3. Ulusal
Klinik Mikrobiyoloji
Kongresi-2015
18-22 Kasım 2015
21.11.2015
09:45:26
UFUK
HASDEMİR
3. Ulusal
Klinik Mikrobiyoloji
Kongresi-2015

Uzman Gözüyle Güncel Direnç Mekanizmalarına Yaklaşım:

Gram Pozitif Bakteriler

Prof. Dr. M. Ufuk HASDEMİR

3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji, 2015, Antalya

Antibiyotik Direnci: Global Problem

- Her yıl 2 milyon kişi AD organizmalarla enfekte olmakta
- 23.000 ölüm/yıl ABD

MDR sepsis, pnömoni: Ampirik antibiyotik tedavisinin gecikmesi veya uygunsuzluğu

- Hastanede yatış süresi uzamakta
- Mortalite artmakta

WHO, CDC, IDSE14_WM.pdf

Dirençleri Nedeniyle Tehdit Oluşturan Bakteriler

Acil Tehditler	Ciddi Tehditler	Tehdit Olabilecekler
C. difficile	MDR Acinetobacter	VRSA
CRE	R-Campylobacter	ER-GABHS
N. gonorrhoeae	R-Salmonella spp.	CR- GBS
	GSBL'ler	
	R-Shigella	
	MDR *P. aeruginosa*	
	Fluconazole R Candida	
	VRE	
	MRSA	
	R-*S. pneumoniae*	
	R-*M. tuberculosis*	

http://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html

Doğal Direnç: Mekanizma

- **Anaerob, enterokok** **Aminoglikozid**
  Oksidatif mekanizma yokluğu
- **Aerobikler** **Metranidazol**
  İlacın aktif formuna redük. anaerob ortamda
- **Gram-pozitifler** **Aztreonam**
  PBP yokluğu
- **Gram-negatifler** **Vankomisin**
  DM'a penetre olamaması
- **Klebsiella spp.** **Ampisilin**
  β-laktamaz varlığı

Doğal (İntrinsik) Direnç Mekanizmaları

- Bakteride ilaç hedefinin yokluğu
- İlacın bakteri hücresine girememesi
- Kromozomal aktif pompa proetinleri ile ilacın hücre dışına atılması
- İlacı inaktive eden enzimlerin doğal üretimi

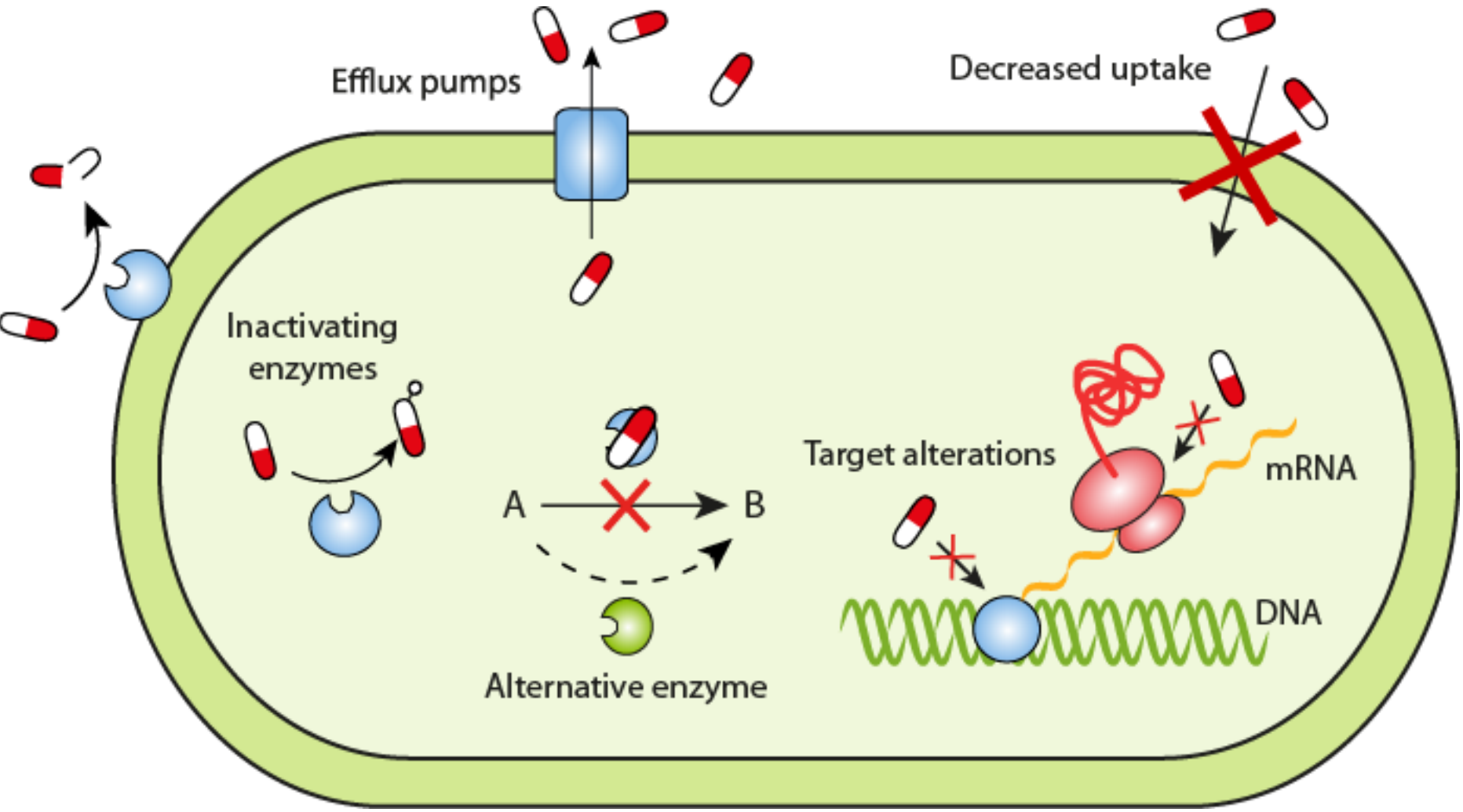
Doğal Direnç Mekanizmalarını Bilelim mi?

EVET !!!

Doğal Direnç Mekanizmalarını Saptayalım mı ?

HAYIR

Kazanılmış Direnç Mekanizmaları



Kazanılmış Direnç Mekanizmalarını Bilelim mi?

EVET !!!

Kazanılmış Direnç Mekanizmalarını Saptayalım mı ?

GEREKTİĞİNDE

Klinik Mikrobiyoloji

- HIZLI Tanımla
- Direnci HIZLA SAPTA
- 'Doğal Direnç Fenotiplerini' BİL
- 'Beklenmedik Direnç Fenotiplerini' BİL
- D. org. larla kolonizasyonu TAKİP ET
- Duyarlılık sonuçlarını periyodik ANALİZ ET
- MEKANİZMAYI SAPTA ??????

Clostridium difficile

- 500.000 ishal/ yıl – 15.000 ölüm ABD
- CDC/ 2013: 'URGENT' halk sağlığı prob.
- Doğal direnci çok yüksek
- Gereksiz antibiyotik kullanımı ve zayıf enfeksiyon kontrol uygulamaları
- Acil aksiyon planı uygulanması

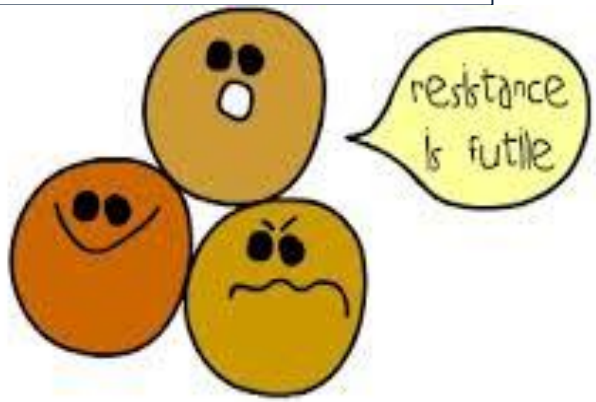
Klinik mikrobiyoloji: Cdif. enfeksiyonlarının tanısını hızlı ve doğru olarak yapmak üzere organize olmalıdır

Staphylococcus aureus
MRSA

- Seftazidime Doğal Direnç

Beklenmedik Direnç Fenotiplerini Bilelim mi?

EVET !



Beklenmedik Direnç Fenotipleri

S. aureus

- **Vankomisin ≥8 µg/mL**
- **Teikoplanin**

- Linezolid
- QDA
- Daptomisin
- Vankomisin =4 µg/mL
- Tigesiklin

KNS

- Vankomisin
- Linezolid
- QDA
- Daptomisin
- Tigesiklin

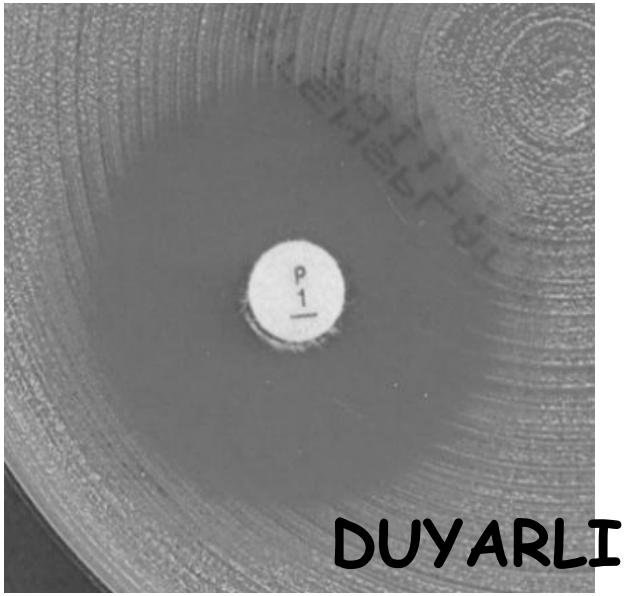
Antibiyotik	Sonuç
Penisilin(1U)	**R**
Sefoksitin	**R**
Eritromisin	**R**
Klindamisin	**R**
Trimetoprim/Sulfamet	S
Vankomisin	S
Rifampisin	S
Norfloksasin	**R**
Gentamisin	S
Linezolid	S
Tetrasiklin	S

1-Penisilin Direnci, 2-Sefoksitin Direnci??

Penisilin ZON ÇAPI Değerlendirme (DİKKAT?)

- ≥ 26 mm ve KESKİN zon kenarı DİRENÇLİ

- ≥ 26 mm ve zon kenarı keskin değilse DUYARLI



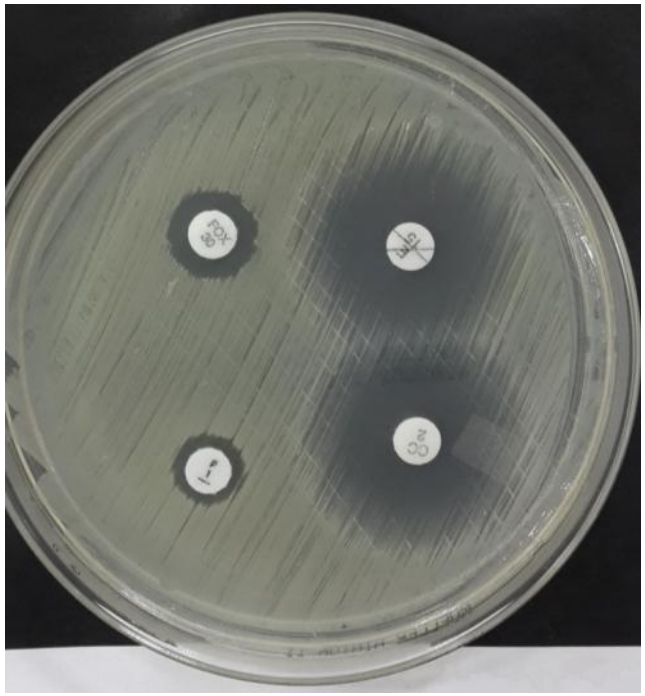
Antibiyotik Duyarlılık Testi

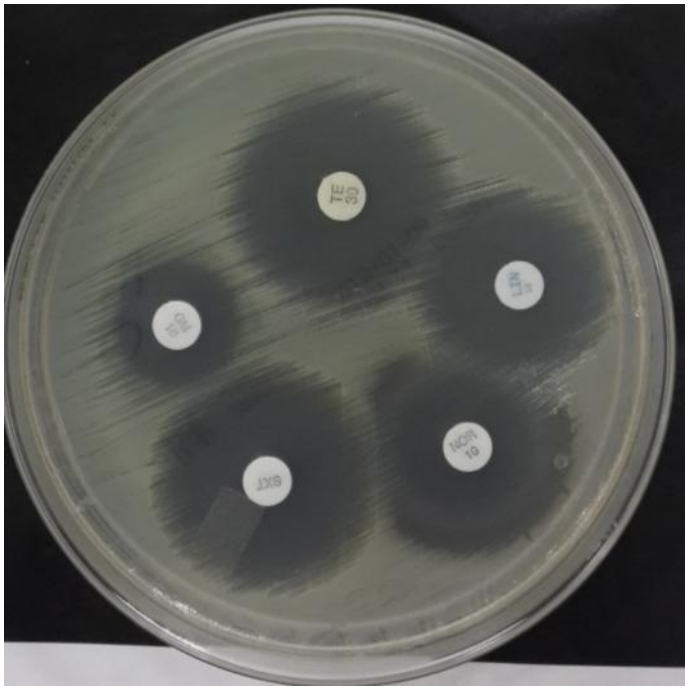
FOX= 8 mm

Otomatize sistem FOX MİK >4mg/L, OX MİK ≤0.25 mg/L

Diğer antibiyotiklere DUYARLI

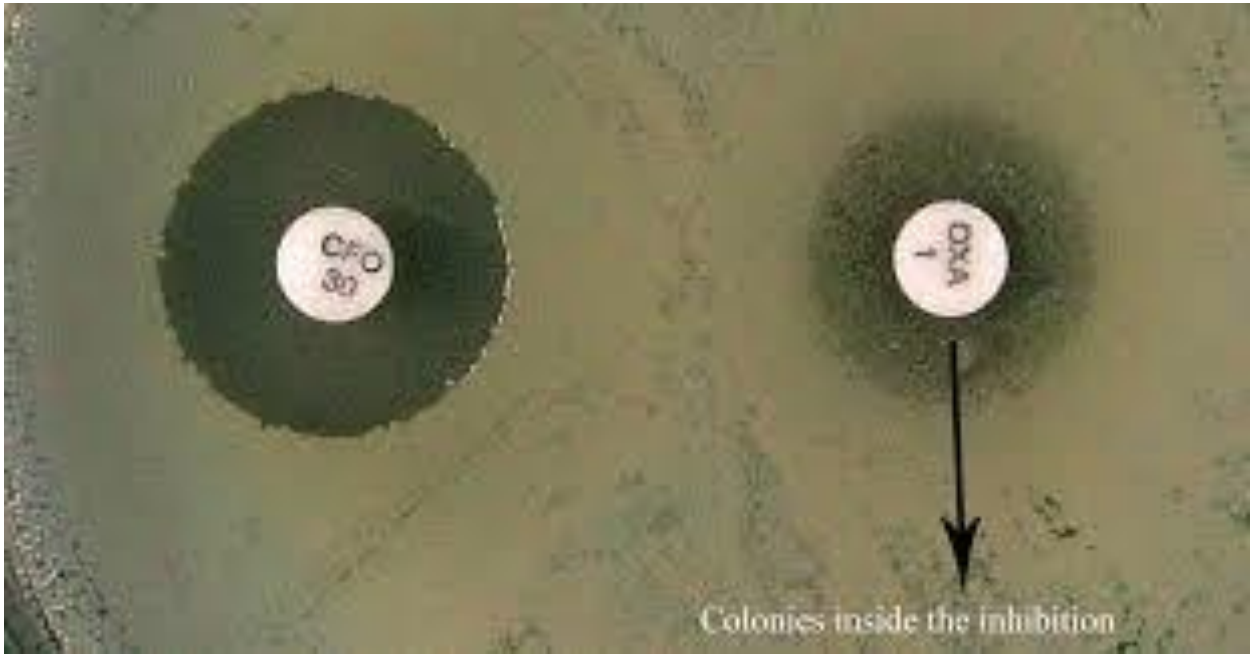
Hızlı PBP2a testi: NEGATİF





Metisiline Direnç Var mı?

Evet **MRSA**



MRSA

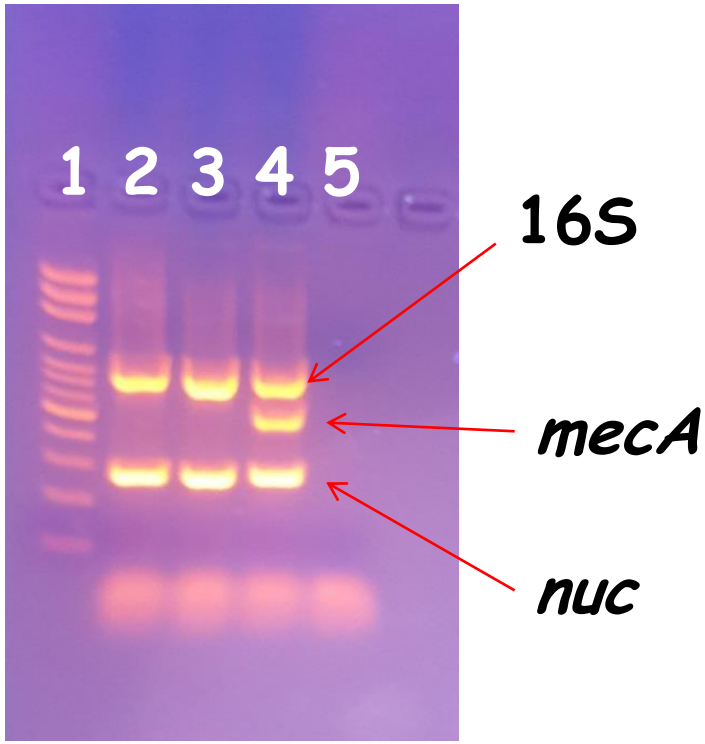
- Antimikrobiyal duyarlılık kategorizasyonu
- Enfeksiyon kontrolu
- Halk Sağlığı

MRSA

- *mecA*
- PBP2a, '*Staphylococcal Cassette Chromosome*' ile taşınır
- HA-MRSA: *SCCmec*-I, -II ve –III
- CA-MRSA': *SCCmec*-IV ve –V

***mecA* PCR yapıldı**

16S/mec/nuc Multipleks PCR



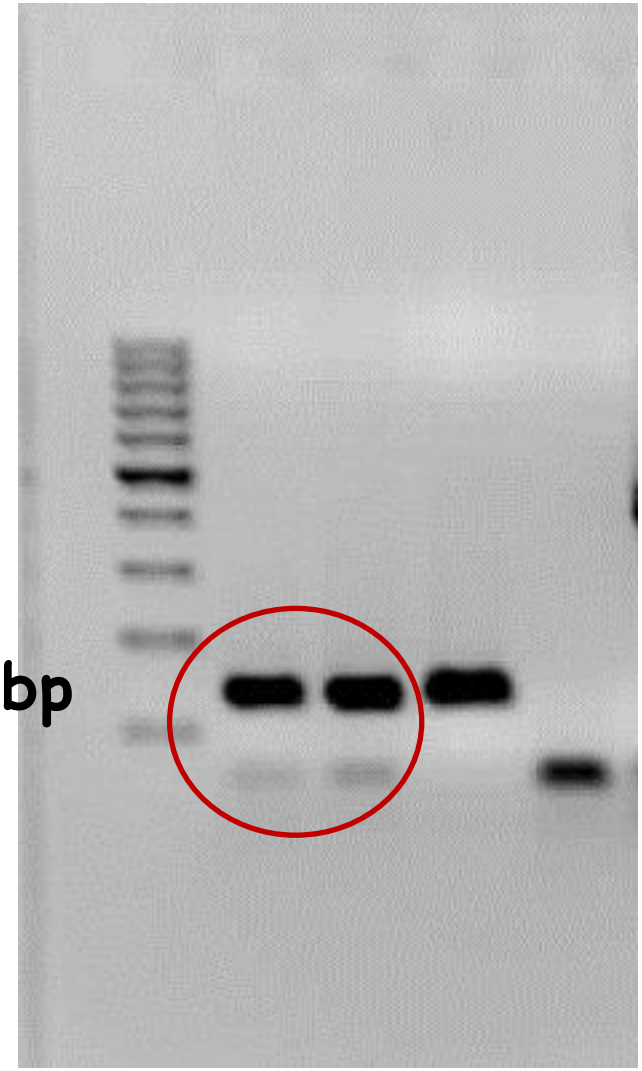
1. Marker
2. *S.aureus* (OLGU)
3. MSSA kontrol
4. MRSA kontrol
5. Negatif kontrol

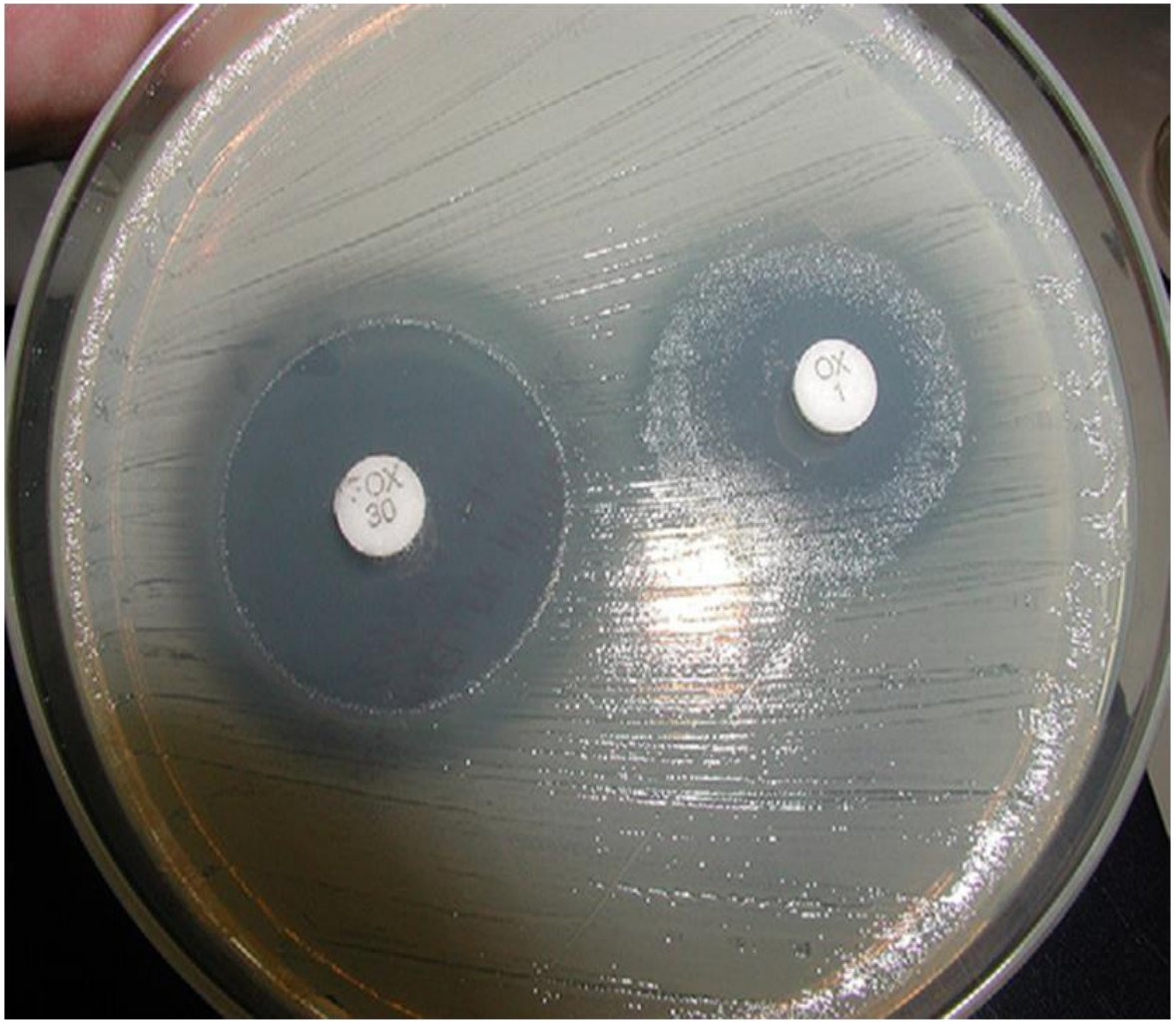
***mecA* PCR**
Negatif

Bu mekanizma nedir?

MRSA

- mecC (*mec*$_{ALGA251}$)
- PBP2 SCC XI ile taşınır
- Oksasilin duyarlı olabilir
- PBP2A lateks Negatif
- Sefoksitin en iyi fenotipik gösterge
- *mecC* PCR (+)





FOX - 25 mm **S**

OX - 12 mm **I**

OX-MIC:4μg/ml

BORSA

- OX MIK: 2 - 8 µg/ml
- Aşırı penisilinaz aktiviteli MSSA
- Yüksek doz beta laktam/beta-laktamaz inhibitorleri etkili
- %1.4-12.5

Klasik MRSA	Yeni MRSA	BORSA/ MODSA
FOX R	FOX R	FOX S
OX I/R	OX I/R	OX I/R
Mec A(+)	Mec A(-)	Mec A(-)
PBP2a (+)	PBP2a (-)	PBP2a (-)
β laktam & non-β lactam R	β laktam R non-β lactam S	β laktam/inh & non-β laktam S

S. aureus: Glikopeptid Direnci

- Antimikrobiyal duyarlılık kategorizasyonu
- Enfeksiyon kontrolu
- Halk Sağlığı

S. aureus: Glikopeptid Direnci

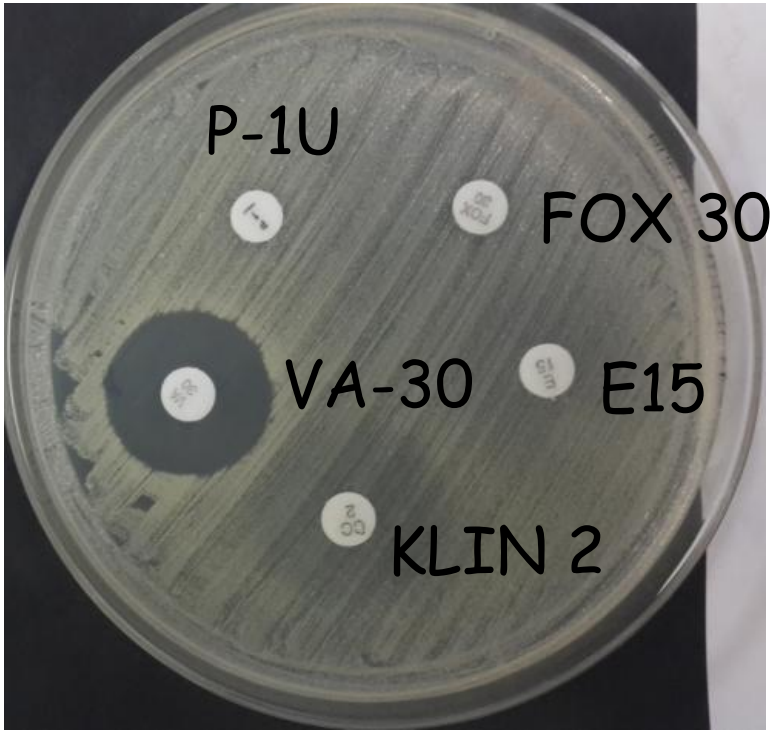
Sınır Değer **>2 mg/L** ise DİRENÇLİ

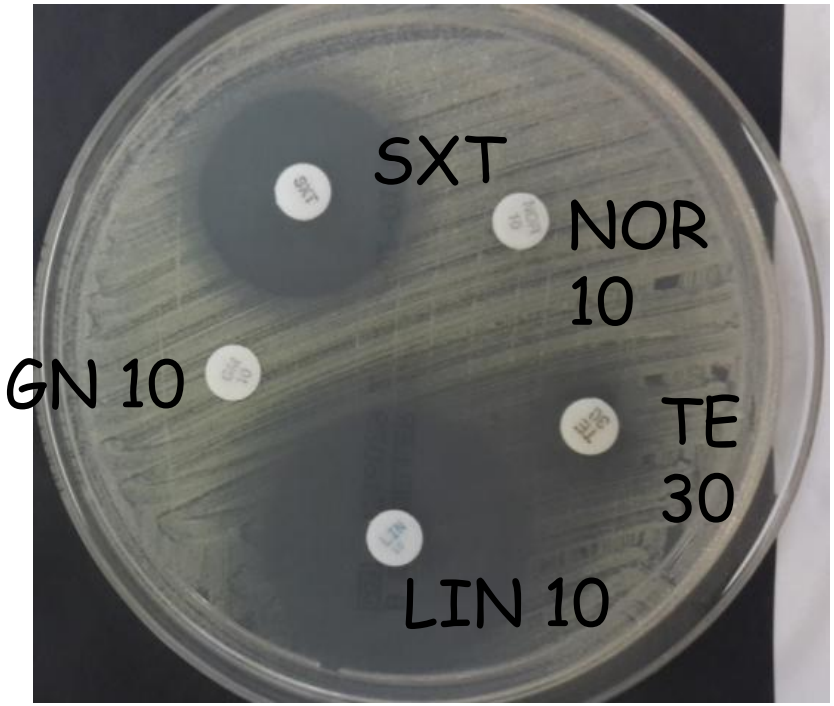
Direnç mekanizmasına göre MİK değerlerinde belirgin farklılıklar

MEKANİZMALARI BİLELİM mi?

EVET !!!

Staphylococcus aureus

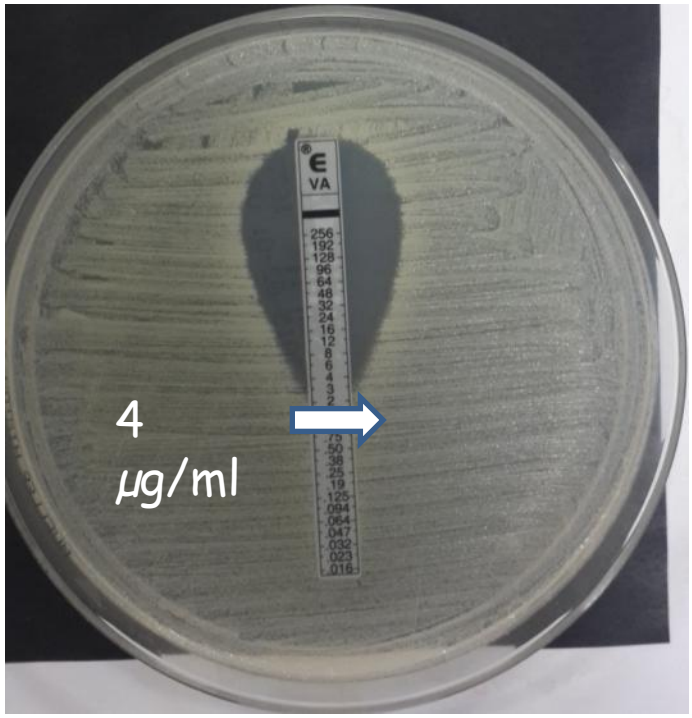




Vankomisin MİK bakılmalı !!!! Sınır değer 2 mg/L

S. aureus Vankomisin MİK: 4 mg/L

- Sonucu nasıl verelim?



EUCAST Sınır Değerleri

Vankomisin/ teikoplanin

S. aureus

S ≤2 - >2 R

KNS

S≤ 4 - >4 R

GRSA ?

GISA ?

hGISA ?

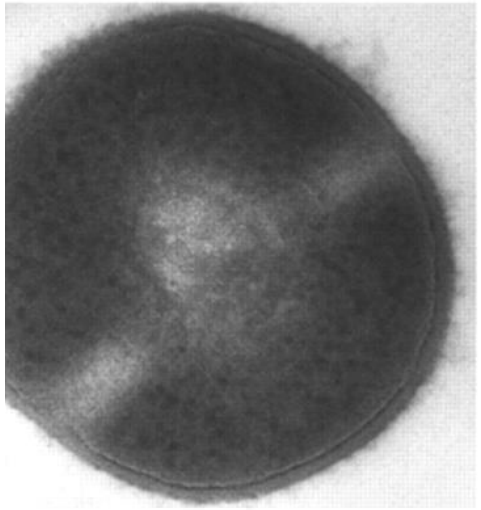
GISA: 4-8 mg/L

Endojen mutasyonlar

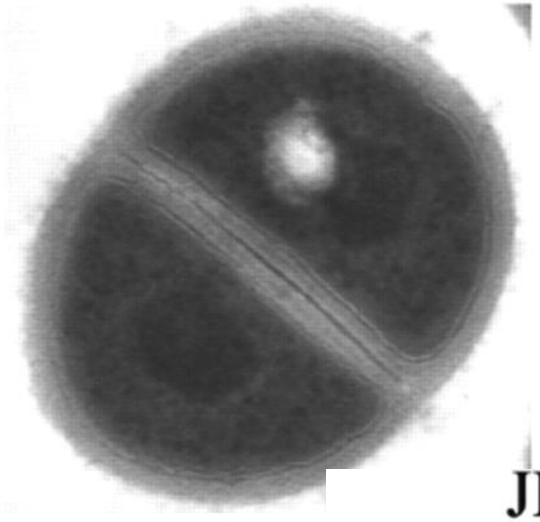
HD'nın aşırı kalınlaşması ve glikopeptid hedefinin aşırı üretimi

VISA: 4-8 mg/L

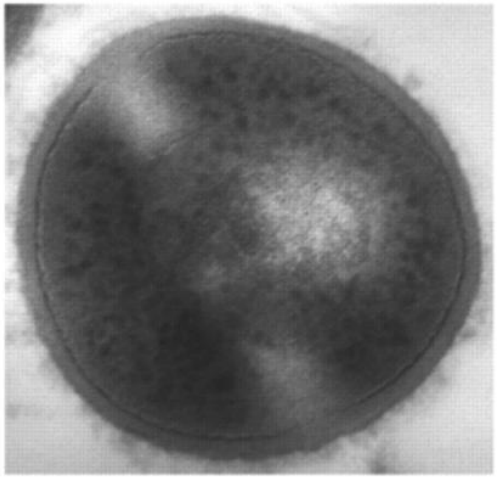
JKD6009
VSSA



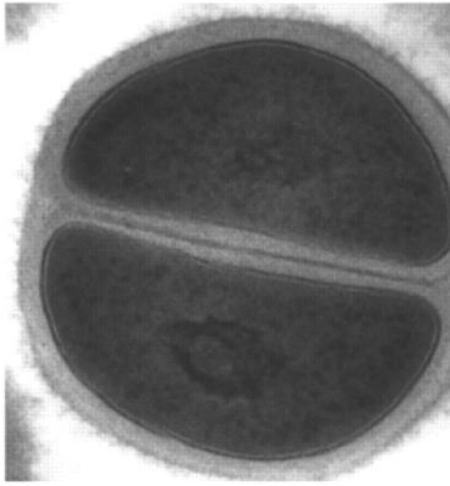
JKD6008
VISA



JKD6021
VSSA



JKD6023
VISA



Staphylococcus aureus – Vankomisin

	MIC, μg/mL
VSSA	≤2
hVISA	1-2
VISA	4-8
VRSA	≥16

GRSA: Mekanizma FARKLI !

- **MİK ≥16 ug/mL**
- Enterokoklardan *vanA* gen kümesinin (Tn1546) aktarımı
- Plazmid (Inc18) stabil değil
- Yayılım sınırlı
- 11 GRSA bildirimi
- Disk difüzyonla ayırtedilebilir

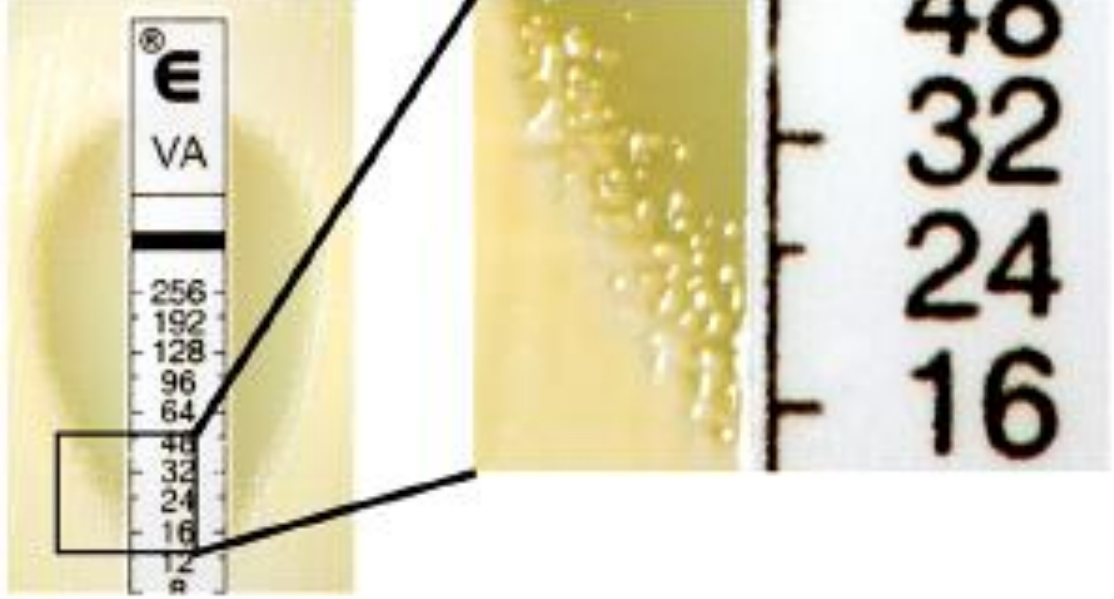
hVISA

- Glikopeptid duyarlı bir popülasyonda, $1/10^6$ bakterinin MİK'I 2 mg/L olabilir
- hGISA fenotipinin varlığı- kötü prognoz?
- Rutin esas olarak GRSA ve GISA saptar
- hVISA'yı saptayalım mı?

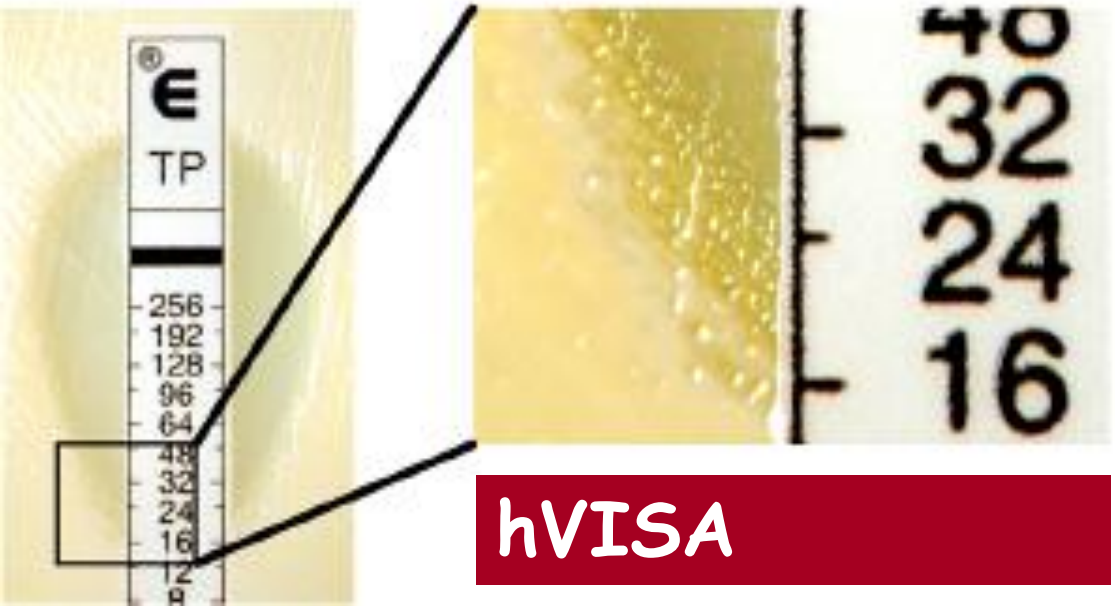
hGISA:

- Özel durumlarda
- 'Population Analysis Profile-Area Under Curve' (PAP-AUC) yöntemi
  - Makro G test
  - Etest-GRD gradyan strip testi
  - Teikoplanin agar Tarama

MAKRO G-TEST



*2 McFarland
*BKI agar
*48 saat inkübasyon



*VA, TP ≥8µg/mL
veya
*TP ≥12µg/mL

hVISA

Etest-GRD

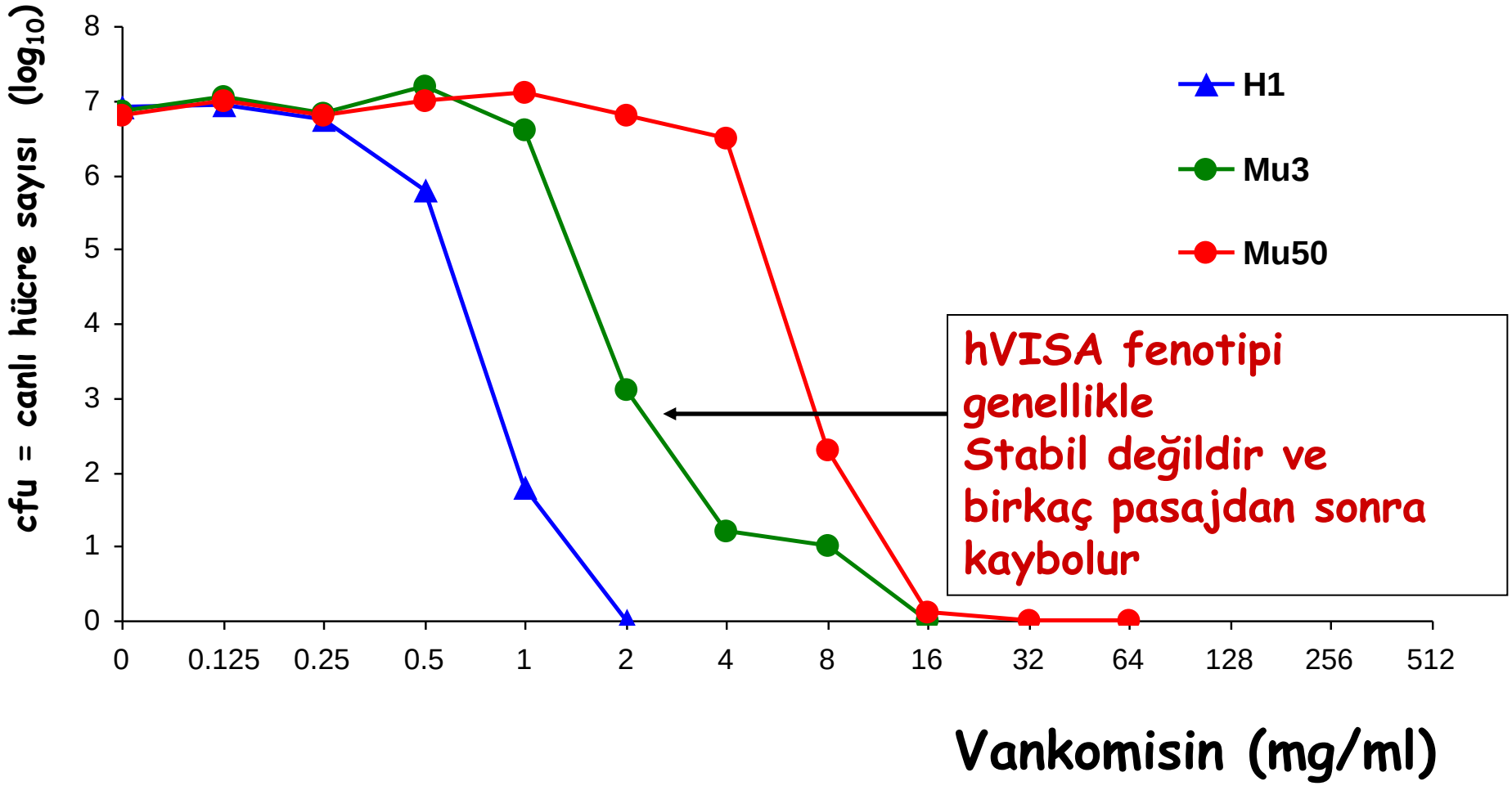
Mu3; hGISA

Etest-GRD
VA/TP >8µg/ml

Standard Etest
<4µg/ml

for *S. aureus* ATCC 700698 (Mu3; hGISA).

PAP-AUC



VISA Mu50, Mu3 (hetero-VRSA) ve H1 (VSSA)

VRE

***E. faecium* ve *E. faecalis* vankomisin duyarlılığı**

- Antimikrobiyal duyarlılık kategorizasyonu
- Enfeksiyon kontrolu
- Halk sağlığı açısından mutlaka test etmelidir

Enterococcus faecium/faecalis

- Doğal Direnç ?
- Beklenmedik Direnç Fenotipleri
- Tür Ayırımı

	FA	Sefalosporinler	AmG	DA
Streptokoklar	R		R*	
E. faecalis	R	R	R	R
E. gallinarum, E. casseliflavus	R	R	R	R
E. faecium	R	R	R	R

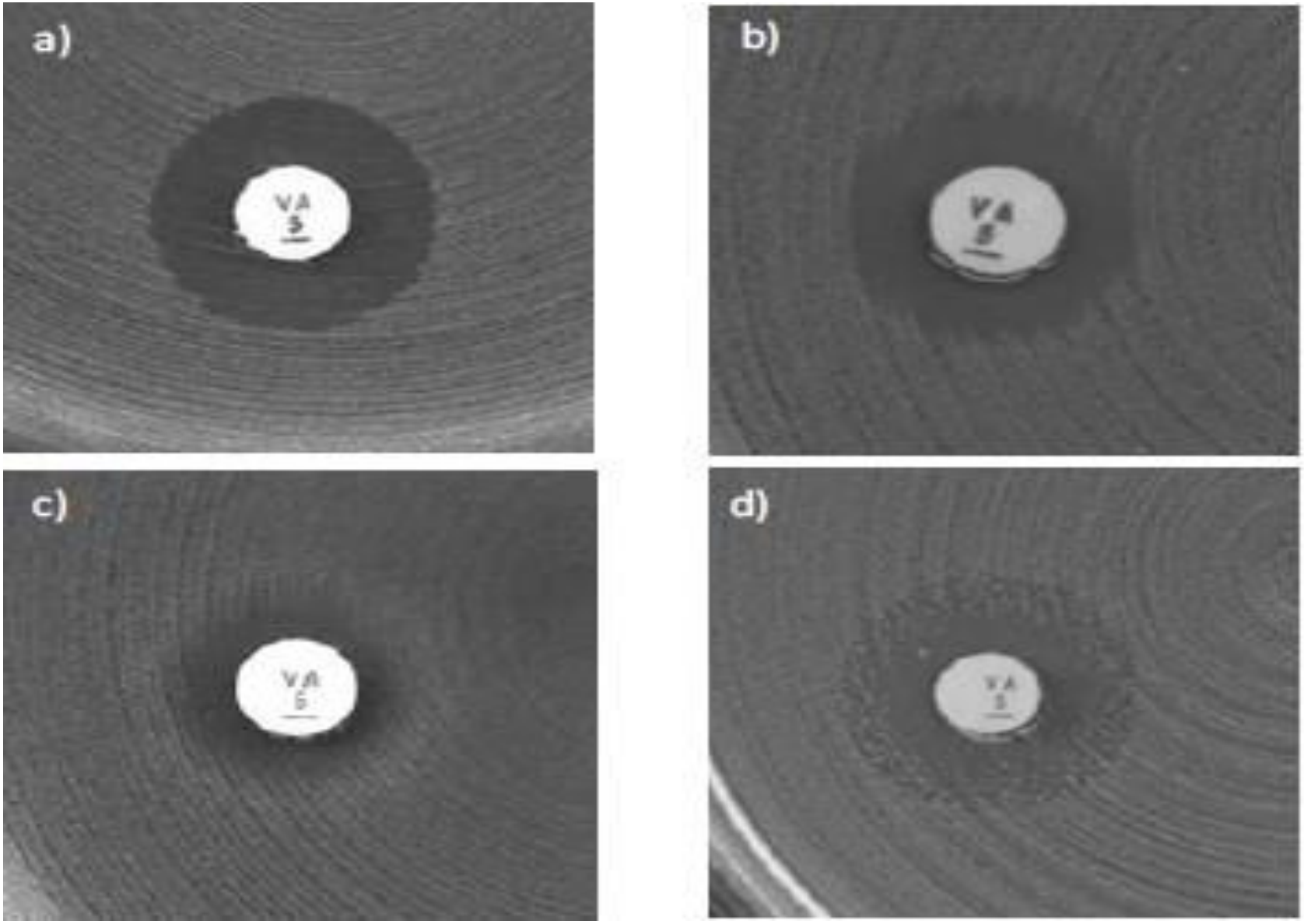
	AMP	QDA	VAN	TPN	FOS	Novo	SSS
Streptokoklar				R			R
E. faecalis		H	R?				R
E. gallinarum, E. casseliflavus		R	R				R
E. faecium		H	R?				R

Enterococcus faecium

Antibiyotik	Sonuç
Ampisilin	**S**
Vankomisin	R
Teikoplanin	R
GN	R
S	R
Linezolid	S

Vankomisin duyarlılığına DD ile bakılır mı?

Bakılır. Dirençli ise mutlaka MİK



a) Keskin zon kenarları ve zon çapı ≥12 mm. DUYARLI
b-d) Belirsiz zon kenarları ve/veya zon içi koloniler DİRENÇLİ

VRE Saptama

1- MİK (dilüsyon testleri, gradiyent strip) - VanA

2- Disk difüzyon – 5 ug disk

≥12 mm keskin zon çapı DUYARLI

<12 mm ise MUTLAKA MİK çalış

VanA

3- 'Sınır Değer Agar' metodu

6mg/L vankomisin içeren BHI agar

VanA + VanB

4- NA testleri (PCR)

VRE: *E. faecium/E. faecalis*

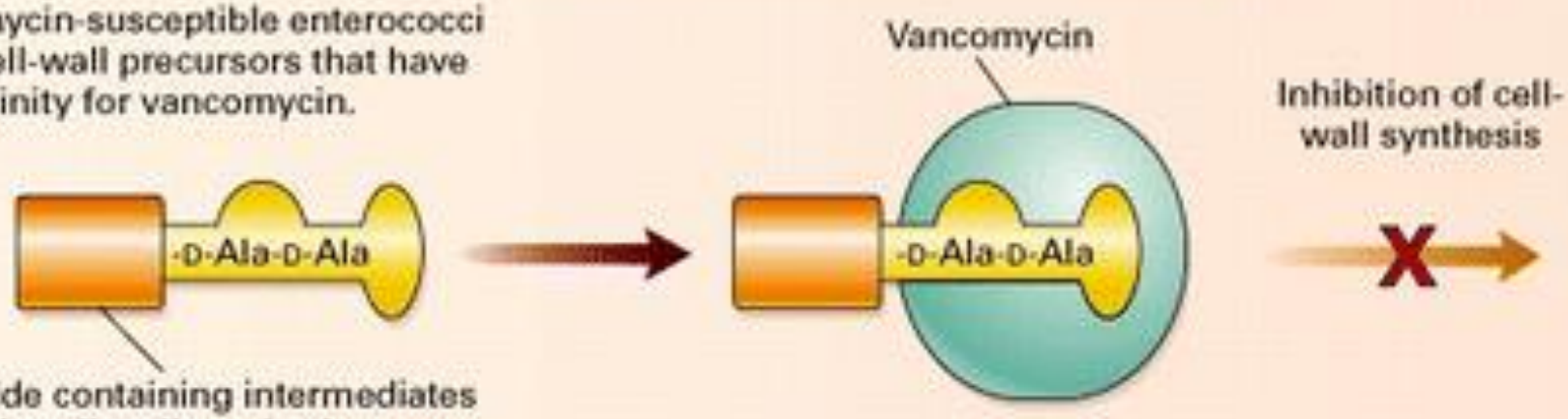
VRE Sınır değer >4 mg/L

- Plazmid - VanA ve VanB ligazlar
- VanB teikoplanine duyarlı
- Peptidoglikanda D-Ala'nın yerine D-Lac
- VanD, VAnE, VanG, VanL, VAnM, VanN
- *E. faecium* CC17 Klonu

	MİK mg/L	
	VanA	VanB
Vankomisin	64-1024	4-1024
Teikoplanin	8-512	0.06-1

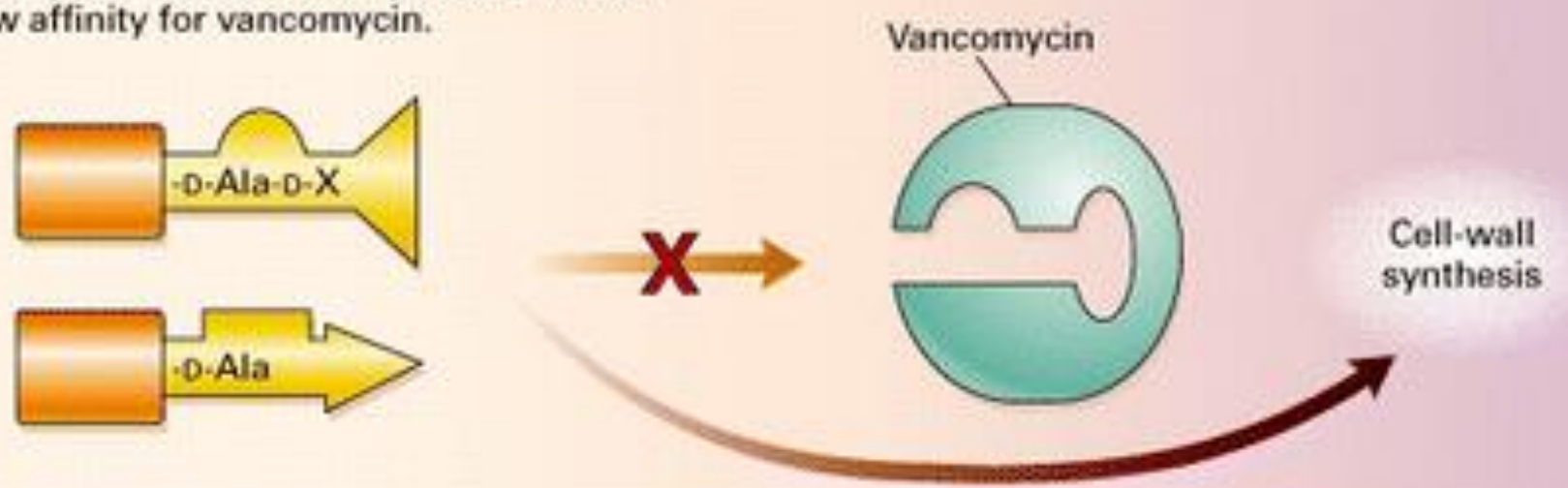
Vancomycin-Susceptible Enterococci

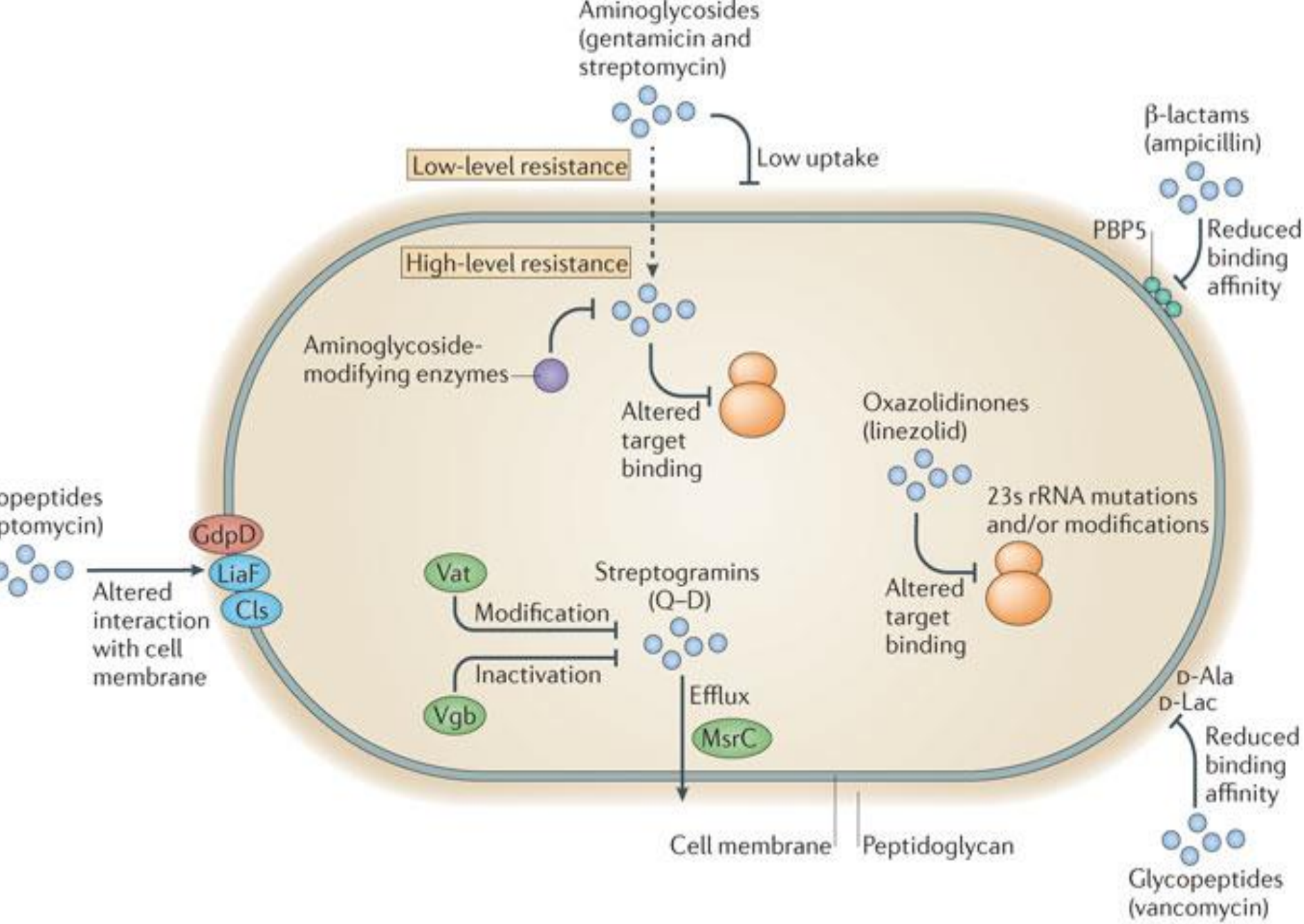
Vancomycin-susceptible enterococci make cell-wall precursors that have high affinity for vancomycin.



Vancomycin-Resistant Enterococci

Vancomycin-resistant enterococci, in the presence of vancomycin, make cell-wall precursors that have low affinity for vancomycin.




Aminoglycosides
(gentamicin and
streptomycin)
Low uptake
Low-level resistance
High-level resistance
β-lactams
(ampicillin)
PBP5
Reduced
binding
affinity
Aminoglycoside-
modifying enzymes
Altered
target
binding
Oxazolidinones
(linezolid)
23s rRNA mutations
and/or modifications
Altered
target
binding
opeptides
ptomycin)
GdpD
LiaF
Cls
Altered
interaction
with cell
membrane
Vat
Modification
Streptogramins
(Q–D)
Inactivation
Vgb
Efflux
MsrC
D-Ala
D-Lac
Reduced
binding
affinity
Cell membrane
Peptidoglycan
Glycopeptides
(vancomycin)

E. gallinarum ve *E. casseliflavus*

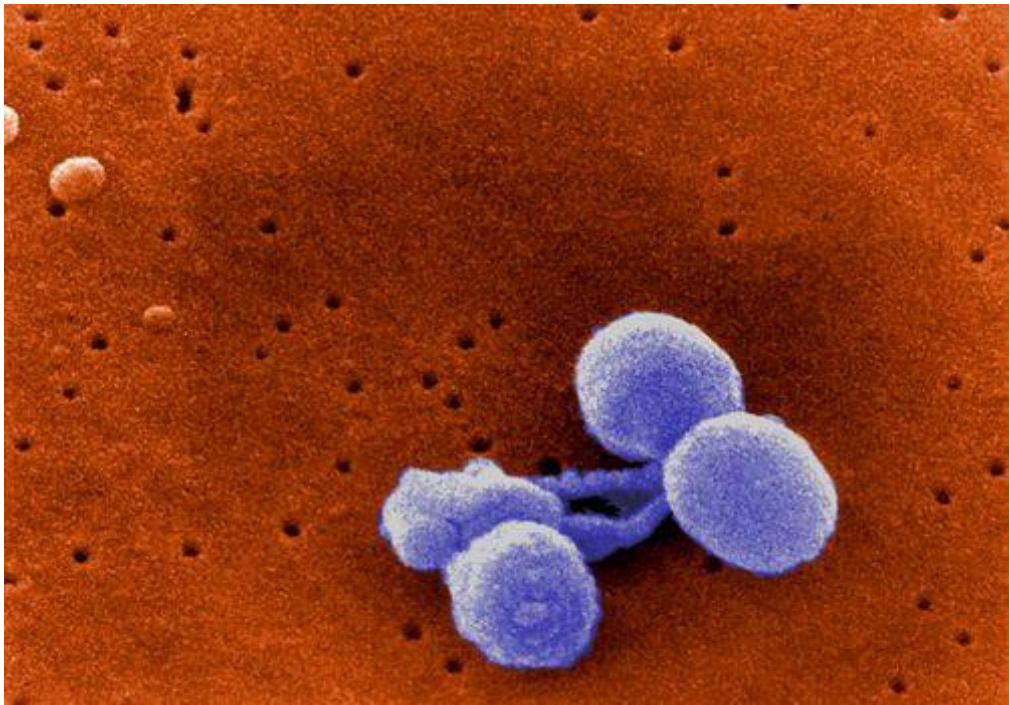
- Vankomisine DD
- Enfeksiyon kontrolu - gerek yok
- Kromozomal VanC enzimi

  MİK 4-16 mg/L

Tür ayırımı çok önemli !!!!

Streptococcus pneumoniae:Penisilin

Direnç saptanmasının önemi	
Antimikrobiyal duyarlılık kategorisinin belirlenmesi için gereklidir	Evet
Enfeksiyon kontrol	Hayır
Halk sağlığı	Evet

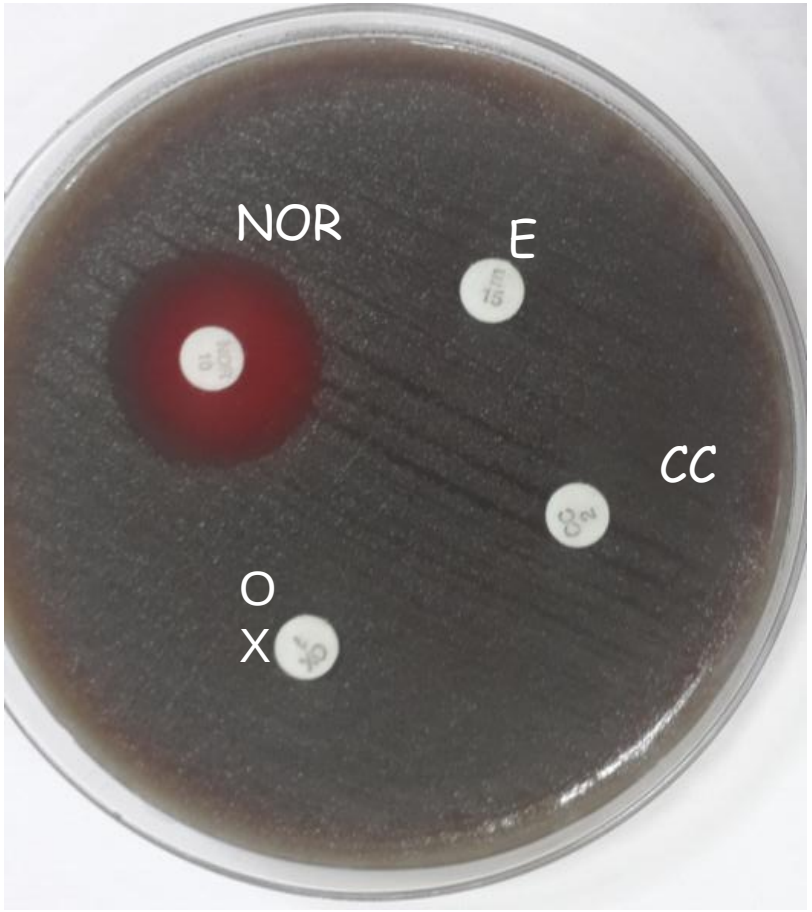


S.pneumoniae'de penisilin direnci

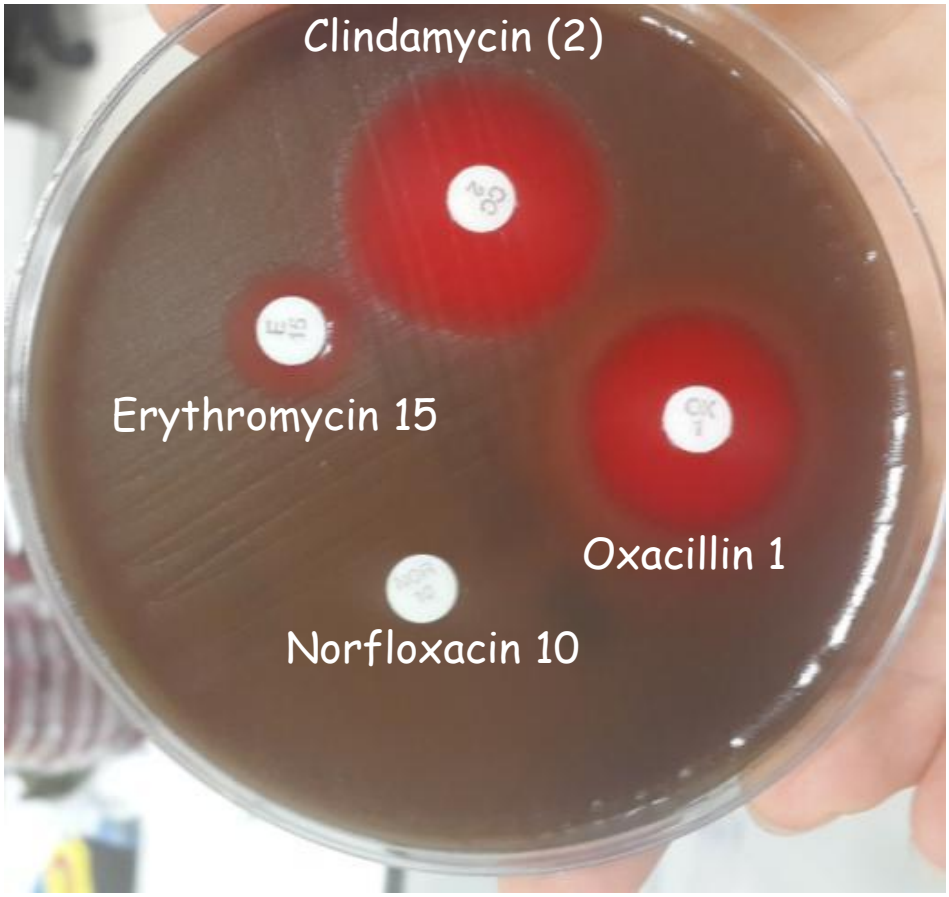
- Kromozomal
- PBP'lerin afinitesindeki değişikliğe bağlı
- Diğer streptokoklardan alınan PBP genlerinin pnömokok kromozomuna entegre olması ile gelişir

  Mozaik genler

Streptococcus pneumoniae



A



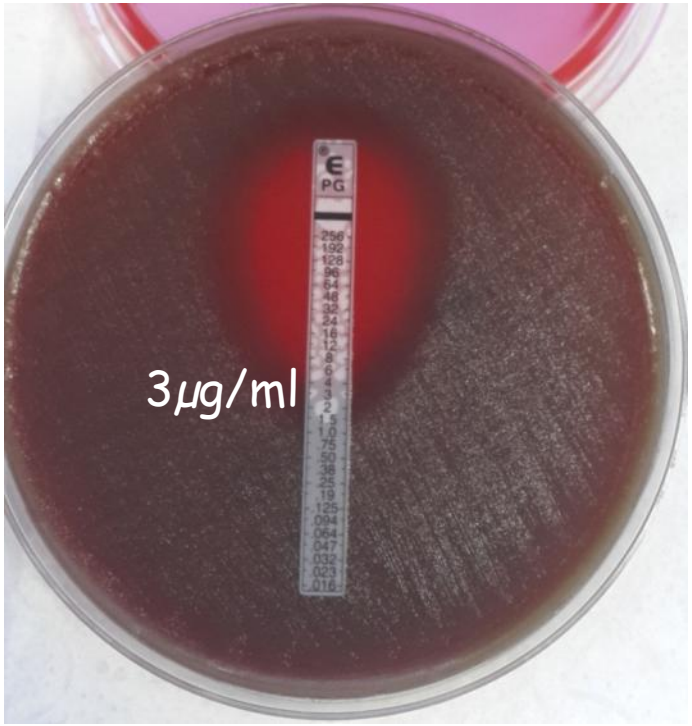
B

S.pneumoniae'da β-laktam direncinin taranması

Oksasilin 1µg disk	Antibiyotik	İleri Test/Yorum
≥ 20mm	Tüm β-laktamlara duyarlı	Klinik endikasyon ne olursa olsun DUYARLI
< 20mm	Benzilpenisilin (menenjit) fenoksimetilpenisilin(tümü)	DİRENÇLİ
	Benzilpenisilin (menenjit dışında)	MİK; sınır değere göre sonuç

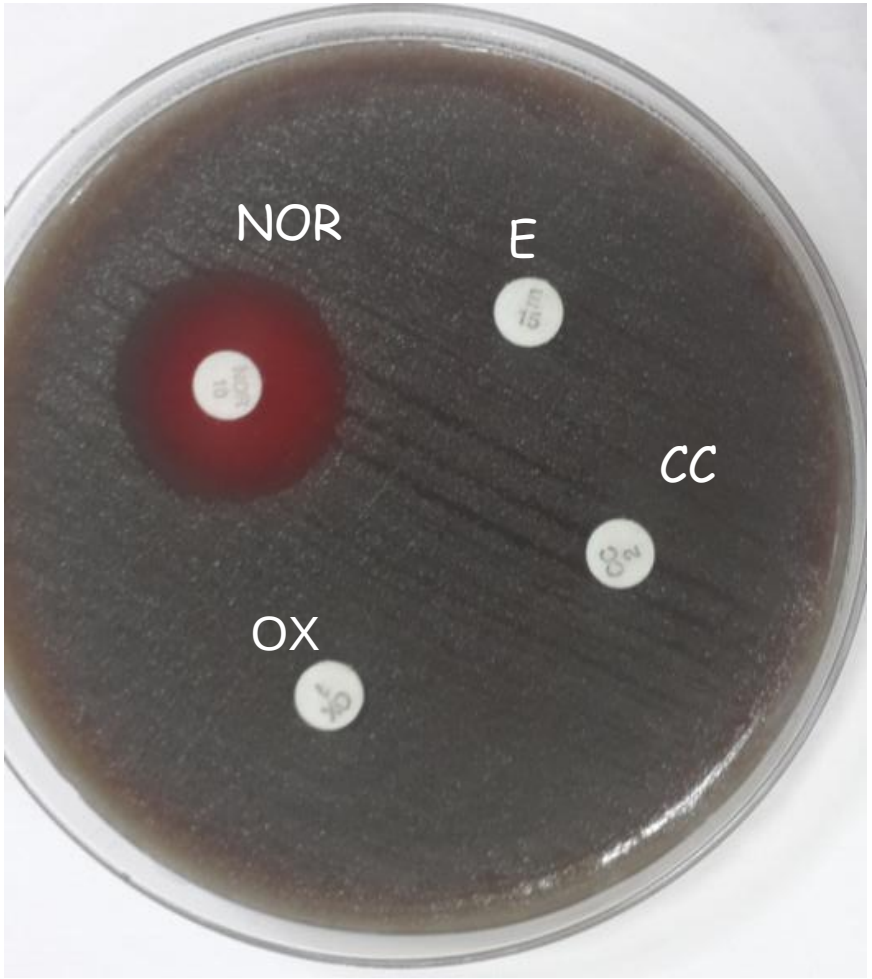
<20 mm ise Her zaman mutlaka MİK bakılmalı

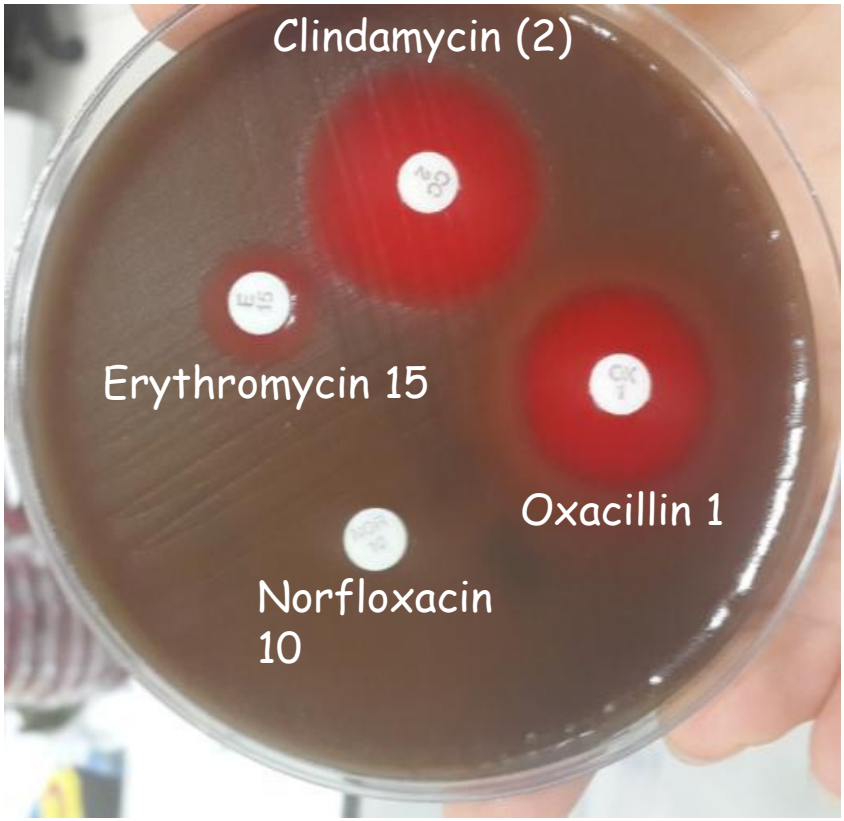
Penisilin MİK değeri



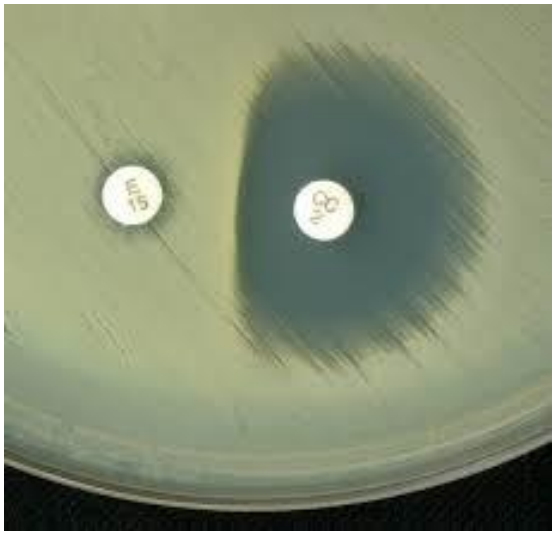
	Duyarlı (S)	Dirençli (R)
Benzilpenisilin	≤0.06	>0.06
Menenjit Dışı	≤0.06	>2

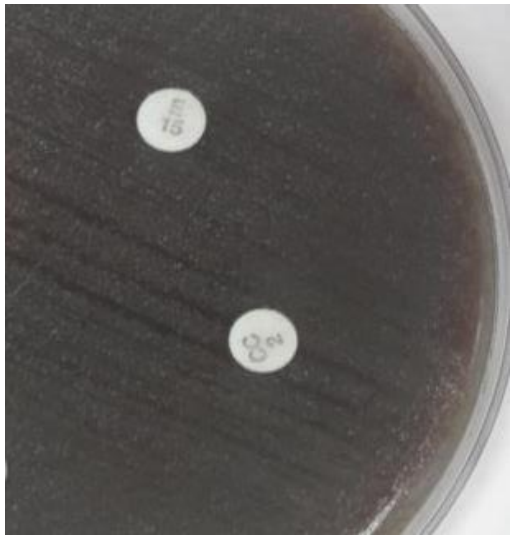
Streptococcus pneumoniae MLS_B





S. pneumoniae MLS_B Direnci





ermB	MLS_B fenotip	
mefA/E	Efluks	Klindamisin aktif

İndüklenebilir klindamisin direnci

A Grubu beta-hemolitik Streptokok

Makrolid ve Klindamisin Direncinin Takibi

ermB, ermTR, mefA

B Grubu beta-hemolitik Streptokok

- Klindamisin ve eritromisin Direnci
- Beta-laktamlara azalmış duyarlılık (benzilpenisilin MİK'i >1 mg/L)
- *erm, mef*

- Gebenin beta-laktam allerjisi varsa, o zaman D testi de değerlendirilecek şekilde eritromisin ve klindamisin duyarlılığı bakılır.
- Sadece klindamisin sonucu bildirilir.

Bakteri Adı	Direnç fenotipi	Direnç mekanizması	Direncin saptanması	Enfeksiyon kontrol amaçlı tarama
Staphylococcus aureus	MRSA	*mecA*, *mecC*	30 µg sefoksitin disk tarama	Evet
	GISA, hGISA	Hücre duvarı aşırı yapımı	MİK tayini	Hayır
	GRSA	*vanA* aktarımı	MİK tayini	Hayır
Streptococcus pneumoniae	Penisilin	Düşük afiniteli mozaik PBP'ler, PBP2x'de mutasyon	1 µg oksasilin disk tarama	Hayır
Enterococcus faecium, E. faecalis	Vankomisin	*vanA*	5 µg vankomisin disk tarama (dirençli ise MİK çalış)	Evet
		*van A*ve *vanB*	MİK tayini	
			Sınır değer agar testi, 6 mg/L vankomisin içeren BHI agar	
A ve B grubu streptokok	Eritromisin, klindamisin	*ermA*, *ermB*, efluks (*mef*)	D test	Hayır

Teşekkürler