



Anaerop Bakterilerin Duyarlılık Testleri ve Direnç Durumu



Dr. F. Ferda TUNÇKANAT

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



Konu akışı

■ Anaerop duyarlılık testleri

- ☐ Karşılaşılan güçlükler
- ☐ Uygulama endikasyonları
- ☐ Yöntemler
- ☐ Sorunlar

■ Anaerop bakterilerde direnç

- ☐ Bilinen sorunlar
- ☐ Yeni sorunlar

Anaerop enfeksiyonlar

■ Genellikle

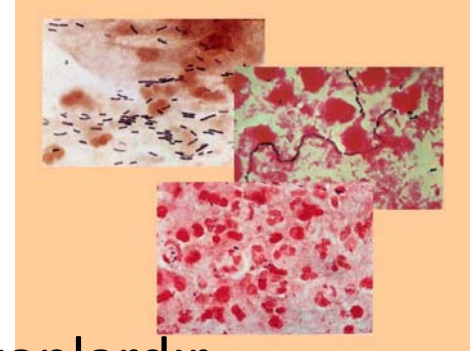
- Endojen
- Polimikrobiyal

} enfeksiyonlardır

■ Tedavide

- Cerrahi tedavi
- Ampirik tedavi yaklaşımı

} esastır





Anaerop duyarlılık testleri



Anaerop duyarlılık testlerinde karşılaşılan güçlükler

- İzolasyon ve tanımlama güçlükleri
- Her aşamada oksijen ile temasın önlenme gerekliliği
- Anaerop kültür yöntemlerinin kullanılma zorunluluğu
- Özel üreme gereksinimleri nedeniyle güç üremeleri
- Üreme hızlarının türden türe değişiklikler göstermesi

Rutin olarak uygulanması önerilmemekte



Anaerop duyarlılık testleri uygulama endikasyonları

- Ciddi ve yaşamı tehdit eden enfeksiyonlarda tedavinin yönlendirilmesi
- Belirli merkezlerde / bölgelerde belirli aralıklarla duyarlılık paternlerinin saptanarak izlenmesi
- Yeni antibiyotiklere duyarlılıkların saptanması



Duyarlılık testlerinin uygulanmasını gerektiren durumlar

- Steril bölgelerden ve tek etken olarak izole edilen anaerop bakteriler
- İzolatların yüksek dirençli türlere ait olduğu durumlar
- Ampirik tedavi seçiminde karar verilemeyen durumlar
- Uygun ampirik tedavi seçimine rağmen iyileşmeyen olgular
- Uzun süreli tedavi gerektiren enfeksiyonlar



Duyarlılık testlerinin uygulanmasını gerektiren durumlar

- Steril bölgelerden ve tek etken olarak izole edilen anaerop bakteriler
- İzolatların yüksek dirençli türlere ait olduğu durumlar
- Ampirik tedavi seçiminde karar verilemeyen durumlar
- Uygun ampirik tedavi seçimine rağmen iyileşmeyen olgular
- Uzun süreli tedavi gerektiren enfeksiyonlar



Duyarlılık testlerinin uygulanmasına karar verilirken dikkat edilecek noktalar

- Örnek alınırken normal flora ile kontaminasyon söz konusu ise, duyarlılık testlerinin uygulanması tedaviyi yanlış yönlendirir
- Patojen olma potansiyeli olan birden fazla bakteri izole edildiğinde duyarlılık testlerinin
 - Dirençli olduğu bilinen
 - Yüksek virülanslı

} Bakterileri kapsamı gerekir

***Bacteroides* türlerini mutlaka kapsamalıdır**

***Bacteroides* türleri**

*B.eggerthii**

B.finegoldii

*B.fragilis**

B.nordii

*B.ovatus**

*B.stercoris**

*B.thetaiotamicron**

*B.uniformis**

*B.vulgatus**

*B.merdae**

*B.distasonis**

B.goldsteinii

Bacteroides

Parabacteroides



Anaerop duyarlılık testleri-Standartlar

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)

EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)



Anaerop duyarlılık testleri

- Disk difüzyon
- Disk elüsyon
- Mikrodilüsyon
- Tüp dilüsyon
- Agar dilüsyon
- Sınırlı agar dilüsyon
- Beta laktamaz testi
- Spiral gradyent yöntemi
- Konsantrasyon gradyent yöntemi (E test)



Anaerop duyarlılık testleri- Yöntemler

Mikrodilüsyon yöntemi

- Kullanımı *Bacteroides fragilis* grubu ile sınırlı
- **Besiyeri:** Brucella sıvı besiyeri (5 µg/ml hemin, 1µg/ml vitamin K₁, % 5 lize at kanı eklenmiş)
- **İnokülüm:** 1x10⁶ CFU/ml
- **İnkübasyon:** Anaerop ortamda 37° de 48 saat
- **Sorun:** Nazlı anaeroplara üreyememesi



Anaerop duyarlılık testleri- Yöntemler

Agar dilüsyon (Wadsworth) yöntemi

- Referans yöntem
- **Besiyeri:** Brucella kanlı agar (5 µg/ml hemin, 1µg/ml vitamin K₁, % 5 dondurulup çözölmüş koyun kanı)
- **İnokölüm:** 10⁵CFU/ml
- **İnkübasyon:** Anaerop ortamda 37° de 48 saat
- **Sorun:** Rutin kullanıma uygun olmaması



Anaerop duyarlılık testleri-Yöntemler

Beta laktamaz testi

- Hızlı sonuç veren bir ön test /tarama testi
- *Bacteroides fragilis* grubu için kullanılmasına gerek yok
- **Uygulama**
 - ☐ Kromojenik sefalosporin (nitrosefin)
 - ☐ Pozitif sonuç için 30 dakikaya kadar beklenilmeli
- **Sorun:** Negatif sonuç her zaman bakterinin duyarlı olduğunu göstermez



Anaerop duyarlılık testleri-Yöntemler

E test

- **Besiyeri:** Brucella kanlı agar (5 μ g/ml hemin, 1 μ g/ml vitamin K₁)
- **İnokulum:** 1 Mc Farland
- **Sonuçların değerlendirilmesi:** 24-72 saat

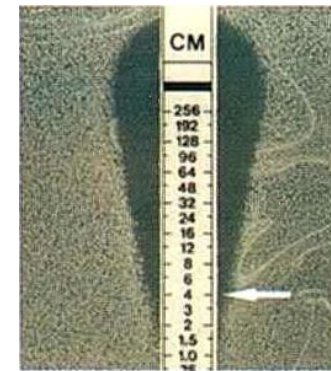
Anaerop duyarlılık testleri- Yöntemler

E test

■ Önemli noktalar:

- Metronidazol için besiyerleri mutlaka önceden anaerop ortamda bekletilmesi gerekir
- Klindamisin sonuçları 48 saatte okunmalıdır

Klindamisin için eğer eliptik zon aşağı doğru derinleşiyorsa, MİK değeri oluşan zonun şerit ile kesim noktası olarak alınmalıdır.



Look for microcolonies when reading enterococci
MIC 4 µg/ml.



Anaerop duyarlılık testleri- Kontrol bakteriler

Bacteroides fragilis ATCC 25285

Bacteroides thetaiotamicron ATCC 29741

Eubacterium lentum ATCC 43055

Clostridium difficile ATCC 700057

Anaerop duyarlılık testleri- Sorunlar

■ Sonuçların değerlendirilmesi ile ilgili sorunlar

- MİK değerinin saptanması ile ilgili sorunlar
- Seçilen sınır değer

CLSI

EUCAST





Anaerop duyarlılık testleri- Sorunlar

EUCAST- MİK değeri bulunmayan antibiyotikler

- Sefoksitin
- Moksifloksasin
- Tigesiklin

CLSI-EUCAST MİK değeri aynı olan antibiyotikler

- Amoksisilin/klavulanik asit
- İmipenem, meropenem
- Klindamisin

Anaerop duyarlılık testleri- Sorunlar

CLSI-EUCAST MİK değeri değişen antibiyotikler

Antibiyotik	CLSI MİK (mg/L)	EUCAST MİK (mg/L)
Ampisilin	≥ 2	> 2
Piperasilin/ tazobactam	≥ 128	> 16
Metronidazol	≥ 32	> 4



Anaerop bakterilerde direnç



Anaerop enfeksiyonların tedavisinde kullanılan ilaçlar

- Penisilin, aminopenisilinler
- Betalaktam-betalaktamaz inhibitörleri
- Karbapenemler
- Sefamisinler (sefoksitin*)
- Klindamisin*
- 5-nitroimidazoller (metronidazol)
- Yeni florokinolonlar (moksifloksasin)
- Yeni antibiyotikler (tigesiklin)



Anaerop bakterilere etkisiz ilaçlar

- Aminoglikozidler
- Monobaktamlar

Anaerop bakterilerde direnç

DİRENÇ !

- Anaerop gram negatif basiller

- ☐ *Bacteroides fragilis* grubu (*Bacteroides* /*Parabacteroides*)

- ☐ *Prevotella*

- ☐ *Fusobacterium*

- ☐ *Bilophila*

- ☐ *Suterella*



- Anaerop gram pozitif basiller

- Anaerop koklar

Anaerop bakterilerde direnç

SORUNLAR

- Bilinen sorunlar
- Yeni karşılaşılan sorunlar

Direnç oranlarında artış



Bazı antibiyotiklerin ampirik tedavi seçeneklerinden çıkartılması

Direnç oranlarındaki bölgesel farklılıklar



Ampirik tedavi seçiminde güçlükler

Bacteroides türlerinde direnç –Avrupadaki durum

Antibiyotik	1988-1989 (1289 izolat) Direnç %	1999-2001 (1284 izolat) Drenç %	2008-2009 (824 izolat) Direnç %	
			CLSI	EUCAST
Ampisilin	93	99	99	98
Amoks/Klav	1		10,4	
Pip/Taz	< 1	< 1	3,1	10,3
Sefoksitin	3	6	17,2	
İmipenem	0.3	< 1	1,2	
Klindamisin	9	15	32,4	
Moksifloksasin	-	9	13,6	
Metronidazol	0	< 1	<1	< 1
Tigesiklin	-	-	1,7	



Anaerop bakterilerde direnç

SORUNLAR-Bölgesel farklılıklar

Avrupa

- ☐ Ampisilin: Fark yok
- ☐ Amoks/Klav %2 (Fransa) - %18,5 (Belçika)
- ☐ Pip/Taz %3,1 (Hollanda)- %19,6 (İsveç)
- ☐ Sefoksitin %3,1 (Hollanda)- %30,6 (Finlandiya)
- ☐ Klindamisin %22,5 (Doğu ülkeleri)- % 41,9 (Akdeniz ülkeleri)
- ☐ Moksifloksasin % 0 (İtalya) - %28,9 (İsveç)



Bacteroides türlerinde direnç – ABD'deki durum

Antibiyotik	1981-1989 (1229 izolat) Direnç %	1990-1999 (2080 izolat) Direnç %	2000-2007 (3140 izolat) Direnç %
Klindamisin	5-6	23	31 - >35
Sefoksitin	4-8	~12	9
İmipenem	< 1	< 1	< 1
Pip /Taz	-	< 1	< 1
Trovafloksasin	-	16	> 40
Metronidazol	0	0	2 izolat
Kloramfenikol	0	0	0

Bacteroides türlerinde direnç – ABD’deki durum

Antibiyotik	2005-2007 n=1351	
	Direnç ort. (%)	Direnç sınır (%)
Sulbaktam/Ampisilin	3, 8	(0- 20,6)
Pip/Taz	0.3	0- 1,1
İmipenem	0.3	0- 1,7
Sefoksitin	9	4,1-17,9
Klindamisin	36	14,3-49,2
Moksifloksasin	40,6	32,1-56,4
Linezolid	7,3	0- 11,2
Tigesiklin	4,7	0- 6,8



Antibiyotik	İÜTF Yayın yılı 1997 N=8	Cerrahpaşa Tıp F Yayın yılı 2000 N=138	MÜTF 1999-2002 N=45	MÜTF 2003-2008 N=66
Ampisilin	-		93	-
Penisilin G	-	90,5	-	-
Piperasilin	-	-	13	-
SAM	-	0	-	-
Amoks/Klav	-	-	2	-
Pip/Taz	-	-	-	-
İmipenem	-	0	2	6
Meropenem				7,5
Sefoksitin	16	81,8	11	-
Klindamisin	10	3,6	36	-
Metronidazol	-	4,3	0	0
Moksifloksin	-	-	-	-
Tigesiklin	-	-	-	-
Kloramfenikol	-	-	2	

***Bacteroides* türlerinde direnç oranları– Türkiye çalışmaları**



Antibiyotik	HÜTF * 1997-2004 N=35	DEÜTF Yayın yılı 2003 N= 27	Osmangazi ÜTF 2007-2008 N= 15
Ampisilin	-	-	-
Penisilin G	81,3	-	-
Piperasilin	-	-	-
SAM	1,7	-	-
Amoks/Klav	-	11,1	-
Pip/Taz	1,7	-	-
İmipenem	1,7	0,7	6
Sefoksitin	3,4	18,5	13
Klindamisin	52,5	18,5	53
Metronidazol	23,5	0	6
Moksifloksin	0	-	-
Tigesiklin	0	-	6
Klora mfenikol	0	-	-

***Bacteroides* türlerinde direnç oranları– Türkiye çalışmaları**



Anaerop bakterilerde direnç-Sorunlar

Prevotella

- Penisilin direnci
 - Beta laktamaz pozitifliği: % 50 (ABD), %94 (Avrupa, Tayvan*)
- Klindamisin direnci: %31 (Tayvan*)

Porphyromonas

- Penisilin direnci
 - Beta laktamaz pozitifliği: % 8, %17 (pelvik izolatlar)

*Chia-Ying Liu, et al. Antimicrob Agent Chemother 2008, 52: 3161-68



Anaerop bakterilerde direnç-Sorunlar

Fusobacterium

- Penisilin direnci (> %90 sefalosporin ve sefamisinlere duyarlı)
 - %11 (Avrupa) penisilinaz pozitif
- Sulbaktam/ ampisilin: azalmış duyarlılık
- Karbapenem direnci
 - İmipenem %4, meropenem %8 (Tayvan*)
- Klindamisin direnci



Anaerop bakterilerde direnç-Sorunlar

Bilophila wadsworthia

- ☐ Penisilin direnci
 - Beta laktamaz pozitif
- ☐ Klindamisin dahil diğer antibiyotiklere oldukça duyarlı

Suterella

- ☐ Klindamisin, piperasilin, metronidazol direnci



Anaerop bakterilerde direnç-Sorunlar

Gram pozitif sporsuz basiller

- Çoğu metronidazole dirençli
- Glikopeptidlerin in vitro etkinliği yüksek

Klostridyumlar

- *C. perfringens* çoğu antibiyotiğe duyarlı-
Tayvanda metronidazol dirençli 3 suş
- *C. butyricum*: Penisilin direnci (penisilinaz)
- *C. clostridioforme*, *C. innocuum*, *C. difficile*: Beta laktam antibiyotikler, klindamisin ve yeni florokinolonlara değişen oranlarda dirençli
- *C. innocuum*' da vankomisine karşı yüksek MİK değerleri



Anaerop bakterilerde direnç-Sorunlar

Gram pozitif koklar

- ☐ Florokinolon direnci (cilt ve yumuşak doku izolatları)
- ☐ Klindamisin direnci (bazı suşlarda)
- ☐ Metronidazol direnci nadir
- ☐ Glikopeptidlerin in vitro etkinliği yüksek



Anaerop bakterilerde direnç-Sorunlar

■ Bilinen sorunlar

■ Yeni karşılaşılan sorunlar

- *B. fragilis* grubu bakterilerde karbapenemaz yapımı ile ilgili olmayan beta laktam/ beta laktamaz direnci
- *Bacteroides'* lerde metronidazol direnci
- Klostridyumlarda glikopeptid direnci



Anaerop bakterilerde direnç

Yeni sorunlar

■ Beta laktam/beta laktamaz direnci

- *Bactereoides* türlerinde karbapenemaz (+) →% 3
- Karbapenemlere duyarlı, beta laktam /beta laktamaz inhibitörlerine direnç

Farklı mekanizma

- *cep A* ile ilişkili IS 1124 varlığı → gen ekspresyonu ↑
→ fazla miktarda enzim yapımı
- Porin proteinlerinde değişiklik

Anaerop bakterilerde direnç

Yeni sorunlar

■ Metronidazol direnci

556

L. Dubreuil, M.F. Odou / *Anaerobe* 16 (2010) 555–559

Table 1

Evolution of resistance in *Bacteroides fragilis* group in France.

Year (reference)	Nb of strains	Antibiotic resistance percentages (breakpoints in mg/L) ^a						
		AMC ^b ($\geq 16/8$)	TIC (≥ 128)	TCC $\geq 128/2$)	CFX (≥ 64)	IMI (≥ 16)	CLN (≥ 16)	MOL ^a (>4)
1992 Dubreuil et al. [57]	61	3	27	3	12	3	12	0
1994 Grollier et al. [58]	222	2.7	24	0.9	9	0.4	14	2
1995 Bland et al. [59]	129	4.6	23	1.5	ND	1.5	19	0
1996 Dubreuil et al. [60]	199	4	22	1.5	6	1.5	20.6	0.4
1998 Mory et al. [50]	209	3.8	22.2	0	7.1	0	29.2	1.9
1999 Dubreuil et al. [61]	228	10.1	32.8	6.6	ND	4.4	28.1	2.2
2000 Behra et al. 2002 [62]	123	4.6	32.5	1.6	ND	0.8	28.4	4.9
2001 Behra et al. 2003 [63]	359	5.6	33.7	2.2	13	0.8	32.6	0.3
2003 Dubreuil, abstract in congress ^c	254	2.8	27.5	1.9	6	0.8	28.3	3.5

^a CLSI breakpoints were used with one exception: the EUCAST metronidazole lower breakpoint was used to allow detection of decreased susceptibility to metronidazole.

^b AMX = amoxicillin, AMC = amoxicillin + clavulanic acid, TIC = ticarcillin, TCC = ticarcillin + clavulanic acid, PIP = piperacillin, CFX = cefoxitin, IMI = imipenem, CLN = clindamycin and MOL = metronidazole.

^c Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), Paris, 2003, Abstract 335/49P.



Anaerop bakterilerde direnç

Yeni sorunlar

■ Metronidazol direnci

- Almanya → % 1,3 (*B. fragilis*)
- Belçika → % 1, %0 (*B.fragilis* grubu)
- Yunanistan → % 1
- Avrupa genel ort → % 1,2
- ABD (2002-2007) → 3 izolat
- Güney Afrika (2003-2004)* → % 22,2 -invaziv *Bacteroides* spp

* Galvao BPGV et al. Anaerobe 2011

Anaerop bakterilerde direnç

Yeni sorunlar

■ Metronidazol direnci

- Direnç sınırı ? CLSI ≥ 32 mg/L EUCAST >8 mg/L
- Direnç *nim* genleri ile ilişkili
- *nim* (A-I) genleri kromozomal ya da plazmid üzerinde
- Farklı bir nitroredüktaz enzim yapımından sorumlu
- Gen taşıyan her suş fenotipik olarak dirençli değil
- Dirençli olan her suшта *nim* geni bulunmayabilir; Farklı mekanizma ???
- Coğrafik olarak ve veya türler arası yayılma eğiliminde

Anaerop bakterilerde direnç

Yeni sorunlar

■ Klostridyumlarda glikopeptid direnci

- *Clostridium ramosum*, *Clostridium innocuum* ve *Clostridium clostridioforme* türlerinde glikopeptid direnci

L. Dubreuil, M.F. Odou / *Anaerobe* 16 (2010) 555–559

557

Table 3

Activity of glycopeptides, lipopeptides and oxazolidinones on *Clostridium* group RIC [adapted from Refs. [48,64–66]].

Microorganism→ Antibiotic	<i>Clostridium clostridioforme</i>			<i>Clostridium innocuum</i>			<i>Clostridium ramosum</i>		
	MIC in mg/L								
	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Vancomycin	0.125–1	0.5	1	8–32	16	16	2–8	4	8
Teicoplanin	1–8	4	8	0.125–1	0.5	1	0.5–1	0.5	1
Dalbavandn	2–8	4	8	0.125–0.5	0.25	0.25	0.25–1	1	1
Daptomycin	0.25–8	2	4/8	8 to >16	8	>16	8 to >32	32	>32
Ramoplanin	4–32	8	16	0.06–0.25	0.06	0.125	0.03–0.06	0.03	0.06
Linezolid	2–8	2/4	4/8	2–4	2	4	4–8	8	8



Anaerop bakterilerde direnç

Yeni sorunlar

■ **Klostridyumlarda glikopeptid direnci**

□ Mekanizma ? İntrensek direnç

□ Direnç genlerinin kaynağı ?

van B geni pozitif dışkı örneklerinde VRE saptanmayıp gen pozitif *C. innocuum*, *Eggerthella lenta*, ve *Finnegoldia magna* saptanmış*

*Ballard SA et al. Antimicrob Agent Chemother 2005, 49: 77-81



Sonuç

- **Önemli enfeksiyonlara neden olan anaerop bakterilerde direnç sorunu giderek artmaktadır.**
- **Duyarlılık testlerinin rutin olarak uygulanmasına gerek yoktur, uygulama ile ilgili endikasyonların iyi bilinmesi önemlidir**
- **Belirli merkezlerde/bölgelerde direncin periyodik olarak saptanarak izlenmesi ampirik tedavi seçimi açısından önemlidir**
- **Tedavide kullanılagelen antibiyotiklere karşı artan direnç oranlarının yanı sıra, ortaya çıkan yeni direnç sorunlarına ilişkin farkındalık, tedavi yönlendirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır**



Teşekkür ederim