

Güncel Direnç Mekanizmalarına İlişkin Ek Testler

Zeynep Gülay

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İzmir

Ek Testler: Amaç

- Rutin testlerde atlanabilecek “silik” direnç mekanizmalarını ortaya koymak
- Beklenmeyen direnç paternlerini doğrulamak
- Sık kullanılmayan antimikrobiyal ajanlara duyarlılığı saptamak
- Tedavi başarısını arttırabilmek için en doğru duyarlılık sonuçlarını elde etmek!

Konular

- ❑ **Gram negatifler**
- ❑ GSBL tarama ve doğrulama testleri:Yeni CLSI önerileri
- ❑ Karbapenemaz üreten suşlar için tarama testleri
- ❑ **Gram pozitifler**
- ❑ Stafilokoklarda oksasilin direnci
- ❑ VISA ve VRSA saptanması
- ❑ İndüklenebilir klindamisin direnci için D testi
- ❑ Enterokoklarda vankomisin direnci ve yüksek düzey aminoglikozid direnci saptanması
- ❑ **Yeni veya yeniden önem kazanan antibiyotikler: duyarlılık testleri**

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar

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

Soru 1

CLSI: Yeni öneriler



- Sınır değerler düşürüldü
- GSBL tanımlaması sadece enfeksiyon kontrolü amacıyla öneriliyor.
- Rutin hizmet için GSBL tanımlamaya gerek yok! deniyor...
 - Vakit kaybına gerek yok: MİK ne kadar düşükse; tedavi olasılığı o kadar yüksektir.
 - Bazı mikroorganizmalarda tanımlama için vakit kaybedilmektedir

Antibiyotik	Eski M100-S19 (2009) MİK değerleri mg/L			Yeni M100-S20 (2010) MİK değerleri mg/L		
	Duyarlı (S)	I	Dirençli (R)	Duyarlı (S)	I	Dirençli (R)
Sefazolin	≤ 8	16	≥ 32	≤ 1	2	≥ 4
Sefotaksim	≤ 8	16-32	≥ 64	≤ 1	2	≥ 4
Seftizoksim	≤ 8	16-32	≥ 64	≤ 1	2	≥ 4
Seftriakson	≤ 8	16-32	≥ 64	≤ 1	2	≥ 4
Seftazidim	≤ 8	16	≥ 32	≤ 4	8	≥ 16
Aztreonam	≤ 8	16	≥ 32	≤ 4	8	≥ 16

Antibiyotik	Eski M100-S19 (2009) Disk difüzyon zon çapları (mm)			Yeni M100-S20 (2010)) Disk difüzyon zon çapları (mm)		
	Duyarlı (S)	I	Dirençli (R)	Duyarlı (S)	I	Dirençli (R)
Sefazolin	≥ 18	15-17	≤ 14	-	-	-
Sefotaksim	≥ 23	15-22	≤ 14	≥ 26	23-25	≤ 22
Seftizoksim	≥ 20	15-19	≤ 14	≥ 25	22-24	≤ 21
Seftriakson	≥ 21	14-20	≤ 13	≥ 23	20-22	≤ 19
Seftazidim	≥ 18	15-17	≤ 14	≥ 21	18-20	≤ 17
Aztreonam	≥ 22	16-21	≤ 15	≥ 21	18-20	≤ 17

EUCAST

- Sefotaksim
- Seftazidim
- Sefepim
- Seftriakson

≤ 1 (S)

> 2 (R) (CTX, CRO)

> 4 (R) (CAZ, FEP, ATM)

Ancak öneriler CLSI gibi uygulanacaktır.

Çekinceler

- Daha önceki klinik başarısızlık örnekleri
- Daha önce yorum yapılıyordu: şimdi tüm beta-laktamlar rutinde kullanılacak mı?
- MİK değerlerinde ± 1 dilüsyon fark zaten normal kabul ediliyor: Kesin ve doğru sonuç verilmesi ??? Tedaviye yansıması???
- Gerek yok denince laboratuvarlar tanımlama yapacak mı? Enfeksiyon kontrolü yönü!!!



CLSI notu. 2010 kriterleri lab.a girene kadar
M100-S19 kriterleri uygulanabilir

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

GSBL saptanması/CLSI önerileri

Antibiyotik*	Disk tarama (mm)	MİK tarama (mg/L)
Sefpodoksim	≤ 17	≥ 8 (2)**
Seftazidim	≤ 22	≥ 2
Sefotaksim	≤ 27	≥ 2
Seftriakson	≤ 25 (NA)**	≥ 2 (NA)**
Aztreonam	≤ 27 (NA)**	≥ 2 (NA)**

*: Disk içeriği 30 μ g

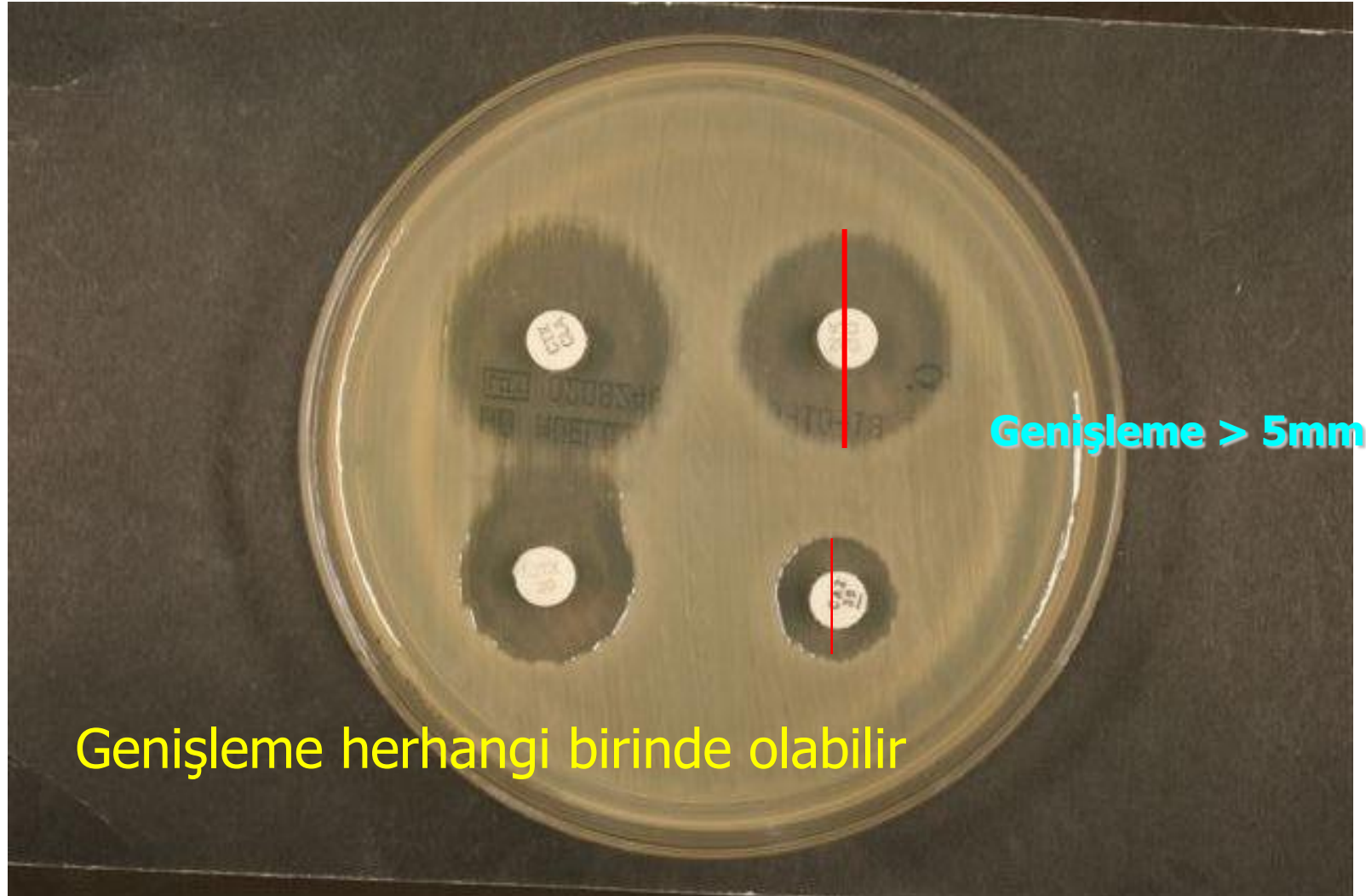
()**: *Proteus mirabilis* için özel
CLSI M100 S19, 2009

Doğrulama testleri

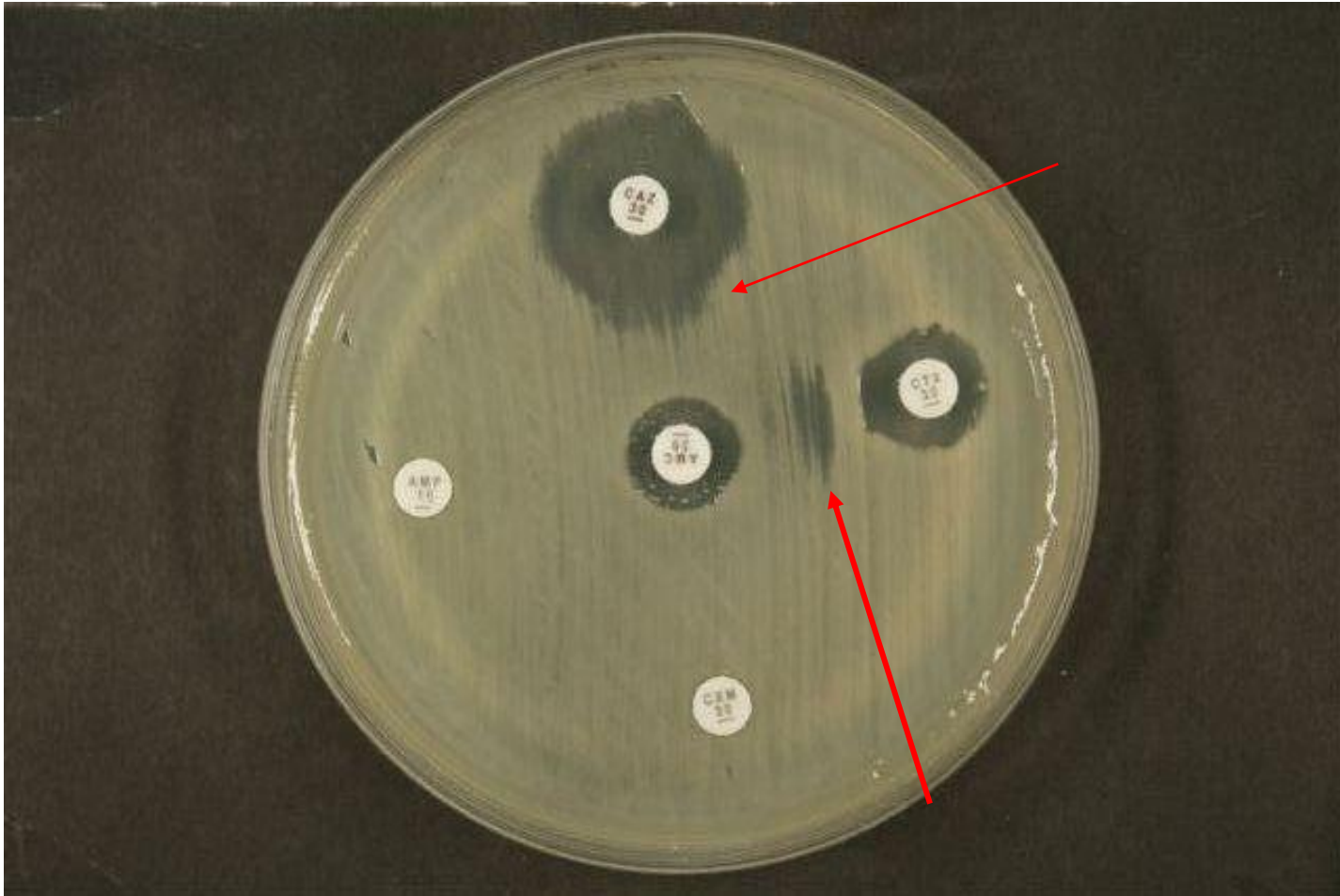
	Disk içeriği	Yorum	MİK dağılımı (mg/L)	Yorum
CAZ	30 μ g	--	0.25-128	--
CAZ +klav	30 μ g+ 10 μ g	≥ 5 mm= GSBL	0.25/4- 128/4	≥ 3 log 2 dil= GSBL
CTX	30 μ g	--	0.25-128	--
CTX+klav	30 μ g+ 10 μ g	≥ 5 mm= GSBL	0.25/4- 128/4	≥ 3 dil= GSBL

=8 kat azalma

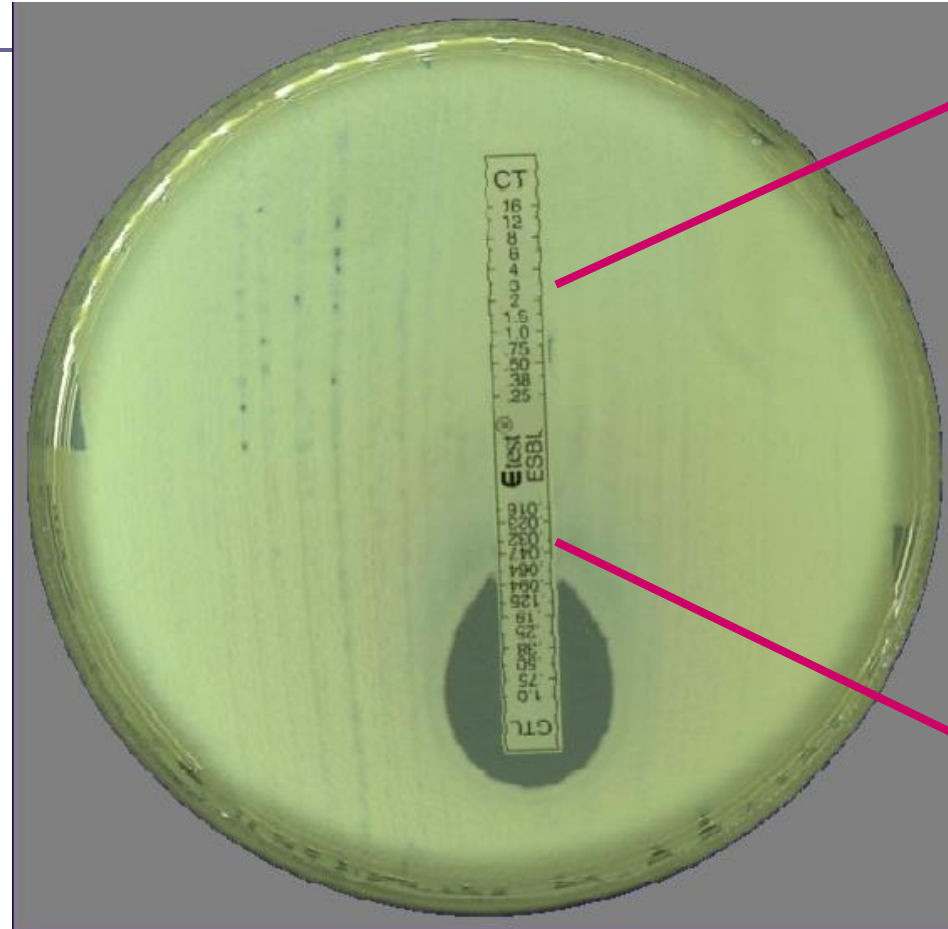
Kombinasyon diskleri: CAZ+ klav CTX+ Klav (Ticari olarak bulunuyor)



Çift disk sinerji (Jarlier V, 1988)



GSBL için E Test™



Sefotaksim

Sefotaksim
+
Klavulanik
A.

GSBL Raporlanması



Görülen antibiyogram:

Sefepim (S), sefotaksim(S)
aztreonamR, seftazidimR,
sefoksitinS

Sonuç: GSBL pozitif *E.coli*

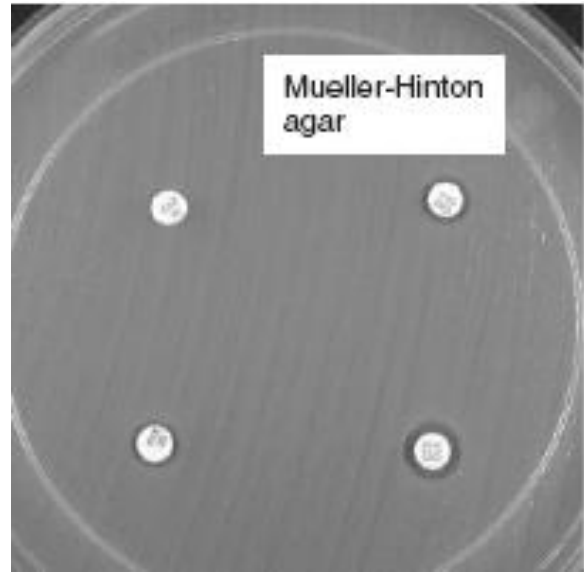
**Verilen antibiyogram: Sefepim,
sefotaksim, aztreonam, seftazidim,
diğer 3.kuşak vb (R),
sefoksitin: raporlanmaz**

Karbapenemler
dışındaki tüm beta-
laktamlar dirençli
olarak bildirilir

GSBL saptanması: Manuel ve otomatize sistemler

Yöntem	Duyarlılık	Özgüllük	PPV	NPV
Microscan	83.4	72.9	81.6	75.5
Phoenix	98.8	52.2	75.0	96.6
Vitek 2	85.9	78.0	84.9	79.3
ÇDS	94.1	81.4	87.9	90.6
Kombine Disk	92.9	96.6	97.5	90.5
ETest	94.1	84.7	89.9	90.9

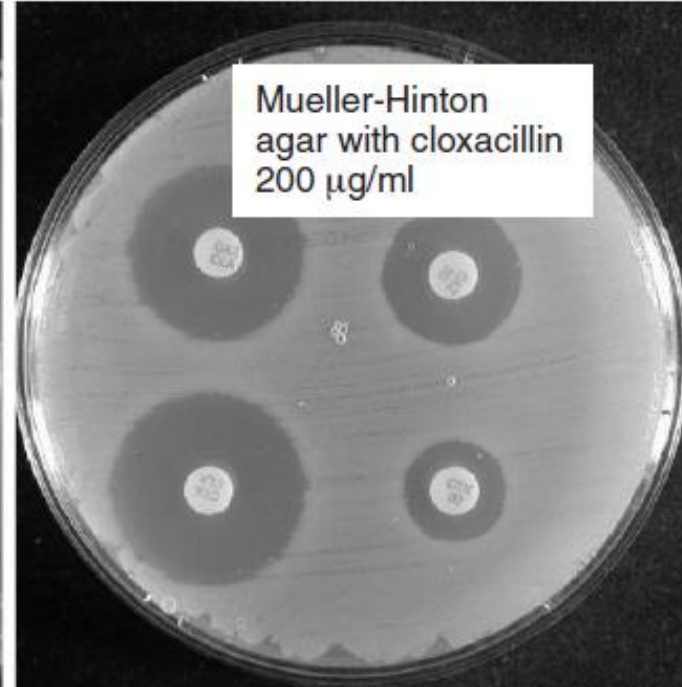
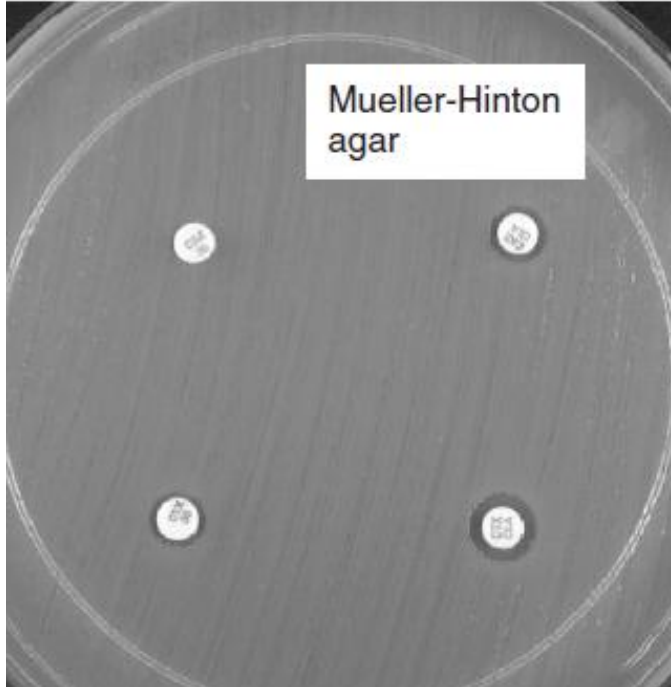
CLSI Kombine disk yöntemi



Plazmid Kökenli AmpC aşırı üreten
bir bakteri: GSBL de yapıyor mu?

Zon genişlemesi= 2 mm

EVET



**Kloksasilin AmpC'yi
inhibe eder. Sonuçlar
görülür**

AmpC yapan türlerde GSBL

- AmpC'den etkilenmeyen substratların kullanılması
 - Sefepim (ÇDS veya ETest™)
- AmpC inhibitörlerinin kullanılması
 - Kloksasilin (MHA 200 mg/ml veya 100/500 µg/disk ile ÇDS)
 - Boronik asit ve türevleri (300-500-600 µg/disk): Kombine disk veya ÇDS

AmpC ile beraber GSBL saptandığında

- **Enterobacter cloacae üredi- İzolat GSBL üretmektedir. Temas izolasyonu önerilir**

■ Amikacin	S	
■ Cefazolin	R	
■ Ampicillin	R	
■ Ceftazidime		R
■ Cefepime		R
■ Ceftriaxone		R
■ Gentamicin	S	
■ Levofloxacin		S

Karbapenem direnci

- Ertapenem, imipenem, meropenem, doripenem
- Bazı bakteriler doğal olarak daha az duyarlı: *Acinetobacter*, *P. aeruginosa*
- Bazılarında edinilmiş direnç söz konusu – *K. pneumoniae*, diğer Enterobacteriaceae
- Direnç mekanizmaları: Karbapenemazlar
 - Sınıf A karbapenemazlar (KPC, GES, SME,...)
 - Sınıf B metallo- β -laktamazlar (IMP, VIM, SPM, NDM-1...)
 - Sınıf D oxa 23, -40, -51, -58, 48

Karbapenem direnç mekanizmaları

□ Ayrıca

- Sınıf A GSBL'ler (CTX-M) + geçirgenlikte azalma
- Sınıf C (Yüksek düzey AmpC) + geçirgenlikte azalma

□ Bu mekanizmalar ertapenem >> meropenem veya imipenem

Karbapenemazlar

Sınıf	Enzim	En sık görülen tür
Sınıf A	KPC, SME, IMI, NMC, GES	Enterobacteriaceae (<i>P. aeruginosa</i> 'da nadir)
Sınıf B (metallo- β - laktamaz)	IMP, VIM, GIM, SPM, IND, NDM- 1	<i>P. aeruginosa</i> Enterobacteriaceae <i>Acinetobacter</i> spp.
Sınıf D	OXA	<i>Acinetobacter</i> spp. Enterobacteriaceae (OXA-48)

Soru 2 ve 3

KARBAPENEMAZLAR

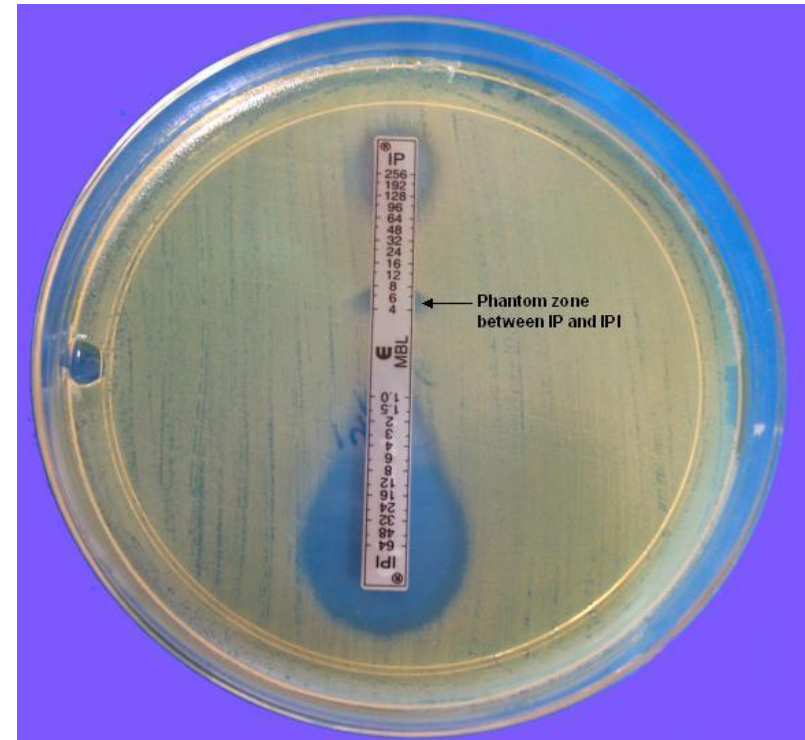
- Saptanmaları çok önemli çünkü GSBL (+) se ilk tedavi seçeneği
- Bu direnç mekanizmalarını edinen bakteriler tüm karbapenemlere dirençli olacaktır **fakat testlerde duyarlı gözükebilirler.**
- Plazmid ve integron kökenliler kolayca yayılmakta infeksiyon kontrolü için saptanmaları gereklidir
- **GSBL (+) lerde atlanmamalı!**

Metalloenzim tanımlanması

- Tanımlanmalarında aktif bölgedeki Zn iyonuna bağlanarak enzimi inaktive eden bileşikler kullanılır: EDTA, dipikolinik asit, tiyol bileşikleri gibi

**İmipenem
/EDTA ile
MİK'de**

**>8 veya >3
log₂
dilüsyon
azalma**



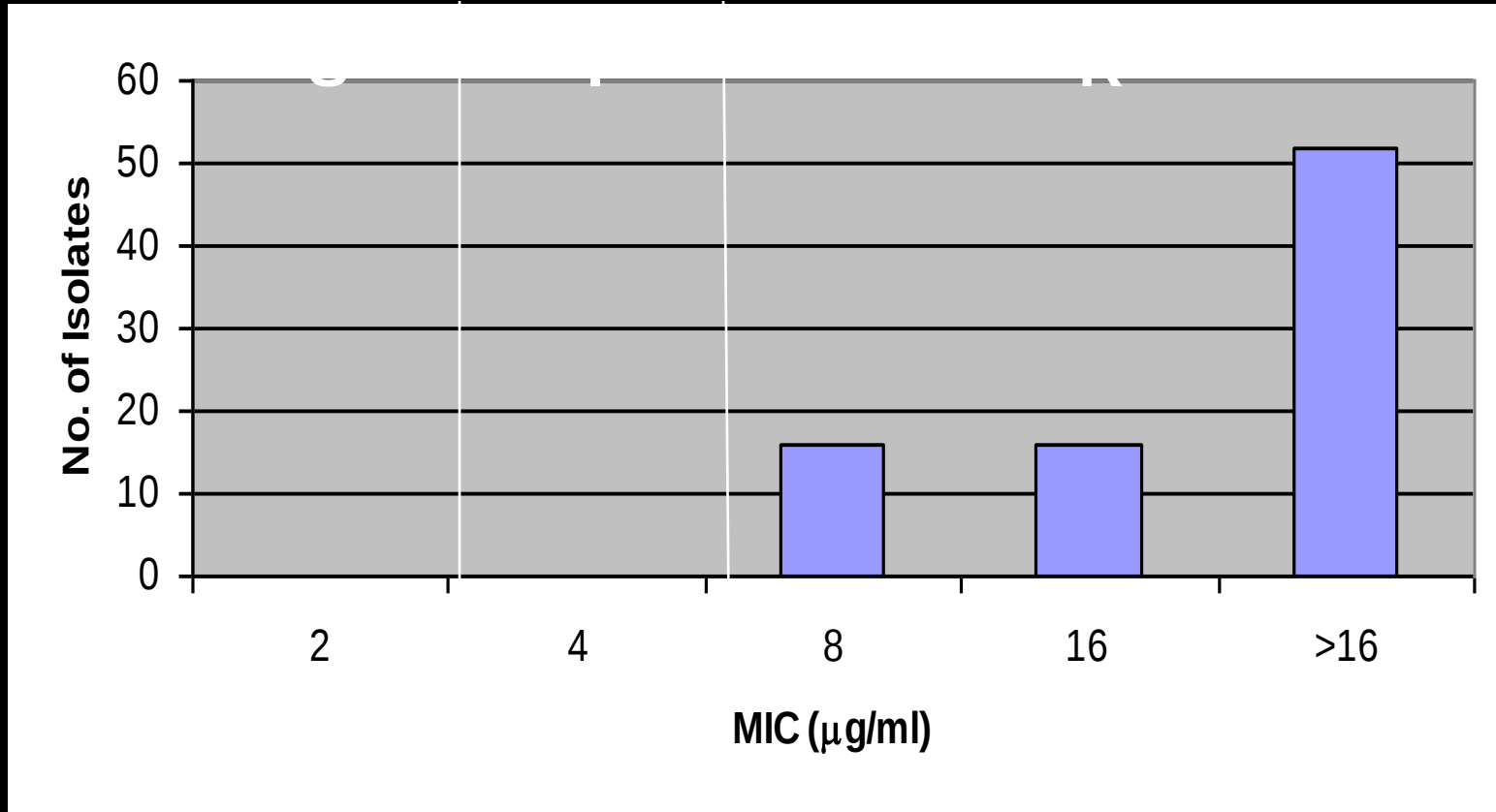
OXA-tipi karbapenemazlar

- ❑ Serin beta-laktamazlardır
- ❑ Klavulanik asit ile inhibe olmazlar
- ❑ İn vitro olarak NaCl ile inhibe olurlar
- ❑ Karbapenemleri genellikle düşük düzeyde etkilerler
- ❑ 3. Kuşak sefalosporinleri etkilemezler*
- ❑ En sık *Acinetobacter* spp. Fakat *Enterobacteriaceae*'de de yayılmaya başladı.

Klebsiella *Pneumoniae* *Carbapenemase* (KPC)

- Sınıf A beta-laktamazlar (KPC 2-11)
 - Karbapenemler ve 3. Kuşak sefalosporinler dahil olmak üzere **TÜM** beta-laktamlara direnç yol açar
- Özellikle ABD'de Enterobacteriaceae üyelerinde bildirilmiş---- Tüm dünya
- Saptanması güç: imipenem ve meropenem (S) olabilir; ertapenem daha iyi bir göstergedir.
- Boronik asit ile inhibe olur (Amp C tipi enzimlere DİKKAT!: kloksasilin/oksasilin inhibisyonu*)

KPC üreten izolatların ertapenem duyarlılığı



İzolatların hepsi ertapeneme dirençli

2010 yılı CLSI karbapenem sınır değerleri

	Önceki sınır değerler		Yeni sınır değerleri (2010)	
Karbapenem	MİK mg/L	Disk (mm)	MİK	Disk
Ertapenem	≤ 2 - ≥ 8	≥ 19 - ≤ 15	≤ 0.25 - ≥ 1	≥ 23 - ≤ 19
İmipenem	≤ 4 - ≥ 16	≥ 16 - ≤ 13	≤ 1 - ≥ 4	≥ 23 - ≤ 19
Meropenem	≤ 4 - ≥ 16	≥ 16 - ≤ 13	≤ 1 - ≥ 4	≥ 23 - ≤ 19
Doripenem	-	-	≤ 1 - ≥ 4	≥ 23 - ≤ 19

I/R olan hastalar için MHT uygulanacaktır

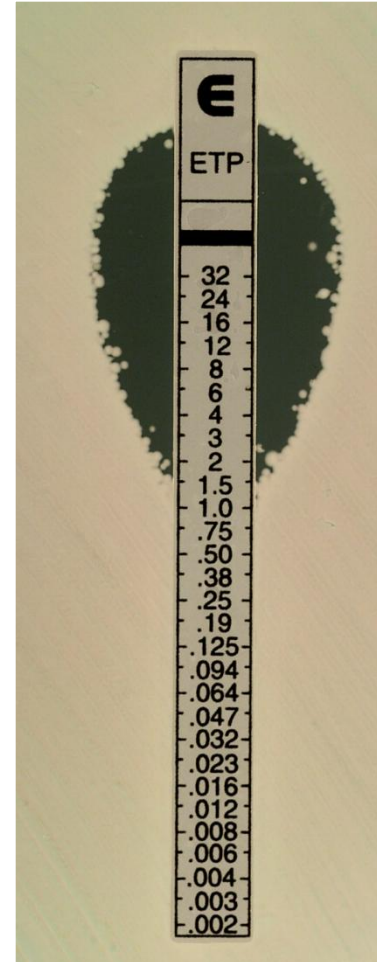
Karbapenemazlar: Ne zaman şüphelenelim?

Karbapenemlere duyarlılığı
azalmış (inhibisyon zonu
I/R; ERT 22 mm ve altı),

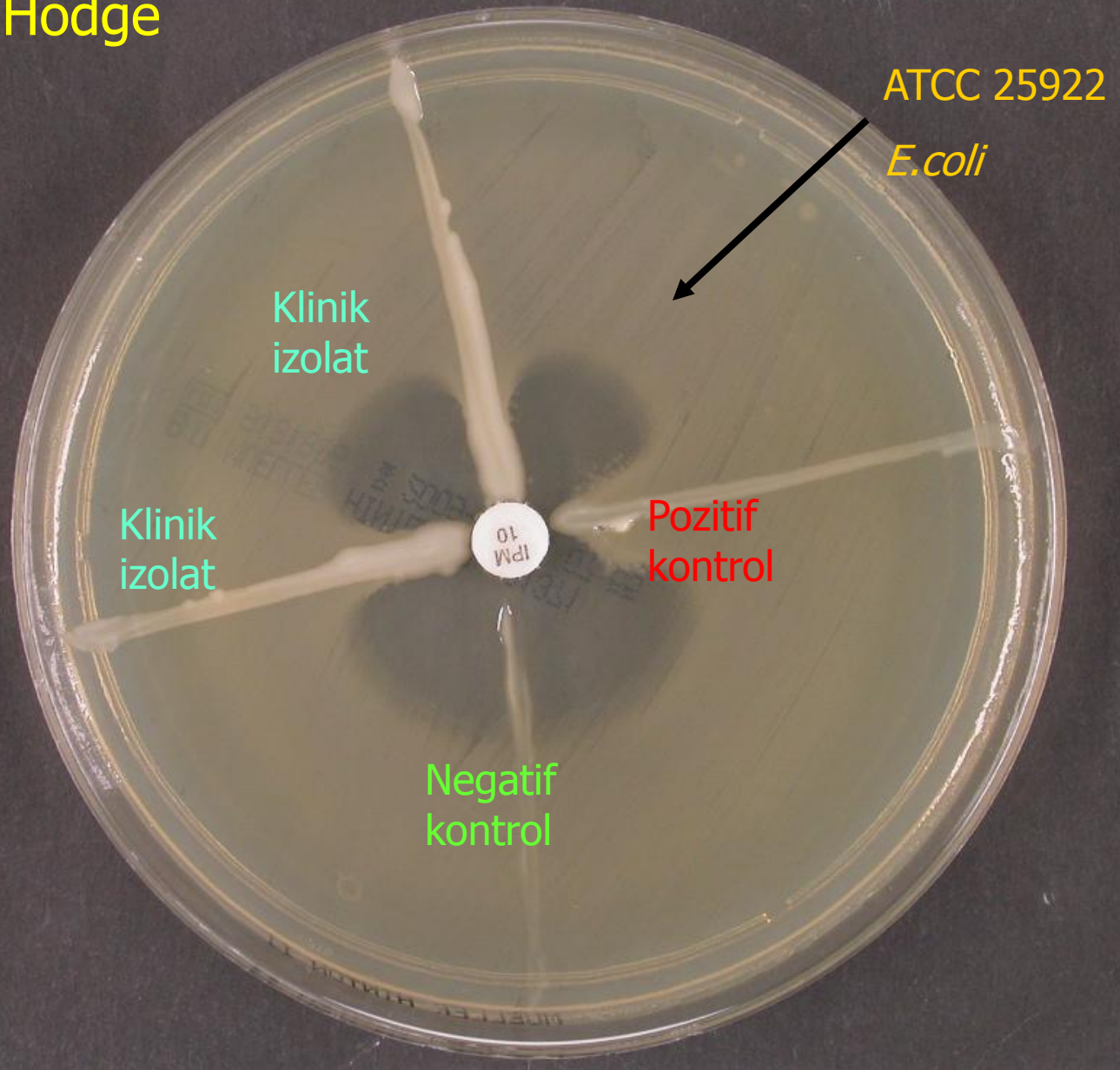
Klebsiella pneumoniae (ve
diğer *Enterobacteriaceae*)

Sıklıkla çoklu direnç
görülmektedir

Disk difüzyon ve E testi



Modifiye Hodge Testi



Karbapenemaz saptanması (Özet)

1. Karbapenem duyarlılığının saptanması

Arama kriteri karbapenemlerden herhangi birine (ertapenem, imipenem, meropenem, doripenem) azalmış duyarlılık (I/R) olmalıdır

2. Karbapenem duyarlılığı azalmış izolatlarda Modifiye Hodge Testi yapılması.

3. Modifiye Hodge Testi pozitif ise “ bakteri karbapenemaz üretmektedir. Bazı karbapenemlere duyarlı gözükse de klinik tedavi sırasında direnç gelişebilir” notu ile raporlama

4. İlgili klinik ve enfeksiyon kontrol hemşiresi uyarılır

Karbapenemazların doğrulanması

- Beta-laktamazlara özgü inhibitörler teste eklenerek duyarlılık düzeyinin değişimi incelenir.
 - MBL EDTA ve dipikolinik asit,
 - KPC için boronik asit,
 - Amp C için kloksasilin veya oksasilin
- Moleküler mikrodilüsyon yöntemleri en iyi yöntemler
- Ticari test yöntemleri

MHT

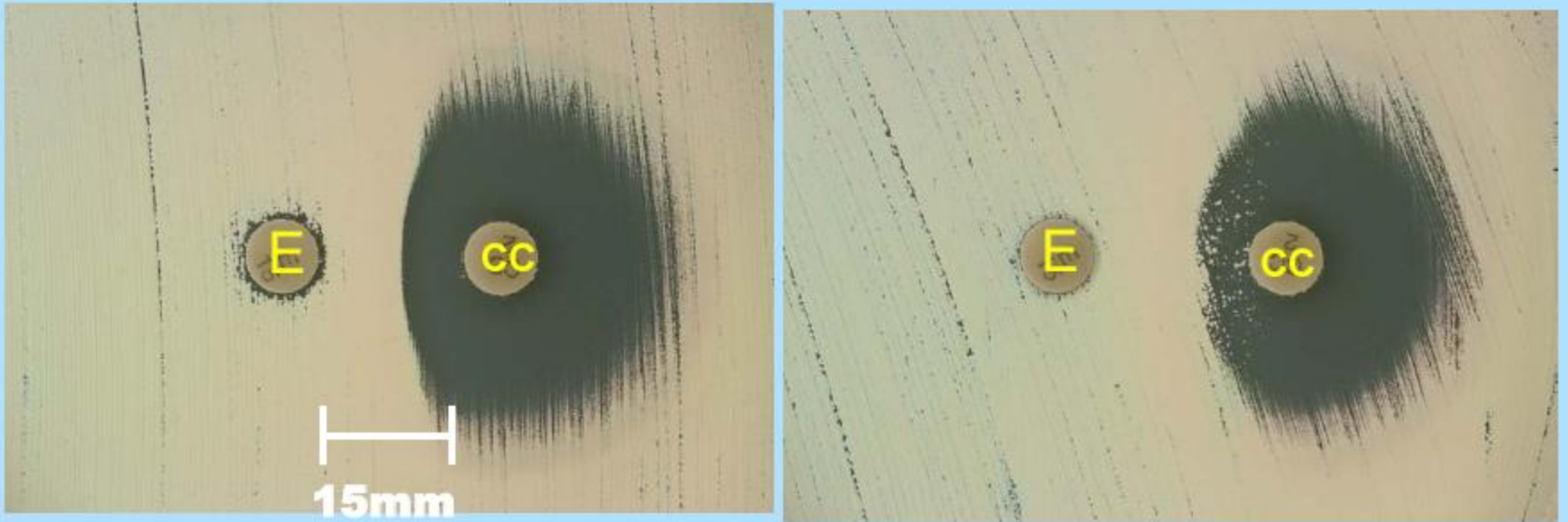
- CTX-M /AmpC aşırı üretimi + ilacın hücre içinde birikmesini engelleyen bir mekanizma (porin/pompa): **yalancı pozitiflik** (ertapenemde de): *Enterobacter spp.* DİKKAT!
- Bazı MBL(Enterobacteriaceae) yalancı negatiflik olabilir.

Soru 4

Gram pozitif koklarda indüklenebilir Klindamisin direnci

- Toplum kökenli MRSA tedavisinde önemli;
oral antibiyotik
- Saptanma kriterleri:
- Eritromisin R; klindamisin "S" olduğunda
- Stafilokoklar için 15 mm
- B-hemolitik streptokoklar için :12 mm
ara ile E ve CC diskleri yerleştirilir

D zonu : indüklenebilir Makrolid, linkozamid,
streptogramin B direnci: **Klindamisin "R"**



ermA

ermC

Bir tek eritromisin(ve diğer makrolidlerin) etkilendiği
pompa direncinden (*mef A/E, msrA*) ayırır

Soru 5

Stafilokoklarda glikopeptid direnci /azalmış duyarlılık

- 1997de ilk kez Japonya'da (Hiramatsu ve ark)
- MİK düzeyleri 8-16mg/l ("I"): VISA veya GISA
- Tüm dünyada vankomisin tedavi başarısızlıklarından sorumlu gösteriliyor.
- Ülkemizde %0-6 VISA; h VISA %17.7(1.6-30)

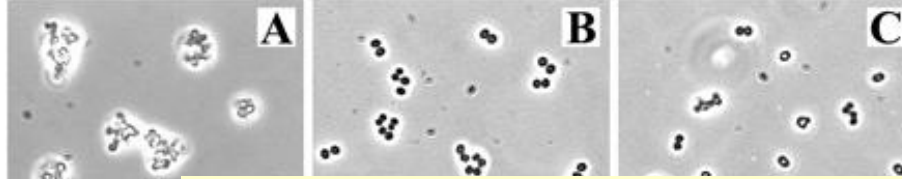
-Nakipoğlu Y, ve ark:, BMC Infect Dis 2005;5(1):31.

-Sancak B, ve ark:, J Antimicrob Chemother 2005;56(3):519-23.

- Torun MM, ve ark: Int J Antimicrob Agents 2005;26(6):508-10.

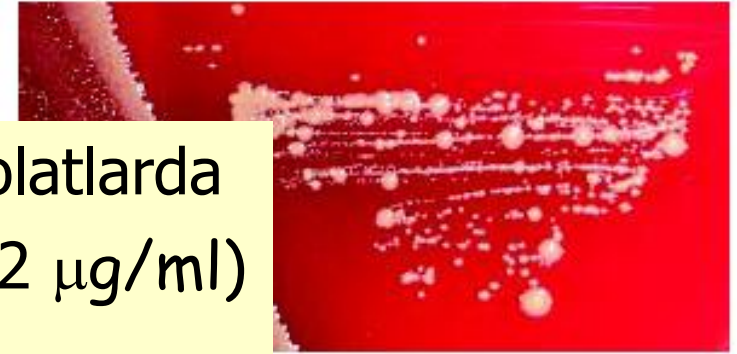
-Hoşgör Limoncu M ve ark. Mikrobiyoloji Bült 2007 Ekim;41(4):511

Hücre duvar metabolizması değişikliği=kalınlaşma ve antibiyotik sekestrasyonu



Aynı mekanizma ile bu izolatlarda
daptomisin direnci ($MIC \geq 2 \mu g/ml$)
de görülmektedir.

Cui L et al AAC 2006;50:1079-82



late incubated for 24h at 35°C in which the
ologies of the Michigan VISA strain can be
m colored colonies and smaller gray colonies
antibiogram (vancomycin MIC= 8 ug/ml) and
pulsed field gel electrophoresis profiles.

5 farklı koloni
yapısı görülebilir.
48-72 st sonra
görülen iğne ucu
koloniler

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

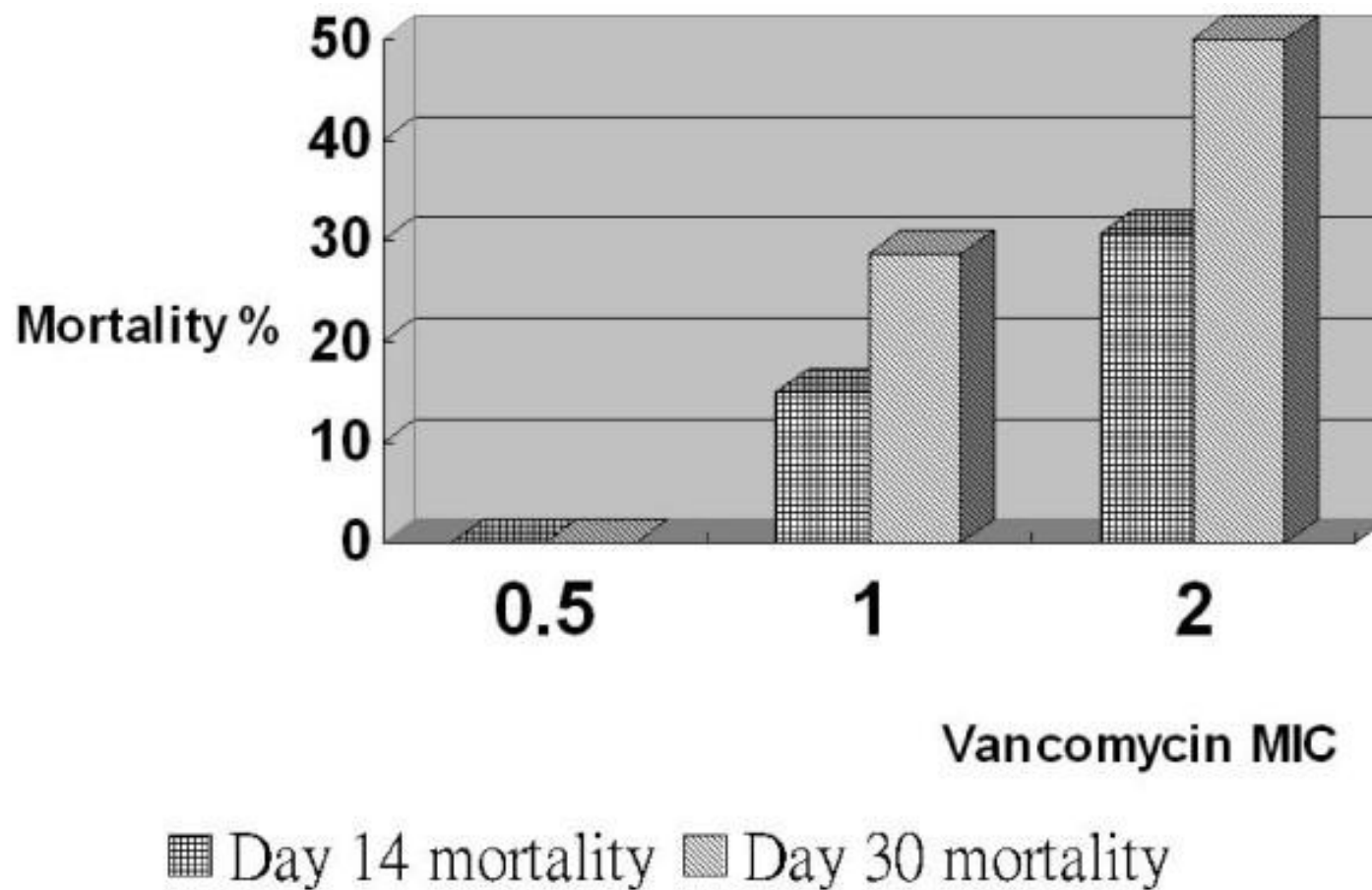
	S	I	R
CLSI MİK	≤ 2	4	≥ 8
EUCAST MİK	≤ 2	-	> 2
CLSI/ EUCAST Disk	Yok	Yok	Yok

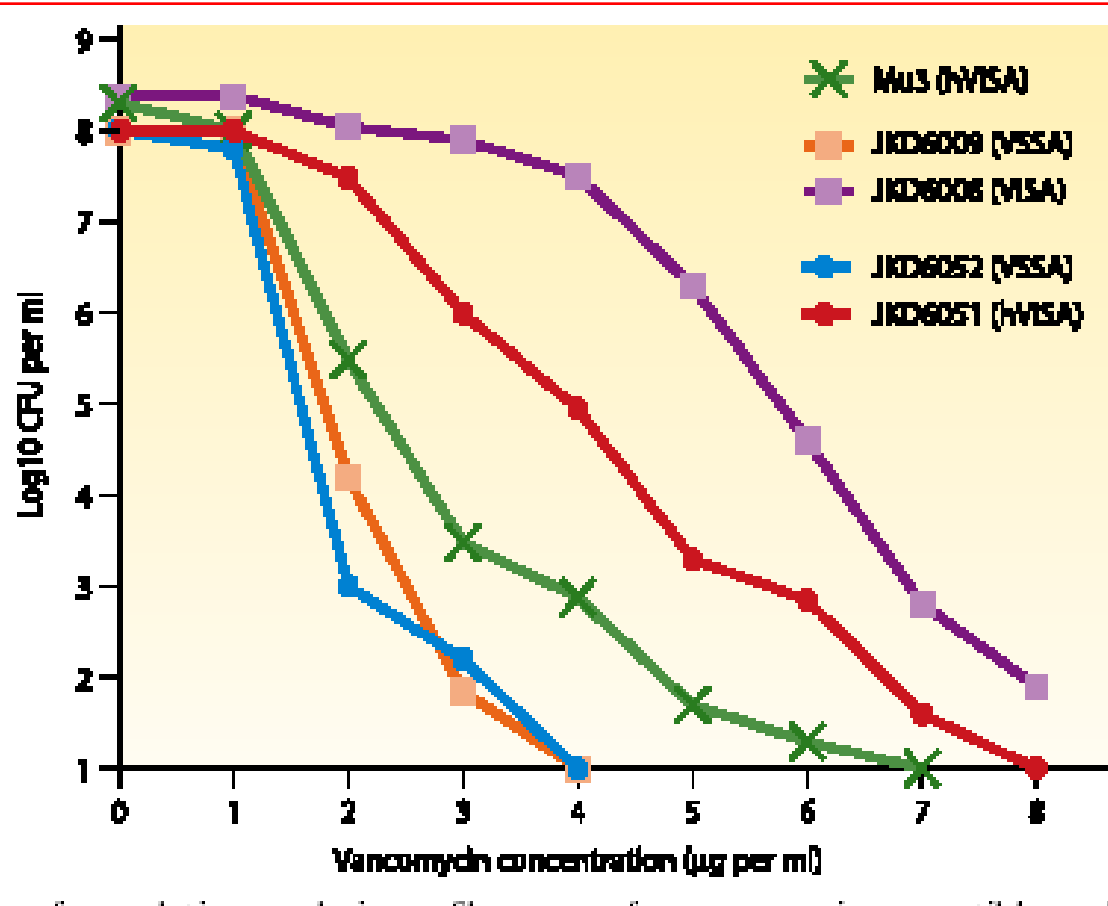
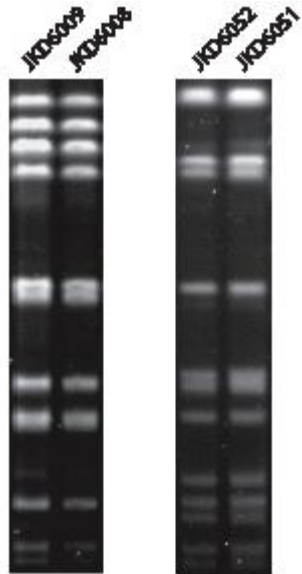
CLSI tanımları

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)

MİK yükseldikçe hVISA oranı da yükselmektedir

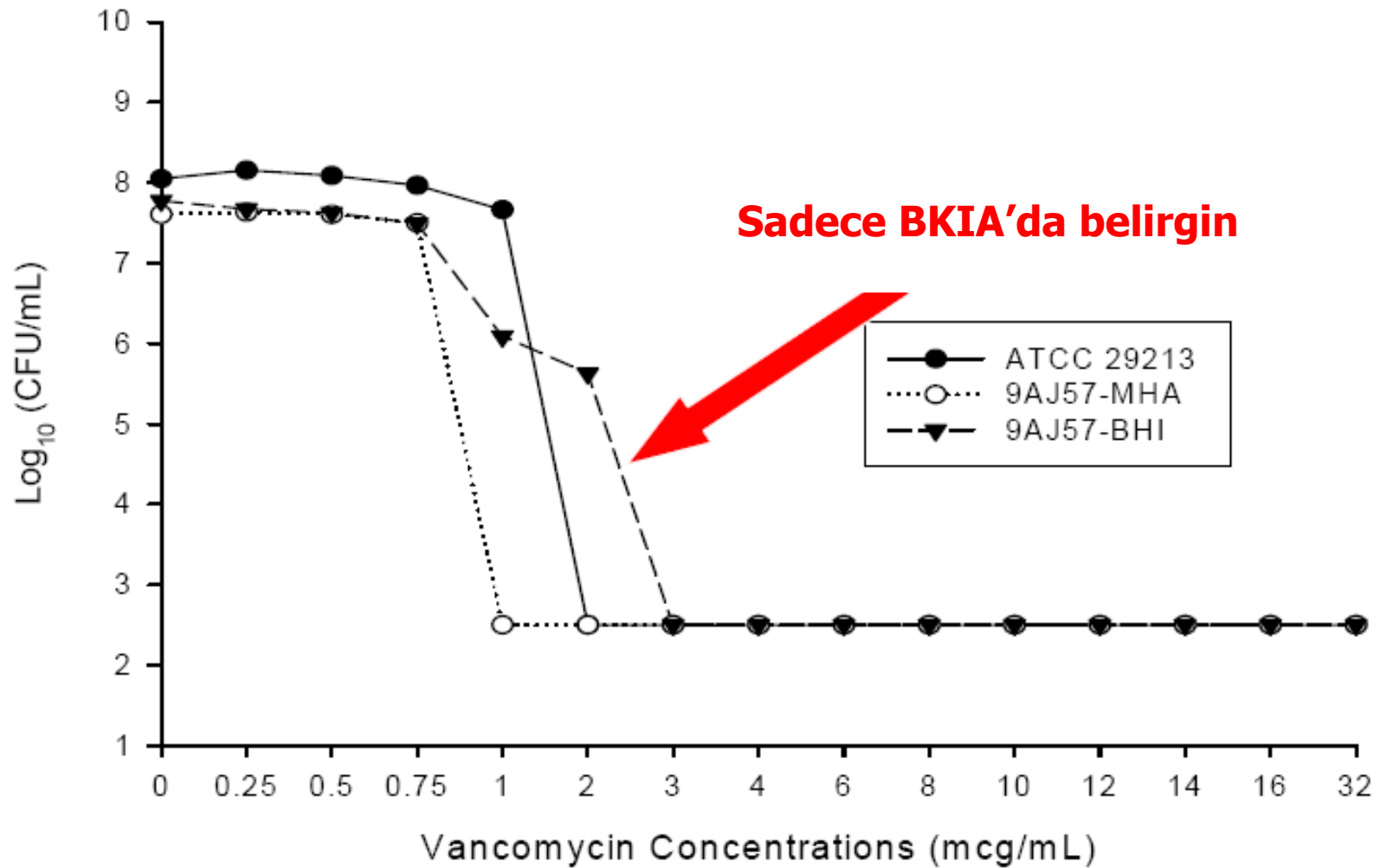
Vankomisin MİK değeri	H VISA %
1 µg/ml	57
2 µg/ml	81
4 µg/ml	100





hVISA suşları MİK= 1-2 olmasına rağmen aralarında 10^{-6} oranında $> 2 \mu\text{g/ml}$ izolatlar bulunur

Fig 1. Population Analysis for Strain 9AJ57 on BHI vs. MHA



Mueller Hinton MİK = 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; BKİ MİK = 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$

A



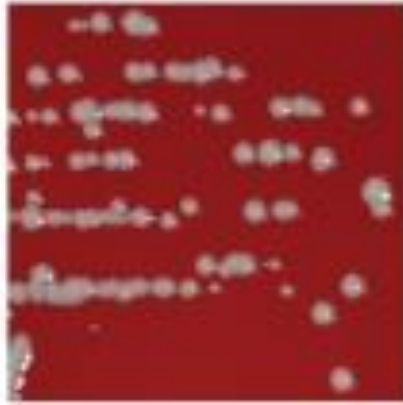
B



C



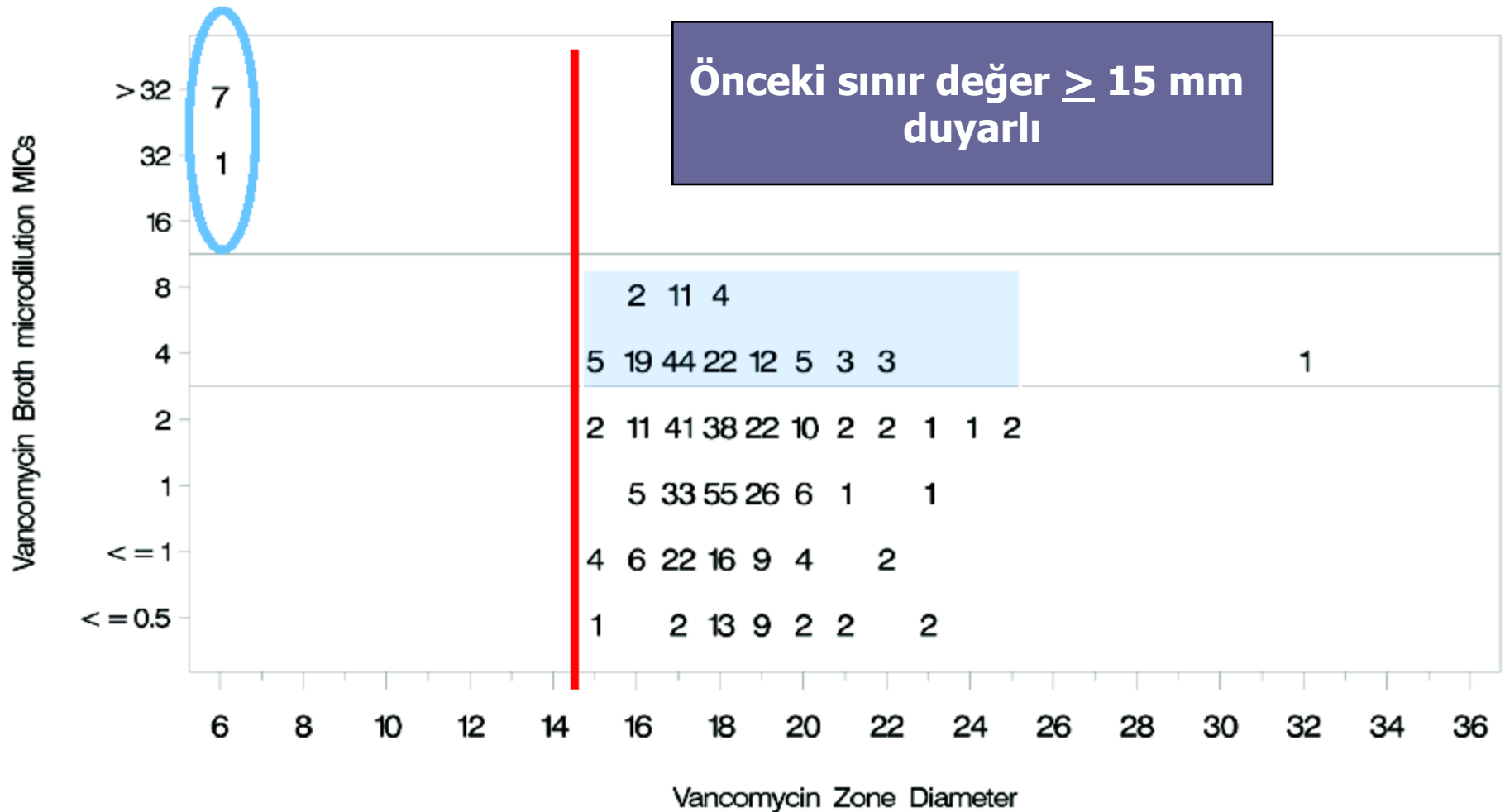
D



**Farklı
kolonilerin tümü
makro E Test ile
çalışılmalı**

CDC Diag
S. aureus

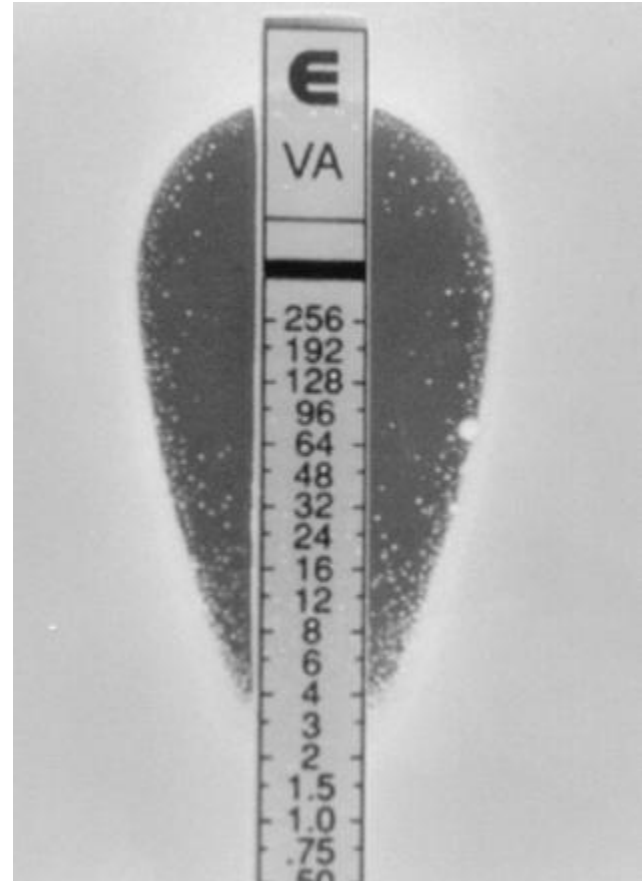
vanA-VRSA



Disk difüzyon testi VRSA'ları yakalıyor. Ancak diğerlerini atlıyor. CLSI'dan zon çapları çıkarıldı (2009)

hVISA suşlarının Makro E Test yöntemiyle gösterilmesi

- Uygulama: 2
McFarland, BKIA, 48
st inkübasyon
- Kriter
- Vanko veya teiko $\geq$
8 μ g/ml
- Veya
- Teiko MİK $\geq$ 12 μ g/ml



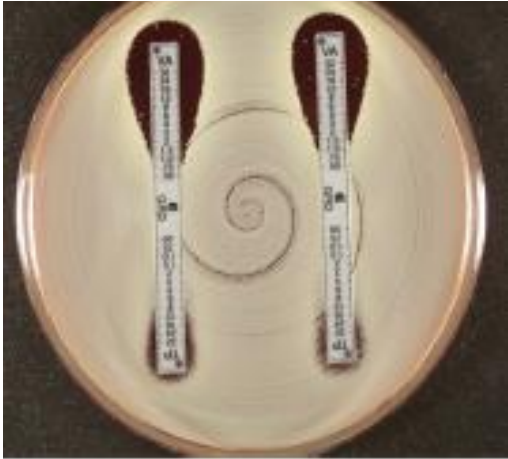
Ne zaman tarayalım?

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

E Test GRD stripleri: %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 MİK $\geq 6 \mu\text{g/ml}$ (GISA);

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



E Test GRD; Mu3 (h VISA)



E Test GRD; Mu50 (VISA)

Duyarlılık %95 ; Özgüllük % 94 (vs PAP)

Tüm GISA ve hVISA (%98) saptamış

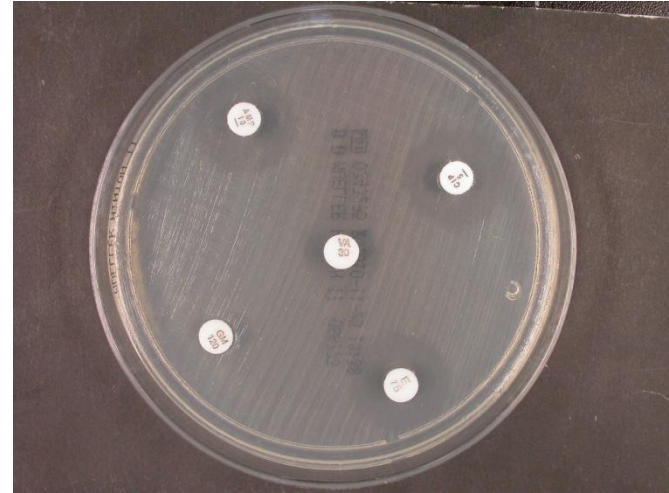
H VISA tarama yöntemi	Duy (%)	Özg (%)
Vankomisin mikrodilüsyon	11	100
BKIA+ V6 (48st) (CDC/CLSI)	4,5-12	68-100
MHA+T5 (EARSS, SFM)(48st)	65-79	35-95
Makro E Test (48 st)	69-98.5	89-94
GRD (24 st)	70-77	98-100
GRD (48 st)	93-94	82-95

Howden BP et al. Clin Microbiol Rev Jan 2010

	Va Doğru tanımlanan %				
	S (n=84)	I (n=45)	VISA→ S	VISA → R	S → VISA
Mikrodil.	98.8	88.9	5		1
Agar dil	97.6	68.9	14		2
Etest	86.9	97.8	1		11
Microscan	88.1	100			10
Phoenix	76.2	100			20
Sensititre	100	64.4	13	1	
Vitek Legacy	100	0	35	10	
Vitek 2	97.6	77.8	10		2

Enterococcus spp

- ❑ Yüksek düzey aminoglikozid direnci: *steril bölge örneklerinde*
- ❑ Vankomisin direnci:
- ❑ DYB da yatan bir hastanın kan ve idrar kültüründe bir enterokok üremiştir.
- ❑ API sonucu : *E.faecium*



Amp-S, Va- 12 mm (I)
Va MİK= 6 µg/ml

VRE: *E. faecium* vs. *E. gallinarum*

E. faecium

- vanA/ van B tipi aktarılabilir direnç
- Amp(R)
- Vanko MİK $\geq$ 256 μ g/ml (genellikle)
- Enfeksiyon kontrolü açısından çok önemli

E. gallinarum

- Doğal direnç (vanC)-kromozomal
- Amp (S)
- Va MİK 2-32 μ g/ml
- Enfeksiyon kontrolü açısından önemli değil

- **Ticari sistemler tür tanımlamasında hata yapabilmektedir.**
- **Duyarlılık paterni+ hareket, pigment gibi özellikler doğru tanım için gerekli**

Sonuç

- ❑ Ek testler duyarlılık sonuçlarının doğruluğunu arttırmak için gereklidir
- ❑ Her izolat için uygulamak gerekmez. (Çoğunda steril bölgelerden üretilenler)
- ❑ Yeni sınır değerler ek test gereksinimini azaltmakta ancak otomatize sistemler için gerekmektedir.
- ❑ İzlenen standarttaki (EUCAST/CLSI) değişiklikleri takip etmek önemlidir.



Target Audience

25 – 30 clinical microbiologists and other interested people.

Faculty Members

- Murat Akova, Ankara, TR
- Sebastian Amyes, Edinburgh, UK
- Sohret Aydemir, Izmir, TR
- Ahmet Basustaoglu, Ankara, TR
- Derek Brown, Cambridge, UK
- Cem Ergon, Izmir, TR
- Christian Giske, Stockholm, SE
- Zeynep Gülay, Izmir, TR
- Deniz Gür, Ankara, TR
- Gunnar Kahlmeter, Växjö, SE
- Cigdem Kayacan, Istanbul, TR
- Sesin Kocagöz, Istanbul, TR
- Mehmet Ali Özinel, Izmir, TR
- Guner Soylerir, Istanbul, TR
- Wolfgang Witte, Wernigerode, DE

Contact

Administrative Secretariat

Zeynep Gülay
Dokuz Eylül University
School of Medicine
Dept of Medical Microbiology
Izmir 35340
Turkey

Phone +90 232 412 45 03
Fax +90 232 259 05 41
zeynep.gulay@deu.edu.tr

Picture on frontpage:

- Courtesy of E. Givicoglu

Pictures inside:

- ISS/mecA/mecR multiplex PCR results for MRSA and MSSA strains
- Modified Hodge Test



ESCMIID EUROPEAN SOCIETY
OF CLINICAL MICROBIOLOGY
AND INFECTIOUS DISEASES

© ESCMIID, August 2011



ESCMIID EUROPEAN SOCIETY
OF CLINICAL MICROBIOLOGY
AND INFECTIOUS DISEASES

ESCMIID Postgraduate Technical Workshop

Clinical Implications of Antimicrobial Susceptibility Testing

**Izmir, Turkey
10 – 12 March 2011**

Registered 5 days, March, Germany, No. 309 55



GSBL üreten bakterilerle gelişen bakteriyemilerde sefalosporin tedavisi

<u>MİK</u>	<u>BAŞARISIZ %</u>	<u>ÖLÜM%</u>
8	100 (6/6)	33 (2/6)
4	67 (2/3)	0 (0/3)
2	33 (1/3)	0 (0/3)
≤1	27 (3/11)	18 (2/11)

(CLSI sınır değeri $\leq 8 \mu\text{g/ml}$)
Sefepim için hala değişmiyor!

Paterson, DL, et al. JCM 39: 2206 – 2212, 2001

GSBL saptama problemleri:

İnokulum etkisi

MİK $\mu\text{g/ml}$: SHV-3 üreten *Citrobacter freundii*

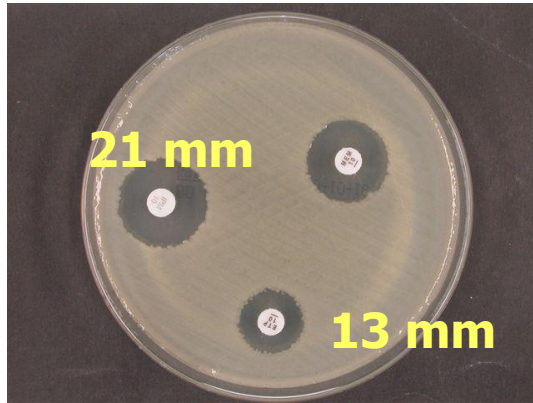
CFU/ml	Sefotaksim	Seftazidim	Aztreonam	Sefepim
5×10^5	2	1	0.5	0.5

5×10^7	256	32	32	512
-----------------	-----	----	----	------------

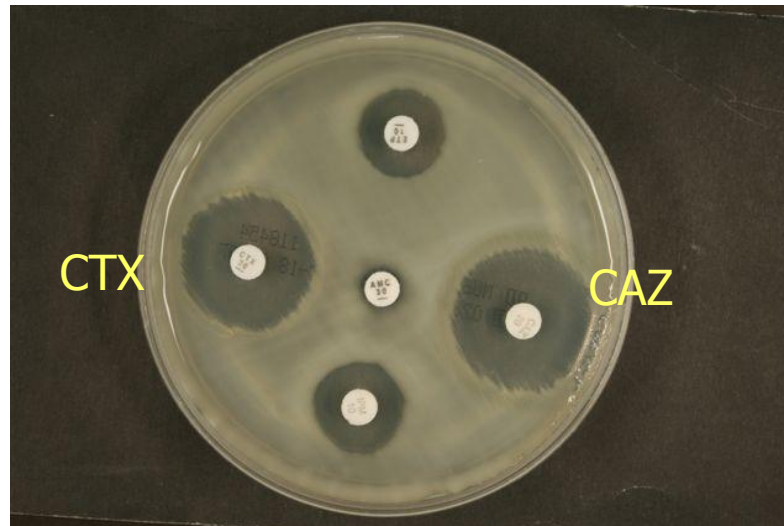
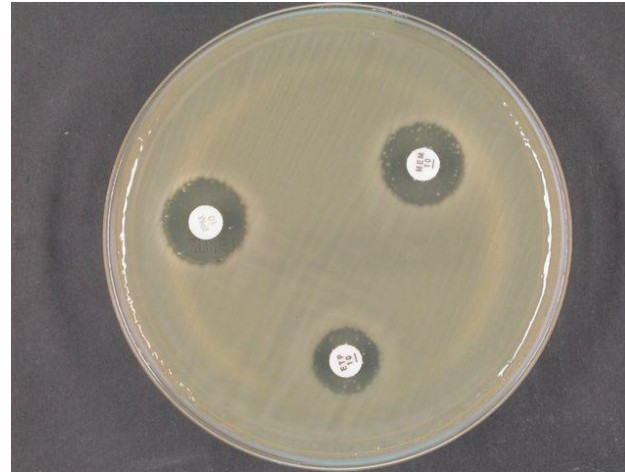
(CLSI duyarlılık sınırı $\leq 8 \mu\text{g/ml}$)

Karbapenemaz saptama zorluklar

Substratların
etkilenmesi farklı



Heterojen direnç: 48 st



3. Kuşak
sefalosporin direnci
arama kriteri
dışında bırakılmalı:

OXA-
karbapenemazlar

Otomatize sistemlerde saptama sorunu var

Carbapenem Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Not Detected by Automated Susceptibility Testing

Fred C. Tenover,* Rajinder K. Kalsi,† Portia P. Williams,‡ Roberta B. Carey,* Sheila Stocker,*
David Lonsway,* J. Kamile Rasheed,* James W. Biddle,* John E. McGowan Jr.,‡ and Bruce Hanna†

**KPC(+) imipenem
dirençli izolatların
ticari sistemlerce
tanınması sorun:
%6.7-%87
oranında atlanıyor**

Detecting β -lactamase-mediated carbapenem resistance among *Klebsiella pneumoniae* isolates and other *Enterobacteriaceae* is an emerging problem. In this study, 15 *bla*_{KPC}-positive *Klebsiella pneumoniae* that showed discrepant results for imipenem and meropenem from 4 New York City hospitals were characterized by isoelectric focusing; broth microdilution (BMD); disk diffusion (DD); and MicroScan, Phoenix, Sensititre, VITEK, and VITEK 2 automated systems. All 15 isolates were either intermediate or resistant to imipenem and meropenem by BMD; 1 was susceptible to imipenem by DD. MicroScan and Phoenix reported 1 (6.7%) and 2 (13.3%) isolates, respectively, as imipenem susceptible. VITEK and VITEK 2 reported 10 (67%) and 5 (33%) isolates, respectively, as imipenem susceptible. By Sensititre, 13 (87%) isolates were susceptible to imipenem, and 12 (80%) were susceptible to meropenem. The VITEK 2 Advanced Expert System changed 2 imipenem MIC results from $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ to $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ but kept the interpretation as resistant. The recognition of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* continues to challenge automated susceptibility systems.

Otomatize sistemler (2010)

		Karbapenem direnç mekanizması belirli izolat sayısı			
Sistem/panel	Karbapenemaz uyarısı	Karbapenemaz ($n=39$)	Karbapenemaz değil ($n=16$)	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
Phoenix NMIC/id-76	Evet Hayır	39 0	16 0	100	0
MicroScan NM36	Evet Hayır	33 6	15 1	85	6
MicroScan NBC39	Evet Hayır	32 7	13 3	82	19
Vitek 2AST-N054	Evet Hayır	29 10	10 6	74	38

	Phoenix		MicroScan NM36		MicroScan NBC39		Vitek 2	
	Positi ve	Negati ve	Positi ve	Negat ive	Positi ve	Negati ve	Positi ve	Negati ve
KPC ($n=8$)	8	0	8	0	8	0	8	0
MBL (IMP,VIM,or NDM; $n=20$)	20	0	19	1 ^b	20	0	16	4 ^b
OXA-48 ($n=11$)	11	0	6	5	4	7	5	6
<i>E.coli/Klebsiella</i> spp.,ESBL,porin loss ($n=10$)	10	0	10	0	8	2	8	2
<i>Enterobacter</i> spp.,AmpC/ESBL,porin loss ($n=6$)	6	0	5	1	5	1	2	4

Oksasilin/sefoksitin duyarlılık farkları

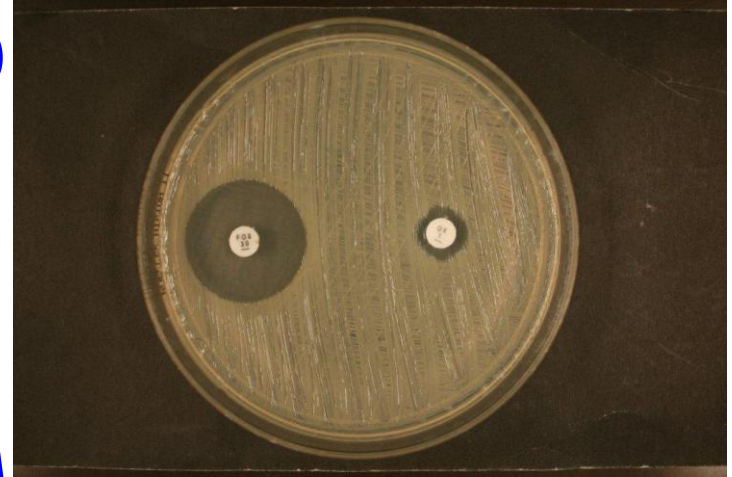
□ OX^R-Sefoksitin (S)/mec A (-)

- Aşırı beta-laktamaz üretimine bağlı: **BORSA**
- Aşırı beta-laktamaz yapımı: oksasilin etkinliği yoktur.
- Sefoksitine göre değerlendirilir

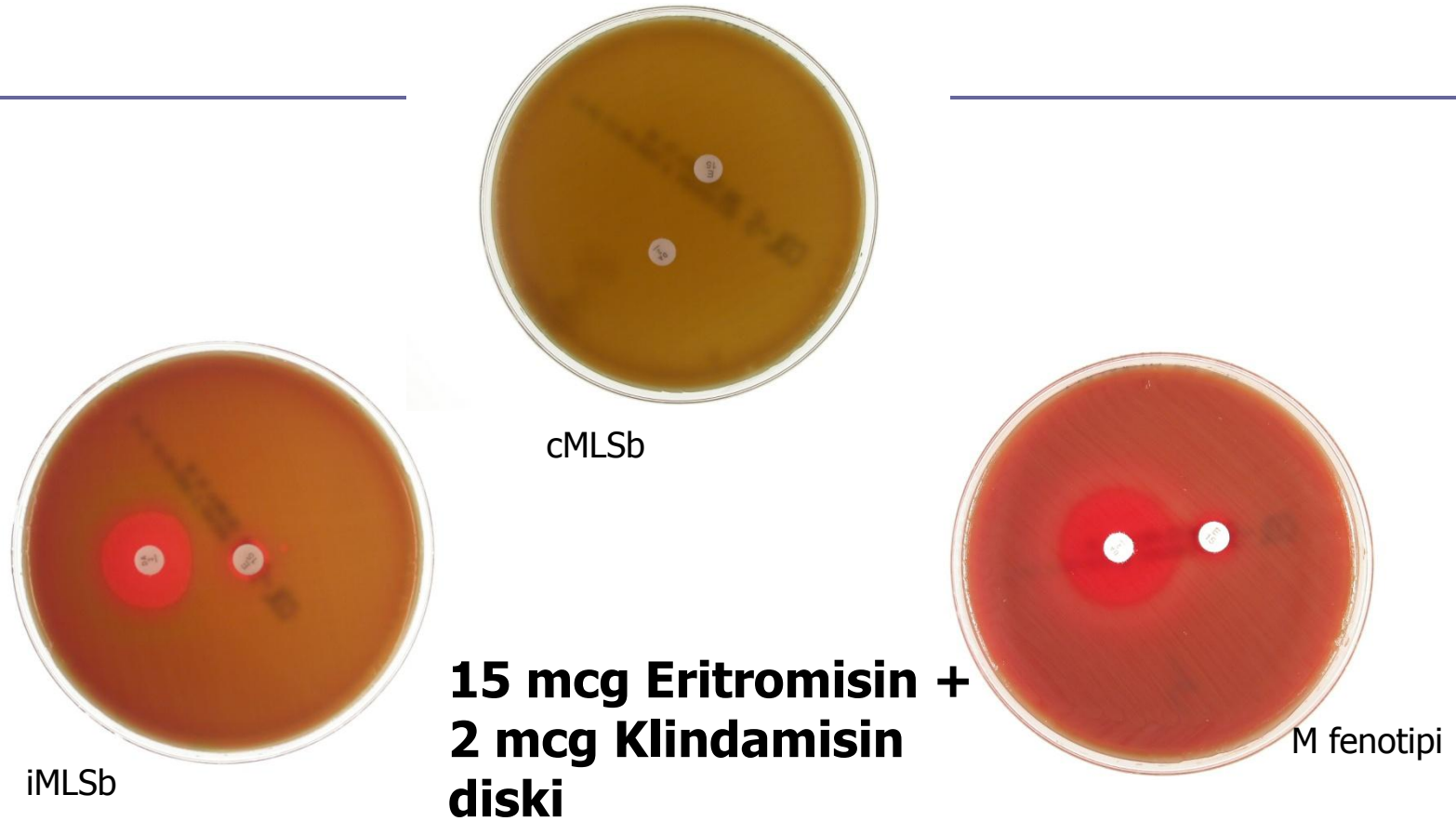
□ OX(S) (MIK < 2µg/ml)- *mecA* (+) izolatlar: OS-MRSA

Yardımcı genlerde (ör. femABX) mutasyonlar

- Japonya, Tayvan, Yunanistan
- SCCmec Tip III- Tip V
- **Sefoksitin *mecA* pozitifliğini yakalayabilmektedir**



Beta-hemolitik Streptokoklar ve *S.pneumoniae*



- Kolay, ucuz ve doğru
- Otomatize sistemler atlayabiliyor
(Lavallee, JCM 2010:1354;Tazi JAC 2007)

TABLE 2. Sensitivities and specificities of BHIT5, BHIV6, MET, and cascade screening methods, based on screening of 199 blood isolates of MRSA of known vancomycin phenotype

Method and result	No. of isolates with:		Sensitivity (%)	Specificity (%)
	PAP-AUC ratio ≥ 0.9 (<i>n</i> = 26)	PAP-AUC ratio < 0.9 (<i>n</i> = 173)		
BHIT5			88.5	17.3
Positive	23	143		
Negative	3	30		
BHIV6			3.8	98.8
Positive	1	2		
Negative	25	171		
MET A			69.2	48.0
Positive	18	90		
Negative	8	83		
MET B			46.1	85.0
Positive	12	26		
Negative	14	147		
Cascade ^a			42.3	86.1
Positive	11	24		
Negative	15	149		

Is,³

Klinik önemi var mı?

- Vankomisin MİK > 1 µg/ml olan izolatlarla klinik tedavi başarısı düşük
- Bakterisidal etkinlik azalıyor.
- Yıllar içerisinde vankomisin MİK'leri yükselmiş (%19.9 (2000) vs %70.4 (2004) Wang et al JCM 2006;44:3683
- Etkinliğin düşmesi heteroVISA suşlarına bağlıyor

Moise et al Aac 2007;57:2582

Hidayat et al Arch Intern Med 2006;166:2138

Sakoulas, Moellering Jr CID 2008 suppl 5

VISA/hVISA

- VISA MİK=4-8
- hVISA daha sık, daha sorunlu
- Özel besin ör. BKİA; Etest üreme faktörü eklenmesi
- Küçük karışık koloni yapısı: daha geç üreme
- Her koloniden ayrı ayrı çalışılması önemli

Vankomisine dirençli *S.aureus* (2002-)

- Enterokoklardan *van* gen kümesi (Tn 1546)aktarımına bağlı
- MİK 32-1024 µg/ml
- ABD'de 11 suş (van A pozitif; 8'i Michigan kökenli)
- Her iki patojenle (VRE ve MRSA) kolonize hastalarda
- Hindistan ve İran'dan 1 suş (olasılıkla van B)

FIG. 1. Disk diffusion and Etest analysis of the PA-VRSA isolate on Mueller-Hinton agar

Disk diff. En zor
VRSA izolatını bile
tanımlıyor.
Otomatize
sistemler NY ve
Pensilvanya
suşlarını atlamış

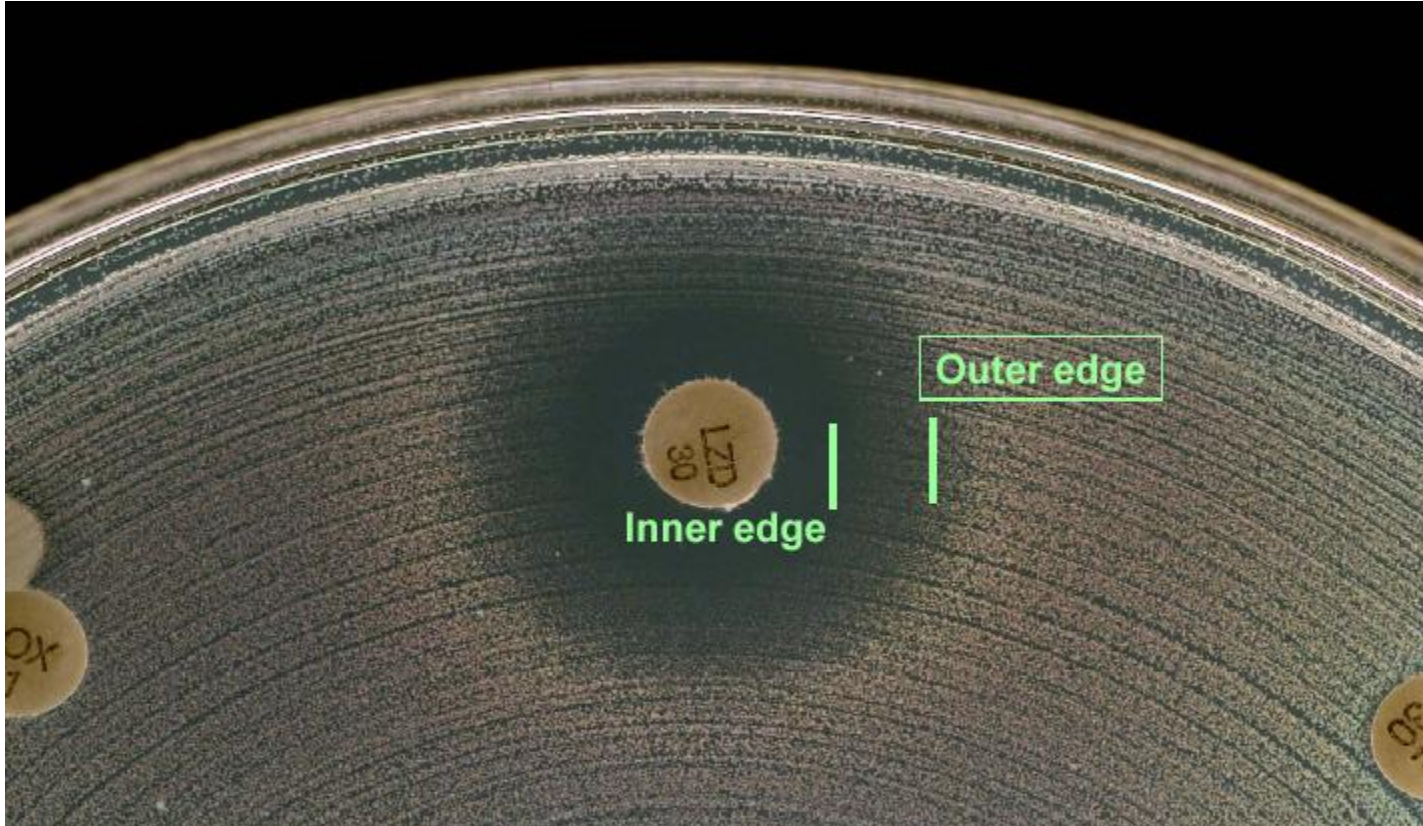


Tenover, F. C. et al. 2004. Antimicrob. Agents Chemother. 48(1):275-280

Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Soru 6

Linezolid duyarlılığını nasıl değerlendirelim?



	S	I	R
MİK	$\leq 4\text{mcg/ml}$	-	-
Zon çapı	$\geq 21\text{ mm}$	-	-

Accuracy of Six Antimicrobial Susceptibility Methods for Testing Linezolid against Staphylococci and Enterococci⁷

Tenover et al JCM 2007; 45:2917

- 100 sorunlu izolat (50 enterokok, 50 stafilokok)
- 6 yöntem (mikrodil, disk, E Test, Vitek, Phoenix, Vitek 2)
- Uyum %85.9 (Vitek)-96 (Microscan)
- Çok büyük hata oranları: Vitek %35, E test %40, disk %53)
- Arkadan gelen ışık ile iç üreme zonu değerlendirilince disk hata oranı %20'ye düşmüş

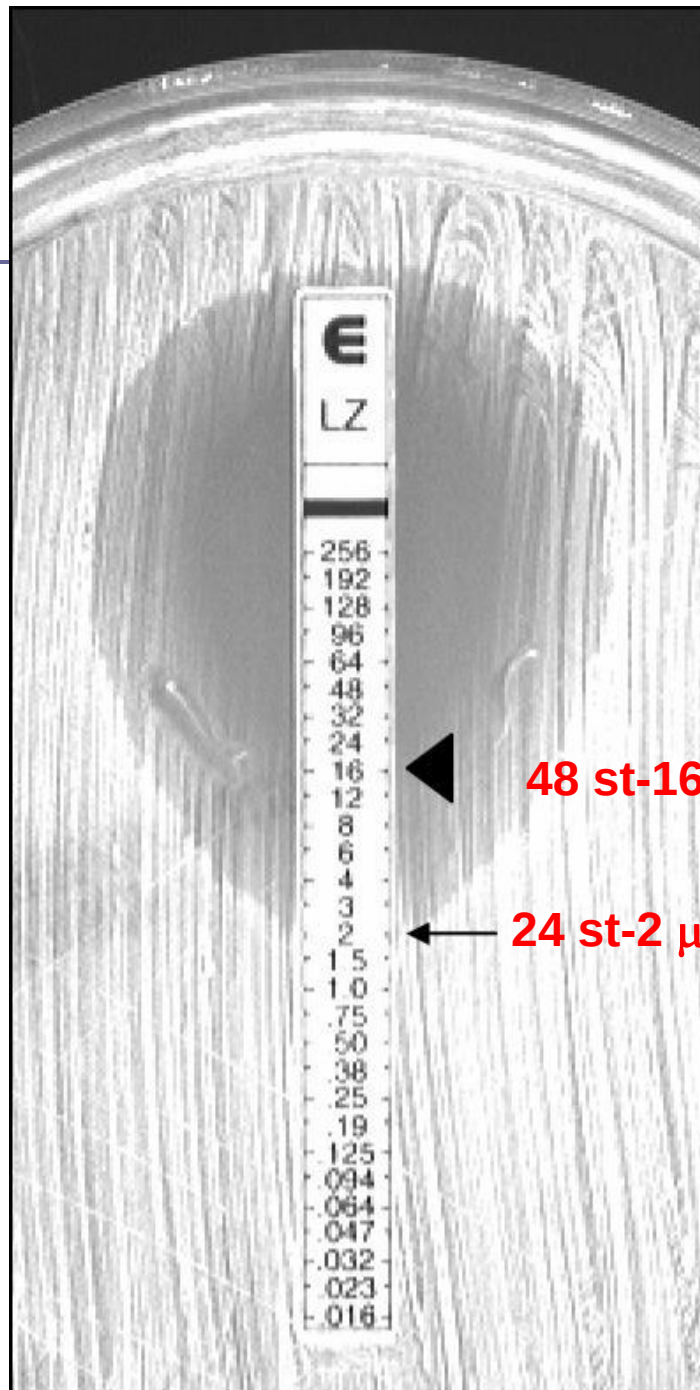
Linezolid direnci

- ❑ Ribozomal mutasyon 23 S rRNA G2576T(U)
- ❑ Etkilenen ribozomal RNA kopya sayısı (*rrl* geni) arttıkça MİK yükselir

Stafilokoklar

- ❑ Plazmid kökenli *cfr* geni: 23 S rRNA metilasyonu (A2503)
- ❑ Çoklu direnç (kloramfenikol, florfenikol, linkozamid, oksazolidinon, streptograminA)

**Direnç 48 saatte
görülüyor!**

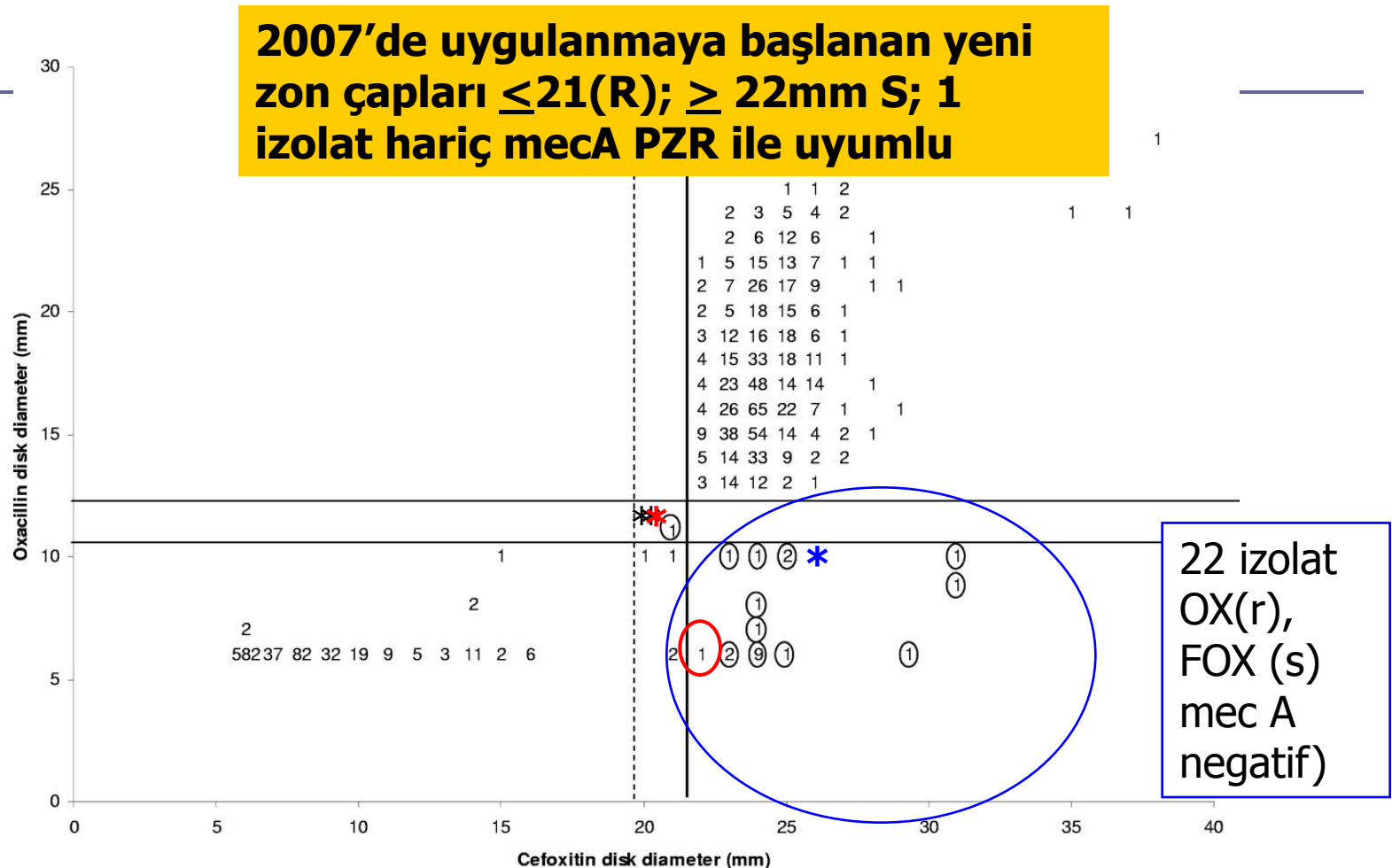


Arias CA JClin Microbiol.
2008 March; 46(3):
892–896.

Staphylococcus spp: Metisilin direnci

- Sefoksitin disk tarama testi
- Sefoksitin ve oksasilin *S.aureus*'ta duyarlılık ve özgüllük açısından eşit
- KNS'ler için sefoksitin zon çaplarını okumak daha kolay: Bazı türlerde sorun olabilir.
- Sefoksitin *mecA* için daha iyi indükleyici
- Değerlendirmeyi 16-18 saate indirmiştir

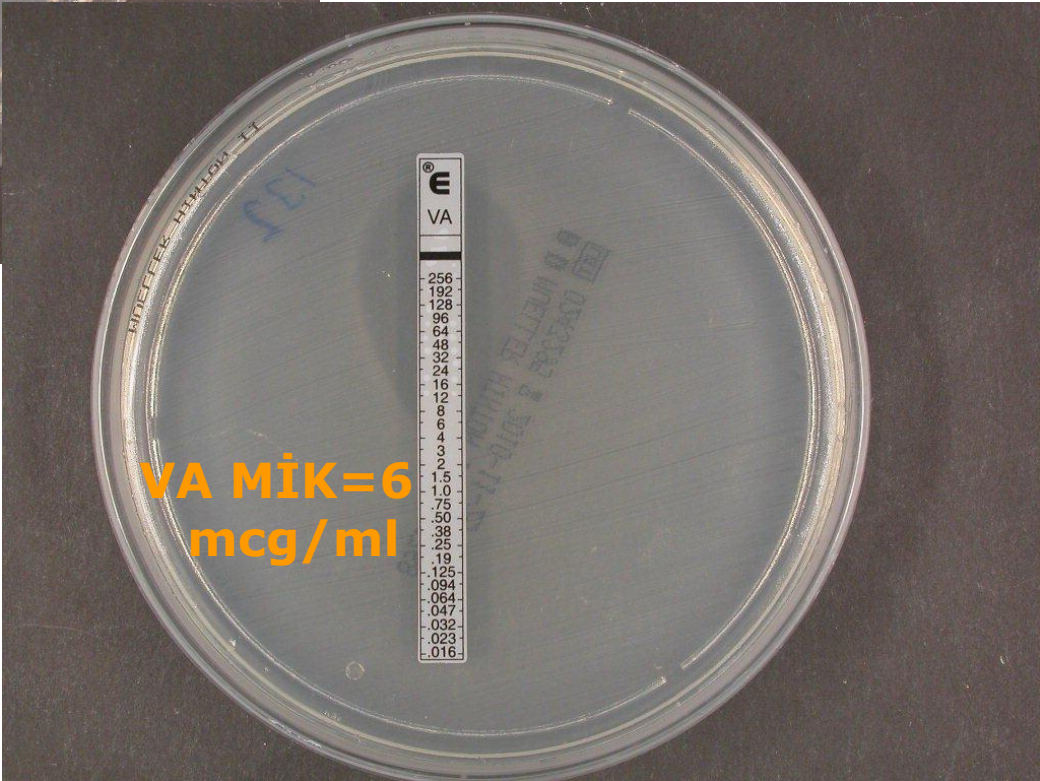
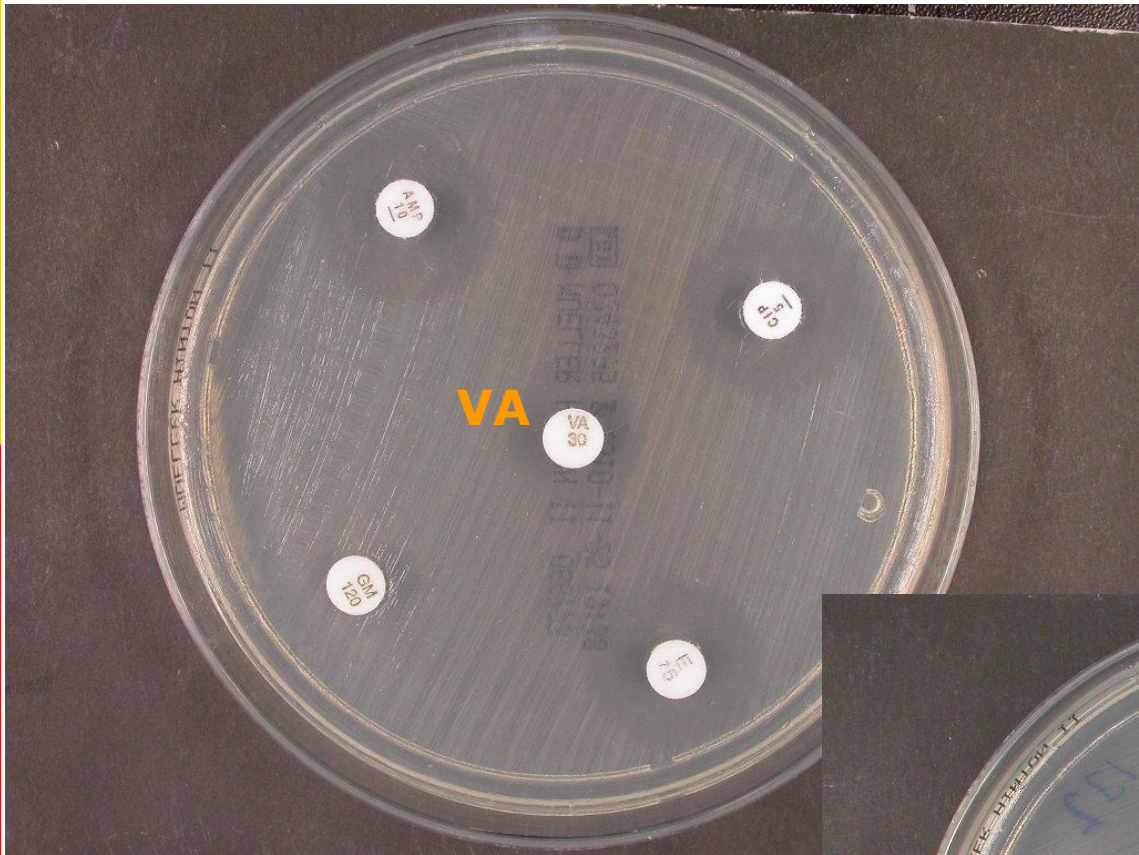
FIG. 1. Correlation of oxacillin (1 {micro}g) and cefoxitin (30 {micro}g) disk test zone diameters obtained from 1,611 Staphylococcus aureus isolates



Broekema, N. M. et al. 2009. J. Clin. Microbiol. 47(1):217-219

Journal of Clinical Microbiology

-
- Dilüsyon testleri: KNS için uygulanmaz
 - Otomatize sistemler: Sefoksitin taramasının eklenmesi ile *S.aureus*'da başarılı
 - >%99 uyum (Junkins JCM 2009);
 - KNS'lerde türe bağlı sorun olabiliyor(*S.simulans*, *S.hominis*, *S. saprophyticus*) (John MA, JAC 200);63:493)

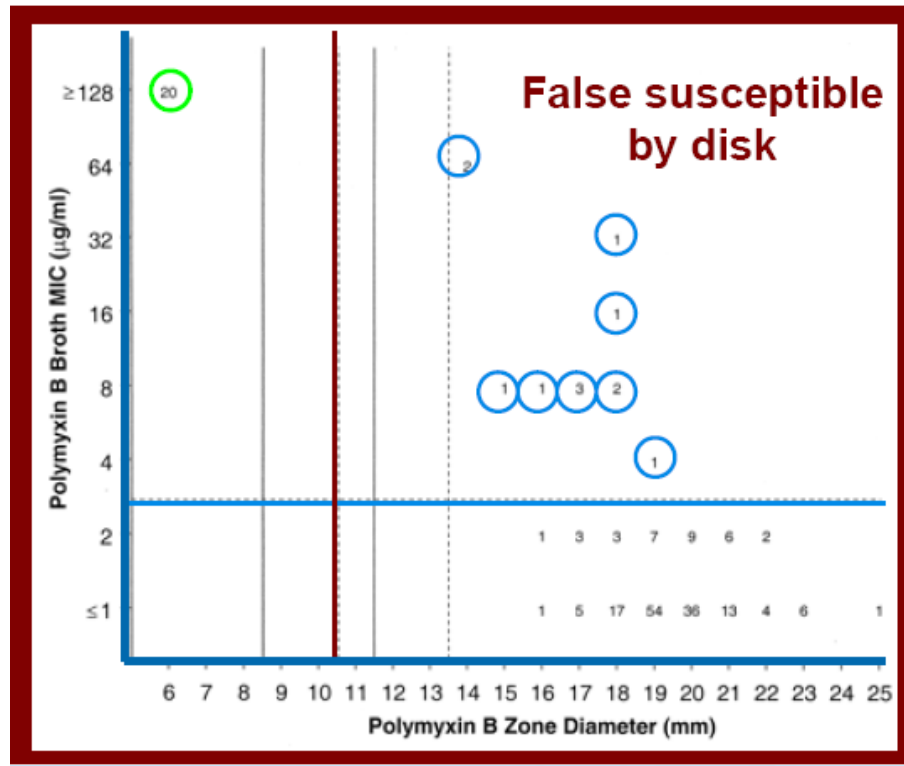


Soru 7 ve Soru 8

Yeni ve yeniden önem kazanan antibiyotikler

- Kolistin
- Daptomisin
- Tigesiklin

Kolistin: disk difüzyon her türde başarılı değil



Acinetobacter, Enterobacter

Gales et al JCM 2001 39; 183

Examples of Etest Colistin and Polymyxin results

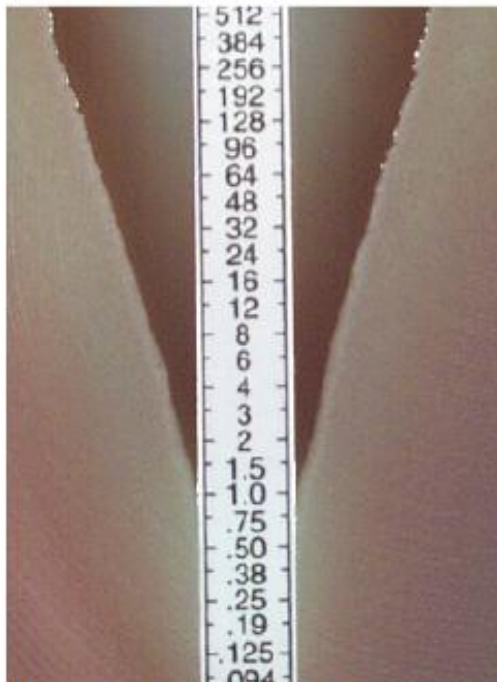


Figure 1. Sharp endpoint.
P. aeruginosa, MIC 1.0 µg/mL

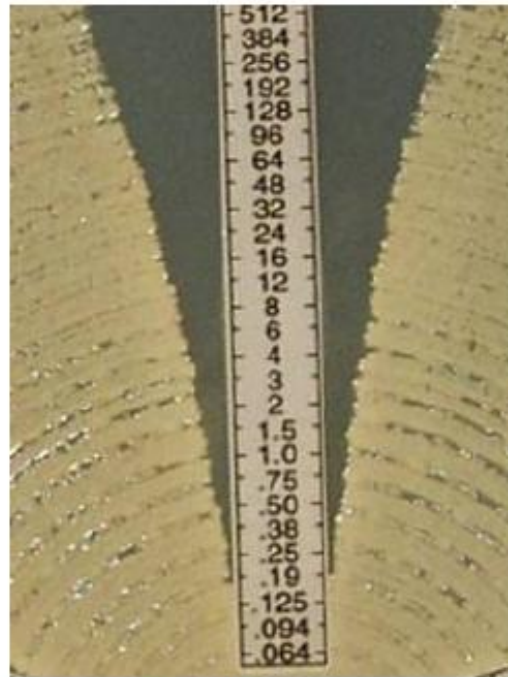


Figure 2. Slim ellipse.
P. aeruginosa, MIC 0.19 µg/mL



Figure 3. Colonies in the "dip".
S. maltophilia, MIC 16 µg/mL

CLSI	MIC ≤ 2 (S); 4 (I); ≥ 8 (R) Disk ≤ 11 (R) ≥ 12 (S)
EUCAST	MIC ≤ 2 (S); > 2 (R)

Daptomisin

In –vitro duyarlılık yöntemleri

□ CLSI

- Disk testi güvenilir değil
- Agar dilüsyon önerilmiyor

□ Önerilenler:

- Dilüsyon testleri için 50µg/mL Ca^{+2} eklenmiş CAMHB
- E-testte sabit Ca^{+2} var (40 µg), Ca^{+2} eklemeye gerek yok.

Tigesiklin

- ❑ MRSA, GSBL yapan Enterobacteriaceae ve Acinetobacter inf.(endikasyon dışı olb.)
- ❑ Besiyeri içeriği: Manganez ve diğer 2 değerlikli iyonlar: E test sonuçları 1 dilüsyon yüksek çıkıyor
- ❑ Besiyerinin beklemesi, oksijen radikalleri, ph
- ❑ Günlük besiyeri ile çalışılmalı

- ❑ Direnç:
- ❑ Aktif pompa sistemlerine bağlı
- ❑ Bazı türlerde doğal direnç (*Pseudomonas*, *Proteae* ailesi)