

SORUN YAŞADIĞIMIZ DİRENÇ MEKANİZMALARI

AmpC ve ESBL

Şöhret Aydemir
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Başlarken

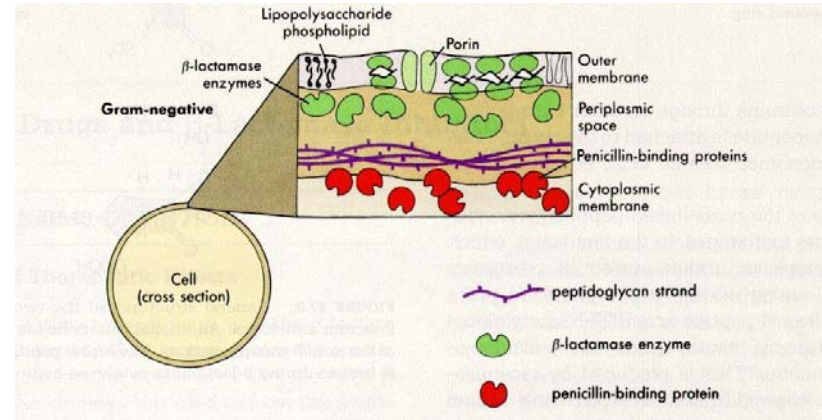
ÖZEL TEŞEKKÜR

Bilimsel desteğinden dolayı

Prof. Dr. Zeynep Gülay'a teşekkürlerimle....

Beta laktamaz enzimleri

- Beta laktam halkasındaki siklik amid bağıını parçalar, beta laktam ajanların etkinliği ortadan kalkar
- gram negatif bakterilerde beta laktam antibiyotiklere direnç yol açan en önemli mekanizma



MINIREVIEW

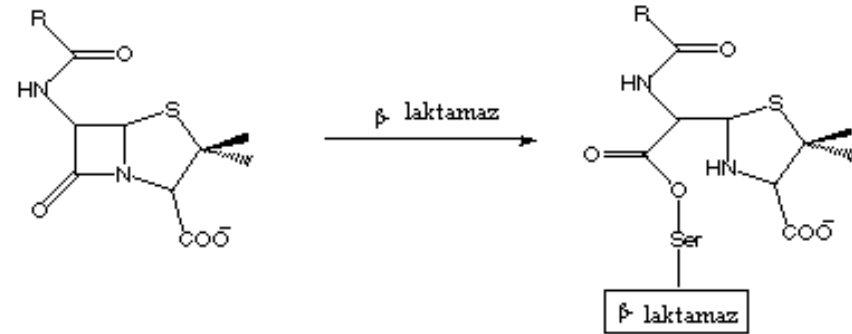
Updated Functional Classification of β -Lactamases[∇]

Karen Bush^{1*} and George A. Jacoby²

Department of Biology, Indiana University, Bloomington, Indiana,¹ and Lahey Clinic, Burlington, Massachusetts²

Moleküler yapılarına
göre: A, B, C, D

İşlevsel özelliklerine
göre: 1,2,3



Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby- Medeiros group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)
1	1	C	Cephalosporins
1e	NI ^b	C	Cephalosporins
2a	2a	A	Penicillins
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams
2br	2br	A	Penicillins
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams
2c	2c	A	Carbenicillin
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime
2d	2d	D	Cloxacillin
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins
2df	NI	D	Carbapenems
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins

AmpC

1980'ler yeni beta laktam antibiyotiklerin kullanıma girmesi;

Sefalosporinlere direnç önce

Enterobacter cloacae, *Citrobacter freundii*,

Serratia marcescens ve *Pseudomonas aeruginosa*'da

AmpC

karbapenemler ve sefepim dışındaki tüm
beta-laktamları hidrolize eden
sefalosporinazlar

beta laktamaz inhibitörlerinden etkilenmemeleri
(klavulanik aside,tazobaktama duyarlı olmamaları)

AmpC

Kromozomal ve plasmid kökenli

Bazıları indüklenebilirler;

Kromozomal kökenliler

Bazı plasmid kökenliler (ACT-1,DHA-1,DHA-2,CMY-13)

AmpC

- Normalde düşük düzeyde üretilen bu beta-laktamazlar, ortamda bir indükleyici bulunması halinde sentezleri uyarılıyor

örn:klavulanik asit

sefoksitin

3. kuşak

sefalosporinler

imipenem





indüklenme sorun değil

indükleyici beta laktam ortadan kalkınca
indüklenme duruyor

Bu nedenle;

indüklenebilir beta laktamazlar (İBL) olarak da
adlandırılırlar

İndüklenebilir Beta Laktamaz (IBL)

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

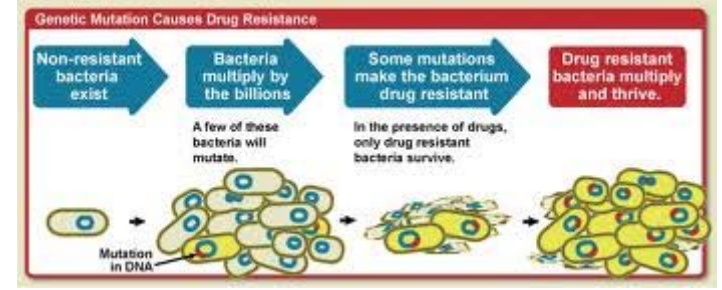
AmpC

- Aslında indüksiyon mekanizması iyi çalışan suşlarda **kromozomal** beta laktamazlar klinik açıdan fazla sorun oluşturmaz

ANCAK

indüksiyon kontrol mekanizmaları defektif olan ve bu nedenle sürekli yüksek düzeyde enzim üretebilen (dereprese) mutantlar bulunmaktadır

AmpC



Sorun:

Bu türlerde bulunan dereprese mutantların seçilmesidir

Sürekli yüksek miktarda enzim sentezi

3. kuşak sefalosporin tedavisi sırasında seçilirler

Tedavi Başarısızlığı

AmpC

Çünkü,

aşırı miktarda İBL

karbapenemler hariç tüm beta laktamları

parçalayabilme özelliğindedir

AmpC

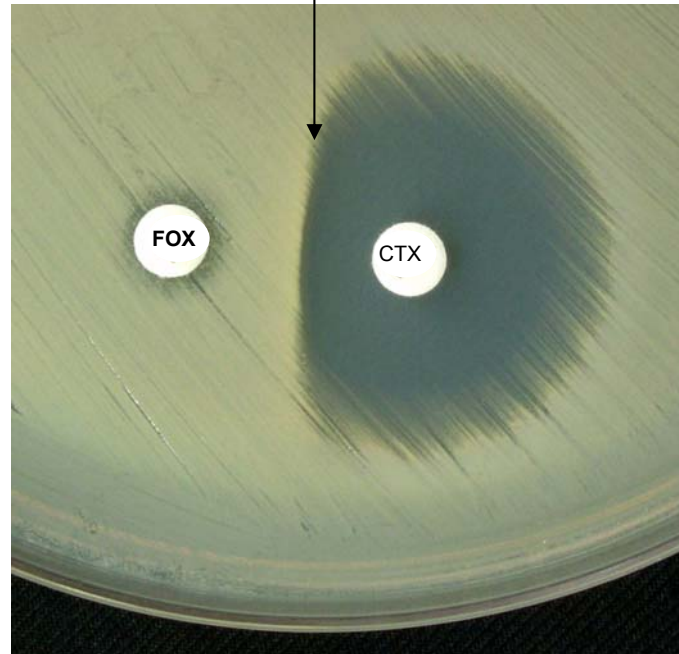
Ayrıca,
antibiyotiğin hücre içinde birikmesini engelleyen
ikinci bir mekanizma ile birleştğinde (örn: porin
kaybı) karbapenemlere bile direnç görülür

AmpC

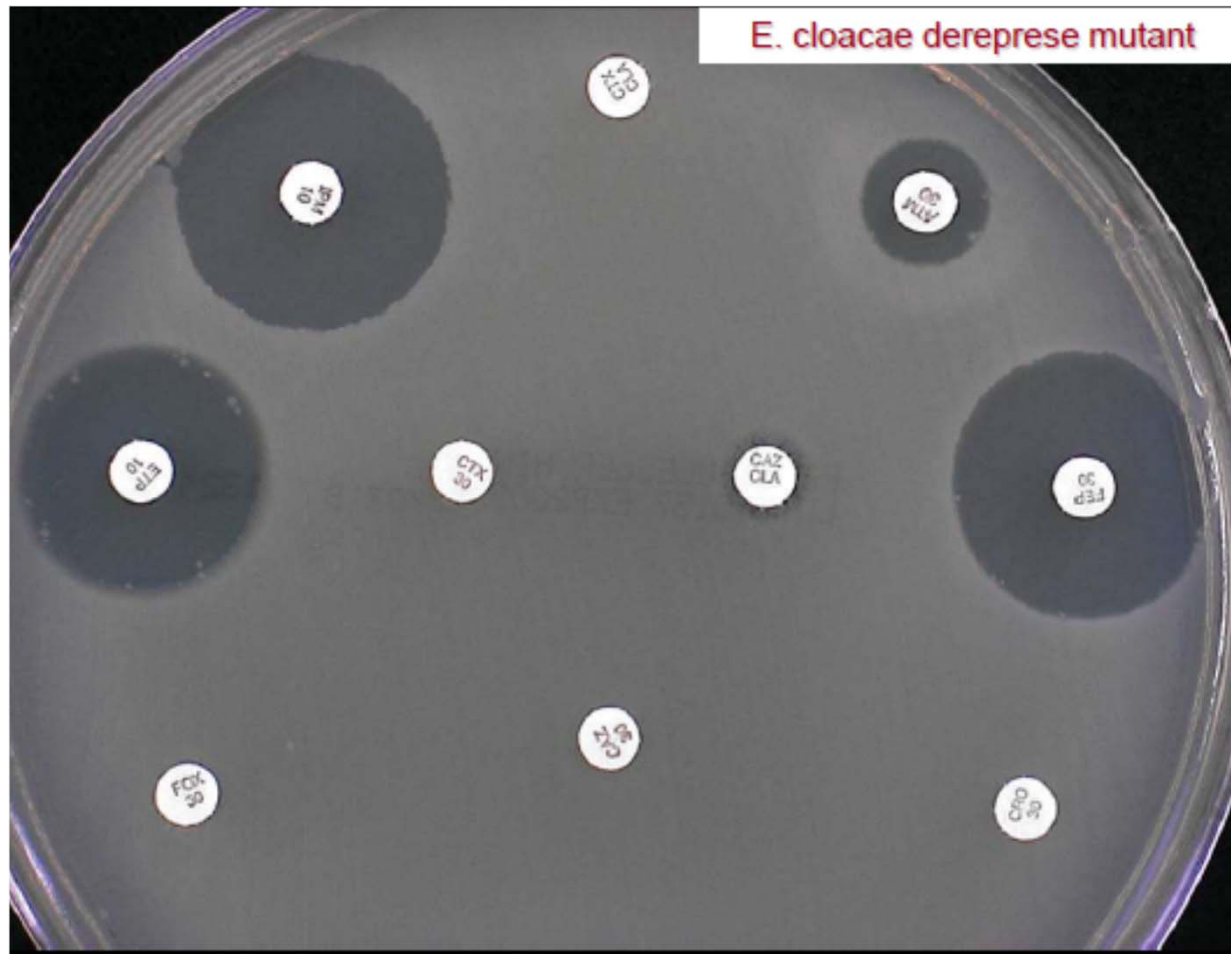


- antibiyogramda

E. cloacae'da iBL



AmpC



AmpC

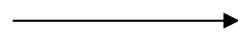
- *E. cloacae*

Ampisilin: S

Sefazolin: S

Seftriakson: S

Sefepim: S



- *E. cloacae*

Ampisilin: R

Sefazolin: R

Seftriakson: R

Sefepim: S

AmpC

- Dirençli mutantların seçilmesi;

Kullanılan antibiyotik

Antibiyotik konsantrasyonu

İnokulum yoğunluğu

Bakteri türü

AmpC

Bakteremi tedavisi sırasında dereprese
mutant seçilme sıklığı %20-40

AmpC

Ne yapmalıyız?

Ayrı test yapılmasına gerek yoktur!

- Laboratuvar klinisyeni bilgilendirmek amacıyla not düşebilir

CLSI notu

Enterobacter, Citrobacter ve Serratia

3. kuşak sefalosporinlerin uzun süre kullanılması durumunda AmpC beta laktamaz derepresyonu nedeniyle direnç gelişebilir.

Bu nedenle 3-4 günde bir kültür ve antibiyotik duyarlılık testlerinin tekrarı uygun olur.

Plasmid kökenli AmpC

Sürekli yüksek düzeyde AmpC yapımı

- **CMY** (1-59),
- **FOX** (1-8),
- **LAT-1**,
- **MOX**(1-8),
- **DHA** (1-7),
- **ACT** (1-8), **ACC** (1-4),
- **MIR** (1-5), CFE-1
- İndüklenebilir:
- **ACT-1**
- **DHA-1**
- **DHA-2**
- **CMY-13**

Plasmid kökenli AmpC

- 1989
- Plasmid üzerinde diğer direnç genleri de bulunur (örn:ESBL)
- Sıklıkla çoklu dirençlidirler

Plasmid kökenli AmpC

En sık

K.pneumoniae, E.coli, Salmonella spp.

Proteus mirabilis gibi

İBL özelliği bulunmayan türlerde;

3. kuşak sefalosporinlerin yanısıra
sefoksitin ve beta laktamaz inhibitörlerine de
direnç varsa!!!düşünülmelidir.

Plasmid kökenli AmpC tanımlanması

İBL özelliği bulunmayan türlerde;

sefoksitin ve beta-laktamaz inhibitörü R

seftazidim, sefotaksim R, sefepim S.

seftazidim, sefotaksim R ama ESBL negatif

ise!

düşünülmeli

(ESBL ile beraber olabilir)

Plasmid kökenli AmpC tanımlanması

Fenotipik yöntemler

E test AmpC

Kloksasilin ve Boronik asit türevleri ile disk kombinasyonları

Moleküler yöntemler

Plasmid kökenli Amp C tanımlanması

E Test Amp C
CN/CNI

(sefotetan- sefotetan ve kloksasilin)
(kloksasilin: AmpC inhibitörü)



Plasmid kökenli Amp C tanımlanması

E Test AmpC

- Sefotetan (0.5-32 mg/L) ±kloksasilin stripleri
- Mueller Hinton agar, 0.5 McFarland
- 16-20 saat inkübasyon
- $MİK \geq 8$ kat azalma



Plasmid kökenli Amp C tanımlanması

Sefoksitin-kloksasilin disk kombinasyonu
(Cefoxitin-cloxacillin double-disc synergy test CC-DDS)

30µg sefoksitin diski

30µg sefoksitin+200 µg kloksasilin diski

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Aug. 2011, p. 2798–2803
0095-1137/11/\$12.00 doi:10.1128/JCM.00404-11
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 49, No. 8

Practical Approach for Reliable Detection of AmpC Beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*[†]

**Silke Polsfuss,[†] Guido V. Bloemberg,[†] Jacqueline Giger, Vera Meyer,
Erik C. Böttger, and Michael Hombach***

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Zürich, 8006 Zürich, Switzerland

Plasmid kökenli Amp C tanımlanması

- Sefoksitin-kloksasilin disk kombinasyonu
Mueller Hinton agar,
0.5 McFarland
16-20 saat inkübasyon

Sefoksitin-kloksasilin inhibisyon zonu-sefoksitin inh
zonu= ≥ 4 mm fark

AmpC tanımlanması

Boronik asit (AmpC inhibitörü) ile disk kombinasyonu

CAZ 30µg ve CAZ 30 µg +BA 400 µg

ve

CTX 30µg ve CTX 30µg +BA 400 µg

CTX+BA inh zonu- CTX inh zonu veya

CAZ+BA inh zonu- CAZ inh zonu= ≥ 5 mm
fark

Plasmid kökenli Amp C tanımlanması

Altın standart:moleküler yöntemler

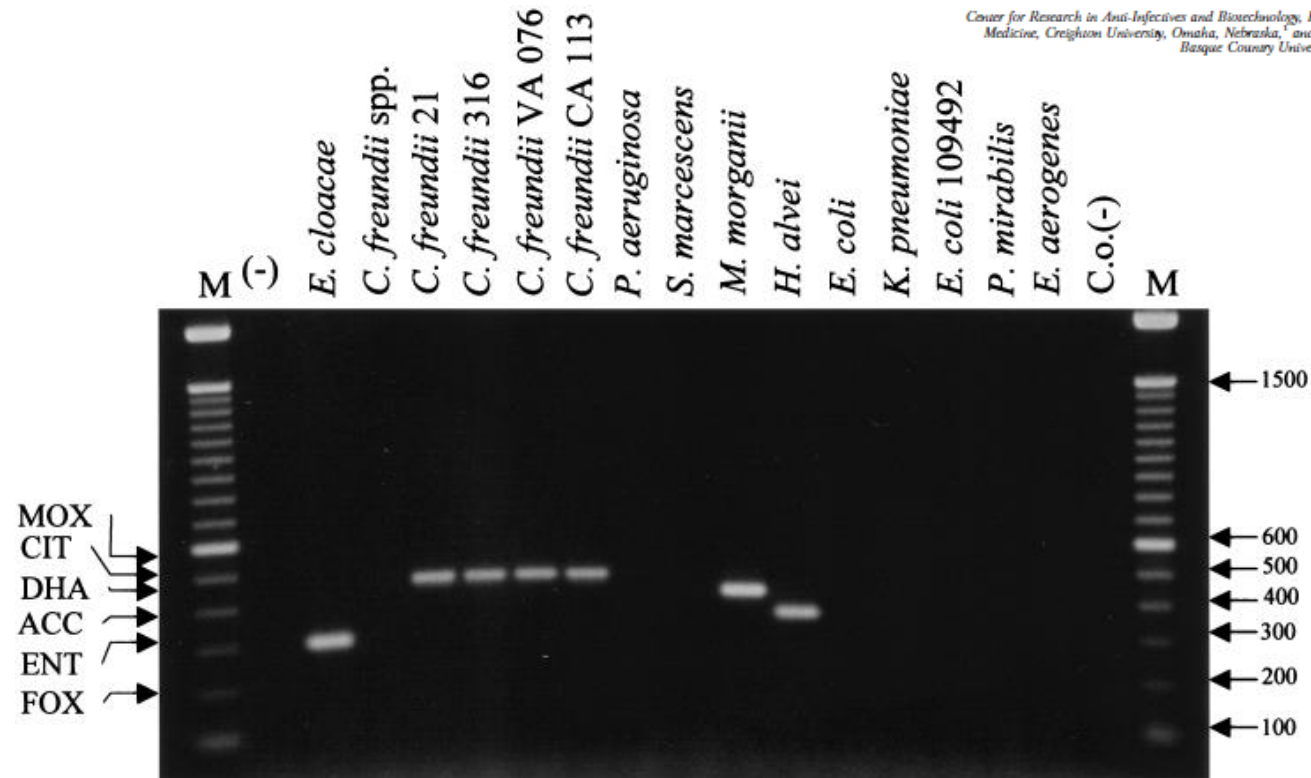
JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, June 2002, p. 2153-2162
0095-1137/02/\$04.00+0 DOI: 10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002
Copyright © 2002, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 40, No. 6

Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR

F. Javier Pérez-Pérez^{1,2} and Nancy D. Hanson^{1*}

Cover for Research in Anti-Infectives and Biotechnology, Department of Medical Microbiology and Immunology, School of Medicine, Creighton University, Omaha, Nebraska,¹ and Department of Immunology, Microbiology, and Parasitology, Basque Country University, Vitoria-Gasteiz, Spain²



ESBL

Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar

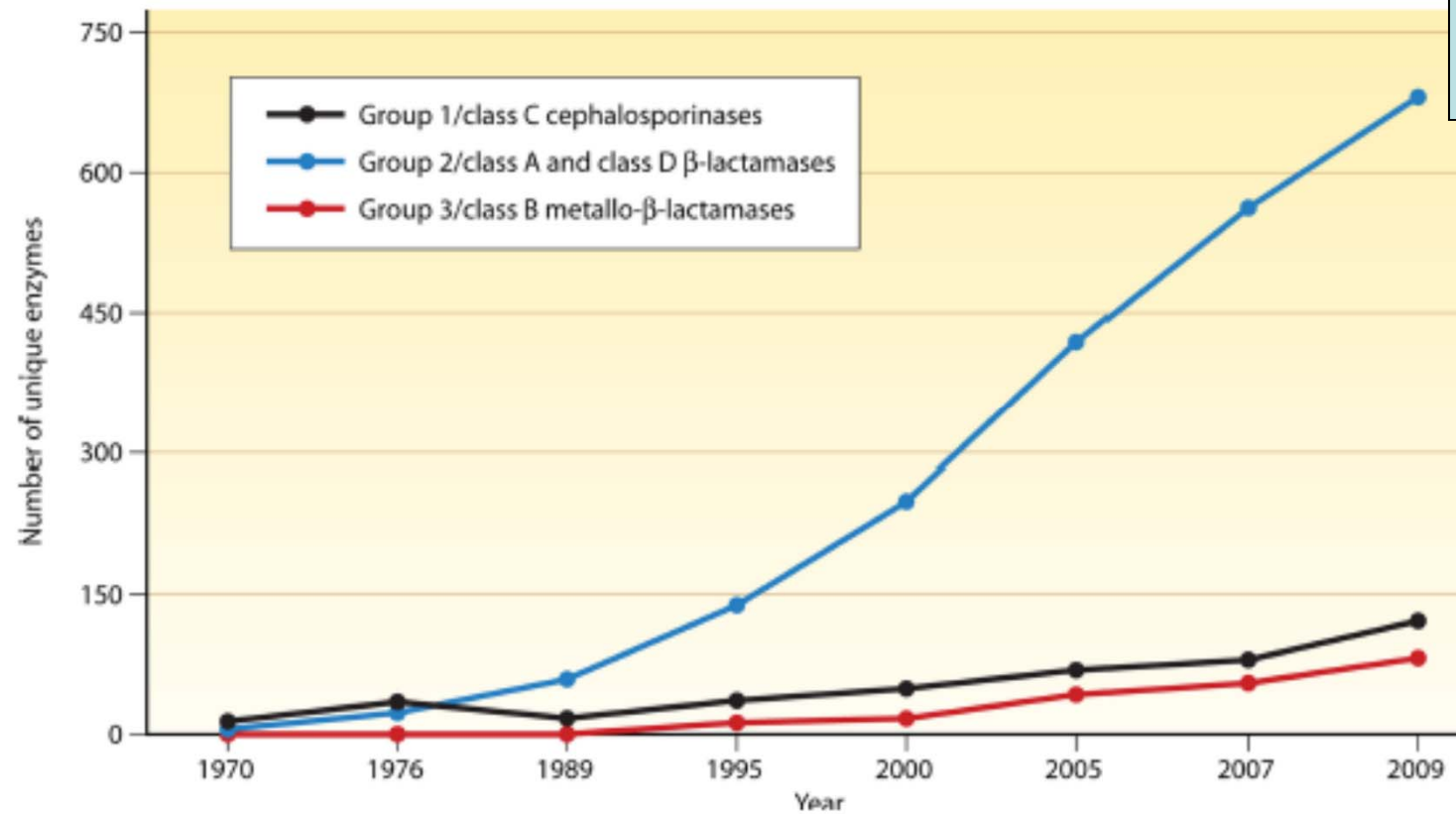
Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby- Medeiros group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)
1	1	C	Cephalosporins
1e	NI ^b	C	Cephalosporins
2a	2a	A	Penicillins
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams
2br	2br	A	Penicillins
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams
2c	2c	A	Carbenicillin
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime
2d	2d	D	Cloxacillin
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins
2df	NI	D	Carbapenems
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins

MINIREVIEW

Updated Functional Classification of β -Lactamases[∇]

Karen Bush^{1*} and George A. Jacoby²

Department of Biology, Indiana University, Bloomington, Indiana,¹ and Lahey Clinic, Burlington, Massachusetts²



Grup2

Sınıf A (Ambler);
veya Grup 2be (Bush-
Jacoby-Mederios)

ESBL

- Penisilinler, 1-4. kuşak sefalosporinler, monobaktamları hidrolize eden enzimlerdir sefamisinler(sefotetan ve sefoksitin) ve karbapenemler etkilenmez

Beta-laktamaz inhibitörleri ile inaktive olurlar
(Klavulanat,tazobaktam,sulbaktam)

ESBL

Temel gruplar:

I. TEM-türevi ESBLler

II. SHV-türevi ESBLler

III. TEM ve SHV dışı ESBLler

- **I. CTX-M**
- **II. GES (IBC)**
- **III. VEB**
- **IV. PER**
- **V. Diğer: BEL-1, BES-1, TLA1/2, SFO-1**
- **VI. OXA ESBL (grup 2d, sınıf D):OXA-10 ve 2 türevleri**

300'e yakın sayıda

www.lahey.org/Studies

ESBL

1980-2000 yılları

- *K.pneumoniae*

SHV ve TEM türevleri

Hastane enfeksiyonlarından

Çoklu dirençli (florokinolon direnci düşük)

ESBL

2000 yıllarından sonra

E.coli

CTX-M (başarılı klonlar ör:üropatojen *E.coli* ST131:O25H4
ve başarılı virulans plazmidleri IncFII/FI-CTX-M-15;Inc L/M
CTX-M-3 ile yayılımına bağlı)



Toplum ve hastane kökenli enfeksiyonlar
Çoklu dirençli, kinolon direnci yüksek

ESBL

Sınır değerler düşürüldü
(CLSI 2010)

Rutin ESBL tanımlaması
önerilmiyor
sadece
epidemiyoloji ve enfeksiyon
kontrolü için
öneriliyor.

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
Seftizoksım	≤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

ESBL Tanımlanması

1-Tarama: İndikatör sefalosporinlerle

K. pneumoniae*, *K. oxytoca* ve *E. coli için;

sefpodoksim 10µg / seftazidim 30µg / aztreonam 30µg /

sefotaksim 30µg / seftriakson 30µg

P. mirabilis için;

sefpodoksim 10µg / seftazidim 30µg / sefotaksim 30µg

Test edilen sefalosporin sayısı çok olursa duyarlılık artar

MHA, disk difüzyon, 16-18 saat

ESBL Tarama (CLSI kriterleri)

antibiyotik	disk tarama(mm)	MİK arama(mg/L)
sefpodoksim	$\leq 17, 22^*$	$\geq 8, 2^*$
seftazidim	≤ 22	≥ 2
sefotaksim	≤ 27	≥ 2
seftriakson	≤ 25	≥ 2
aztreonam	≤ 27	≥ 2

* *P. mirabilis* için (klinik açıdan önemi olan izolatlarda önerilir örn: bakteremik)

ESBL Tanımlanması

2- Fenotipik Doğrulama: Taramada şüpheli olanlara uygulanır

Beta laktamaz inhibitörlerine duyarlılık temellidir

seftazidim 30 μ g ve seftazidim-klavulanik asit 30/10 μ g

VE

sefotaksim 30 μ g ve sefotaksim-klavulanik asit 30/10 μ g

ESBL doğrulama (CLSI kriterleri)

	Disk içeriği (µg)	Yorum	MİK dağılımı (mg/L)	Yorum
CAZ	30		0.25-128	
CAZ+klav	30+10	≥ 5 mm	0.25/4- 128/4	≥ 3 log 2dil (8 kat azalma)
CTX	30		0.25-128	
CTX+klav	30+10	≥ 5 mm	0.25/4- 128/4	≥ 3 log 2dil (8 kat azalma)

ESBL doğrulama (CLSI kriterleri)



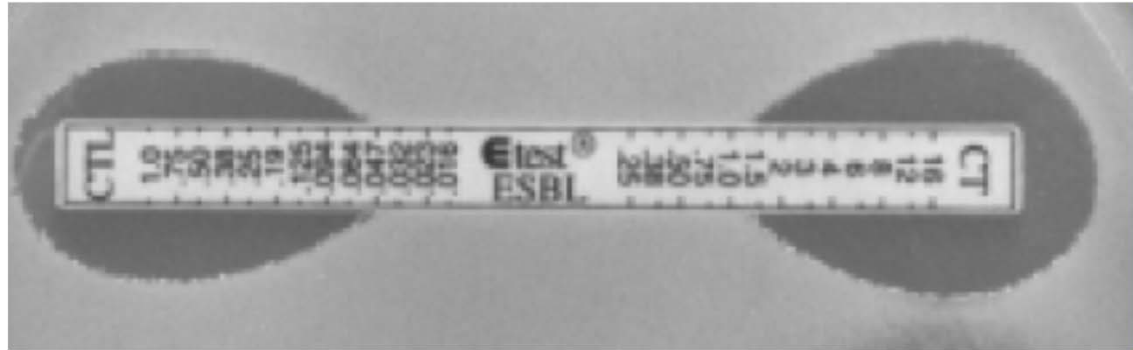
Herhangi birinde 5mm ve üzeri genişleme

Çift disk sinerji

Çift disk
sinerji

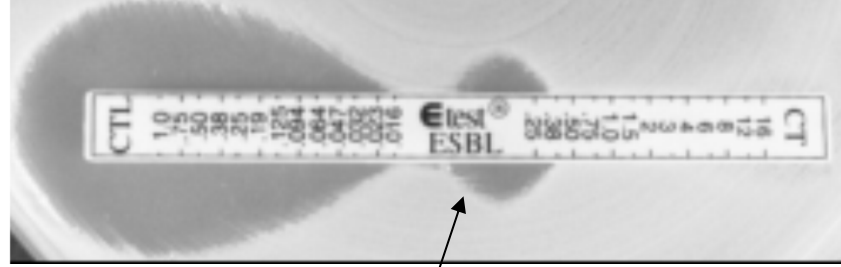


E test ile ESBL doğrulama

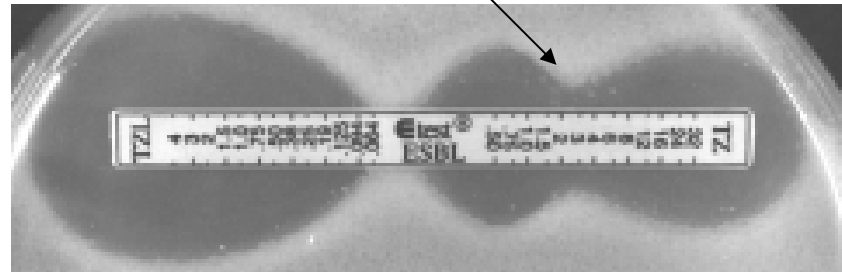


CT/CTL
TZ/TZL
MİK değerinde >8 kat azalma

E test ile ESBL doğrulama



Fantom zon
Elipste deformasyon



ESBL Tanımlanması

	olumlu	olumsuz
Çift disk sinerji (DDS)	rutin antibiyogramda Ucuz kolay uygulanır	Diskler arası uzaklık standart olmuyor Değerlendirme için deneyim
Kombine disk	Ucuz, duyarlı,özgül; Kantitatif sonuç	Kontroller uygulanmalı
E test	Duyarlı, kolay,kantitatif	Pahalı

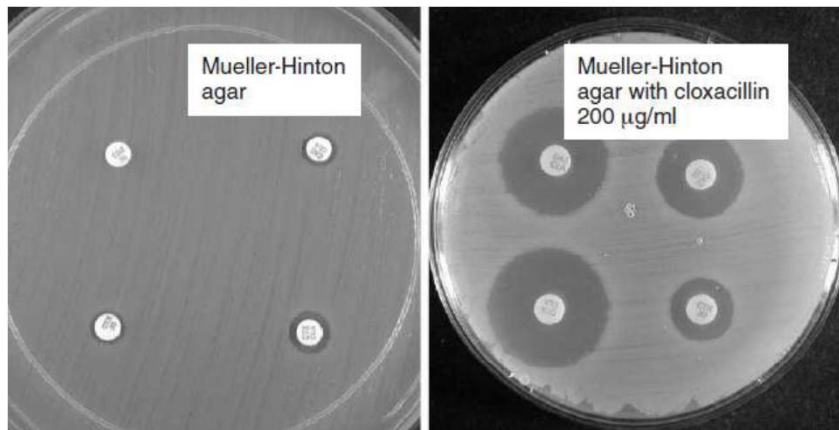
Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamases among
Enterobacteriaceae by Use of Semiautomated Microbiology
Systems and Manual Detection Procedures⁷

Irith Wiegand,¹ Heinrich K. Geiss,² Dietrich Mack,³ Enno Stürenburg,⁴ and Harald Seifert^{5*}

yöntem	duyarlılık	özgüllük	PPV	NPV
Microscan	83.4	72.9	81.6	75.5
Phoenix	98.3	53.2	75.0	96.6
Vitek2	85.9	78.0	84.9	79.3
DDS	94.1	81.4	87.9	90.6
Kombine disk	92.9	96.6	97.5	90.5
E test	94.1	84.7	89.9	90.9

AmpC + ESBL

Ortama AmpC inhibitörü eklemek
yada
100/500 µg /disk ile çift disk test



AmpC (+) E. coli
MHA'a kloksasilin
200 µg /ml eklenince
ESBL (+)

COMMENTARY

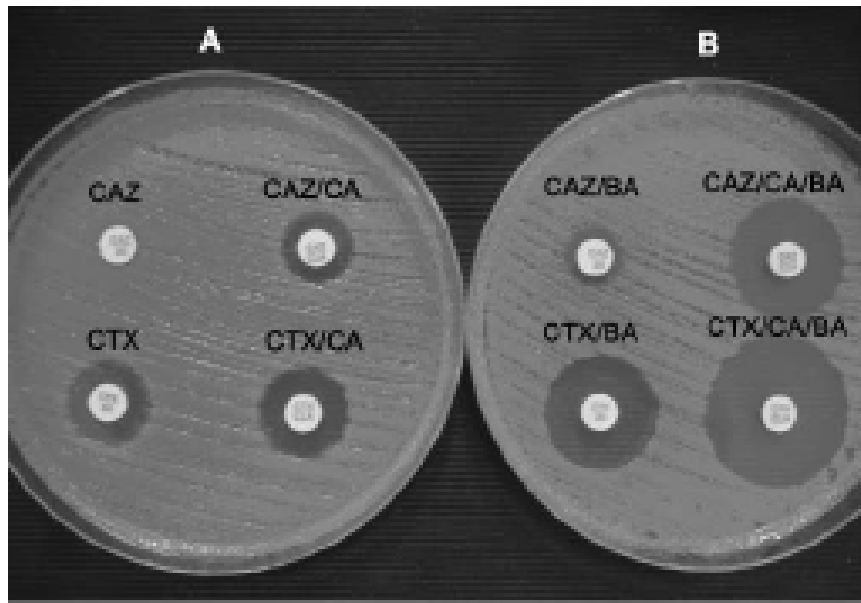
Extended-Spectrum-β-Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues^v

Kenneth S. Thomson*

Creighton University School of Medicine, 2500 California Plaza, Omaha, Nebraska

AmpC + ESBL

2. AmpC inhibitörü boronik asitle
Kombine disk veya çift disk sinerji



ESCMID Postgraduate
Technical Workshop

**Clinical Implications
of Antimicrobial
Susceptibility Testing**

**Izmir, Turkey
10 – 12 March 2011**

$$\begin{aligned} &(\text{CAZ} + \text{Klv} + \text{BA}) - (\text{CAZ} + \text{BA}) = \\ &(\text{CTX} + \text{Klv} + \text{BA}) - (\text{CTX} + \text{BA}) = \\ &\geq 5 \text{ mm} \\ &\text{ESBL (+)} \end{aligned}$$

AmpC + ESBL



3. AmpC ile hidrolize olmayan bir sefalosporin

(örn: sefepim) ve klavulanat ile kombinasyonu

(disk/ E Test)

Belirsiz sonuçlarda MHA'a kloksasilin eklenmeli

Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2004) 54, 134–138
DOI: 10.1093/jac/dkh274
Advance Access publication 18 May 2004

JAC

Evaluation of a new cefepime–clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum β -lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection

Enno Stürenburg*, Ingo Sobottka, Djahesh Noor, Rainer Laufs and Dietrich Mack

*Institut für Infektionsmedizin, Zentrum für Klinisch-Theoretische Medizin I, Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, D-20246 Hamburg, Germany*



ESBL (+)