

# KÜÇÜK KOLONİ VARYANTLARI, BİYOFİLM FORMLARI TOLERAN, PERSİSTAN BAKTERİLER VE L-FORMLARI

Dr. Burçin Şener

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji AD



*10. Antimikrobik Kemoterapi Günleri – Nisan 2012, İstanbul*

# Duyarlılık Testlerinin Uygulanmasında ve Yorumlanmasında Sorun Yaşanan Bakteriler

- Küçük koloni varyantları
- Biyofilm formasyonu
- L-formlar
- Tolerans
- Persistans

**NEDEN**

**SORUN**

**YAŞANMAKTA ?**

Klinik örneklerden izolasyonları zor

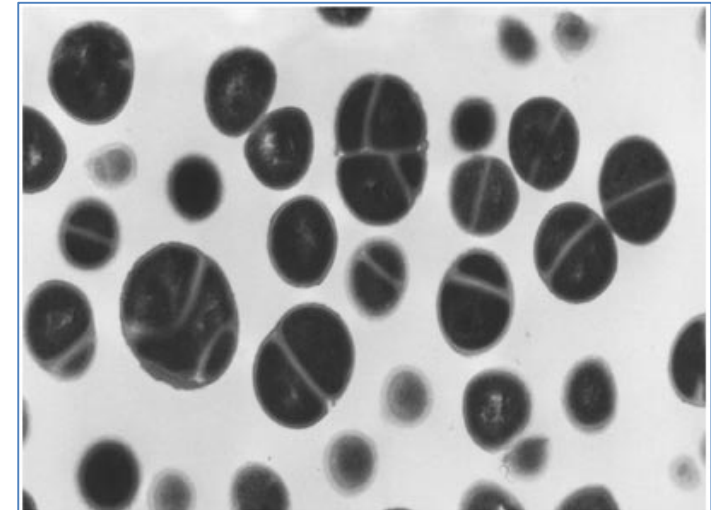
Tanımlanma problemleri

Standart duyarlılık yöntemleri henüz yok

Duyarlılık sonuçlarının klinik yansıması ?

# Küçük Koloni Varyantları (KKV)

- Normal koloni morfolojisine göre daha küçük, fenotipik özellikleri değişken bakteriler
- Metabolik özellikleri:
  - Karbonhidrat kullanımları kısıtlı
  - Fermentasyon ve solunum yetenekleri azalmış
  - Düşük ATP düzeyine sahip
  - Elektron transportunda yetersizlik
  - Timidin biyosentezinde yetersizlik



# KKV enfeksiyonları

- Hücre içi yaşama özelliği
  - Antibiyotiklerden korunma
  - Bağışıklık sisteminden kaçış
- Kronik, persistan enfeksiyonlar
  - Kistik fibrozis solunum yolu enfeksiyonları
  - Kronik osteomyelitler
  - Protez enfeksiyonları

---

The small colony variant (SCV) concept—the role of staphylococcal SCVs in persistent infections

Christof von Eiff, Georg Peters, Karsten Becker    Injury, Int. J. Care Injured (2006) 37, S26–S33

# Kistik Fibrozis ve KKV

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Jan. 2007, p. 168–172

0095-1137/07/\$08.00+0 doi:10.1128/JCM.01510-06

Copyright © 2007, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 45, No. 1

## Prevalence and Clinical Significance of *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants in Cystic Fibrosis Lung Disease<sup>▽</sup>

Silke Besier,<sup>1\*</sup> Christina Smaczny,<sup>2</sup> Christian von Mallinckrodt,<sup>2</sup> Andreas Krahel,<sup>3</sup>

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Nov. 2008, p. 3829–3832

0095-1137/08/\$08.00+0 doi:10.1128/JCM.01440-08

Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 46, No. 11

## Thymidine-Dependent *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants: Human Pathogens That Are Relevant Not Only in Cases of Cystic Fibrosis Lung Disease<sup>▽</sup>

Silke Besier,<sup>1\*</sup> Johannes Zander,<sup>1</sup> Ekkehard Siegel,<sup>2</sup> Stephan H. Saum,<sup>3</sup> Klaus-Peter Hunfeld,<sup>1</sup>

Annabelle Elkhart, Volker Bräde, and Thomas A. Wichelhaus

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, May 2008, p. 1832–1834

0095-1137/08/\$08.00+0 doi:10.1128/JCM.00361-08

Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 46, No. 5

## Clinical Characteristics Associated with Isolation of Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from Respiratory Secretions of Patients with Cystic Fibrosis<sup>▽</sup>

Michael Schneider,<sup>1</sup> Kathrin Mühlemann,<sup>1</sup> Sara Droz,<sup>1</sup> Sabine Couzinet,<sup>1</sup>  
Carmen Casaulta,<sup>2</sup> and Stefan Zimmerli<sup>1\*</sup>

# Kistik Fibrozis ve KKV

- KF *S.aureus* KKV prevelansı: % 4-50
  - Yağcı ve ark. Hacettepe: olguların % 8.1'i
- Uzun süreli aminoglikozid ve TMP-SXT kullanımı
  - Timidin KF'de solunum sekresyonlarında bol miktarda bulunmakta
  - Timidin-bağımlı KKV, SXT'nin inhibe ettiği sentez basamağından etkilenmeden, hücre dışı timidini alarak SXT varlığında da canlılığını sürdürebilmekte

# Recovery of Small Colony Variants of *Staphylococcus aureus* Following Gentamicin Bead Placement for Osteomyelitis

Christof von Eiff, Dieter Bettin, Richard A. Proctor,  
Bernd Rolaufts, Norbert Lindner, Winfried Winkelmann,  
and Georg Peters

**Table 1.** Small colony variants and normal colony type of *Staphylococcus aureus* in patients with or without previous local gentamicin treatment.

| Case no. | Colony type | Previous local gentamicin therapy | Other previous systemic antibiotics | Auxotroph | Cause of osteomyelitis | Recurrence of osteomyelitis* |
|----------|-------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------|------------------------|------------------------------|
| 1        | n           | No                                | PenG, Ctax, Cm, Cpfx                | No        | Postoperative          | No                           |
| 2        | n           | No                                | None                                | No        | Hematogenous           | No                           |
| 3        | n           | No                                | Cm                                  | No        | Contiguous             | No                           |
| 4        | n           | No                                | None                                | No        | Posttraumatic          | No                           |
| 5        | n           | No                                | None                                | No        | Hematogenous           | No                           |
| 6        | n           | No                                | None                                | No        | Hematogenous           | No                           |
| 7        | n           | No                                | Oxa                                 | No        | Posttraumatic          | No                           |
| 8        | n           | No                                | None                                | No        | Hematogenous           | No                           |
| 9        | n           | No                                | Ctax                                | No        | Postoperative          | No                           |
| 10       | n           | No                                | Amox/CA                             | No        | Contiguous             | No                           |
| 11       | SCV         | Yes                               | Vm, Cfur                            | Hemin     | Postoperative          | Yes                          |
| 12       | SCV, n      | Yes                               | Cm                                  | Hemin     | Postoperative          | Yes                          |
| 13       | SCV, n      | Yes                               | Vm                                  | Hemin     | Posttraumatic          | Yes                          |
| 14       | SCV, n      | Yes                               | Oxa, Ctax, Cm                       | Menadione | Postvaccination        | Yes                          |

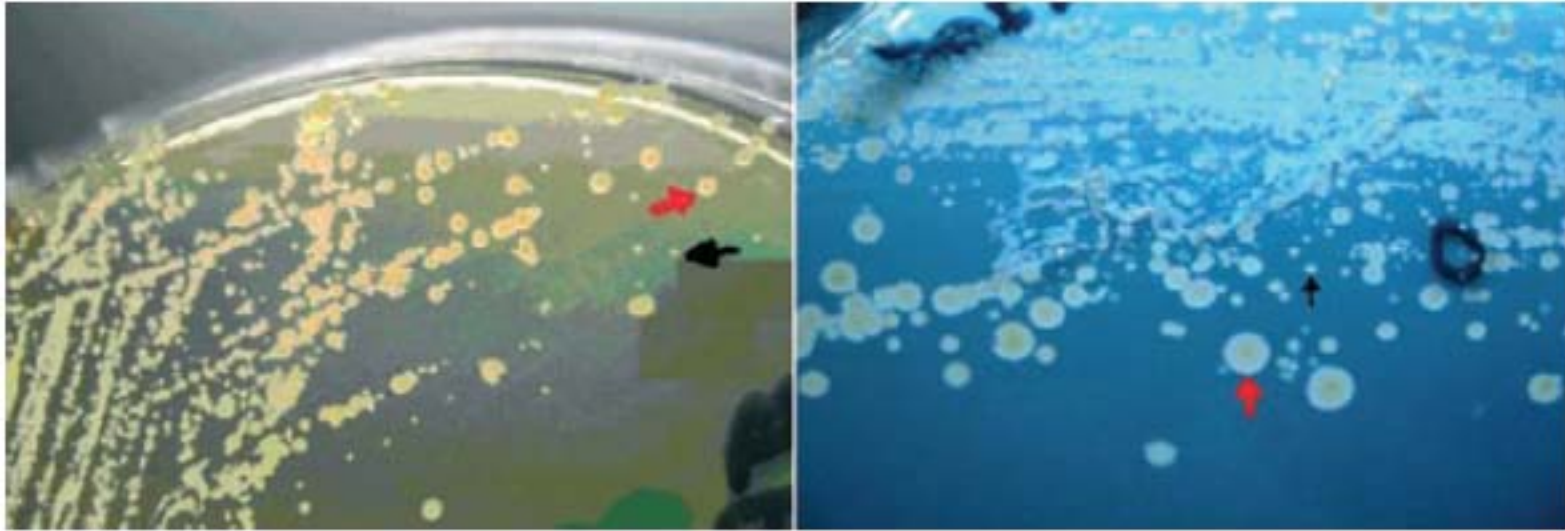


# Hangi durumlarda KKV düşünülmeli?

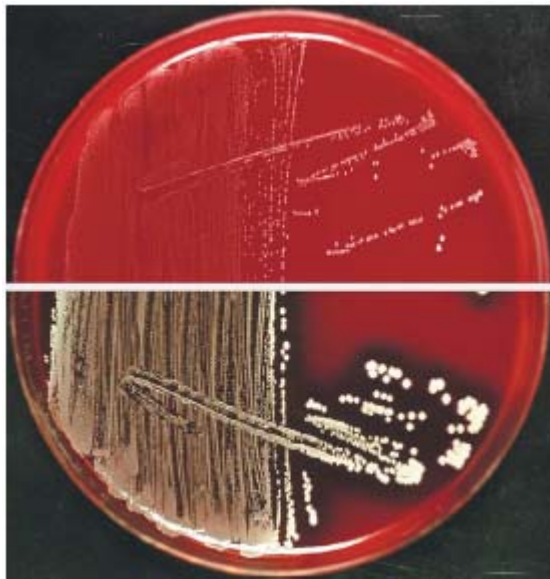
- Uzun hastalıksız dönemleri olan KF hastaları
- Nadir görülen persistan enfeksiyonu olan hastalar
- Kronik enfeksiyonlarda tedaviye yanıt vermeyen hastalar
- Uzun süreli aminoglikozid ve TMP-SXT kullanan hastalar

# KKV – Laboratuvar tanı

- Koyun kanlı agarda zayıf üreme
  - Gözden kaçabilir
- Mannitol tuz agar
- Columbia kanlı agar
- Kromojenik *S.aureus* ID agar
- % 5 sodyum klorürlü beyin-kalp infüzyon agar
- 48-72 saat inkübasyon
- %5-10 CO<sub>2</sub>'de inkübasyon

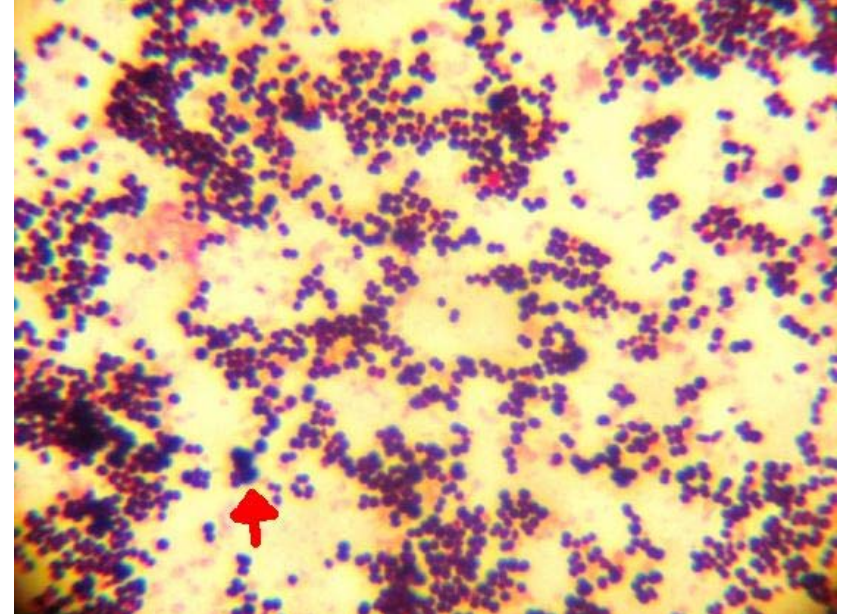


Karışık morfotipte koloniler



KKV

Normal fenotip



Gram boyalı yayma

# KKV - Tanı

- Pigment: +/-
- Hemoliz: +/-
- Koagülaz: +/-
- Gram boyama: pleomorfik koklar
- Schaedler agara pasaj, %5-10 CO<sub>2</sub>'de inkübasyon
  - Normal fenotipe dönüşüm
- % 5 kanlı agara pasaj, normal atmosferde inkübasyon
  - KKV fenotipinde üreme

## **KKV saptanması neden önemli ?**

- Etkenin hücre içi yerleşim göstermesi
  - Tedavi güçlüğü
- Uzun süreli tedavi gerekliliği
- Kombine tedavi gerekliliği
- Tedaviye rifampisin eklenmesi ?

# KKV- Antibiyotik Duyarlılık Testleri

- Henüz belirlenmiş bir standart yoktur
- Yavaş üreme difüzyon testlerini ve duyarlılık saptama zamanını etkilemekte
- Disk difüzyon ve otomatize sistemler önerilmemekte
- Dilüsyon esaslı testler önerilmekte
  - Sıvı dilüsyon
  - Agar dilüsyon

# KKV – Direnç

- Yavaş üreme özelliği → beta-laktamlara direnç
- Elektron transport zincirinde yetersizlik → aminoglikozidlere direnç
- Timidin bağımlı suşlar → SXT direnci
- Florokinolon duyarlı ?
  - Özellikle asidik pH'da etkili olan ve hücre içi konsantrasyonu yüksek olan antibiyotikler
- KKV *S.aureus*'da metisilin direnci saptanması:
  - *mecA* geninin moleküler yöntemlerle gösterilmesi
  - PBP2a lateks aglütinasyon testi

## Prevalence and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis patients

S. Yagci<sup>1</sup>, G. Hascelik<sup>2</sup>, D. Dogru<sup>3</sup>, U. Ozcelik<sup>3</sup> and B. Sener<sup>2</sup>

1) Infectious Diseases and Clinical Microbiology Clinic, Ankara Training and Research Hospital, 2) Department of Microbiology and Clinical Microbiology, Hacettepe University Medical Faculty and 3) Chest Diseases Unit, Hacettepe University Medical Faculty, Ihsan Dogramaci Children's Hospital, Ankara, Turkey

*Clin Microbiol Infect*

- 248 KF olgusu
- Şubat 2007-Ocak 2008
- İzolasyon ve tanımlama: Mannitol tuz agar, Columbia kanlı agar, %5 koyun kanlı BKİA
- nucA PCR ile doğrulama
- Oksotrofi testleri: timidin ve menadion için
- Antibiyotik duyarlılık testi: mikrodilüsyon
- PFGE ile asıl koloni ve KKV arasında genetik yakınlık araştırma



248 olgu

123 olgu (%49.6) *S.aureus* (+)  $\longrightarrow$  20'si (%16.2) KKV (+)  $\longrightarrow$  48 KKV izolatı

En çok KKV üreyen besiyeri: Mannitol tuz agar

14 olguda KKV ve asıl *S.aureus* suşları arasında klonal yakınlık gösterildi

**TABLE 3.** Antibiotic susceptibilities of *Staphylococcus aureus* small-colony variants (SCVs) and paired normal *S. aureus* strains

| Antibiotic               | <i>S. aureus</i> (n = 33) |                          |                          |                    | <i>S. aureus</i> SCV (n = 48) |                          |                          |                    |
|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|
|                          | MIC range (mg/L)          | MIC <sub>50</sub> (mg/L) | MIC <sub>90</sub> (mg/L) | R (%) <sup>a</sup> | MIC range (mg/L)              | MIC <sub>50</sub> (mg/L) | MIC <sub>90</sub> (mg/L) | R (%) <sup>a</sup> |
| Oxacillin                | ≤0.06–2                   | 0.25                     | 1                        | –                  | ≤0.06 to >64                  | 0.25                     | 4                        | 5 (10.4)           |
| Gentamicin               | ≤0.125–4                  | 1                        | 4                        | –                  | ≤0.125 to >128                | 1                        | 4                        | 4 (8.4)            |
| Vancomycin               | 0.25–2                    | 1                        | 2                        | –                  | 0.125–2                       | 1                        | 2                        | –                  |
| Ciprofloxacin            | 0.25 to >32               | 0.5                      | 4                        | 27 (81.8)          | 0.03 to >32                   | 1                        | 16                       | 37 (77.1)          |
| Linezolid                | 0.25–4                    | 2                        | 4                        | –                  | 0.25–4                        | 2                        | 2                        | –                  |
| TMP-SXT                  | 0.016–32                  | 0.125                    | 0.25                     | 1 (3.0)            | 0.023 to >32                  | 0.25                     | 32                       | 8 (16.7)           |
| Tigecycline <sup>b</sup> | 0.015–0.5                 | 0.125                    | 0.25                     | –                  | 0.015–2                       | 0.06                     | 1                        | 6 (12.5)           |

R, resistant; TMP-SXT, trimethoprim-sulphamethoxazole.

<sup>a</sup>Intermediate strains were included in the resistant category.

<sup>b</sup>According to EUCAST breakpoints.

REVIEW ARTICLE

## ***Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology**

Ethan E. Mann & Daniel J. Wozniak

Department of Microbial Infection and Immunity, Department of Microbiology, Center for Microbial Interface Biology, The Ohio State University Medical Center, Columbus, OH, USA

*Acta Orthopaedica* 2007; 78 (3): 299-307

299

### **Review**

## **The role of nose and tre**

Daniëlle Neut<sup>1,2</sup>, Henny C van

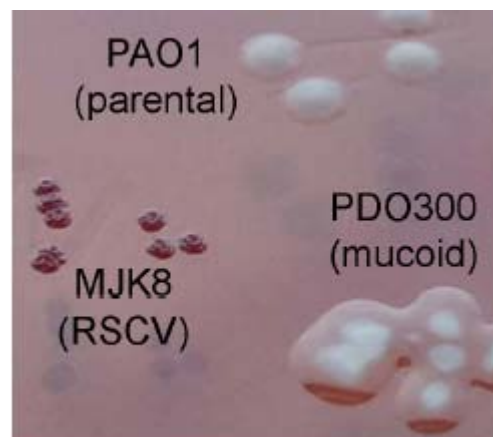
ner<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Biomedical Engineering and <sup>2</sup>Orthopaedic Surgery, University Medical Center Groningen, and University of Groningen, Groningen, the Netherlands

**Bakterilerin biyofilm içinde  
KKV formunda bulunması  
biyofilm enfeksiyonlarının  
kalıcılığını sağlayan faktördür**

KKV

BIYOFILM



# Biyofilm Formları

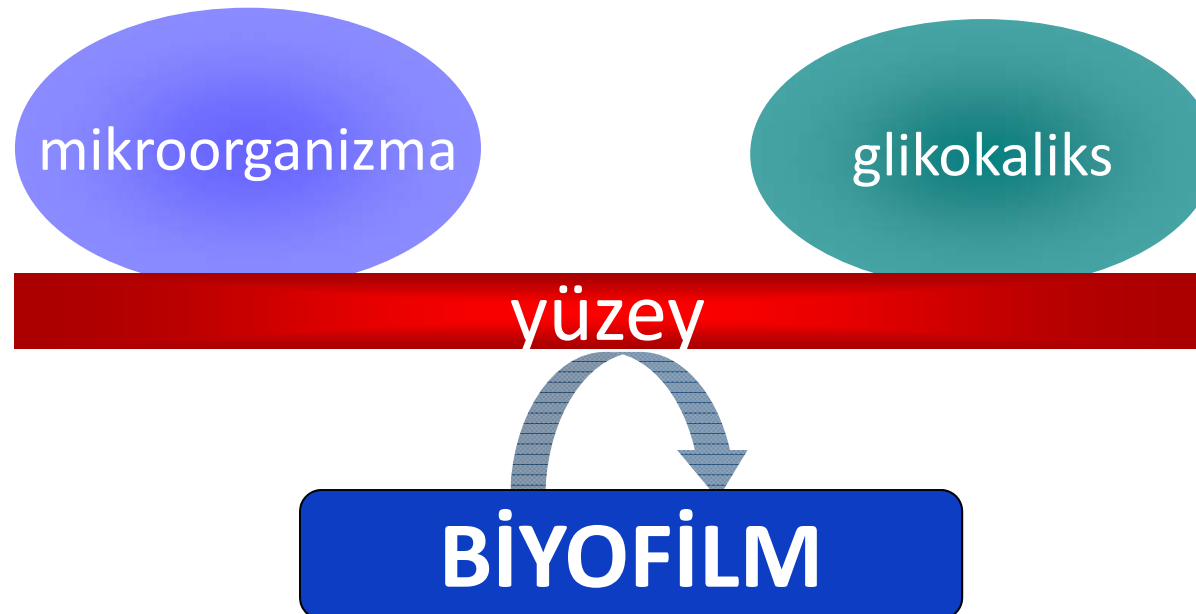
- Canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polisakkarid matriks içinde gömülü halde yaşayan mikroorganizma topluluğu
- Kalıcı ya da kalıcı olmayan tıbbi araçları veya kistik fibrozis gibi bazı hastalıklarda solunum yollarını kolonize eden bakterilerin oluşturduğu dinamik yapı

Nozokomiyal  
enfeksiyonların %65'i



# Mikroorganizmalar Neden Biyofilm Oluşturur?

- Savunma
  - Strese yanıt
    - besin yoksunluğu, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoz ve antibiyotikler
- Adezyon ve kolonizasyon
- Adaptasyon



# Biyofilm enfeksiyonlarında tanı

- Klinik
- Histolojik
- Mikrobiyolojik
  - Peri-prostetik/implant biyopsi
  - Çoklu artroskopik sinoviyal/implant doku biyopsileri
  - Operasyon materyali (protez+çimento+çevre doku)
  - Enfeksiyon bölgesinden sıvı aspiratlar ?
  - Örneklerin **sonikasyonu** !!!
    - Antibiyotik tedavisi alan olgularda dahi üremeyi arttırıcı bir faktör
  - 7-10 gün inkübasyon

## In Vitro Effect of Ultrasound on Bacteria and Suggested Protocol for Sonication and Diagnosis of Prosthetic Infections<sup>7</sup>

Tor Monsen,<sup>1,4,5\*</sup> Eliot <sup>3</sup> and Lars Wallinder<sup>2</sup>

Sonikasyon kültürde  
bakteri üreme şansını  
önemli ölçüde arttırıyor

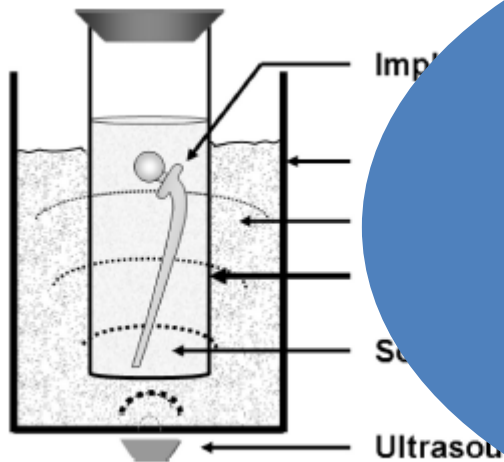


FIG. 1. Sonication system.

Gram (+)/(-) bakteriler için:  
7 dak. 22°C'de sonikasyon

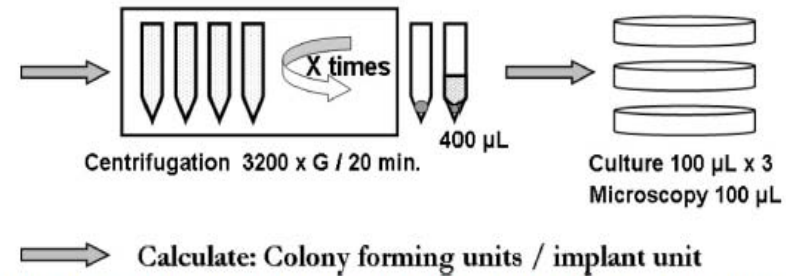


FIG. 5. Protocol for sonication of prosthetic units. (A) Sonication tube (glass cylinder) with the implant. (B) Sonication apparatus with the sonication tube and implant within the sonication tank.

# **Biyofilm formlarında antibiyotik duyarlılık testleri**

- Gerekli mi?
- Doğru in vitro model nedir?
- Tekrarlanabilirliği düşük sonuçlar
- Yetersiz klinik veri

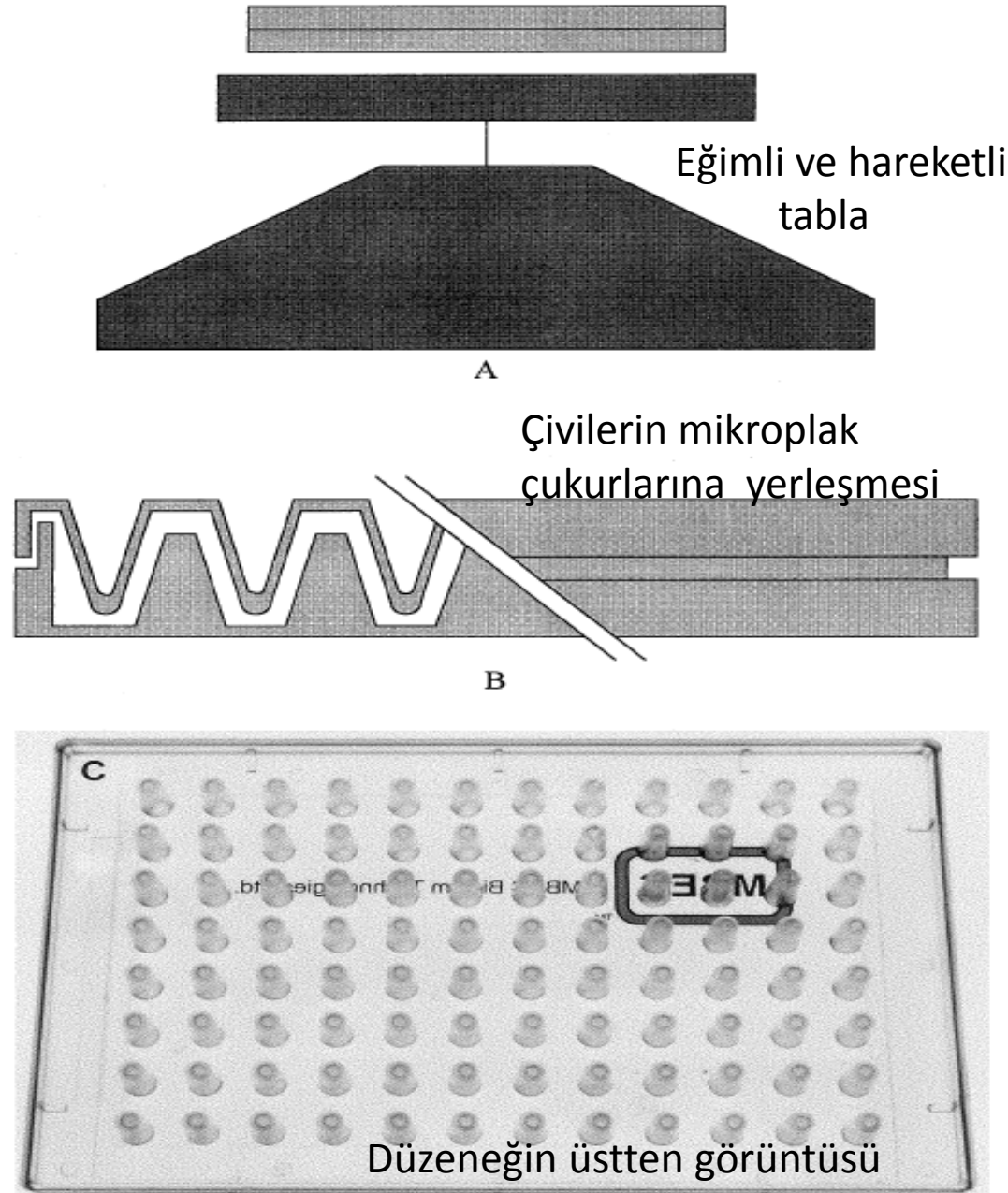


## Technology for Rapid Optibilities

MORCK,<sup>1,2</sup> AND A. BURET<sup>1,2</sup>

*Infectious Diseases,*<sup>3</sup>

IN4



CBD: Calgary Biofilm Device

# Biyofilm duyarlılık yöntemi

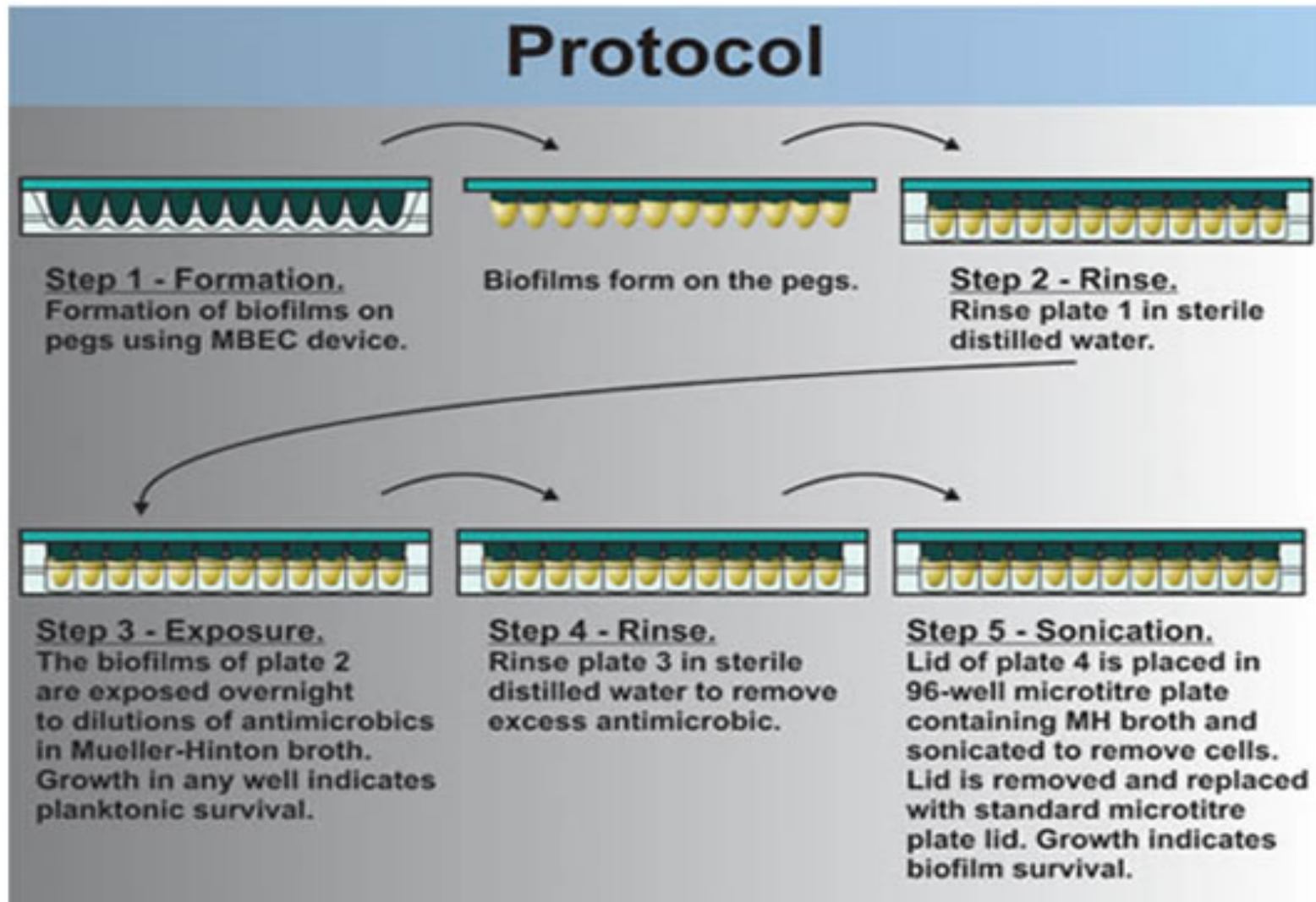


TABLE 4. Antibiotic susceptibility of *S. aureus* ATCC 29213 as a planktonic population (MIC) and as a biofilm population (MBEC) derived by the NCCLS assay and an assay with the CBD

| Antibiotic    | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) |                             | MBEC ( $\mu\text{g/ml}$ ) |                        |
|---------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------------------|
|               | NCCLS assay <sup>a</sup> | Assay with CBD <sup>a</sup> | $A_{650}$ <sup>a</sup>    | 0 CFU/peg <sup>b</sup> |
| Cefazolin     | 0.5                      | 0.5                         | >1,024                    | >1,024                 |
| Ciprofloxacin | 0.25                     | 0.5                         | 512                       | 512                    |
| Clindamycin   | 0.12                     | 0.25                        | 128                       | 256                    |
| Gentamicin    | 0.5                      | 0.5                         | 2                         | 2                      |
| Oxacillin     | 0.12                     | 0.25                        | >1,024                    | >1,024                 |
| Penicillin    | 1                        | 4                           | 128                       | 128                    |
| Vancomycin    | 1                        | 1                           | >1,024                    | >1,024                 |

<sup>a</sup> The values were obtained by measuring the turbidity at 650 nm ( $A_{650}$ ) on a 96-well plate reader.

<sup>b</sup> The values were obtained by determination of plate counts.

## Use of *Pseudomonas* bi... to assign simulated antibiotic... infection

**Biyofilm duyarlılığına ve  
konvansiyonel yöntem  
duyarlılığına göre saptanan  
antibiyotik rejimleri çok farklı**

Table 3. Effect of suscep

| Antibiotic class or combination   | MIC             | BIC  | acute hierarchy |      |
|-----------------------------------|-----------------|------|-----------------|------|
|                                   |                 |      | MIC             | BIC  |
| $\beta$ -Lactam                   | 100.0           | 42.5 | 100.0           | 65.0 |
| Aminoglycoside                    | 40.0            | 25.0 | 70.0            | 65.0 |
| Fluoroquinolone                   | 60.0            | 75.0 | 30.0            | 55.0 |
| Macrolide                         | ND <sup>a</sup> | 57.5 | ND <sup>a</sup> | 15.0 |
| $\beta$ -Lactam + aminoglycoside  | 40.0            | 10.0 | 70.0            | 35.0 |
| $\beta$ -Lactam + fluoroquinolone | 60.0            | 22.5 | 30.0            | 22.5 |
| Aminoglycoside + fluoroquinolone  | 0               | 10.0 | 0               | 27.5 |
| $\beta$ -Lactam + macrolide       | ND <sup>a</sup> | 10.0 | ND <sup>a</sup> | 7.5  |
| Aminoglycoside + macrolide        | ND <sup>a</sup> | 5.0  | ND <sup>a</sup> | 2.5  |
| Fluoroquinolone + macrolide       | ND <sup>a</sup> | 42.5 | ND <sup>a</sup> | 5.0  |

# A retrospective analysis of biofilm antibiotic susceptibility testing: A better predictor of clinical response to exacerbations ☆

Tara Keays <sup>a</sup>, Wei-Yai Yeung <sup>b</sup>,  
Thier <sup>a,\*</sup>

**Biyofilm duyarlılık sonuçlarına göre  
antibiyotik tedavisi verilen  
olgularda klinik yanıt daha iyi**

|                                              |            |             |      |
|----------------------------------------------|------------|-------------|------|
| Treatment failure                            |            |             | 0.14 |
| Patients infected with <i>B. cepacia</i>     | 4/32       |             | 0.38 |
| or <i>A. xylosoxidans</i>                    |            |             |      |
| Patients not infected with                   | 1/37       | 2/17        | 0.23 |
| <i>B. cepacia</i> and <i>A. xylosoxidans</i> |            |             |      |
| Mean hospital length of stay in days         | 13.3 (6.9) | 17.4 (11.3) | 0.04 |

# Randomized Trial of Biofilm Testing to Select Antibiotics for Cystic Fibrosis Airway Infection

Samuel M. Moskowitz, MD,<sup>1,2,3\*</sup> Julia C. Emerson, MD, MPH,<sup>2,3</sup> Sharon McNamara, MN,<sup>3</sup>  
 Richard D. Shell, MD,<sup>4</sup> David M. Orenstein, MD,<sup>5</sup> Daniel Rosenbluth, MD,<sup>6</sup> Marcia F. Katz, MD,<sup>7</sup>  
 Richard Ahrens, MD,<sup>8</sup> Douglas Hornick, MD,<sup>9</sup> Patricia M. Joseph, MD,<sup>10</sup> Ronald L. Gibson, MD, PhD,<sup>2,3</sup>  
 Moira L. Aitken, MD,<sup>11</sup> Wade W. Benton, PharmD and,<sup>3</sup> Jane L. Burns, MD<sup>2,3</sup>

**TABLE 2—Antibiotic Susceptibilities of *P. aeruginosa* Isolated at Screening From Subsequently Randomized Subjects**

|                         | Achievable serum<br>conc., mg/L | Biofilm susceptibilities, mg/L<br>(N = 69 isolates <sup>1</sup> ) |                                                     | Planktonic susceptibilities, mg/L,<br>(N = 69 isolates) |                                                     |
|-------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|                         |                                 | BIC <sub>50</sub> (BIQ <sub>50</sub> ) <sup>2</sup>               | BIC <sub>90</sub> (BIQ <sub>90</sub> ) <sup>2</sup> | MIC <sub>50</sub> (MIQ <sub>50</sub> ) <sup>2</sup>     | MIC <sub>90</sub> (MIQ <sub>90</sub> ) <sup>2</sup> |
| Amikacin                | 16                              | 32 (0.5)                                                          | 128 (0.125)                                         | 16 (1)                                                  | 128 (0.125)                                         |
| Azithromycin            | 2                               | >16 (<0.125)                                                      | >16 (<0.125)                                        | >16 (<0.125)                                            | >16 (<0.125)                                        |
| Ceftazidime             | 8                               | 16 (0.5)                                                          | >64 (<0.125)                                        | 2 (4)                                                   | 32 (0.25)                                           |
| Ciprofloxacin           | 1                               | 1 (1)                                                             | 8 (0.125)                                           | 1 (1)                                                   | 4 (0.25)                                            |
| Meropenem               | 4                               | 1 (4)                                                             | 16 (0.25)                                           | 0.25 (16)                                               | 4 (1)                                               |
| Piperacillin/tazobactam | 64                              | 32 (2)                                                            | >512 (<0.125)                                       | 2 (32)                                                  | 128 (0.5)                                           |
| Ticarcillin/clavulanate | 64                              | 32 (2)                                                            | >512 (<0.125)                                       | 16 (4)                                                  | 256 (0.25)                                          |
| Tobramycin              | 4                               | 4 (1)                                                             | 16 (0.25)                                           | 2 (2)                                                   | 32 (0.125)                                          |



TABLE 4—Changes in *Pseudomonas*

|                                                 | ence between<br>ted for<br>(CI) | P-value |
|-------------------------------------------------|---------------------------------|---------|
| Change in <i>P. aeruginosa</i> density (CFU/mL) |                                 |         |
| Subjects with follow-up                         |                                 |         |
| Baseline density, mean (SD)                     |                                 |         |
| Follow-up density, mean (SD)                    |                                 |         |
| Change in density, mean (SD)                    |                                 | 0.80    |
| Change in FEV <sub>1</sub> (L)                  |                                 |         |
| Subjects with follow-up                         |                                 |         |
| Baseline FEV <sub>1</sub> , mean (SD)           |                                 |         |
| Follow-up FEV <sub>1</sub> , mean (SD)          |                                 |         |
| Change in FEV <sub>1</sub> , mean (SD)          | (-0.22)                         | 0.34    |

Biyofilm duyarlılık veya konvansiyonel duyarlılık yöntemlerine göre belirlenen antibiyotik uygulamaları arasında mikrobiyolojik veya klinik yanıt açısından önemli bir fark yoktur

# L-form bakteriler

- “Duvarsız bakteriler”
- “Kokkoid form”
- 1935: “L-form” Kleinberger (Lister Enstitüsü)
- Pleomorfik hücreler
  - Sıklıkla hücre içinde kümeler halinde bulunurlar
- Kronik enfeksiyonlarla ilişki
  - Antibiyotiklerden korunma
  - İmmün sistemden kaçış
- Biyofilm ortamı

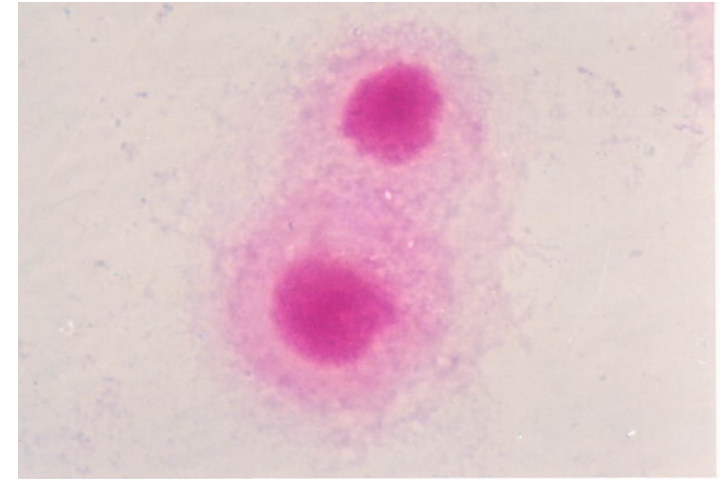
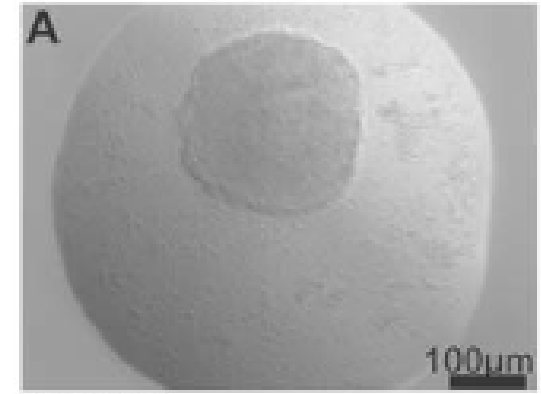


# L-formları ile ilişkilendirilen hastalıklar

- Kronik yorgunluk sendromu
- Sarkoidoz
- Lyme hastalığı
- Crohn hastalığı
- İnfektif endokardit
- Akut koroner sendrom
- Kronik üriner enfeksiyon
- *Helicobacter pylori* “kokkoid formlar”
- Kronik osteomyelitler
  - *S.aureus*
  - *S.enteritidis*
- Kronik pyelonefrit/bakteriüri

# L-form: Mikrobiyolojik özellikler

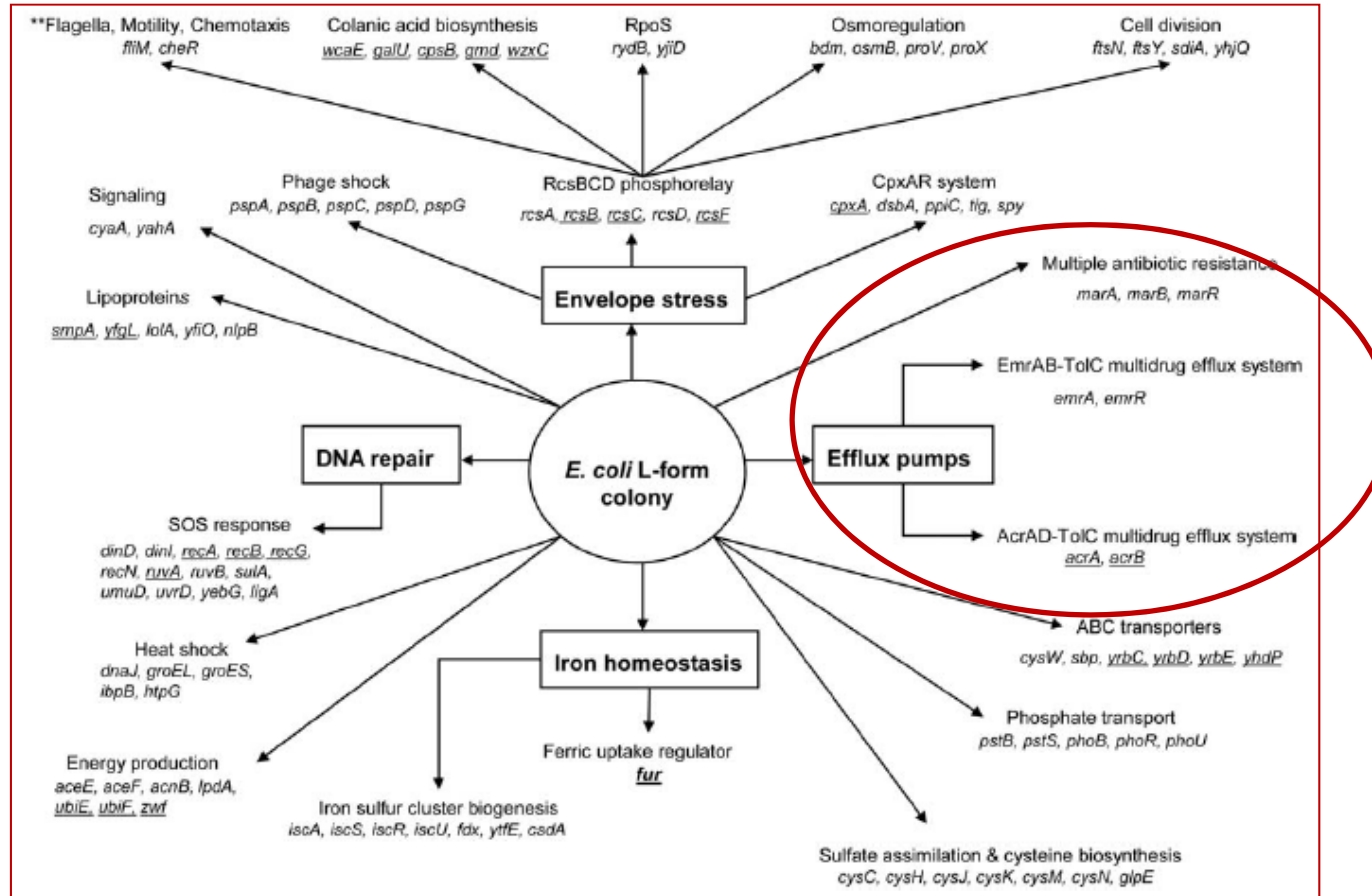
- Genel amaçlı besiyerlerinde üremezler
  - Makrofaj içinde yerleşim
- Belli ozmotik basıncın sağlanabildiği özel besiyerlerinde ürerler
- L-form indüksiyon besiyeri:
  - Beyin-kalp infüzyon buyyon + %1 agar + %10 sukroz + %0.0125  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  + 6000  $\mu\text{g/ml}$  Penisilin G
- Besiyerlerinde ince, uzun biyofilm filamentleri şeklinde ürerler



“Sahanda yumurta görünümü”

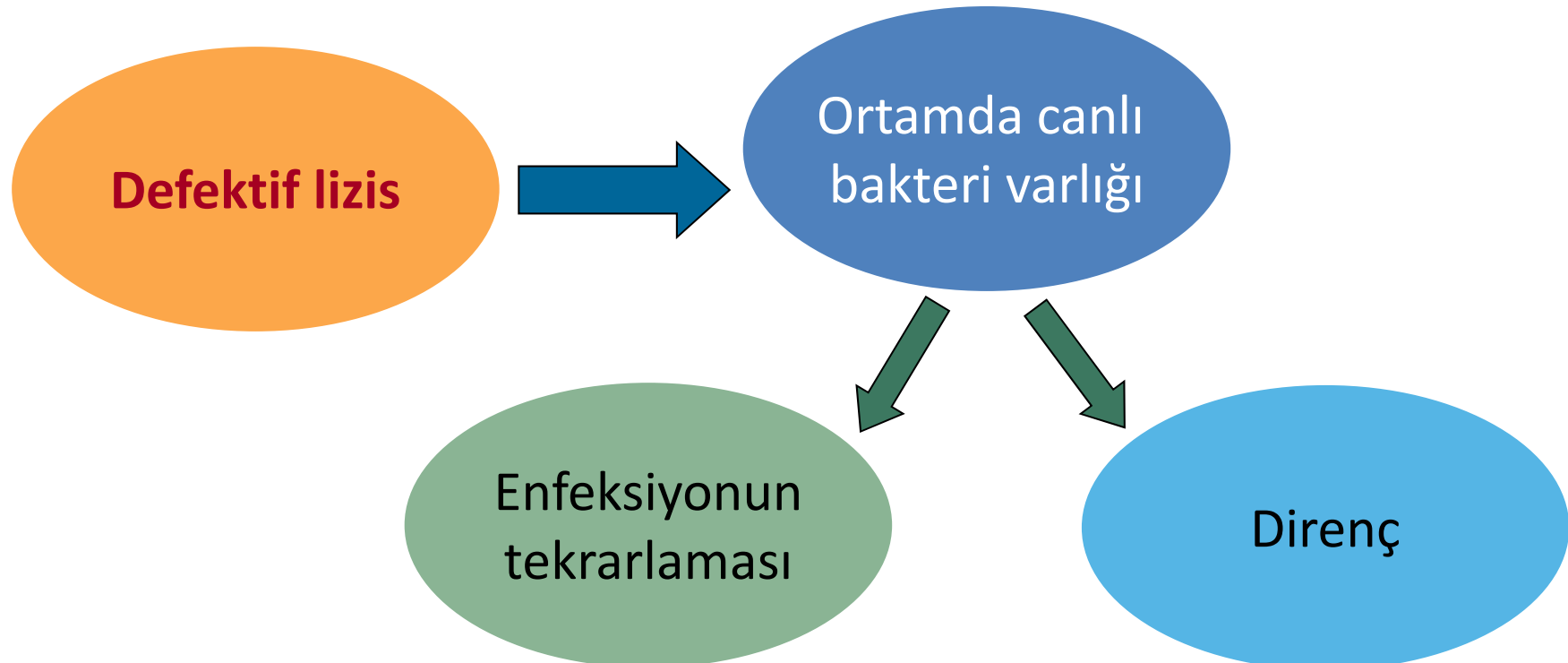
# L-form bakterilerde duyarlılık testleri

- Fenotipik yöntemler kullanılmamakta
- Genomik yöntemlerle direnç geni ekspresyonunun araştırılması



# Toleran Bakteriler

- **Tolerans:** Bakterilerin MİK değeri üzerindeki ilaç konsantrasyonlarında canlılıklarını sürdürmeleri durumu
  - MİK değeri duyarlılık sınırlarında
  - Antibiyotiğin hedefe bağlanması normal



## Tolerans hangi durumlarda araştırılmalı ?

- Penisilin dirençli pnömokoklara bağlı gelişen menenjit olguları
- Tedaviye yanıt vermeyen olgular
  - Endokardit
  - Menenjit
  - İmmünsupresyon durumunda gelişen enfeksiyonlar
- Tekrarlayan enfeksiyonlar

Biyofilm ortamında  
üreyen bakteriler

**İn-vivo ortamda en sık karşılaşılan  
tolerans türü !**

## “Persister” hücreler

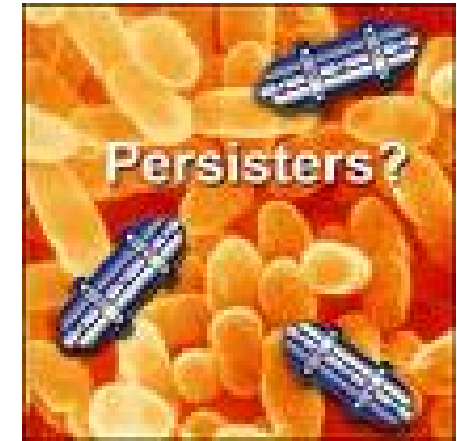
Biyofilm + uzun süre yüksek konsantrasyonda antibiyotik



Canlı kalan hücreler ( $\leq 1\%$ )



Biyofilmin yeniden oluşumu



Metabolik olarak  
daha düşük aktivite  
gösteren hücreler

**TOLERANS**

## Toleransı tanımlamak neden önemli ?

- Tedavi protokolünde değişiklik yapılmasının sağlanması
  - Antibiyotik değişikliği
  - Ek antibiyotik
- Tedavi süresinin uzatılması
- Sürveyans bilgisi  empirik tedavi protokollerinin oluşturulması

# In-vitro tolerans saptama yöntemleri

- MBK/MİK oranı
- Zamana karşı ölüm eğrileri
- Hücre lizis yöntemi
- Moleküler yöntemlerle mutant genlerin saptanması



## MBK/MİK

- **MBK/MİK  $\geq 32$** 
  - $\geq 8 - \geq 100$ : Değişken bir oran
  - Tekrarlanabilirliği düşük
  - Yavaş ölüm hızı olan bakterileri “persister”lardan ayıramıyor
- Teknik hata payı yüksek !
  - İnokulumun üreme fazı
  - Bakterinin tüp veya çukur kenarlarına yapışması
  - Inkübasyon süresi
  - Besiyeri içeriği
  - pH
  - Sıvı besiyerinden agara antibiyotik taşınması



**Paradoksik etki  
“Persisters”  
Tolerans**

# SONUÇ

- Kronik, tekrarlayan enfeksiyonlarda KKV'larına dikkat !
- KKV varlığı rapor edilmeli ve duyarlılık testleri denenmeli
- Biyofilm enfeksiyonlarında bakteri KKV formunda bulunabilir → üretmek için ek yöntemler denenmeli
- Biyofilm duyarlılık testlerinin rutinde uygulanması için henüz yeterli kanıt yoktur

