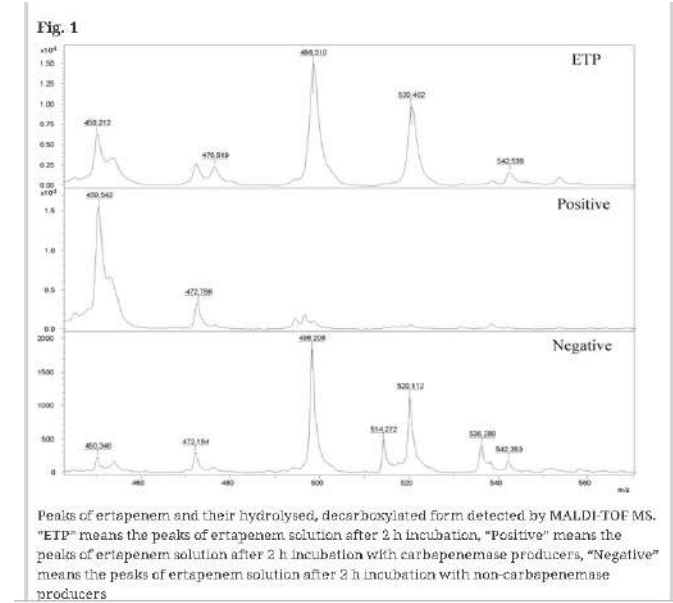
- Boronik asidin inhibitör etkisine dayalı testlerdir
- İmipenem veya meropenem zon çapı ile boronik asitli karbapenem diskinin zon çapı arasında $\geq 4-7$ mm fark olması



Sınıf A karbapenemaz pozitif

Maldi-tof MS

- Karbapenemin hidrolize bağı olarak kütle piklerinin tespiti
- + Kısa sürede sonuç verebilir
- + Kültürden veya direk örnekten çalışılabilir
-  Cihazın farklı veritabanının kullanılması gerekli
-  Metotların standartizasyon sıkıntısı



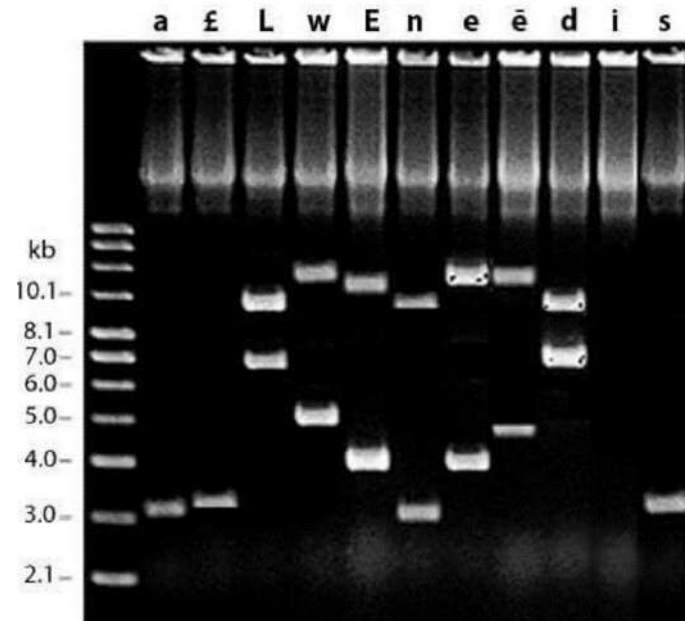
Jiajia Yu, Jingxian Liu, Yuanrui Li, Jing Yu, Weinan Zhu, Ying Liu* and Lisong Shen. Rapid detection of carbapenemase activity of Enterobacteriaceae isolated from positive blood cultures by MALDI-TOF MS. Ann Clin Microbiol Antimicrob (2018) 17:22

Moleküler yöntemler

- In-house PZR
- MLST
- Sekanslama
- PFGE
- Ticari PZR sistemler

- In-house PZR

- + İstenilen gen bölgeleri çalışılabilir
- + Ticari yöntemlere göre ucuz
- ■ Ekipman gerekiyor
- ■ Yeni gen bölgeleri tespit edilemeyebilir



- Ticari PZR sistemleri

- Cepheid Xpert Carba R
- GenePOC
- BD Max

- KPC, NDM, VIM, OXA-48, IMP

- Kısa sürede sonuç
- Ekipman gereksinimi az
- Kapalı sistemler, kontaminasyon riski az
- Pahalı

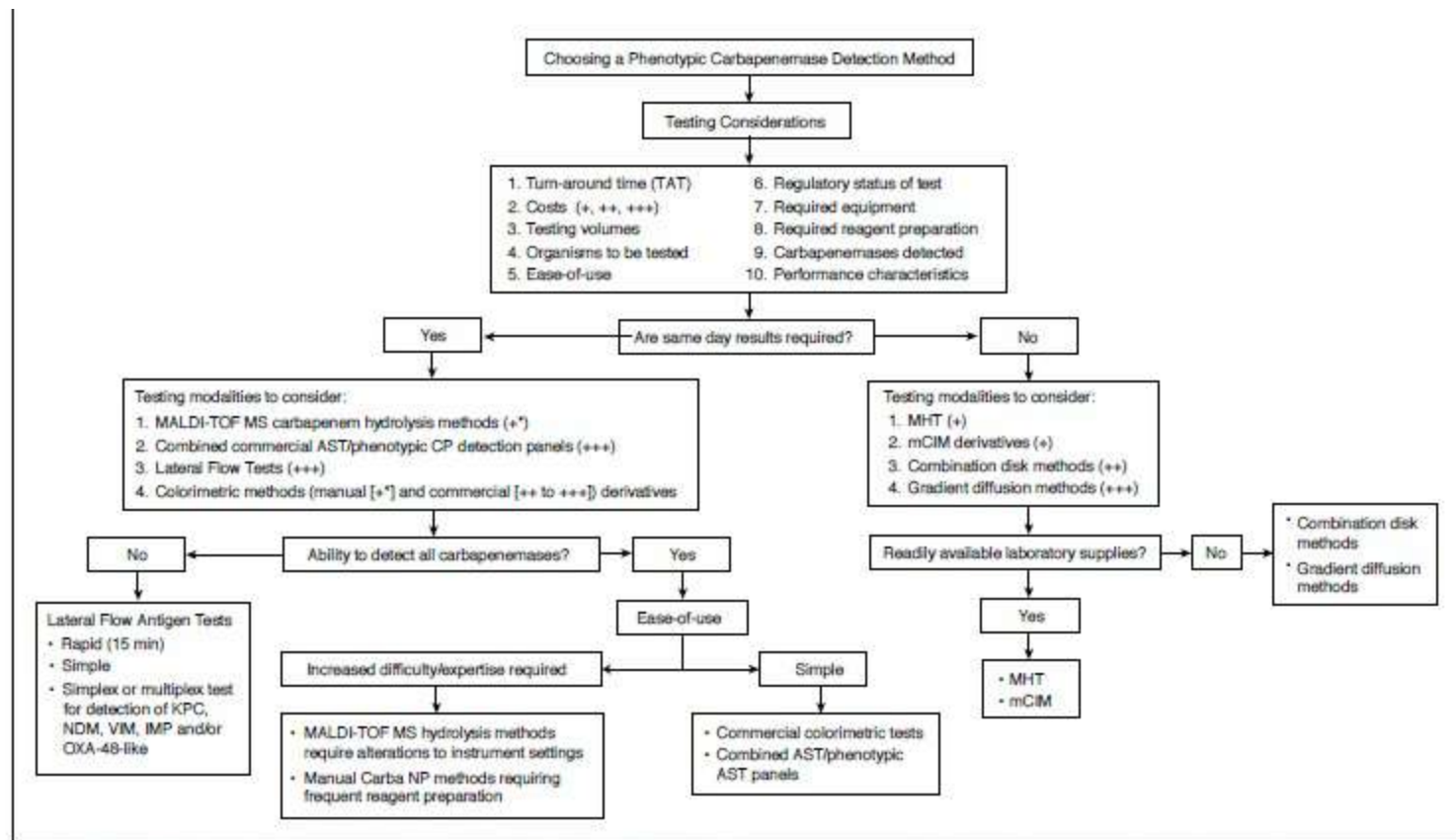


Figure 1. Algorithm for selecting a phenotypic method for detection of carbapenemase-producing carbapenem-resistant organisms. +, <\$1.00; ++, ≤\$1.00 to \$5.00; +++, >\$5.00; *, can be affected by volume.

Aminoglikozidler

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

- Kolorimetrik test

- pH indikatörü fenol red
- 16S rRNA metilaza bağlı direnci tesbit ediyor
- Amikasin ve gentamisin kullanılıyor

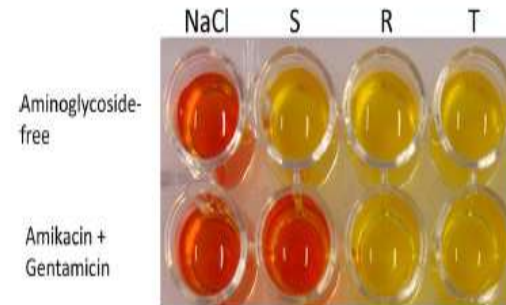


FIG 1 Representative results of the rapid aminoglycoside NP test. The rapid aminoglycoside NP test was performed with a reference susceptible isolate (S) in the second column and with a reference 16S rRNA methylase isolate (ArmA) (R) in the third column in a reaction medium without (upper) and with (lower) the AG mix (amikacin plus gentamicin). Noninoculated wells are shown in the first column (NaCl-containing wells). The tested isolate (T), in the fourth column, grew in the presence of the mix of aminoglycosides and therefore presented resistance to multiple aminoglycosides. The picture was taken after 2 h of incubation.

Nordmann P, Jayol A, Dobias J, Poirel L. 2017. Rapid aminoglycoside NP test for rapid detection of multiple aminoglycosideresistance in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 55:1074 –1079

Enterobacteriaceae 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

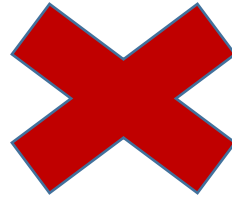
P.aeruginosa'da aminoglikozid direnç fenotipleri ve direnç mekanizmaları

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.

Kolistin

- CLSI ve EUCAST
 - Otomatize sistem
 - Disk difüzyon
 - Gradyen difüzyon
- Sıvı mikrodilüsyon



Liofilchem® SensiTest™ Colistin

Kolistin

- Kolistin disk elusyon yöntemi
 - 10 μg kolistin diski; sırasıyla tüplere 0,1,2 ve 4 tane konulur
 - 0.5 Macfarland bakteri süspansiyonu eklenir
 - İnkübe edilir
 - Üreme varlığı değerlendirilir
- Yeni bir yöntem
- Kategorik uyum %98, esansiyel uyum %99
- Ancak MİK 2 $\mu\text{l/ml}$ ise sıvı mikrodilüsyon ile kontrol edilmesini öneriyor

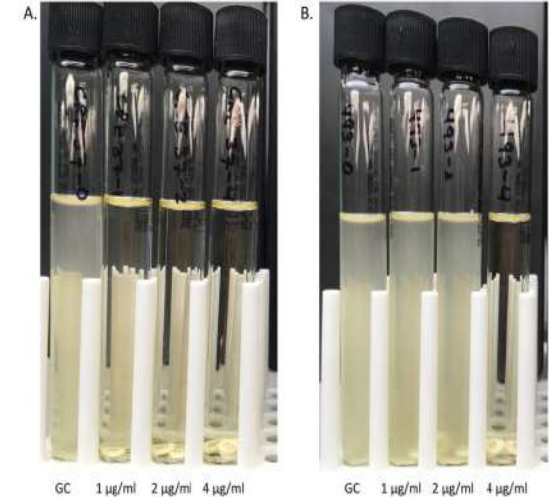


FIG 1 Colistin broth disk elution method. CBDE is performed with four 10-ml cation-adjusted Mueller-Hinton broth tubes per isolate, to which 0, 1, 2, and 4 colistin disks (10 μg) are added, generating final concentrations of 0 (growth control [GC]), 1, 2, and 4 $\mu\text{g/ml}$, respectively. (A) Tubes for a non-carbapenemase-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate with a colistin MIC of ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$. (B) Tubes for an *mcr-1*-producing *Escherichia coli* isolate (CDC AR Bank accession number 493) with a colistin MIC of 4 $\mu\text{g/ml}$.

Simner PJ, Bergman Y, Trejo M, Roberts AA, Marayan R, Tekle T, Campeau S, Kazmi AQ, Bell DT, Lewis S, Tamma PD, Humphries R, Hindler JA. 2019. Two-site evaluation of the colistin broth disk elution test to determine colistin in vitro activity against Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 57:e01163-18



"The microbe always has the last word."

LOUIS PASTEUR (1822-1895)