



Kombinasyon Testleri ve Makrometod

Yrd.Doç.Dr. Uğur ARSLAN



Kombinasyon tedavisi

- İmmun sistemi normal olan konakta bir çok infeksiyon tek bir antimikrobiyal ajanla tedavi edilebilir
- Ancak bazı durumlarda kombinasyon tedavisine de gerek duyulabilir



Kombine Antibiyotik Kullanımının Gerekçeleri

- İnfeksiyon etkeninin bilinmediği, durumu ağır olan bazı hastalarda **geniş bir antibakteriyel spektrum sağlanması**
- Tek bir antimikrobik ajanın spektrumunun etken mikroorganizmaların hepsine etkili olmadığı **polimikrobik infeksiyonların tedavisi**
- Belli bir bakteri üzerinde tek bir antimikrobik ajanla sağlanan **inhibitör ve bakterisid etkinin artırılması**
- Tedavi sırasında tek bir ajana karşı **direnç gelişimi olasılığının azaltılması**
- İlaçları düşük dozda **kombine ederek toksisiteyi azaltmak**



Kombinasyon tedavisi

Sinerjistik etki: Kombine edilen ilaçların etkisi, bu ilaçların tek tek kullanıldıklarında gözlenen etkilerin toplamından fazladır

Antagonist etki: Kombinasyonun etkisi, ilaçlar tek tek uygulandıklarında saptanan etkilerin toplamından düşüktür

Aditif etki: Kombinasyondaki ilaçların etkisi, tek tek kullanıldıklarında gözlenen etkilerin toplamına eşittir



Kombine Antibiyotik Tedavisinin Sakıncaları

- Antagonist etkilerin
- Dirençli mikroorganizmaların kolonizasyonlarında artışlar
- Süperinfeksiyonlar
- Toksisitenin artması
- Farmakolojik istenmeyen etkileşimler
- Mali yükün artması



Kombinasyon yapılabilen antibiyotikler

1.Grup (Bakterisidler)

Aditif veya sinerjistik etki gösterirler

- Beta laktamazlar
- Aminoglikozidler
- Polipeptid antibiyotikler
- Vankomisin
- Aztreonam
- İmipenem
- Rifampisin
- Florokinolonlar

2.Grup (Bakterisitatikler)

Aditif etki gösterirler

- Makrolidler
- Fusidik asit
- Tetrasiklinler
- Kloramfenikol
- Linkomisin
- Klindamisin
- Sülfonamidler

1 Grup + 2.Grup = Antagonizma



Antimikrobiyallerin uygun kombinasyonlarına örnekler

Nedeni	Örnek
<p>1. Sinerji</p> <p>Gram Negatif şok'un ampirik tedavisi Nedeni bilinmeyen yaşamı tehdit eden infeksiyon Ciddi enterokokkal infeksiyon (Örn: Endokardit) Ciddi P.aeruginosa inf. (Örn: Pnömoni ile ilişkili sepsis)</p>	<p>Aminoglikozid+antipsödomonal penisilin Aminoglikozid+İmipenem Gentamisin+ampisilin Aminoglikozid+antipsödomonal penisilin</p>
<p>2. Ciddi aerobik + anaerobik karma infeksiyonlar</p>	<p>Aminoglikozid+Metranidazol</p>
<p>3. Antimikrobiyal direnç oranını azaltmak</p>	<p>Tüberkülozda:Isoniazid+Rifampin+Pirazinamid+Etambutol</p>



Kombinasyon Testleri

- Antimikrobik kombinasyonlarının etkileşimlerinin anlaşılabilmesi için uygulanan tüm in vitro duyarlılık işlemlerine **sinerji testleri** denilmektedir
- Bu amaçla **iki boyutlu sulandırım** (Dama Tahtası “Chequerboard”) **yöntemi**
- **Öldürme- zaman kinetik yöntemi**
- Difüzyon yöntemi uygulanabilmektedir
 - Difüzyon yöntemlerinden biri de **Etest yöntemi**dir



Modifiye "dama tahtası" yöntemi

- Bu yöntem
 - İn vitro antimikrobiyal kombinasyonların değerlendirilmesinin basit olması
 - Mikrodilüsyon sistemlerinin kullanıldığı laboratuvarlarda rahatlıkla uygulanabilmesi nedeniyle en sık kullanılan yöntemdir.



A B C D E F G H I J K L

1



2



3



4



5



6



7



8



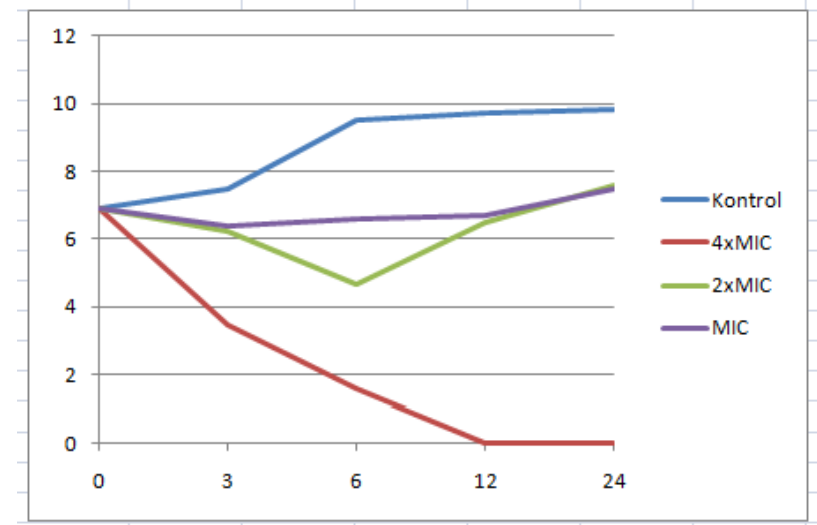
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ÜK	IMP 0.125	IMP 0.25	IMP 0.5	IMP 1	IMP 2	IMP 4	IMP 8	IMP 16	IMP 32	IMP 64	IMP 128
B	AK 1	IMP 0.125	IMP 0.25	IMP 0.5	IMP 1	IMP 2	IMP 4	IMP 8	IMP 16	IMP 32	IMP 64	IMP 128
	AK 1	AK 1	AK 1	AK 1	AK 1	AK 1	AK 1	AK 1	AK 1	AK 1	AK 1	AK 1
C	AK 2	IMP 0.125	IMP 0.25	IMP 0.5	IMP 1	IMP 2	IMP 4	IMP 8	IMP 16	IMP 32	IMP 64	IMP 128
	AK 2	AK 2	AK 2	AK 2	AK 2	AK 2	AK 2	AK 2	AK 2	AK 2	AK 2	AK 2
D	AK 4	IMP 0.125	IMP 0.25	IMP 0.5	IMP 1	IMP 2	IMP 4	IMP 8	IMP 16	IMP 32	IMP 64	IMP 128
	AK 4	AK 4	AK 4	AK 2	AK 4	AK 4	AK 4	AK 4	AK 4	AK 4	AK 4	AK 4
E	AK 8	IMP 0.125	IMP 0.25	IMP 0.5	IMP 1	IMP 2	IMP 4	IMP 8	IMP 16	IMP 32	IMP 64	IMP 128
	AK 8	AK 8	AK 8	AK 8	AK 8	AK 8	AK 8	AK 8	AK 8	AK 8	AK 8	AK 8
F	AK 16	IMP 0.125	IMP 0.25	IMP 0.5	IMP 1	IMP 2	IMP 4	IMP 8	IMP 16	IMP 32	IMP 64	IMP 128
	AK 16	AK 16	AK 16	AK 16	AK 16	AK 16	AK 16	AK 16	AK 16	AK 16	AK 16	AK 16
G	AK 32	IMP 0.125	IMP 0.25	IMP 0.5	IMP 1	IMP 2	IMP 4	IMP 8	IMP 16	IMP 32	IMP 64	IMP 128
	AK 32	AK 32	AK 32	AK 32	AK 32	AK 32	AK 32	AK 32	AK 32	AK 32	AK 32	AK 32
H	AK 64	IMP 0.125	IMP 0.25	IMP 0.5	IMP 1	IMP 2	IMP 4	IMP 8	IMP 16	IMP 32	IMP 64	IMP 128
	AK 64	AK 64	AK 64	AK 64	AK 64	AK 64	AK 64	AK 64	AK 64	AK 64	AK 64	SK 64

ÜK: Üreme kontrolü, SK: Sterilite kontrolü, AK: Amikasin, IMP: İmipenem, Sayılar µg/ml olarak antibiyotik konsantrasyonu



Zaman-Ölüm Eğrisi Yöntemi

- Bakteriyostatik ve bakterisid aktiviteyi zamana karşı gösteren,
- Dama tahtası metodunun tersine antimikrobiyal ilişkiyi dinamik olarak gösterir
- Sık kullanılan bir sinerji testidir
 - Zaman alıcı
 - Uygulaması zor
 - Sınırlı sayıda antimikrobik ile yapılabilmesi
 - Dikkat gerektiren bir methodur



Eliopoulos GM, Moellering RC. Antimicrobial combinations. In: Lorian V, ed. Antibiotics in Laboratory Medicine. 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996: 502-78

White RL, Burgess DS, Mandura M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 1914-8



Zaman-Ölüm eğrisi Yöntemi

- "Dama tahtası" ve Zaman-Ölüm eğrisi Yöntemi ile yapılan mukayeseli çalışmaların
 - bir kısmında uyum
 - bazı çalışmalarda "dama tahtası" metodunun yetersizliği gösterilmiştir

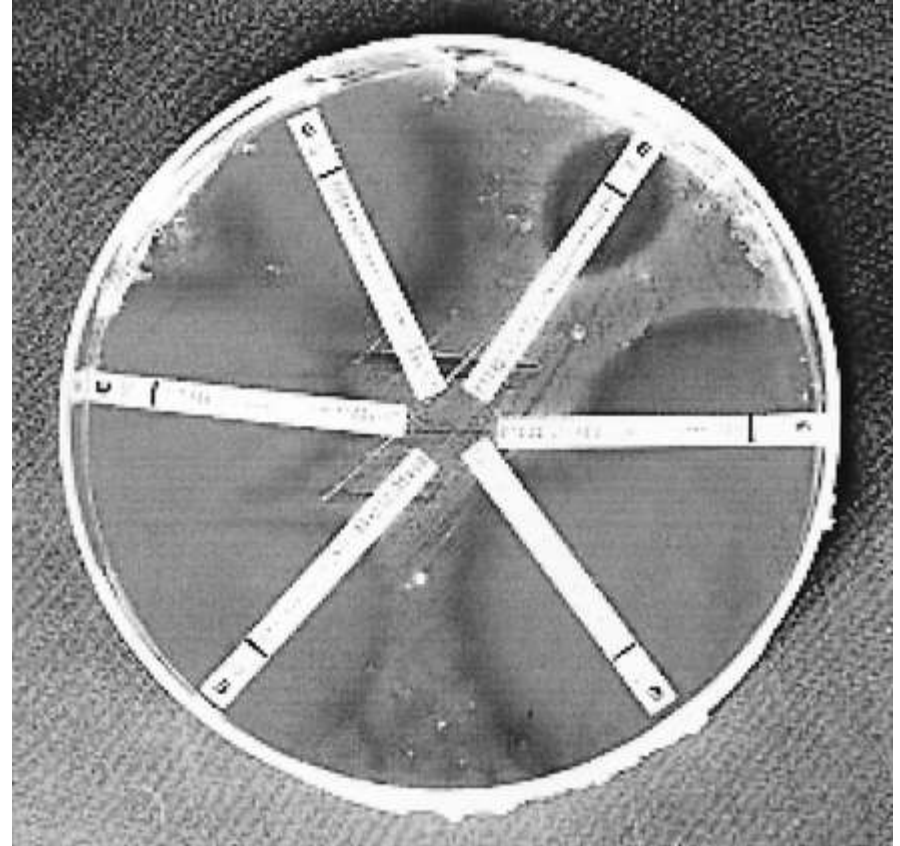
Eliopoulos GM, Moellering RC. Antimicrobial combinations. In: Lorian V, ed. Antibiotics in Laboratory Medicine. 4th ed. Baltimore: Williams & Willkins, 1996: 502-78

White RL, Burgess DS, Mandura M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 1914-8



Etest metodu

- Diğer sinerji testlerine göre
 - Daha az emek harcanan
 - Kullanımı kolay
 - Ancak dama tahtası metodu ile yüksek korelasyon gösteren bir metottur.



Manno G, Ugolotti E, Belli ML, Fenu ML, Romano L, Cruciani M. Use of the E test to assess synergy of antibiotic combinations against isolates of *Burkholderia cepacia-complex* from patients with cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22:28–34

Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with E-test, time-kill, and checkerboard methods. Diagn Microbiol Infect Dis 2000;38:43–50



Etest metodu

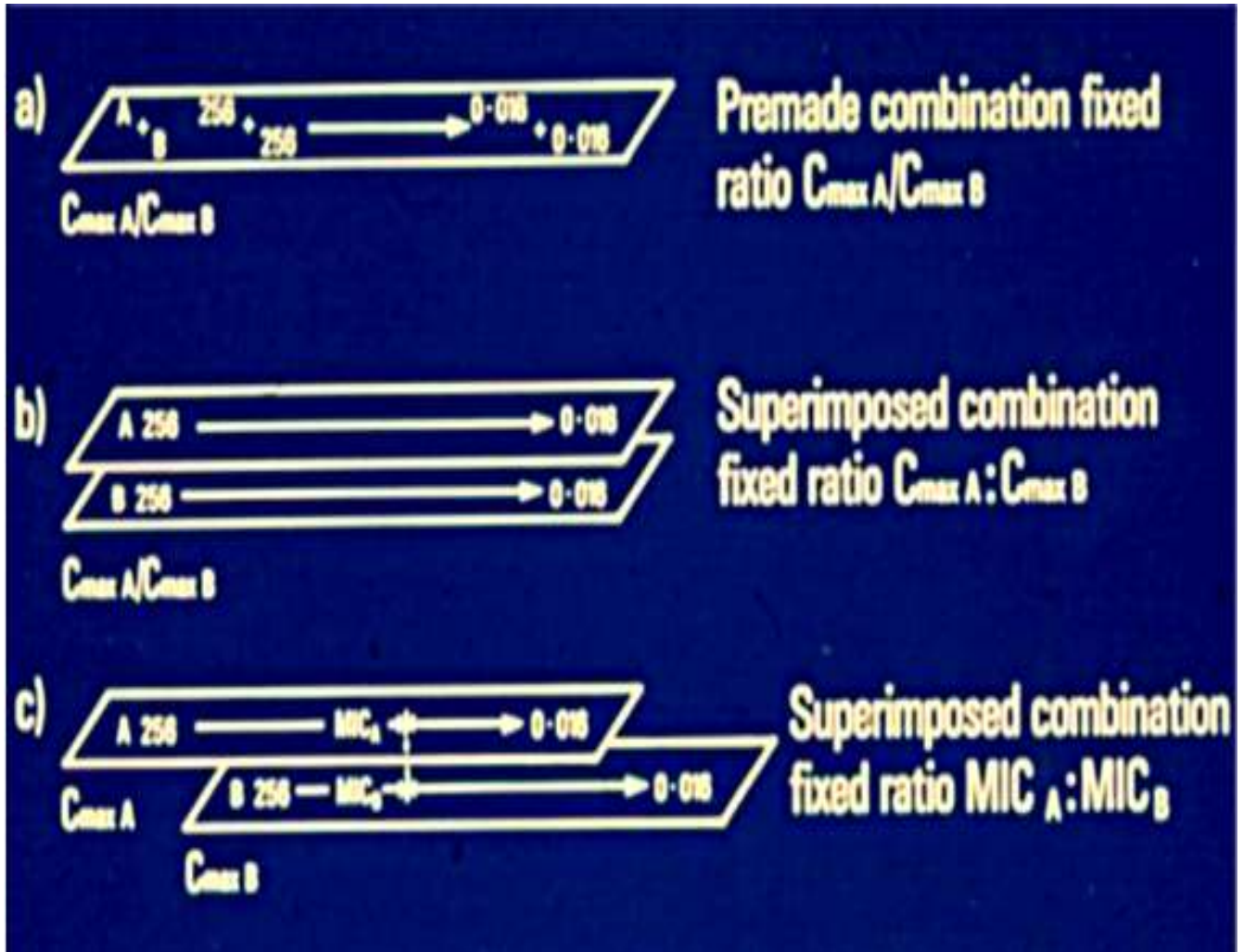
- Etest ve dama tahtası yöntemleri arasında %90 oranında korelasyon olduğu belirtilmiştir
- Etest metodunda üreticinin önerilerine göre metodolojinin uygulanmadığı takdirde aradaki farkın büyüyebileceği belirtilmiştir

*Manno G, Ugolotti E, Belli ML, Fenu ML, Romano L, Cruciani M. Use of the E test to assess synergy of antibiotic combinations against isolates of *Burkholderia cepacia-complex* from patients with cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22:28–34

* *Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with E-test, time-kill, and checkerboard methods. Diagn Microbiol Infect Dis 2000;38:43–50



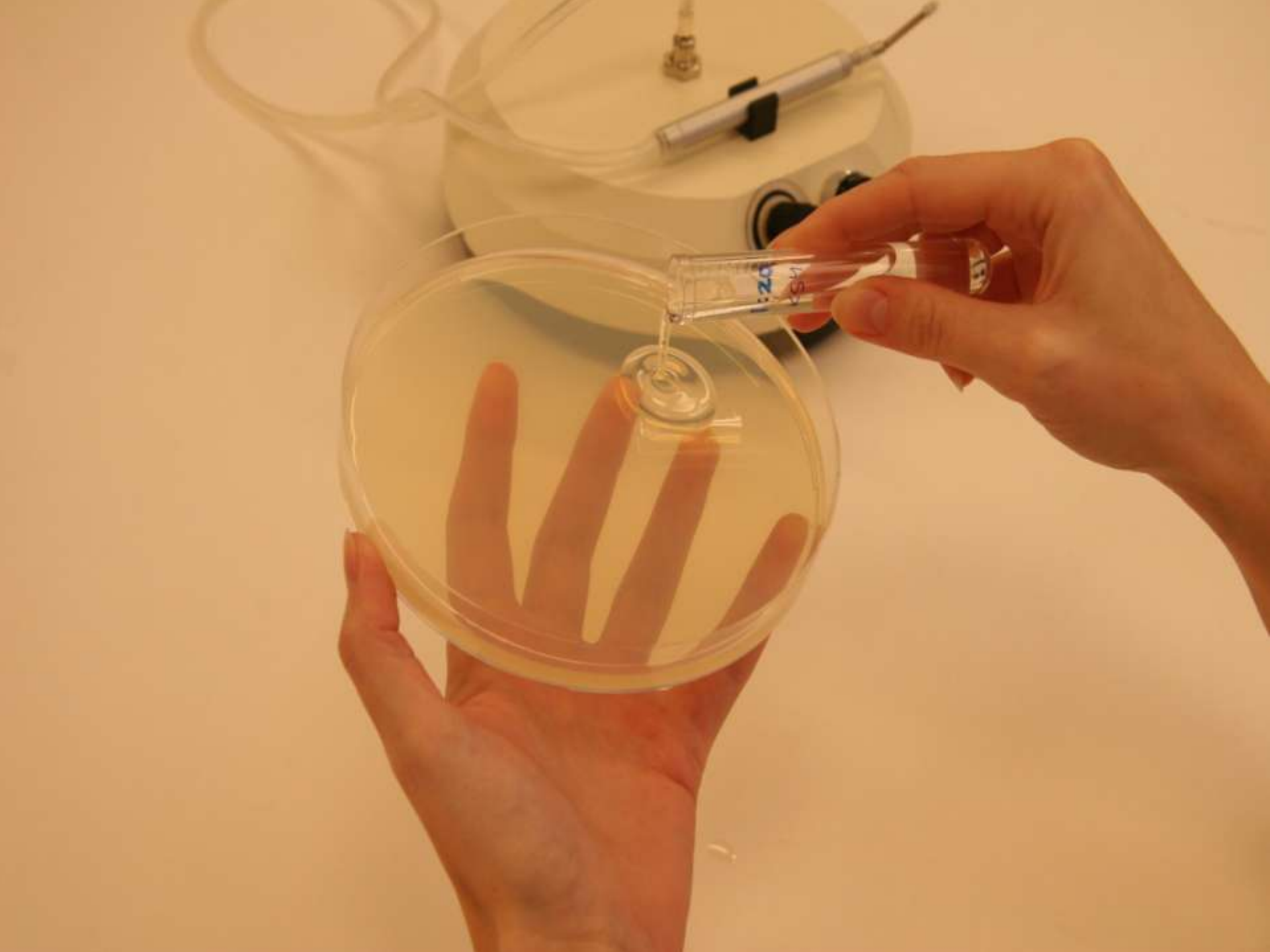
Farklı Etest Gradiyent Kombinasyonları





Etest Sinerji Testinde Tavsiye Edilen Kurulum

- Süspansiyonu 0.5 McFarland'a ayarlanır (veya istenen yoğunluğa)
- Agar petrisini doldurma:
 - Süspansiyonu dilüe edilir (Ör: 1:10, 1:20).
 - Dilüe süspansiyonu agar petrisi üzerine dökülür
 - Yavaşça petriyi dairesel olarak döndürünüz böylece agar tüm yüzeyi kaplayacaktır
 - Pipet kullanarak dikkatlice fazla sıvıyı çekilir
 - Petri yüzeyinin tamamen kurummasını beklenir (inkübatörde kurutulabilir)

















Etest Striplerinin Hazırlanması

- İlk Etest strip yerleştirilir
- İlk sribin tam olarak yeri
 - kenarı boyunca ve petrinin arkasından sribin üst ve alt kısmı işaretlenir
- Yaklaşık 1 saat kadar beklenir



—

018
023
025
041
044
049
084
118
120
122
124
126
128
130
132
134
136
138
140
142
144
146
148
150
152
154
156
158
160
162
164
166
168
170
172
174
176
178
180
182
184
186
188
190
192
194
196
198
200

018
023
025
041
044
049
084
118
120
122
124
126
128
130
132
134
136
138
140
142
144
146
148
150
152
154
156
158
160
162
164
166
168
170
172
174
176
178
180
182
184
186
188
190
192
194
196
198
200

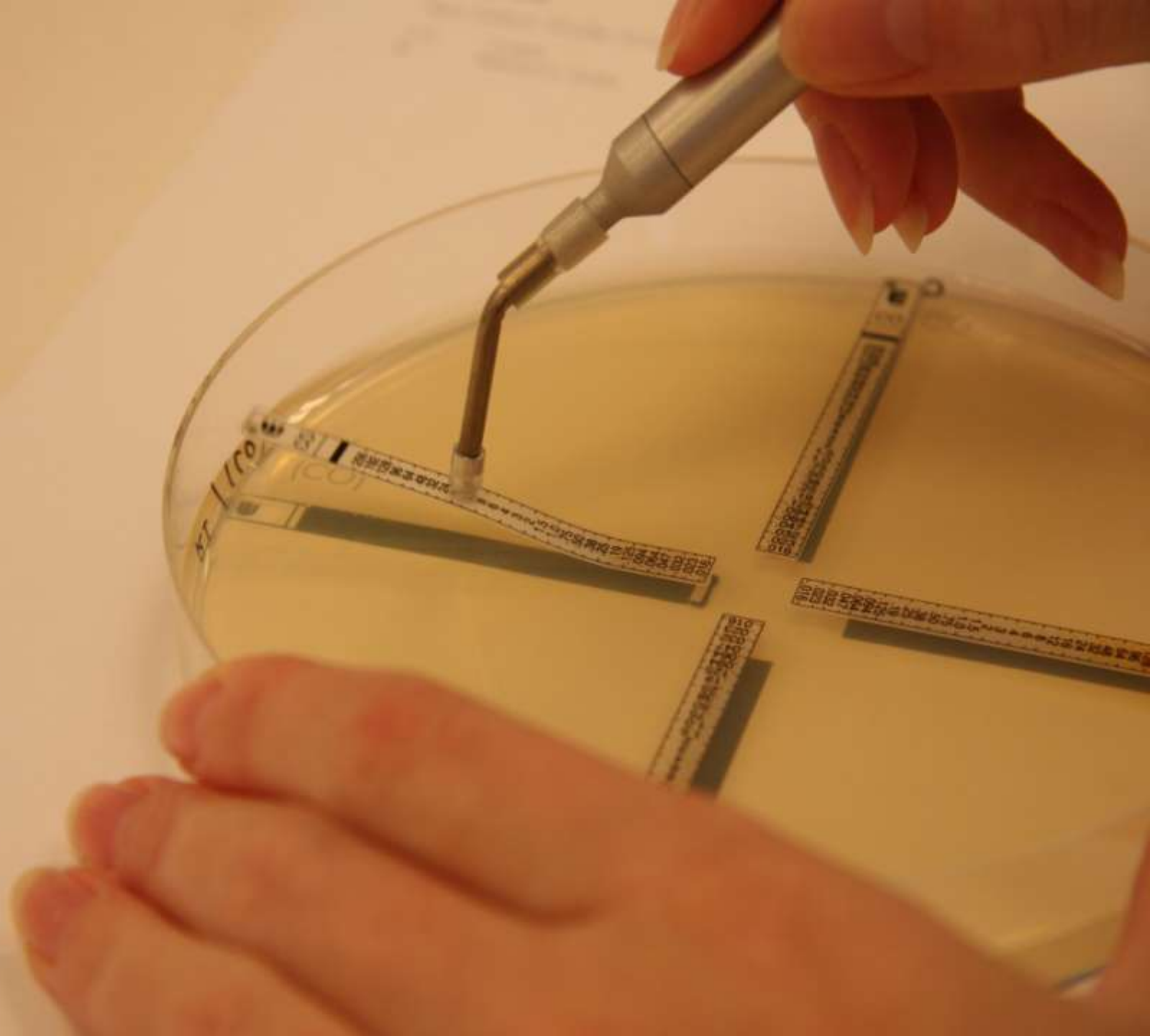
018
023
025
041
044
049
084
118
120
122
124
126
128
130
132
134
136
138
140
142
144
146
148
150
152
154
156
158
160
162
164
166
168
170
172
174
176
178
180
182
184
186
188
190
192
194
196
198
200

**Fram-Gast
www.fram-gast.com



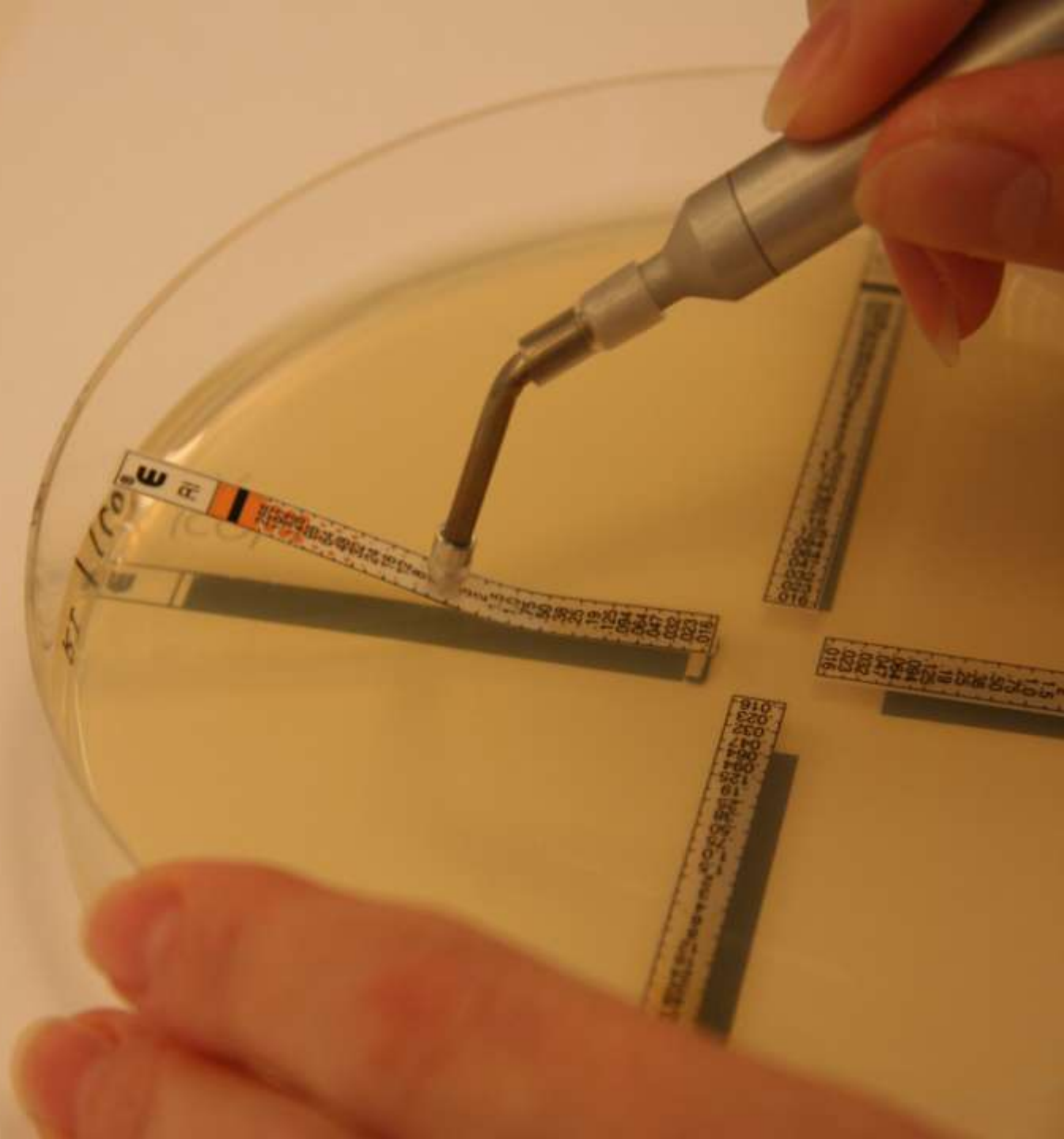
Sabit Oranların Ayarlanması

- Yaklaşık bir saat sonra, ilk Etest stripi çıkarılır
- İkinci Etest striplerini birinci ile tamamen aynı yere yerleştirilir











Dr. 1170

PI CO
2000 1999 1998 1997 1996 1995 1994 1993 1992 1991 1990 1989 1988 1987 1986 1985 1984 1983 1982 1981 1980 1979 1978 1977 1976 1975 1974 1973 1972 1971 1970 1969 1968 1967 1966 1965 1964 1963 1962 1961 1960 1959 1958 1957 1956 1955 1954 1953 1952 1951 1950 1949 1948 1947 1946 1945 1944 1943 1942 1941 1940 1939 1938 1937 1936 1935 1934 1933 1932 1931 1930 1929 1928 1927 1926 1925 1924 1923 1922 1921 1920 1919 1918 1917 1916

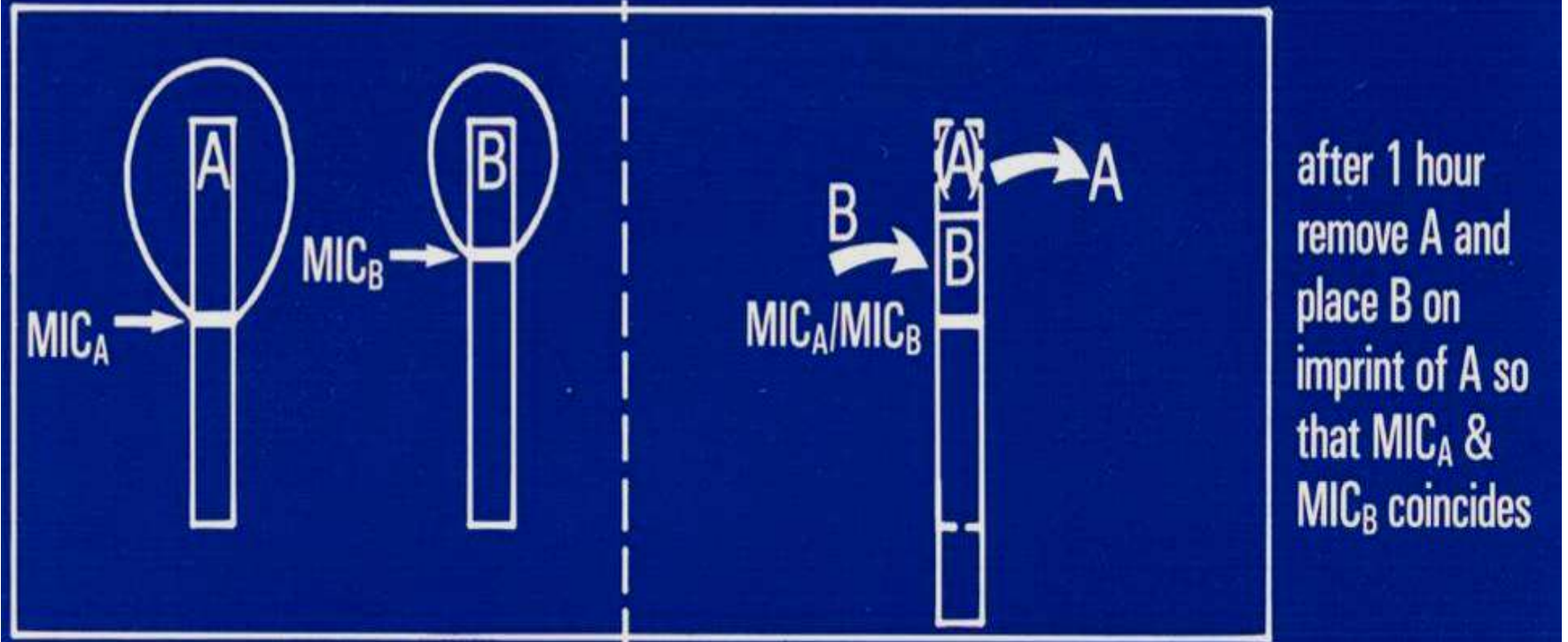
2000 1999 1998 1997 1996 1995 1994 1993 1992 1991 1990 1989 1988 1987 1986 1985 1984 1983 1982 1981 1980 1979 1978 1977 1976 1975 1974 1973 1972 1971 1970 1969 1968 1967 1966 1965 1964 1963 1962 1961 1960 1959 1958 1957 1956 1955 1954 1953 1952 1951 1950 1949 1948 1947 1946 1945 1944 1943 1942 1941 1940 1939 1938 1937 1936 1935 1934 1933 1932 1931 1930 1929 1928 1927 1926 1925 1924 1923 1922 1921 1920 1919 1918 1917 1916

2000 1999 1998 1997 1996 1995 1994 1993 1992 1991 1990 1989 1988 1987 1986 1985 1984 1983 1982 1981 1980 1979 1978 1977 1976 1975 1974 1973 1972 1971 1970 1969 1968 1967 1966 1965 1964 1963 1962 1961 1960 1959 1958 1957 1956 1955 1954 1953 1952 1951 1950 1949 1948 1947 1946 1945 1944 1943 1942 1941 1940 1939 1938 1937 1936 1935 1934 1933 1932 1931 1930 1929 1928 1927 1926 1925 1924 1923 1922 1921 1920 1919 1918 1917 1916

2000 1999 1998 1997 1996 1995 1994 1993 1992 1991 1990 1989 1988 1987 1986 1985 1984 1983 1982 1981 1980 1979 1978 1977 1976 1975 1974 1973 1972 1971 1970 1969 1968 1967 1966 1965 1964 1963 1962 1961 1960 1959 1958 1957 1956 1955 1954 1953 1952 1951 1950 1949 1948 1947 1946 1945 1944 1943 1942 1941 1940 1939 1938 1937 1936 1935 1934 1933 1932 1931 1930 1929 1928 1927 1926 1925 1924 1923 1922 1921 1920 1919 1918 1917 1916

MİK:MİK Oranlarında Etest Gradyentleri

MICs of A & B known/Ratio A:B = MIC_A:MIC_B



1.Gün

2.Gün

Her bir antibiyotik için MİK belirleyiniz



MIK:MIK Oranı Ayarlanması

- Petriyi doldurulur
- İlk Etest sribini petriye uygulanır
- Stribin ve MIK pozisyonununun tam yerini petrinin arka kısmına işaretlenir
- 1 saat kadar beklenir



- MIC



MIK:MIK Oranı Ayarlanması

- İlk Etest sribini çıkarılır
- İlk Etest sribinin bulunduğu bölgenin tam üstüne ikinci sribi yerleştirilir
 - böylece MIK pozisyonları üst üste gelecektir
- Petriyi ikinci strip üzerindeyken ve bu organizma için önerilen inkübasyon özelliklerine uygun olarak inkübe edilir



€ RI
236
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

JIM

€ RI
236
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

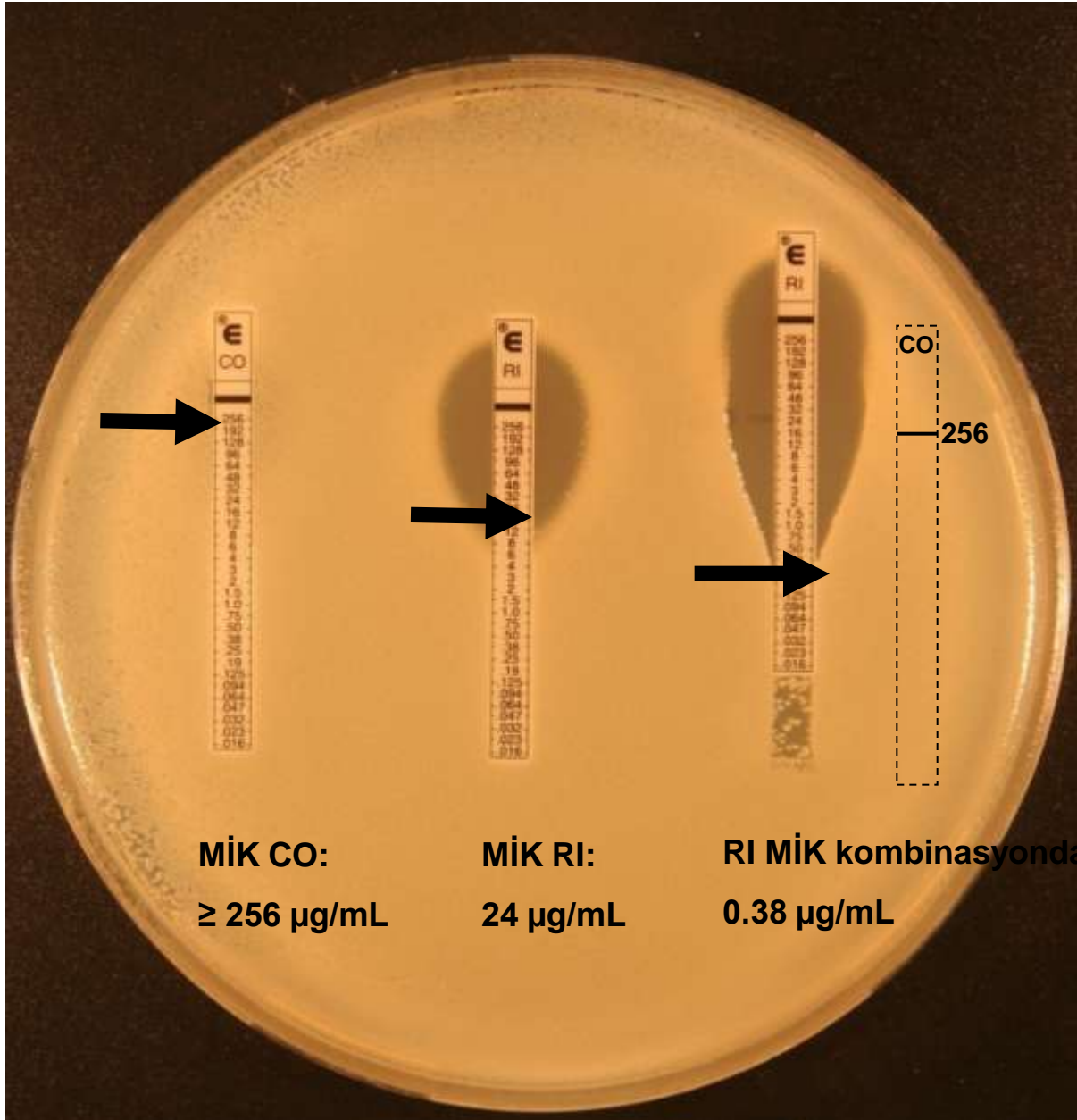
®
E
RI

256
192
128
96
64
48
32
24
16
12
8
6
4
3
2
1.5
1.0
.75
.50
.38
.25
.19
.125

JIM -

E
RI

256
192
128
96
64
48
32
24
16
12
8
6
4
3
2
1.5
1.0
.75
.50
.38
.25
.19
.125
.094
.064
.047
.032
.023
.016



En aktif ilaç
RI (MIK 24)
>2 dilüsyon azalmıştır

SİNERJİ

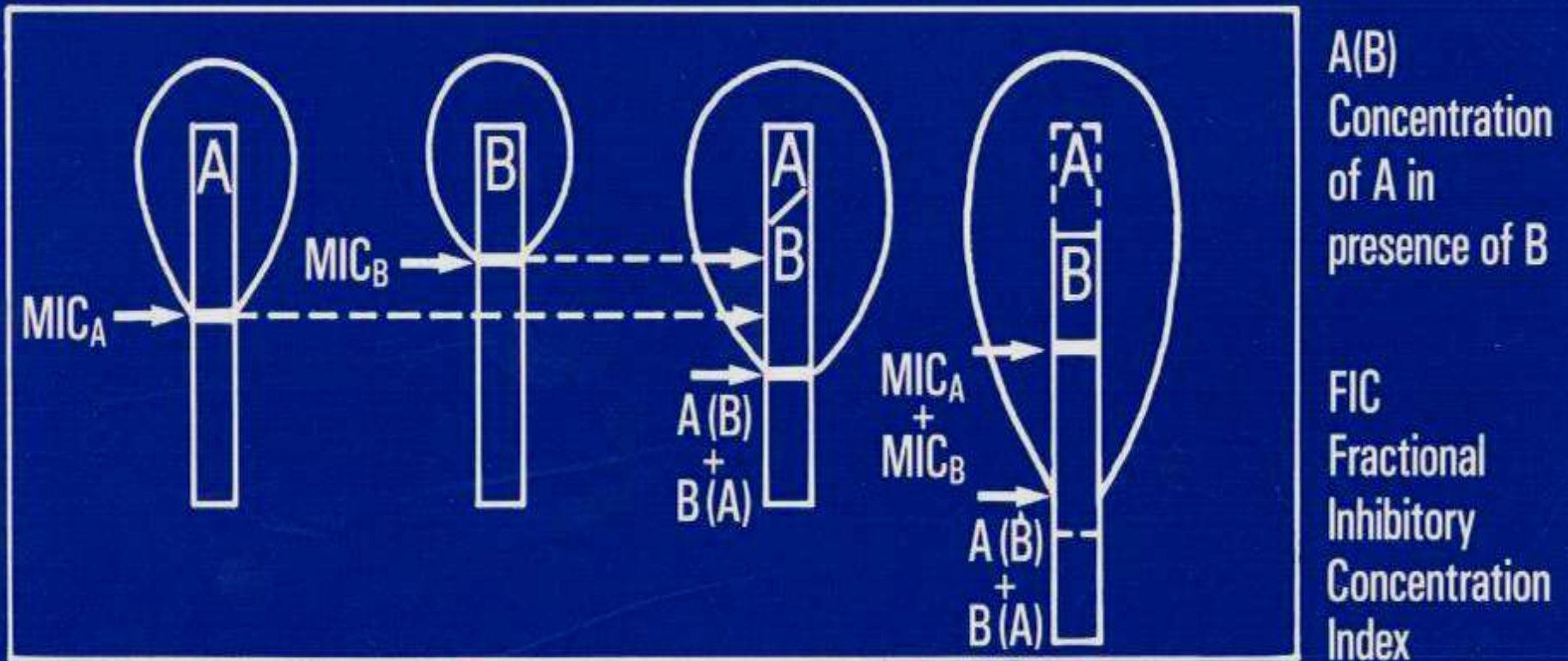
Okuma ve Yorumlama

- Sinerji – Kombinasyonda $MİK \geq 2$ dilüsyondur ve tek başına en aktif ilaçtan DAHA DÜŞÜK $MİK$ 'e sahiptir
- Antagonizma – Kombinasyonda $MİK \geq 2$ dilüsyonda ve tek başına en aktif ilaçtan DAHA YÜKSEK $MİK$ 'e sahiptir
- Indiferans/Aditif – Kombinasyonda $MİK$ en aktif ilacın $\pm 1-2$ dilüsyonu kadardır
- Örnek: $MIC_A = 256$ ve $MIC_B = 24$ (B en aktif)
 - $MIC_{B(A)} = 0.38 \rightarrow$ Sinerji
 - Eğer $MIC_{B(A)} = 96 \rightarrow$ Antagonizma

Okuma ve Yorumlama

Öncelikle en aktif ilaca göre kombinasyonu kıyaslayınız

MICs of A & B used individually and in combination



$$\frac{A(B)}{MIC_A} + \frac{B(A)}{MIC_B} = FIC_A + FIC_B = FIC_{index}$$



Kombinasyonun etkinliğini belirlemek için FİK indeksi ve hesaplanması

- FİK A = $\frac{\text{B'nin varlığında A'nın MİK sayısal değeri}}{\text{Tek başına A'nın MİK sayısal değeri}}$
- FİK B = $\frac{\text{A'nın varlığında B'nin MİK sayısal değeri}}{\text{Tek başına B'nin MİK sayısal değeri}}$

Σ FİK indeksi = FİK A+ FİK B

Σ FİK indeksi $\leq 0,5$ **sinerji**

Σ FİK $>0,5$ ve ≤ 1 **aditif**

Σ FİK >1 - <4 **indiferan (etkisiz)**

Σ FİK ≥ 4 ise **antagonist etkileşim** olarak değerlendirilmiştir.

MİK RI (CO):
3 µg/mL

MİK CO:
≥ 256 µg/mL

MİK CO (RI):
3 µg/mL

MİK RI:
16 µg/mL

Alt 1:
$$\frac{FICI}{FICI} = \frac{3}{256} + \frac{3}{16} = 0.31$$

SİNERJİ

Alt 2:
Ayrıca, en aktif ilaç
RI (MIC 16)
>2 dilüsyon azalmıştır

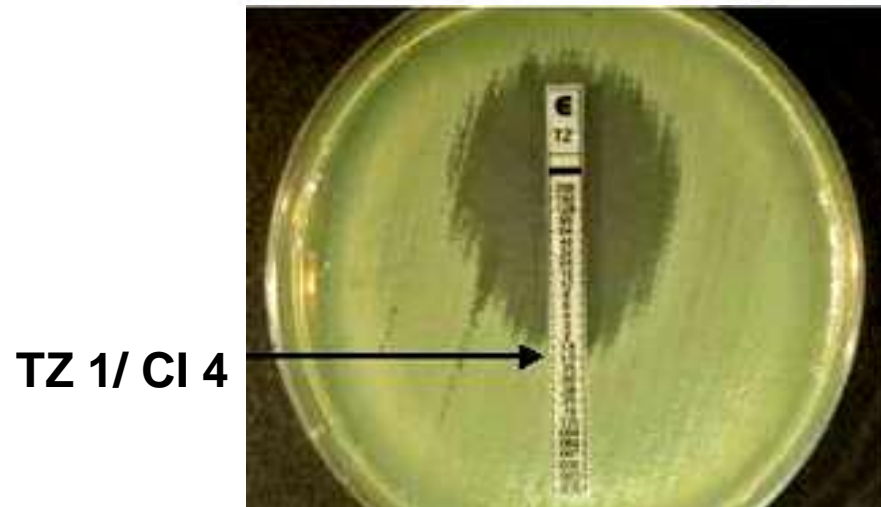
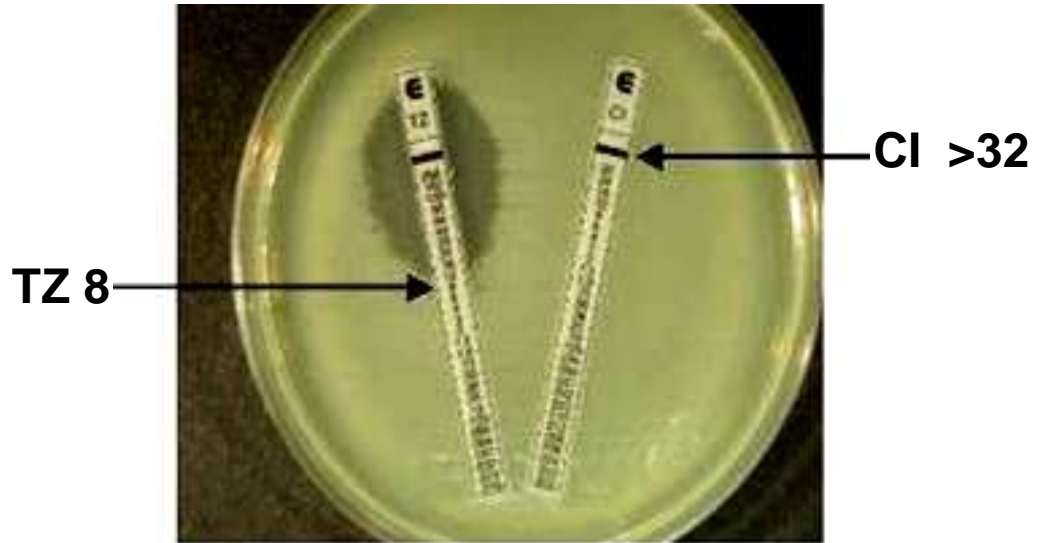
SİNERJİ

P. aeruginosa – *MiK:MiK* Oranı

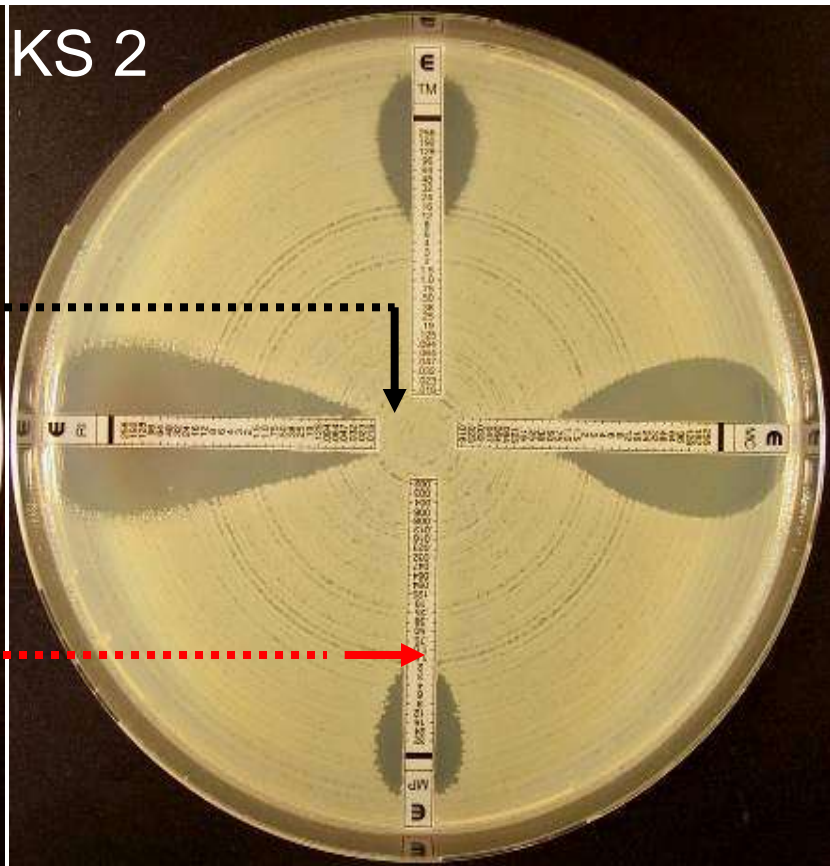
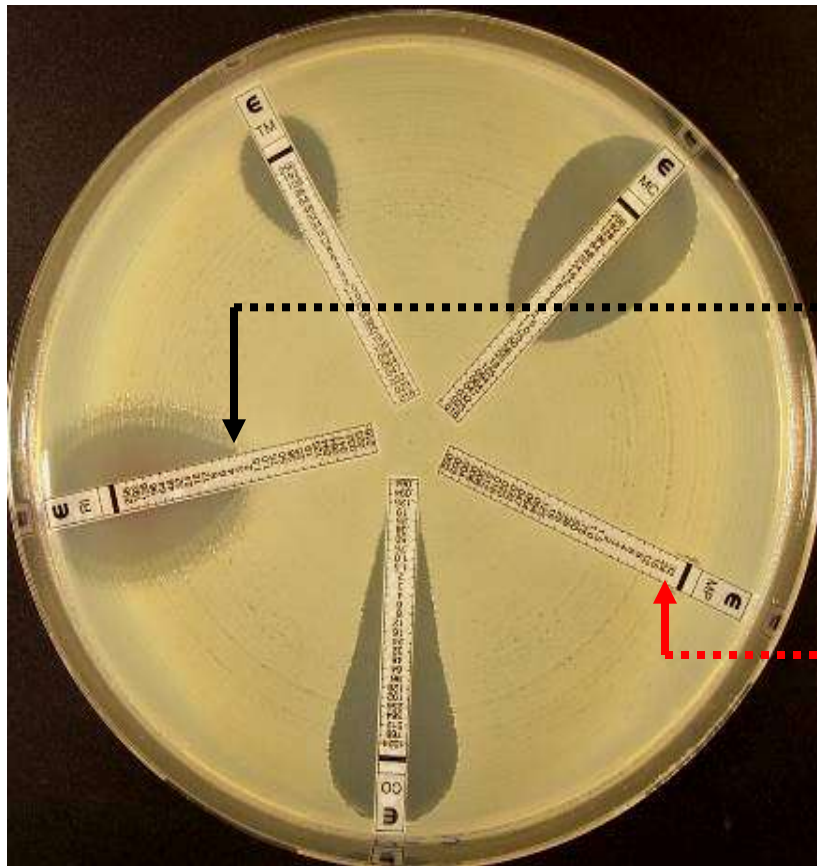
Etest *MiK:MiK*
TZ/CI (8:>32) = 1:4

$FIC = 1/8 + 4/32$
(0.125 + 0.125)

FIC = 0.25 Sinerji



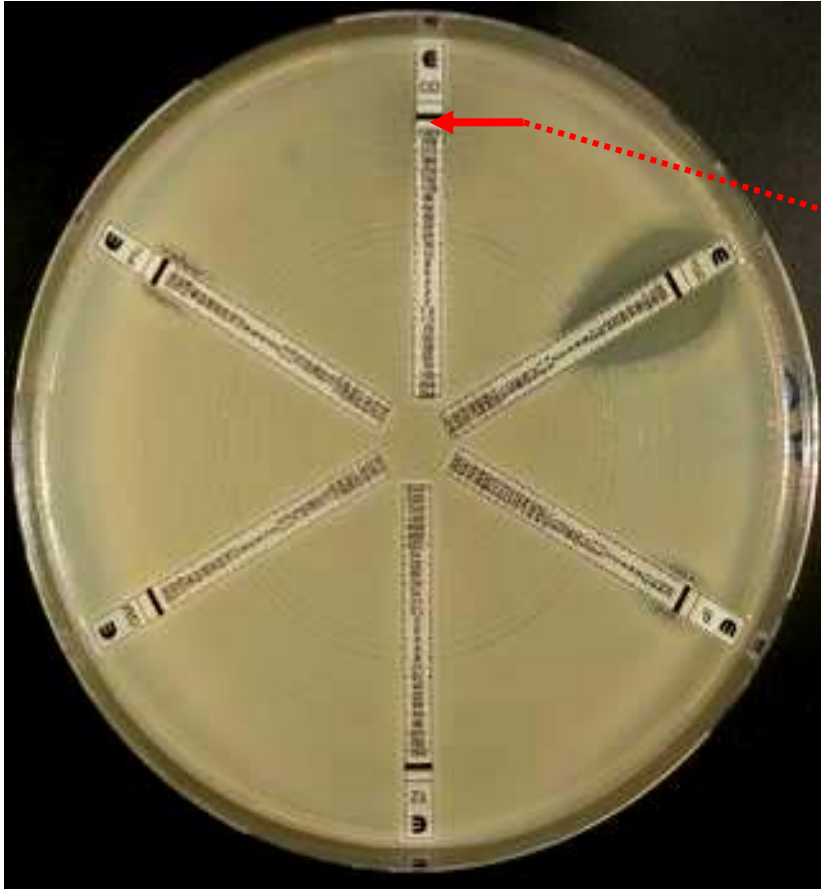
Tsunami A. baumannii İzolat - I Carbapenem-R (OXA 23)



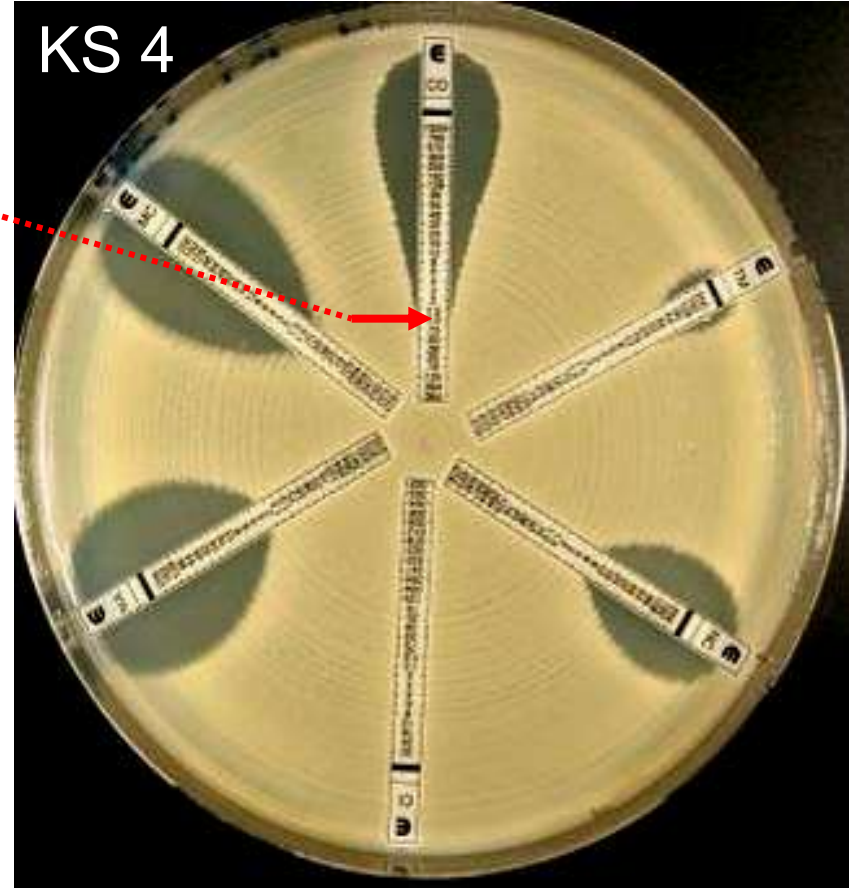
MHA üzerinde Ettest

MHA üzerinde Ettest+ 0.125µg/mL CO

Tsunami MDR A. baumannii İzolat - II
Carbapenem-R (MİK >32) ve Colistin-R (MİK >1024)



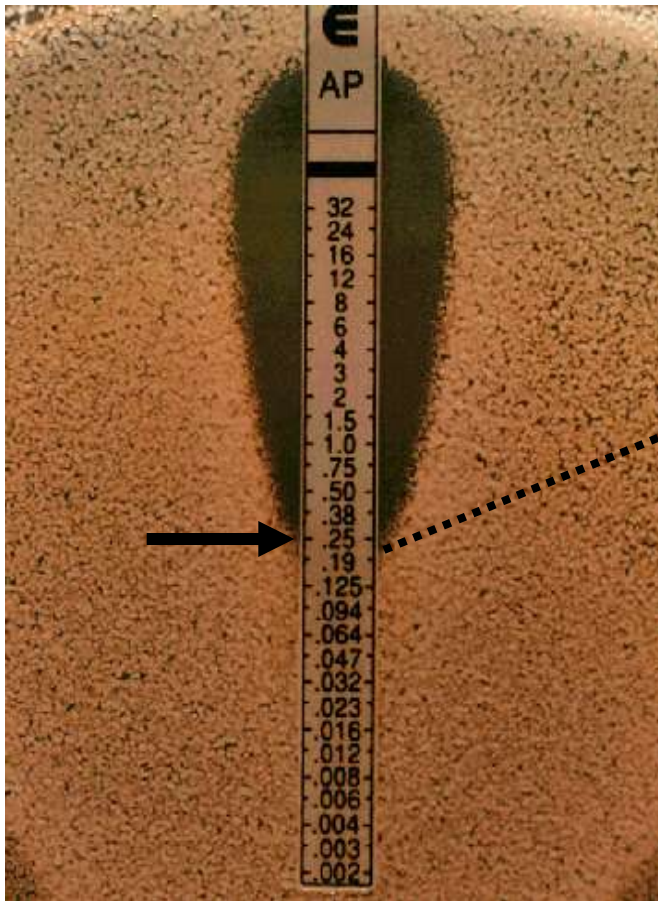
MHA üzerinde Etest



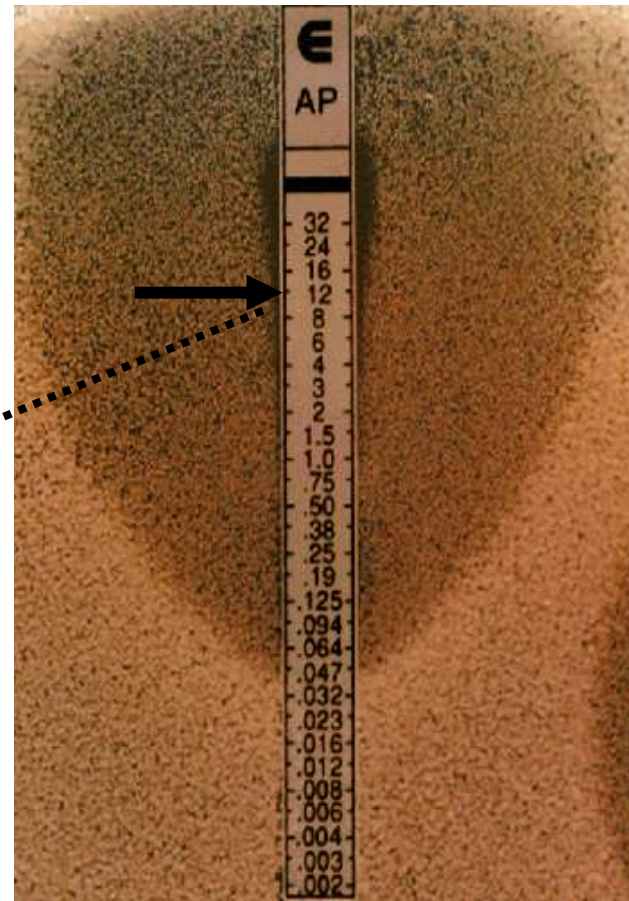
MHA üzerinde Etest +1µg/mL RI

Etest - Antifungal Kombinasyonları

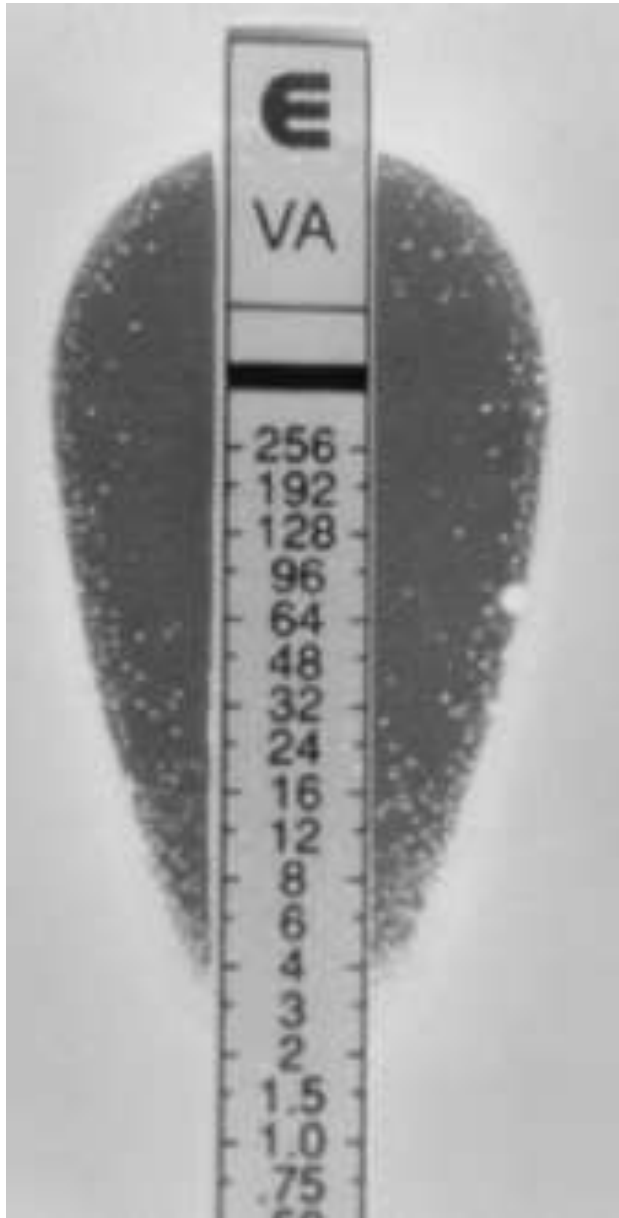
C. albicans ATCC 90028



Amfoterisin B tek başına



**Amfo + Flukonazol
ANTAGONİZM?**



Makrometod

Stafilokoklarda glikopeptid direnci /azalmış duyarlılık

- İlk kez 1997'de Japonya'da (Hiramatsu ve ark)
- Tüm dünyada vankomisin tedavi başarısızlıklarından sorumlu gösteriliyor.
- Ülkemizde %0-6 VISA; h VISA %17.7 (1.6-30)

Vankomisin sınır değerleri ($\mu\text{g/ml}$) (Yeni)

	S	I	R
CLSI MiK	≤ 2	4	≥ 8
EUCAST MiK	≤ 2	-	> 2
CLSI/ EUCAST Disk	Yok	Yok	Yok

CLSI tanımları

Kategori	Adlandırma	MİK ($\mu\text{g/ml}$)
Duyarlı	VSSA	≤ 2
Heterorezistan	hVISA/hGISA	1-2
“Intermediate”	VISA/GISA	4-8
Dirençli	VRSA (vanA)	≥ 16 (8)

Tanıda sıkıntılar: hVISA

- 1997 yılında Japonya'da saptanan ve vankomisine karşı heterojen duyarlılık azalması olan Mu3'teki dirençte bakterilerin vankomisin için MİK değerleri duyarlı sınırları içinde olsa da, topluluğun içindeki $1/10^6$ bakteri vankomisinin $> 4\mu\text{g/ml}$ (4-9 $\mu\text{g/ml}$)'lik konsantrasyonlarında üreyebilmektedir.

Tanıda sıkıntılar

- *Staphylococcus aureus* kökenlerindeki vankomisin direncinin rutin duyarlılık testlerinde belirlenmesi sorunludur.
- VISA ve hVISA kökenlerindeki hücre duvarı değişiklikleri bu durumun en önemli sebebi olarak gösterilmektedir.

- VISA, hVISA ve VRSA'nın hastalarda hızlı ve doğru tanımlanması
 - Enfeksiyon kontrol programlarının başlatılmasını sağlamak
 - Bu suşların seçilmesini ve yayılımını kontrol altına almak için önemlidir.



Ne zaman tarayalım?

- İnvaziv veya derin enfeksiyonu olan hastalarda
- S.aureus MİK= 2 µg/ml
- Vankomisin tedavi başarısızlığından şüpheleniliyorsa

Vankomisin Direncinin Saptanması

- Rutin laboratuvar yöntemleriyle vankomisin direncinin saptanması oldukça güçtür
- 2001'de yapılan bir çalışmada
 - Laboratuvarların %75'i kontrol suşları arasında yer alan vankomisine duyarlılığı azalmış bir *S. epidermidis* izolatını tanımlayamamıştır

Saptama Yöntemleri

• hGISA ve GISA tanısı için birçok yöntem savunulmuştur

– Otomatize yöntemler

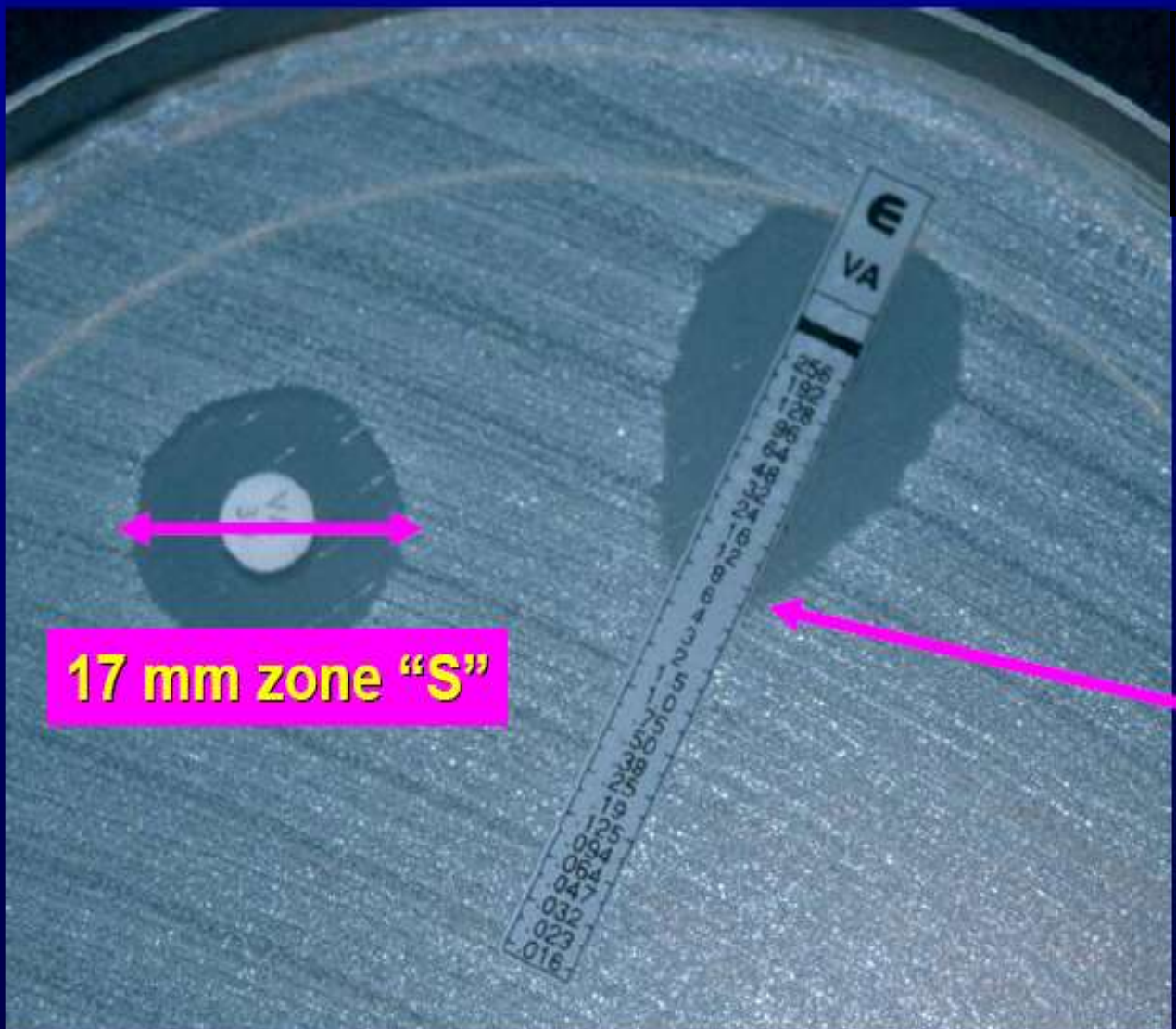
- Yüksek-seviye VA-dirençli S.aureus (MİK >32 µg/ml) tespiti için modifiye edilmiştir
- Bu yöntemler GISA ve hGISA tespiti için yeterli değildir

Saptama Yöntemleri

Disk difüzyon

- Vankomisin disk difüzyon testi sadece *van-A* geni taşıyan *S.aureus* suşlarını saptamak için uygulanabilir (bu suşlarda zon oluşmamaktadır, $\leq 6\text{mm}$)
- VSSA ve VISA suşları disk difüzyon testi ile ayrılamamaktadır
- Uygun olmayacağı hızlıca anlaşıldığından diğer yöntemler teklif edilmiştir
 - Örneğin :Tarama plakları

VISA - falsely "S" by previous (CLSI M100-S18) vancomycin disk diffusion breakpoints...



	S	I	R
Vankomisin	≤2	4-8	≥16

S. aureus

17 mm zone "S"

MIC – 8 μg/ml "I"

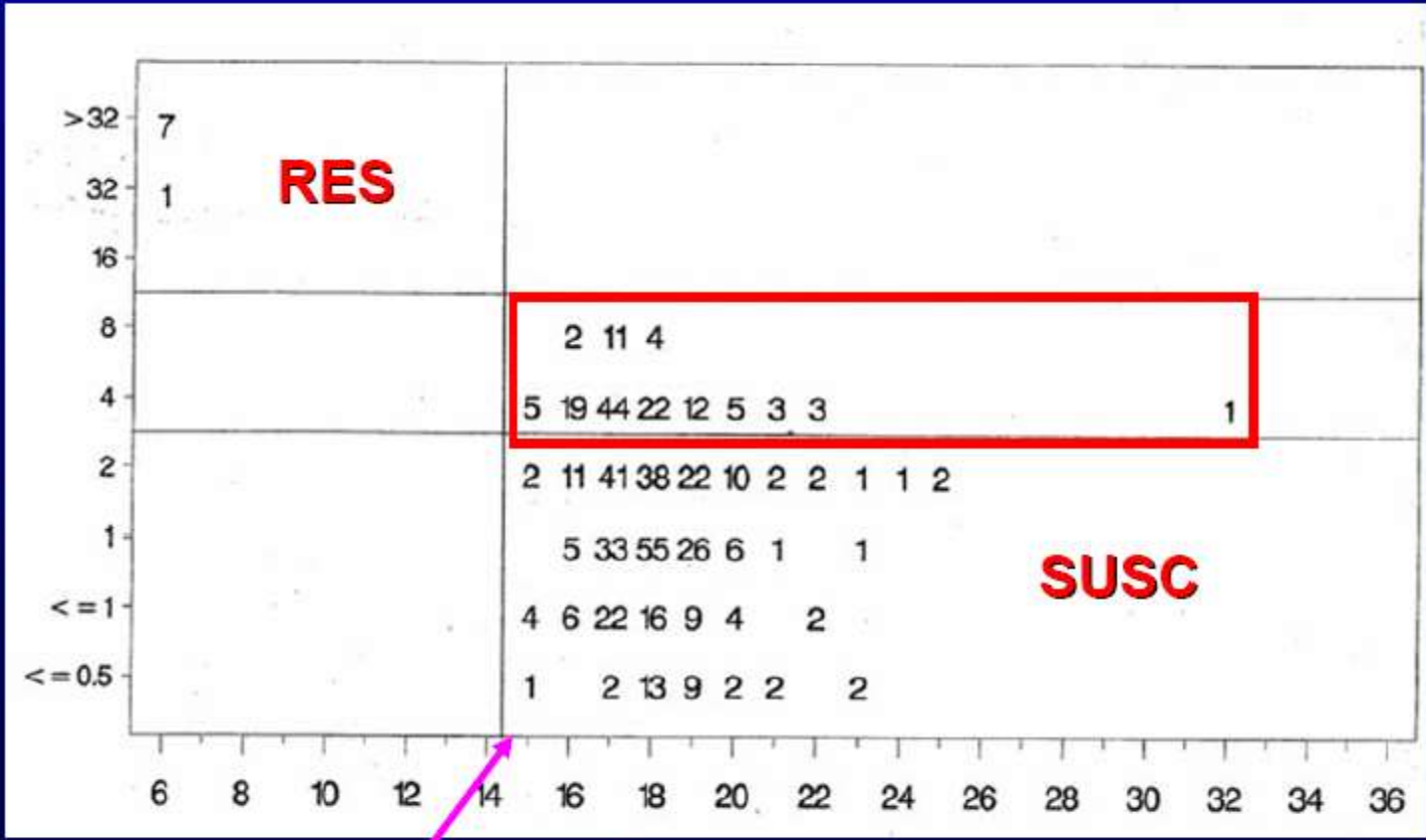
Photo courtesy of S. Munro

	S	I	R
Vankomisin	≤2	4-8	≥16

Vancomycin Zone Diameter vs. MIC *S. aureus*

VRSA {
VISA {
VSSA {

Vancomycin MIC (μg/ml)



former (2008) 15 mm cutoff

Vancomycin Zone (mm)

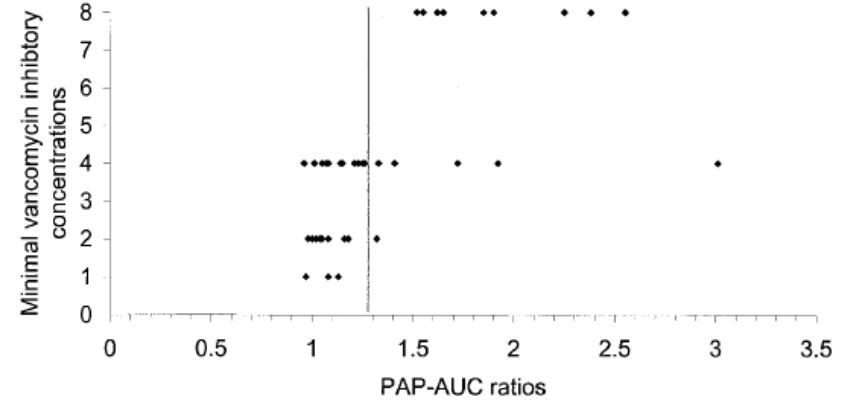
Saptama Yöntemleri



Tarama Plakları ve hVISA

- BHIA ve MHA
- Bakteri süspansiyonunun konsantrasyonu; 2.0 ve 0.5 McFarland
- Uygulanacak inokulum miktarı; 100 ve 10 μ l
- Besiyerindeki glikopeptid miktarı; 6, 5 veya 4 μ g/ml (vankomisin ve teikoplanin)
- Duyarlılık %58 - %98, özgüllük %68 - %97

Saptama Yöntemleri



Populasyon Analiz Profili

- VISA ve hVISA suşlarının saptanmasında önerilen yöntem
- hVISA identifikasyonu için AUC hesaplamaları ile beraber referans metot olarak kabul edilmekte

Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2001) 47, 399-403

JAC

A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital

M. Wootton*, R. A. Howe, R. Hillman, T. R. Walsh, P. M. Bennett and A. P. MacGowan

Populasyon Analiz Profili

- İncelenecek suş BHI broth'da 24 saat inkübe edilir
- 10^{-3} ve 10^{-6} düzeyinde tuzlu suda kültür dilüe edilir
- İçerisinde 0.5, 1, 2, 2.5 ve 4 mg/l vankomisin içeren BHIA plaklarına spiral bir dağıtıcı aracılığı ile aktarılır
- 37°C da 48 saatlik inkübasyondan sonra oluşan koloniler sayılır
- Üreyen bakteri sayısı ile AUC hesaplaması yapılır

Populasyon Analiz Profili

Saptanan PAP-AUC hesabının sonucu

- < 0.9 ise VSSA
- $0.9-1.3$ ise hVISA
- > 1.3 ise VISA olarak değerlendirilmekte

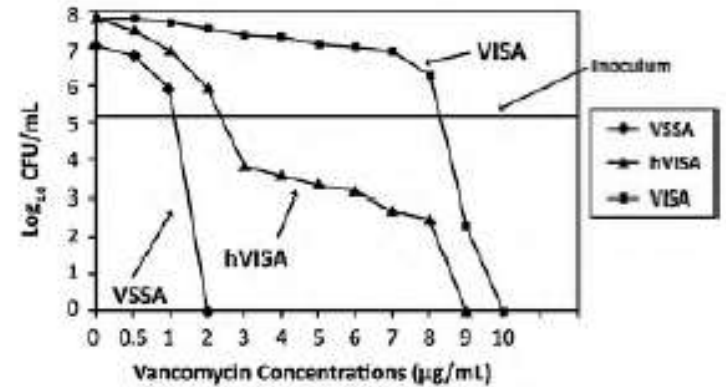


Fig. 1. Population analysis of vancomycin-susceptible *Staphylococcus aureus* (VSSA), vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA) and heterogeneously vancomycin-intermediate *S. aureus* (hVISA) isolates. Inoculum for broth microdilution tests is 5×10^5 CFU/mL. CFU, colony-forming units.

Populasyon Analiz Profili

- PAP
 - Zaman alıcı
 - Özel ekipman gerekli
 - Pahalı
- Acil değerlendirmeler için daha basit laboratuvar tarama teknikleri gerekli
- **Makro E-test yöntemi** rutin laboratuvar koşullarında hVISA suşlarını saptamakta önerilmektedir

Makro E-test yöntemi

- VRSA ve VISA saptanması yanı sıra hVISA saptanmasında da yararlı
- Agar tarama testlerine göre hVISA suşlarını saptamada daha yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip

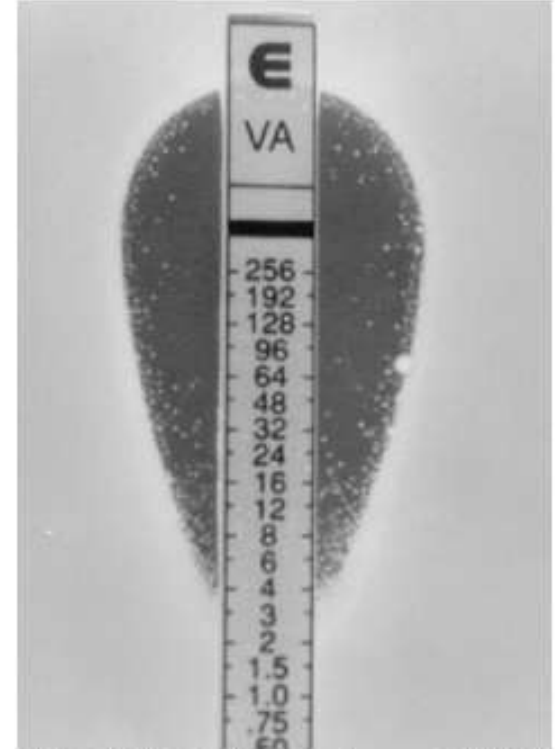


FIG. 1. Typical Etest result when using the macromethod of Mu50 possessing a PAP-AUC of 1.51. The microcolonies appear only after the plates have been incubated for 48 h. In this particular instance and under these conditions, cells can grow at up to a vancomycin concentration of 48 µg/ml.

Evaluation of Current Methods for Detection of Staphylococci with Reduced Susceptibility to Glycopeptides

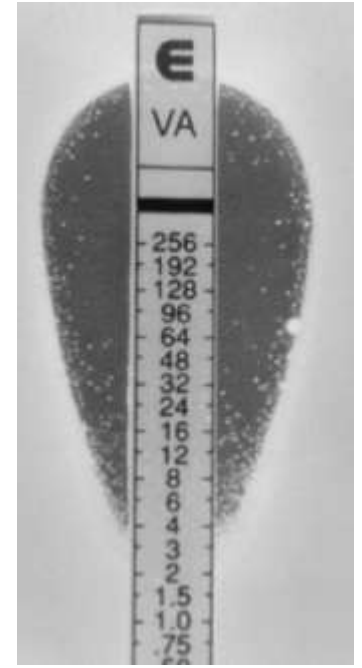
TIMOTHY R. WALSH,^{1*} ANNE BOLMSTROM,² ANETTE QWARNSTROM,² PHION HO,²
MANDY WOOTTON,² ROBIN A. HOWE,² ALASDAIR P. MacGOWAN,²
AND DAN DIEKEMA⁴

hVISA suşlarının Makro E-test yöntemi ile gösterilmesi

- MH broth'da bir gece inkübe edilen suşlar

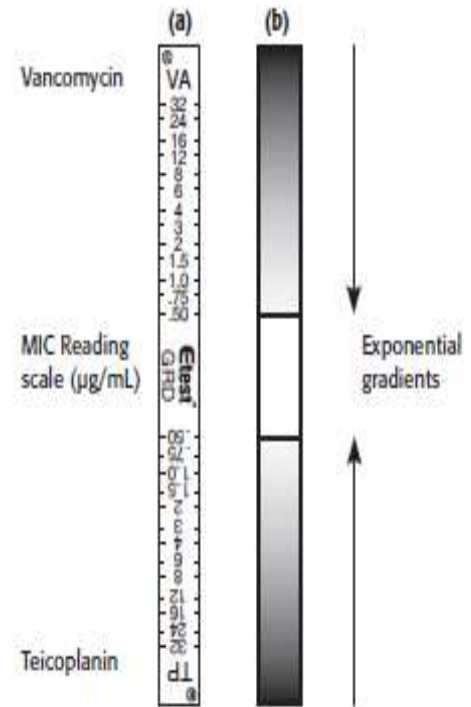
2 McFarland yoğunluğunda ayarlanır

- 200µl örnek BHIA'a yayılır
- Vankomisin ve Teikoplanin E-test stripleri yerleştirilir
- Plaklar 48 saat 37°C da inkübe edilerek CLSI göre yorumlanır.



GRD Strip (İki Taraflı E-test Stripi)

- Glikopeptid direnci saptamaya yönelik geliştirilmiş
- Vankomisin ve Teikoplanin aynı stripte yer almakta
- Agar olarak MHA önerilmekte
- 0.5 McFarland bakteri yoğunluğu
- 48 saat 35°C de inkübasyon



- 48 saatin sonundaki deęerlendirmede
- VISA veya hGISA için cut-off değerleri
 - Teikoplanin veya vankomisin >8 mg/l
- Standart yöntem ile
 - Vankomisin MIK ≥ 4 mg/l ise VISA
 - Vankomisin MIK <4 mg/l ise hVISAolarak yorumlanır.

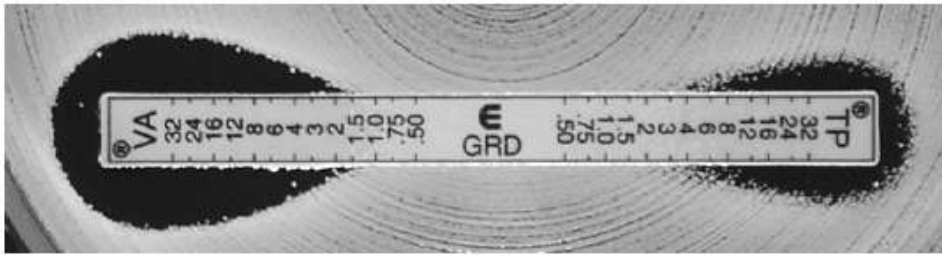


Figure 3. *S. aureus* 78 (hGISA) (VA 1.5, TP 8)



Figure 4. *S. aureus* 63 (GISA) (VA 8, TP >32)

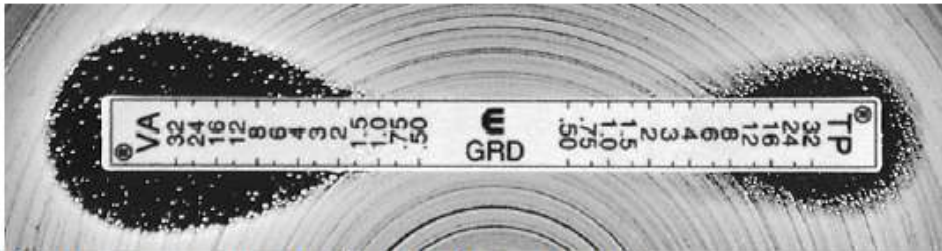


Figure 5. *S. aureus* 100 (hGISA) (VA >32, TP 12)

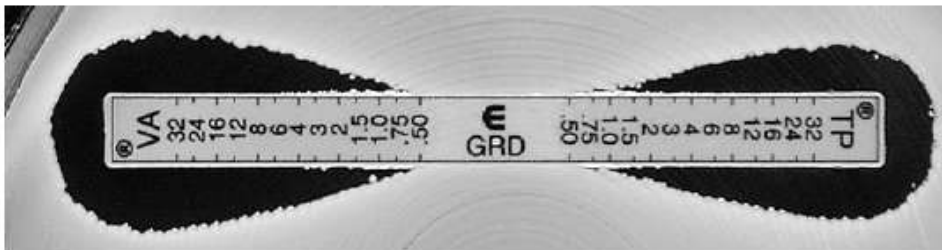


Figure 6. *S. aureus* ATCC 29213 (MSSA) (VA 1, TP 1)



E Test GRD stripleri (MHB)

%5 Kanlı Mueller Hinton Agar

0.5 Mc Farland inokulum

24 ve 48 saatte değerlendirme:

GRD vanko/ Teiko $\geq 8 \mu\text{g/ml}$; standart $\text{MIK} \geq 6 \mu\text{g/ml}$ (GISA);

GRD vanko/ Teiko $\geq 8 \mu\text{g/ml}$; standart $\text{MIK} \leq 4 \mu\text{g/ml}$ (hGISA);



E Test GRD; Mu3 (h VISA)



E Test GRD; Mu50 (VISA)

E-VA/TP+S stripleri

- hGISA üremesini arttırmak için
 - VA+TP çift- taraflı gradiyent stribe bir besin maddesi eklenerek üreme kuvvetlendirilmiş (E-VA/TP +S)
- Standart inokulum ve agar:
 - 0.5 McFarland standart
 - MHA +%5 Kan (MHB)
 - 18, 24 ve 48 saatte

Test	Medium	Time of reading (h)	Detection (%)		
			Sensitivity	Specificity	
Etest GRD strips	E-VA/TP	MHA	24	53	100
			48	80	95
	MHB	24	55	100	
		48	89	95	
	E-VA/TP+S	MHA	24	63	100
			48	84	95
	MHB	24	70	100	
		48	94	95	
E-M	BHI/2 McFarland	24	80	87	
		48	94	96	
Agar screens	VA/BHI	48	27	100	
	TP/MH	48	65	95	

Hassaslık ve Özgüllük

- hGISA/GISA tespiti için 48.saatte okunan MHB üzerindeki GRD stribi en yüksek hassasiyete sahiptir (%94)
- 48.saatte okunan GRD'nin hassasiyeti 24.saatten daha fazladır (SCV-Küçük koloni değişiklikleri görünür hale gelir)
- Pozitifler 24 saatte rapor edilebilir fakat negatiflerin 48.saatte konfirme edilmesi gereklidir
- 48 saat inkübasyondan sonra tüm yöntemler %95-96 özgüllük verir

Tekrarlanabilirlik

Strain(s) ^a	% Correct phenotype							
	Etest GRD (48 h)				E-M (BHI/2 McFarland)	Agar screen		
	E-VA/TP		E-VA/TP+S			VA/BHI	TP/MH	
	MH	MHB	MH	MHB				
GISA	100	100	100	100	100	87	93	
hGISA	81	95	89	98	92	12	58	
5 ATCC strains	100	100	100	100	100	80	100	

^a For GISA, 15 isolates were tested in triplicate; for hGISA, 60 isolates were tested in triplicate; and for the five ATCC reference strains, 25 isolates were tested in triplicate.

GISA: E-M ve GRD için %100 fakat VA/BHI %87 ve TP/MHA %93

Agar tarama hGISA tespiti için hassaslık açısından güvenilir olmamakla beraber tekrarlanabilirliği düşüktür

Tekrarlanan hGISA tespiti için en iyi performans GRD idi – 48 saatte tekrarlanabilirlik %98

hVISA Tarama Yöntemleri

Method	Sensitivity	Specificity
Vancomycin broth MIC ^b	11%	100%
BHIA + vancomycin at 6 µg per ml, 10 µl of a 0.5-McFarland-standard suspension (BHIA6V) ^c	48 h, 4.5–12%	48 h, 68–100%
MHA + teicoplanin at 5 µg per ml, 10 µl of a 2-McFarland-standard suspension (MHA5T) ^d	48 h, 65–79%	48 h, 35–95%
MHA + teicoplanin at 5 µg per ml, 10 µl of a 2-McFarland-standard suspension ^e	48 h, 98%	48 h, 53%
MHA + vancomycin at 5 µg per ml, 10 µl of a 0.5-McFarland-standard suspension	48 h, 1–20%	48 h, 59–99%
Simplified PAP ^f	48 h, 71%	48 h, 88%
Macromethod Etest (MET)	48 h, 69–98.5%	48 h, 89–94%
Etest GRD	24 h, 70–77%	24 h, 98–100%
	48 h, 93–94%	48 h, 82–95%

hVISA Tarama Yöntemleri

TABLE 3. Comparison of two reference and six commercial susceptibility testing methods and discrepancies for categorization of 129 *S. aureus* isolates compared with categorization by BMIC-Difco reference method

Method or system	No. (%) ^a of isolates categorized as:		No. (%) of isolates with overall category agreement (<i>n</i> = 129)	No. of discrepancies by test method		
	Susceptible (<i>n</i> = 84)	Intermediate (<i>n</i> = 45)		VISA categorized as susceptible	VISA categorized as resistant	Susceptible isolate categorized as VISA
BMIC-BBL	83 (98.8)	40 (88.9)	123 (95.3)	5		1
Agar dilution	82 (97.6)	31 (68.9)	113 (87.6)	14		2
Etest	73 (86.9)	44 (97.8)	117 (90.7)	1		11
MicroScan	74 (88.1)	45 (100)	119 (92.2)			10
Phoenix	64 (76.2)	45 (100)	109 (84.5)			20
Sensititre ^b	84 (100)	29 (64.4)	113 (89.0)	13	1	
Vitek Legacy ^c	83 (100)	0 (0)	83 (64.8)	35	10	
Vitek 2	82 (97.6)	35 (77.8)	117 (90.7)	10		2

^a The percentage is based on 84 susceptible strains and 45 VISA strains.

^b The final number of results was 127 (84 susceptible, 43 intermediate) because of insufficient growth of two isolates in the test panel.

^c The final number of results was 128 (83 susceptible, 45 intermediate) because of insufficient growth of one isolate in the test panel.

Sonuç

- Etest GRD stribi, E-M ve referans PAP-AUC kadar iyi performans göstermektedir
- Standart rutin diagnostik test basitliğindedir
- Tedavi yanıtının tahmininde göreceli olarak daha güvenilirdir
- hGISA fenotipli suşlarda daha yüksek MİK değerleri vermektedir