



EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

EUCAST Klinik ve/veya epidemiyolojik önemi olan direnç mekanizmaları ve direnç özelliklerini saptama kılavuzu

Versiyon 2.0¹

(Temmuz 2017)

¹EUCAST Klinik ve/veya epidemiyolojik önemi olan direnç mekanizmaları ve özel direncin saptanması Alt Komitesi tarafından Aralık 2013’de yayınlanmış olan versiyon 1,0 temel alınmıştır. İlk versiyonun yazarları da dahil olmak üzere yazarlar: Christian G Giske (İsveç, EUCAST Yönetim Kurulu ve EARS-Net Koordinasyon Grubu; Başkan), Louis Martinez Martinez (İspanya), Rafael Canton (İspanya, EUCAST), Stefania Stefani (İtalya), Robert Skov (Almanya) Youri Glupczynski (Belçika), Patrice Nordmann (Fransa), Mandy Wootton (Birleşik Krallık), Vivi Miragou (Yunanistan), Gunnar Skov Simonsen (Norveç, EARS-Net Koordinasyon Grubu), Helena Zemlickova (Çek Cumhuriyeti, EARS-Net Koordinasyon Grubu), James Cohen –Stuart (Hollanda), ve Marek Gniadkowski (Polonya).

Çeviri: Deniz Gür, Zeynep Gülay

İçindekiler

Bölüm

1. Giriş
2. Karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae
3. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten Enterobacteriaceae
4. Kazanılmış Amp-C üreten Enterobacteriaceae
5. Gram negatif basillerde polimiksin direnci
6. *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter* izolatlarında karbapenem direnci
7. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*
8. Glikopeptidlere duyarlı olmayan *Staphylococcus aureus*
9. Vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*
10. Penisiline duyarlı olmayan *Streptococcus pneumoniae*

1. Giriş

Bu yönergeler kısmen EUCAST kullanıcıları tarafından sık sorulan sorulara yanıt olarak; kısmen de EARS-Net Mikrobiyoloji Rehberinin güncellenmesi sırasında uzman görüşü gerektiği için, Avrupa Hastalık Önlenim ve Kontrol Merkezi (ECDC)'nin isteği ile, hazırlanmıştır.

EUCAST Alt Komitesi, klinik ve/veya epidemiyolojik önemi olan direnç mekanizmalarını saptanması için pratik önerler geliştirmek amacı ile yola çıkmıştır. Bu belgenin her bölümünde; özel bir direnç mekanizmasının tanımı, saptanmasının klinik ve/veya halk sağlığı açısından önemi, önerilen yöntemlerin genel özeti ve ayrıntılı yöntem önerisinin kaynakları yer almaktadır.

Burada bulunan öneriler, sistematik literatür taramaları ile geliştirilmiş ve çok merkezli çalışmalar veya tek merkezde yapılan çok sayıda çalışma sonucuna göre doğrulanmış yöntemlerdir. Halen geliştirilmekte olan veya çalışma sonuçları henüz tamamlanmamış olan birçok yöntem, bu rehberde yer almamaktadır.

Rehber halen görüş alınma aşamasındadır.

Önerilerde yer alan kimyasallar ve diğer malzeme için mümkün olduğunca jenerik adlar kullanılmıştır. Ticari ürün adlardan kaçınılmaya çalışılmış, ancak bazı durumlarda söz edilmiştir.

Yine bazı mekanizmaların her zaman klinik dirence yol açmamasına rağmen, saptanmalarının enfeksiyon kontrolü ve halk sağlığı açısından önemli olduğu akılda tutulmalıdır. Bunun sonucunda özellikle gram negatif basillerdeki genişletilmiş spektrumlu β -laktamazlar (GSBL) ve karbapenemazlar açısından; mekanizma saptanmasına rağmen, bakteri her zaman “dirençli” kategorisinde yer almayabilir.

Christian G Giske
Alt Komite Başkanı

Rafael Canton
EUCAST Başkanı

2. Karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae

Direnç mekanizması saptanmasının önemi	
Antibiyotik duyarlılığının sınıflandırılması için gereklidir	Hayır
Enfeksiyon kontrolü için	Evet
Halk sağlığı için	Evet

2.1 Tanım

Karbapenemazlar; penisilinleri, çoğu zaman sefalosporinleri ve değişen derecelerde olmak üzere karbapenemleri ve monobaktamları hidrolize eden beta-laktamazlardır. Monobaktamlar, metallo-beta-laktamazlar tarafından parçalanmazlar.

2.2 Klinik ve/veya epidemiyolojik önemi

Avrupa’da karbapenemazların yayılma problemi, birçok Akdeniz ülkesinde 1990’ların ikinci yarısında başlamış ve temel olarak *Pseudomonas aeruginosa*’da gözlenmiştir (1). 2000’li yılların başında, Yunanistan’da *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında bir Verona integron aracılı metallo-β-laktamazı (VIM) salgını ortaya çıkmış (2), bunu bir *K.pneumoniae* Karbapenemazı (KPC) salgını izlemiştir (1). Günümüzde OXA-48 grubu karbapenemazlar, Avrupa ülkelerinde en hızlı artış gösteren karbapenemazdır (3). Hali hazırda invazif *K.pneumoniae* izolatlarının Yunanistan için yaklaşık %62’si, İtalya için yaklaşık %33’ü, karbapenemlere duyarlı değildir (4). 2013 yılında 38 Avrupa ülkesinin altısında (6/38) bölgesel ve/veya epidemik olarak karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae (KÜE) yayılımı bildirilmişken, 2015 yılında bu oran 13/38’e yükselmiştir. Sadece üç ülke hiç KÜE olgusu tanımlanmadığını bildirmiştir (3). Diğer Avrupa ülkelerinde de salgınlar gözlenmesine rağmen, invazif izolatlardaki problem bu denli yaygın değildir (1). Problem yaratan diğer karbapenemazlar, özellikle Hindistan ve Ortadoğu ülkelerinde prevalansı yüksek olan ve Avrupa ülkelerine taşınan Yeni Delhi (New Delhi metallo-β-lactamase ; NDM) metallo beta-laktamazlarıdır. Bu enzimlerin, bazı ülkelerde bölgesel yayılım gösterdiğine ilişkin örnekler bulunmaktadır (5). IMP karbapenemazları da dünyadaki bazı ülkelere sık görülmektedir (6).

Karbapenemazlar, tüm beta-laktamlara direnç yol açmaları ve kolayca yayılabilmelerinedeniyle bir endişe kaynağı oluşturmaktadır. Ayrıca, karbapenemaz üreten suşlar genellikle diğer direnç mekanizmalarını da taşıdıkları için çoklu dirençlidirler ve karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae enfeksiyonları yüksek mortalite hızları ile ilişkilidir (7-9).

2.3 Direnç mekanizması

Karbapenemazların çoğu, plazmidler üzerindeki transpoze olabilen elemanlarca kodlanan, kazanılmış enzimlerdir. Karbapenemazlar çeşitli düzeylerde eksprese edilebilir. Ayrıca gerek biyokimyasal özellikleri gerekse etkiledikleri beta-laktam spektrumu açısından birbirlerinden farklıdırlar. Ekspresyon düzeyi, β -laktamazın özellikleri, diğer direnç mekanizmalarının varlığı (diğer β -laktamazlar, aktif pompa, geçirgenlik değişimleri), karbapenemaz-üreten izolatlarda gözlenen farklı direnç fenotiplerine yol açmaktadır (10,11). Enterobacteriaceae üyelerinde, GSBL veya AmpC enzim üretimi, porin (veya olasılıkla PBP) değişimleri veya kaybı ile birlikteyse de, karbapenem duyarlılığında azalma görülebilmektedir (12,13).

Karbapenemaz üreten izolatların çoğu genişlemiş spektrumlu (oksimino) sefalosporinlere (yani sefotaksim, seftazidim, seftriakson ve/veya sefepim) de dirençlidir (14). Bazı enzimlerin varlığında (ör OXA-48 benzeri enzimler), bakteri sefalosporinlere duyarlı da olabilir. Ancak, bu izolatların çoğu aynı zamanda CTX-Mler gibi bir sefalosporin-hidrolze eden bir enzim de ürettiğinden, sıklıkla sefalosporin direnci izlenir. Karbapenemazların, özellikle de karbapenemlerden (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem) birine duyarlılıkta azalmaya neden olmuşsa, bir başka deyişle MİK değerleri EUCAST tarafından tanımlanan epidemiyolojik sınır değerlerin (ECOFF) üzerinde ise, epidemiyolojik açıdan yüksek önem taşıdığı kabul edilir (15).

2.4 Enterobacteriaceae üyelerinde karbapenemaz üretiminin saptanması için önerilen yöntemler

2.4.1 Karbapenemaz üretiminin taranacağı fenotipler

Karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae üyelerinde karbapenem MİK değerleri klinik sınır değerlerin altında olabilir (14-16). Ancak, EUCAST tarafından belirlenen ECOFF değerleri karbapenemaz üreticilerinin saptanması için kullanılabilir. Meropenem, karbapenemaz üreticilerinin saptanmasında duyarlılık ve özgüllük dengesi açısından en iyi ajandır (14,17). Ertapenem duyarlılık açısından mükemmel olmakla birlikte, özgüllüğü düşüktür. Bu antibiyotik, porin mutasyonları varlığında GSBL ve AmpC tipi enzimlere göreceli olarak duyarlı olduğu için, bu durum özellikle *Enterobacter* spp'de belirgindir (14). Karbapenemaz taranması için uygun eşik değerler Tablo 1'de gösterilmiştir. Özgüllüğü arttırmak için, meropenem ve ertapenem eşik değerleri, ECOFF'larından bir dilüsyon yüksektir.

Tablo-1 Karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae için kinik sınır değerler ve tarama eşik değerleri (EUCAST önerileri kullanıldığında)

Karbapenem	MİK (mg/L)		Disk difüzyon zonları (mm) (10 µg diklerle)	
	S/l sınır değeri	Tarama eşik değeri	S/l sınır değeri	Tarama eşik değeri
Meropenem ¹	≤ 2	> 0.12	≥ 22	<28 ²
Ertapenem ³	≤ 0.5	> 0.12	≥ 25	<25

¹Duyarlılık ve özgüllük dengesi en iyi olan

²Zon çapı 25-27 mm olan izolatlar ancak piperasilin tazobaktam ve/veya temosiline dirençli ise (temosilin özgüllük açısından daha iyidir) çalışılmalıdır. Meropenem zonu <25 mm ise karbapenemazlar açısından tarama mutlaka yapılmalıdır.

³Yüksek duyarlılık ancak düşük özgüllüktedir. Tarama için kullanılabilir, ancak GSBL veya AmpC üreten izolatlar, karbapenemazları olmasa da dirençli olabilir.

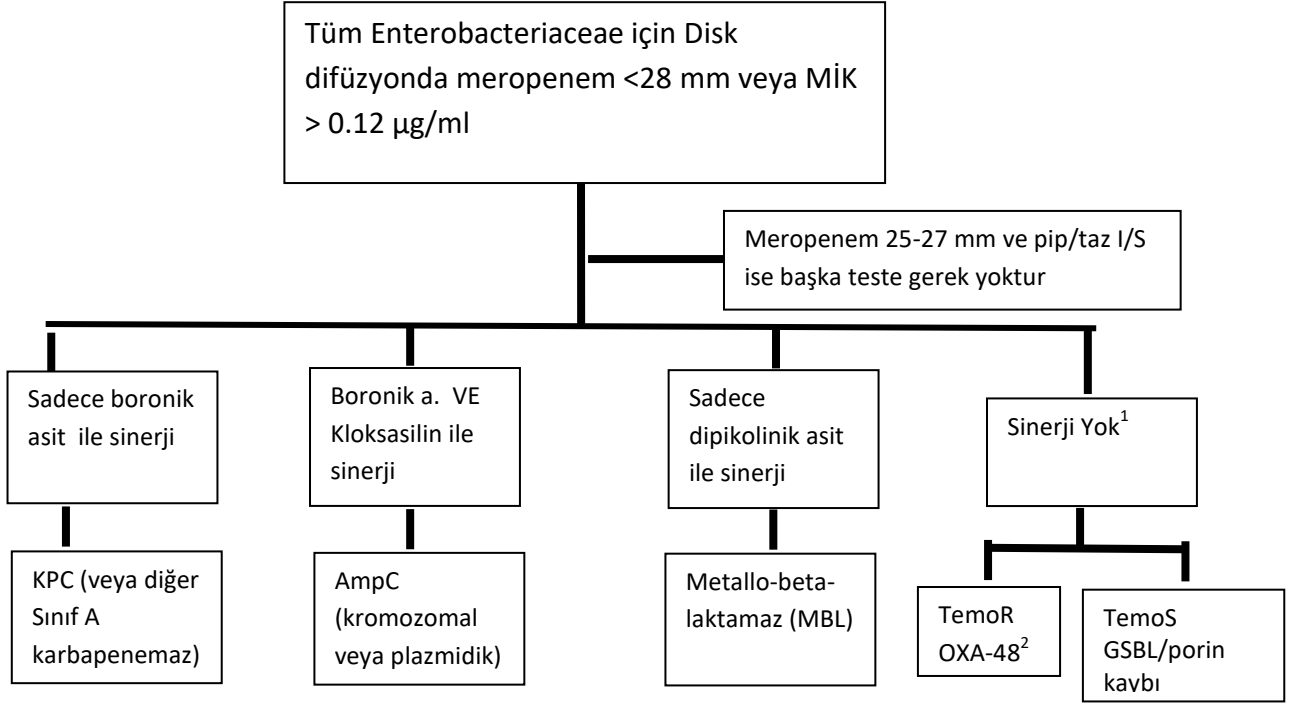
Rutin duyarlılık testlerinde karbapenem duyarlılığında azalma saptandıktan sonra, karbapenemaz varlığını göstermek için fenotipik testler uygulanmalıdır. Bu yöntemler, temel olarak; kombinasyon disk testleri, karbapenem hidrolizini gösteren kolorimetrik yöntemler, karbapenem hidrolizini gösteren diğer yöntemler ve en son olarak da lateral akım yöntemleri şeklinde sınıflandırılabilir. Bu testler aşağıda açıklanmıştır

2.4.2 Kombinasyon Disk Testi

Kombinasyon disk yöntemi, çeşitli çalışmalarla valide edilmiş olması ve ticari olarak bulunabilmesi (Mast, ROSCO) gibi avantajlara sahiptir (18-20). Diskler veya tabletler meropenem yanı sıra, çeşitli inhibitörler içerirler. Kısaca, boronik asit sınıf A karbapenemazları inhibe ederken (KPC dışındaki grup üyeleri ile ilgili deneyim kısıtlıdır), dipikolinik asit ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA), sınıf B karbapenemazları inhibe eder. Bunun yanı sıra, OXA-48 avibaktam ile inhibe olmaktadır, ancak bu inhibitör halen ticari fenotipik panellere eklenmemiştir (21,22). Kloksasilin testlere aşırı AmpC üretimi ve porin kaybı birlikteliği ile ortaya çıkan karbapenem direnci ile karbapenemaz üretiminin ayrılması amacıyla eklenir.

İnhibitör testlerinin yorumlanması ile ilgili akış şeması Şekil-1 ve Tablo 2’de görülmektedir. Bu yöntemlerle ilgili temel dezavantaj, yapılması için 18 saat (pratikte bir gecelik inkübasyon) gerekmesidir. Bu nedenle de yeni hızlı yöntemler kullanıma girmiştir.

Şekil 1



¹Çeşitli karbapenemazların birlikteliği de sinerji görülmemesine neden olur (ör. MBL ve KPC birlikteliği). Genel olarak bu olgularda moleküler yöntemler kullanılır. ²Yüksek düzey temosilin direnci (MIC > 128 mg/L veya temosilin diski ile ≤11 mm zon, OXA-48 için fenotipik belirleyicidir.

Tablo 2’deki algoritma metallo-beta-laktamazlar, sınıf A karbapenemazlar, sınıf D karbapenemazlar ve karbapenemaz dışı mekanizmalar (GSBL ve/veya AmpC ve porin kaybı) arasında ayırım yapılabilmesini sağlamaktadır. Testler güç üreyenler dışındaki bakteriler için EUCAST disk difüzyon yöntemiyle uygulanabilir. Ticari testler, üretici önerilerine göre uygulanmalıdır.

Günümüzde OXA-48 benzeri enzimler için herhangi bir inhibitör bulunmamaktadır. Temosiline yüksek düzey direnç (MİK>128 mg/L) OXA-48 üreten suşlar için bir fenotipik belirleyici olarak önerilmiştir (23,24). Ancak, diğer direnç mekanizmaları da benzer fenotipe yol açabildiği için, temosilin direnci OXA-48 –tipi karbapenemazlara özgül değildir. Bu nedenle de OXA-48 varlığı diğer yöntemlerle doğrulanmalıdır.

Modifiye Hodge Testi (Yonca yaprağı testi), hem sonuçların yorumunun zor olması hem de duyarlılık ve özgüllüğünün düşük olması nedeniyle, önerilmemektedir (12). Bu test için de bazı yeni değişiklikler önerilmişse de, bunların rutinde uygulanması zor ve zaman alıcıdır; ayrıca duyarlılık ve özgüllük ile ilgili tüm problemler de çözülememiştir.

Tablo-2 Disk veya tabletlerle uygulanan fenotipik testlerin yorumu (karbapenemazlar **koyu font** ile yazılmıştır). Sinerji tanımlanması için kesin değerler, ticari ürünlerin kullanım kılavuzlarında bulunmaktadır

B-laktamaz	Meropenem (10µg) disk/tableti ile zon çapında artış				Temosilin MİK>128mg/L veya zon çapı < 11 mm
	DPA/EDTA	APBA/PBA	DPA+APBA	CLX	
MBL	+	-	-	-	Değişken ¹
KPC	-	+	-	-	Değişken ¹
MBL+KPC²	Değişken	Değişken	+		Değişken ¹
OXA-48-benzeri	-	-	-	-	Evet
AmpC+porin kaybı	-	+	-	+	Değişken ¹
GSBL+porin kaybı	-	-	-	-	Hayır

Kısaltmalar: MBL= Metallo-β-laktamaz, KPC= *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase, DPA= Dipikolinik asit, EDTA= Etilendiamintetraasetik asit, APBA= aminofenil boronik asit, PBA=fenil boronik asit, CLX= kloksasilin

¹Temosilin sadece hiçbir sinerjinin gözlenmediği durumlarda OXA-48 üretimi ile GSBL+porin kaybının ayırt edilmesinde önerilir (23,24). Diğer enzimlerin varlığında duyarlılık değişir ve bulunan beta-laktamazın tanımlanması için yol gösterici olmaz.

²İki inhibitörü (DPA veya EDTA +APBA/PBA) bir arada içeren tabletlerin kullanılmasını destekleyen sadece bir yayın bulunmaktadır., ancak halen çok merkezli çalışmalar veya tek merkezde yapılmış çok sayıda çalışma sonuçları eksiktir. Bu fenotip Yunanistan dışında nadirdir ve karbapenemlere yüksek düzey direnç yol açar.

2.4.3 Biyokimyasal (kolorimetrik) testler

CarbaNP testi, karbapenem hidrolizini gösteren hızlı (< 2st) bir testtir. Testin çalışma prensibi, karbapenem hidrolizinin pH değişimine yol açması ve bunun sonucunda fenol kırmızısı solüsyonunun kırmızıdan sarıya dönmesidir (26,27). Carba NP testinin yöntem onayı (validasyon basamağı) Mueller Hinton agar, kanlı agar, triptikaz soya agar ve karbapenemaz tarama besiyerlerinin çoğunda üretilmiş koloniler ile yapılmıştır. Carba NP testi, Drigalski ve McConkey agar plaklarında üretilmiş kolonilerde uygulanmamalıdır. Tekrarlanabilir sonuçlar alınabilmesi için, yöntem basamakları ile ilgili detaylar dikkatle izlenmeli ve uygulanmalıdır. Bu testin yüksek duyarlılık ve özgüllükte olduğunu bildiren birçok yayın bulunmaktadır (28). Ancak, bir yayında

mukoid koloniler ve OXA-48 üreticilerinde duyarlılığın düştüğü gözlenmiştir (29). Bu yöntemden geliştirilmiş bir ticari test de genel olarak, Enterobacteriaceae türlerindeki karbapenemazların saptanmasında, iyi bir performans göstermektedir (30,31). Ancak, CarbaNP'nin ticari versiyonu da dahil olmak üzere tüm kolorimetrik ticari testlerde, sonuçların %3-5'i renk değişiminin "şüpheli" olması nedeniyle, yorumlanamamaktadır.

CarbaNP testinin bir türevi olan Blue-Carba testi (BCT) karbapenemaz üretimini gösteren bir başka hızlı (<2 st) testtir (32,33). Bu test ise, önceden lizis yapılmadan doğrudan teste eklenen bakteri kolonilerinin imipenemi hidrolize etmesini; pH değişikliği oluşması ve bunun sonucunda indikatör olan brom timol mavisinin renginin, maviden yeşil/sarıya veya yeşilden sarıya değişmesi ile saptamaktadır. Pasteran ve arkadaşlarının geniş kapsamlı ancak tek bir merkezde uygulanmış olan değerlendirmesinde, testin A ve B sınıfı enzimler açısından mükemmel duyarlılık gösterdiği; buna karşın OXA-48 enzimlerinin saptanmasında daha düşük performans sergilediği bildirilmiştir (34).

Üçüncü ticari test olan β -CARBA testi™ de yine < 2saatte sonuç verebilmektedir. Bu testte de 1-3 koloni test reaktifleri ile karıştırılmaktadır. Okumalar en fazla 30 dk inkübasyon sonunda yapılmalıdır. Rengin sarıdan turuncu, kırmızı veya mora değişmesi pozitif reaksiyonu göstermektedir. Bir çalışmada üretici tarafından önerilen 0.5 saatlik inkübasyon süresinin OXA-48 üreten izolatlar için çok kısa olduğu bildirilmiştir. Ancak değerlendirilen suş koleksiyonu çok kısıtlıdır ve testin performansının diğer biyokimyasal testlerle kıyaslanabileceği daha geniş bir çalışma önerilmiştir (35). Bir başka çalışmada ise testin KÜE izolatlarında özellikle de OXA-48 üretenlerde çok iyi performans gösterdiği belirtilmiştir. Ancak, bu testin A sınıfı karbapenemazlarını saptama performansının tekrar değerlendirilmesi gerektiği ve K1 aşırı üretimi gibi diğer beta-laktamazların varlığında yanlış pozitif sonuç alınabildiği hatırlanmalıdır.

2.4.4 Karbapenem İnaktivasyon Yöntemi (Carbapenem Inactivation Method; CIM)

Bu yöntemin çalışma prensibi ise, bir karbapenemin bakteri süspansiyonu ile inkübasyonu sonucunda enzim aracılığıyla parçalandığını göstermektir. CIM testi, substrat olarak antibiyotik disklerini kullanmaktadır. Meropenem diski, bir öze dolusu bakteri ile iki saatlik inkübe edildikten sonra, *E.coli* ATCC 25922 (meropeneme duyarlı suş) yayılmış Mueller- Hinton besiyerine yerleştirilmektedir. Enzimatik inaktivasyon oldu ise disk etrafında inhibisyon zonu oluşmamakta veya çok daralmaktadır. CIM testi farklı çalışmalarda değişken performans göstermiştir (36-38). Negatif prediktif değeri açık olmamakla birlikte, diğer testlere alternatif olarak uygulanabilir. Bu yöntemin temel dezavantajı, sonuç alınabilmesi için en az 18 saat gerekmesidir.

2.4.5 Karbapenem hidrolizinin MALDI-TOF ile saptanması

Buradaki prensip karbapenemlerin test bakterisi ile karşılaştırılması sonrasında, kütle spektrumunda karbapenemlere ait özgül piklerin kaybolmasının veya yüksekliğindeki azalmanın bir MALDI-TOF analizörü aracılığıyla gösterilmesidir (39,40). Değişik çalışmalarda, OXA-48 üreten izolatlar haricinde, bu yöntemin duyarlılık ve özgüllüğü iyi bulunmuştur. OXA-48 ile ilgili problemin üstesinden gelmek için reaksiyona NH_4HCO_3 eklenmesi önerilmektedir (41). Ancak bu öneri henüz çok merkezli bir çalışma veya tek merkezli çok sayıda çalışma ile değerlendirilmemiştir. Bunun yanı sıra, MALDI-TOF ayarlarının tür saptama için kullanılandan farklı olması, bu yöntemin pratikliğini azaltmaktadır (41).

2.4.6 Lateral akım yöntemleri

Karbapenemaz saptanması için son yıllarda yeni bir immunokromatografik lateral akım testi geliştirilmiştir. Bu test, nitroselüloz membrana sabitlenmiş anti OXA-48 kaplı koloidal altın nanopartikülleri ile OXA-48 epitoplarının “yakalanması” prensibine dayanmaktadır. OXA-48 benzeri enzimlerin doğrudan tanımlanması için anti-OXA-48 antikorları özgül yakalama reaktifleri olarak kullanılmaktadır(42). Test yaklaşık 4 dakika sürmektedir. Hem koloniler ile hem de kan kültür şişelerindeki simüle örneklerle denenmiştir (43-46). Yine yakın zamanda KPC için de benzer bir test geliştirilmiş, ancak tekrarlanabilirliği henüz çok merkezli bir çalışma veya birden çok tek merkezli çalışma ile değerlendirilmemiştir (46).

2.4.7 Kontrol suşları

Aşağıda fenotipik ve genotipik deneyler için kullanılabilecek bazı kontrol suşları listelenmiştir. Bu suşlar için MİK, zon çapı, sonuç dağılımları bulunmamaktadır. Ticari yöntem kullanıcıları, kontrol suşları açısından üretici firma önerilerini incelemelidir

Tablo 3. Karbapenemaz testi için uygun kontrol suşları

Suş	Mekanizma
<i>Enterobacter cloacae</i> CCUG 59627	AmpC ve azalmış porin ekspresyonu
<i>Enterobacter cloacae</i> CCUG 58547 <i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 13440	Metallo- β -laktamaz (VIM)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 13443	Metallo- β -laktamaz (NDM-1)
<i>E.coli</i> NCTC 13476	Metallo- β -laktamaz (IMP)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCUG 56233 <i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 13438	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase (KPC)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 13442	OXA-48
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 25955	Negatif kontrol

2.5 Kaynaklar

1. Canton R, Aköva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. Clin Microbiol Infect. 2012;18:413-31
2. Vatopoulos A. High rates of metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece - a review of the current evidence. Euro Surveill. 2008;13(4). doi:pii: 8023
3. Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. Euro Surveill. 2015;20(45).
4. European Centres for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)
5. Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, Gawryszewska I, Bojarska K, et al. NDM-producing Enterobacteriaceae in Poland, 2012-2014: interregional outbreak of *Klebsiella pneumoniae* ST11 and sporadic cases. J Antimicrob Chemother. 2016;71:85-91
6. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. 2011;17(10):1791-8.
7. Souli M, Galani I, Antoniadou A, Papadomichelakis E, Poulakou G et al. An outbreak of infection due to β -lactamase *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. Clin Infect Dis 2010;50:364-73.
8. Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, Quale J. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. Arch Intern Med. 2005; 165:1430-5.
9. Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:1413-8
10. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. Clin Microbiol Rev 2007;20:440-58
11. Falcone M, Mezzatesta ML, Perilli M, Forcella C, Giordano A et al. Infections with VIM-1 metallo β -lactamase- producing *Enterobacter cloacae* and their correlation with clinical outcome. J Clin Microbiol 2009;47: 3514-9.
12. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. J Antimicrob Chemother. 2009;63:659-67
13. Yamachika S, Sugihara C, Kamai Y, Yamashita M. Correlation between penicillin-binding protein 2 mutations and carbapenem resistance in *Escherichia coli*. J Med Microbiol. 2013;62:429-36.
14. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Mirlagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Infect. 2012;18:432-8.
15. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Website with MIC-distributions. (<http://mlc.eucast.org/>, accessed on 23 December 2012)
16. Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, Rezende de Castro R, Bauriang C et al. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae

Isolates in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39:168-72

17. Tato M, Coque TM, Ruiz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J et al. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of Enterobacteriaceae infection involving VIM-1 metallo-3-lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis*. 2007;45(9):1171-8.
18. Vadnang M, Samuelsen O, Haldorsen B, Sundsfjord AS, Giske CG. Comparison of disk diffusion, Etest® and VITEK2 for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:668-74. •
19. Giske CG, Gezellus L, Samuelsen O, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-3-lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dlplcollnlc acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:552-6.
20. Doyle D, Pelrano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol*. 2012;50:3877-80.
21. Porres-Osante N, de Champs C, Dupont H, Torres C, Mammeri H. Use of avlbactam to detect Ambler class A carbapenemases and OXA-48 3-lactamases in Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014; 79:399-400.
22. Huang TD, Berhln C, Bogaerts P, Glupczynski Y. Evaluation of avlbactam-supplemented combination disk tests for the detection of OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;79:252-4.
23. Van Dijk K, Voets G, Scharringa J, Voskuil S, Fluit A, Rottler W, Leversteijn-Van Hall M, Cohen Stuart J. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenyl boronic acid, dlplcollnlc acid, and temocillin. *Clin Microbiol Infect* 2013. In press
24. Hartl R, Wldhalm S, Kerschner H, Apfalter P. Temocillin and meropenem to discriminate resistance mechanisms leading to decreased carbapenem susceptibility with focus on OXA-48 in Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19:E230-2.
25. Mrlagou V, Tzelepi E, Kotsakis SD, Daikos GL, Bou Casals J, Tzouveleki LS. Combined disc methods for the detection of KPC- and/or VIM-positive *Klebsiella pneumoniae*: Improving reliability for the double carbapenemase producers. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19:E412-5
26. Nordmann P, Polrel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:1503-7.
27. Dortet L, Polrel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:6437-40.
28. Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC, Simner PJ, Mandrekar JN, Lolans K, Hayden MK, Patel R. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol*. 2013;51:3097-101.
29. Tljet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57:4578-80.
30. Dortet L, Agathine A, Naas T, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. Evaluation of the RAPIDEC® CARBA NP, the Rapid CARB Screen® and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2015 ; 70):3014-22. f
31. Kabir MH, Meunier D, Hopkins KL, Giske CG, Woodford N. A two-centre evaluation of

- RAPIDEC® CARBA NP for carbapenemase detection in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. J Antimicrob Chemother. 2016 ;71:1213-6.
32. Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y. Comparative evaluation of two chromogenic tests for rapid detection of carbapenemase in Enterobacteriaceae and In *Pseudomonas aeruginosa* isolates. J Clin Microbiol. 2014;52(8):3060-3.
 33. Noel A, Huang TD, Berhln C, Hoebeke M, et al. Comparative Evaluation of Four Phenotypic Tests for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria. J Clin Microbiol. 2017 Feb;55(2):510-518
 34. Pasteran F, Vellz O, Cerlana P, Lucero C, Rapoport M, et al. Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases In gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. 2015 ;53(6):1996-8.
 35. Compain F, Gallah S, Eckert C, Arlet G, Ramahefasolo A, et al. Assessment of Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae with the Rapid and Easy-to-Use Chromogenic O-Carba Test. J Clin Microbiol. 2016;54(12):3065-3068
 36. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, et al. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. PLoS One. 2015;10(3):e0123690
 37. Yamada K, Kashiwa M, Arai K, Nagano N, Saito R. Comparison of the Modified-Hodge test, Carba NP test, and carbapenem inactivation method as screening methods for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. J Microbiol Methods. 2016;128:48-51.
 38. Tijet N, Patel SN, Melano RG. Detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test J Antimicrob Chemother. 2016 ;71(1):274-6.
 39. Hrabák J, Studentová V, Walkova R, Zemlickova H, Jakubu V et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2012;50:2441-3
 40. Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G, Bogaerts P, Lamar E, et al. Efficient Detection of Carbapenemase Activity in Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes. J Clin Microbiol. 2015; 53:2163-71.
 41. Papagiannitsis CC, Studentova V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer Y, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH₄HC0₃, a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. J Clin Microbiol. 2015;53(5):1731
 42. Pasteran F, Denorme L, Ote I, Gomez S, De Beider D, Glupczynski Y, Bogaerts P, Ghiglione B, Power P, Mertens P, Corso A. Rapid identification of OXA-48 and OXA-163 Subfamilies in carbapenem-resistant gram-negative bacilli with a novel immunochromatographic lateral flow assay. J Clin Microbiol. 2016;54(11):2832-2836
 43. Dortet L, Jousset A, Sainte-Rose V, Cuzon G, Naas T. Prospective evaluation of the OXA-48 K-SeT assay, an immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-type carbapenemases. J. Antimicrob Chemother. 2016;71 (7): 1834-40.
 44. Wareham DW, Shah R, Betts JW, Phee LM, Momin MH. Evaluation of an Immunochromatographic Lateral Flow Assay (OXA-48 K-SeT) for Rapid Detection of OXA-48-Like Carbapenemases in Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2016;54(2):471-3
 45. Meunier D, Vickers A, Pike R, Hill RL, Woodford N, Hopkins KL. Evaluation of the K-SeT R.E-.S.I.S.T. Immunochromatographic assay for the rapid detection of KPC and OXA-48-like carbapenemases. J Antimicrob Chemother. 2016;71(8):2357-9.

46. Glupczynski Y, Evrard S, Ote I, Mertens P, Huang TD, et al. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(5):1217-22

3.Genişletilmiş-spektrumlu-β- laktamaz (GSBL) üreten Enterobacteriaceae

Direnç mekanizması saptanmasının önemi	
Antibiyotik duyarlılığının sınıflandırılması için gereklidir	Hayır
Enfeksiyon kontrolü için	Evet
Halk sağlığı için	Evet

3.1 Tanım

GSBL'ler oksimino-β-laktamlar (sefuroksim, 3. ve 4. Kuşak sefalosporinler ve aztreonam) da dahil olmak üzere penisilinler ve sefalosporinlerin çoğunu hidrolize eden, ancak sefamisinler ve karbapenemleri etkilemeyen enzimlerdir. GSBL'lerin çoğu Ambler Sınıf A'da yer alır ve β-laktamaz inhibitörleri (klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam)ve diazabisklooktanonlar (avibaktam) ile inhibe olur (1).

3.2 Klinik ve/veya epidemiyolojik önem

GSBL üreten suşlar, 1983'de ilk kez saptanmalarından itibaren geçen sürede tüm dünyada gözlenir olmuşlardır. Bu yayılım, klonal çoğalma, GSBL genlerinin plazmidler üzerinde aktarılmalrı ve nadiren de yeni enzimlerin ortaya çıkmasının bir sonucudur. GSBL'ler içerisinde en önemli grup, 2000li yılların başında ortaya çıkan CTX-M enzimleridir. Bu grubu, SHV ve TEM-türevi GSBL'ler izlemektedir (2-5).

GSBL üretimi en sık Enterobacteriaceae'de, önce hastane ortamında, sonralı bakım evlerinde ve 2000'li yıllardan itibaren de toplumda (poliklinik hastaları, sağlıklı taşıyıcılar, hasta ve sağlıklı hayvanlar, yiyecek ürünleri) izlenmektedir. GSBL üretiminin en sık saptandığı türler *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*'dir Ancak klinik açıdan önemli diğer Enterobacteriaceae de GSBL üretmektedir. GSBL prevalansı; tür, coğrafi bölge, hastane/servis, hasta özellikleri, enfeksiyon tipi gibi birçok faktörden etkilendiği için, çalışmadan çalışmaya değişmektedir (2,3,6,7). 2011 EARS-Net verilerine göre, 3. Kuşak sefalosporinlere duyarlı olmayan invazif *K.pneumoniae* hızları, Avrupa ülkelerinin çoğunda %25'den, hatta bir çoğunda %50'den yüksektir. KPC-tipi karbapenemaz üreten izolatların yüksek oranda olduğu İtalya ve Yunanistan hariç, bu izolatların çoğu yerel GSBL test sonuçlarına göre GSBL-pozitif olarak kabul edilmiştir (8).

3.3 Direnç mekanizması

GSBL'lerin çoğu akkiz (kazanılmış), plazmidlerce kodlanan enzimlerdir. Bu kazanılmış GSBL'ler hem değişik düzeylerde eksprese edilirler hem de spesifik β-laktam ajanlara (ör. Sefotaksim seftazidim, aztreonam) etki gibi biyokimyasal özellikleri açısından büyük farklar gösterirler. Bir

enzimin ekspresyon düzeyi, yapısal ve hidroliz özellikleri ile birlikte bulunan diğer direnç mekanizmaları (diğer β -laktamazlar, aktif pompa sistemleri, geçirgenlik değişimleri) GSBL üreten izolatlarda çok çeşitli direnç fenotipleri görülmesine neden olmaktadır (1-4,9-11).

3.4. Enterobacteriaceae üyelerinde GSBL saptanması için önerilen yöntemler

Birçok bölgede, GSBL saptanması ve enzimlerin tanımlanması özellikle enfeksiyon kontrolü açısından önerilmektedir. Enterobacteriaceae üyelerinde GSBL saptanması açısından önerilen strateji, öncelikle oksimino- sefalosporinlere “duyarlı olmama” özelliğinin saptanması ile başlamakta, bunu takiben fenotipik (bazen genotipik) doğrulama testleri uygulanmaktadır (Tablo 1, Şekil 1).

Sefotaksim, seftriakson, seftazdim ve sefpodoksim için EUCAST ve CLSI rehberleriyle uyumlu olarak, tarama sınır değerinin MİK $>1\text{mg/L}$ olması, önerilmektedir (Tablo 1) (12,13). Enterobacteriaceae için EUCAST’ın önerdiği klinik sınır değeri de $\leq 1\text{mg/L}$ ’dir (12). Sefpodoksim GSBL üretimin saptanması için en duyarlı indikatör sefalosporindir ve bu nedenle taramada kullanılabilir. Ancak, bu β -laktam ajanla alınan sonuçların özgüllüğü, sefotaksim (veya seftriakson) ile seftazidim kombinasyonu ile alınan sonuçlara kıyasla daha düşüktür. Bu nedenle de doğrulama amacıyla son iki bileşik kullanılmaktadır. İndikatör sefalosporinler için inhibisyon zonu çapları Tablo 1’de yer almaktadır.

Tablo 1 Enterobacteriaceae için GSBL tarama yöntemleri (13-19)

Yöntem	Antibiyotik	GSBL testi uygulanması için sınır değeri
Sıvı veya agar dilüsyon ¹	Sefotaksim/seftriakson VE seftazidim	MİK $> 1\text{mg/L}$
	Sefpodoksim	MİK $> 1\text{mg/L}$
Disk difüzyon ¹	Sefotaksim (5 μg) VEYA	İnhibisyon zonu $<21\text{ mm}$
	Seftriakson (30 μg)	İnhibisyon zonu $<23\text{ mm}$
	VE Seftazidim (10 μg)	İnhibisyon zonu $<22\text{ mm}$
	Sefpodoksim (10 μg)	İnhibisyon zonu $<21\text{ mm}$

¹ Tüm yöntemlerle i) sefotaksim veya seftriakson VE seftazidim; VEYA tek ajan olarak sefpodoksim test edilebilir.

3.4.1. Enterobacteriaceae üyelerinde GSBL tarama yöntemleri

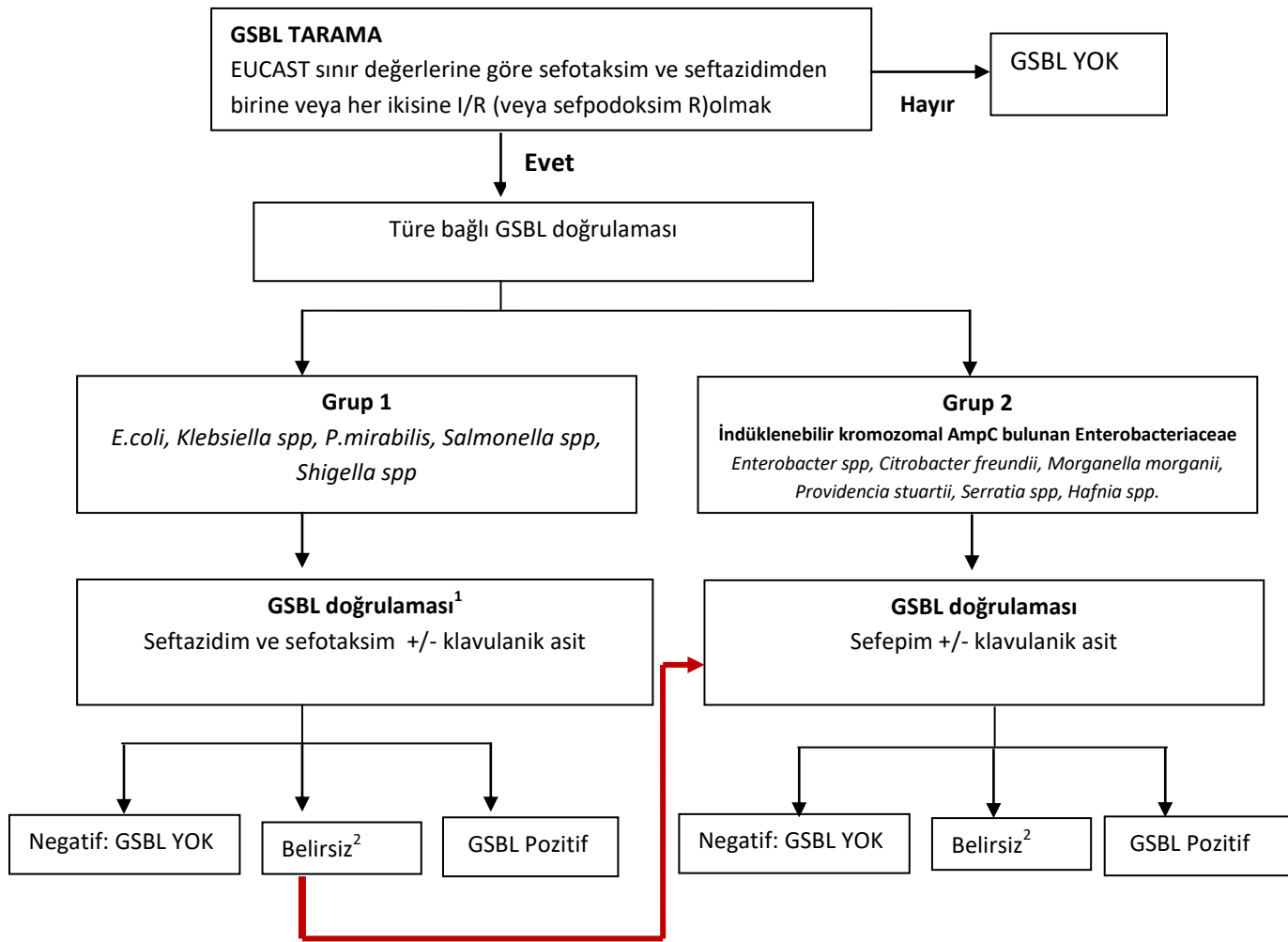
A- Grup 1 Enterobacteriaceae (*E.coli*, *Klebsiella spp*, *Raoultella spp*, *P. mirabilis*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*)’de Tarama

Grup 1 Enterobacteriaceae’de GSBL tarama için önerilen yöntemler sıvı dilüsyon, agar dilüsyon, disk difüzyon veya bir otomatize sistem kullanımıdır (13,20, 21). Sefotaksim (veya seftriakson)

ve seftazidim MİK değerleri farklı GSBL pozitif izolatlarda çok fazla değişkenlik gösterebildiği için, indikatör sefalosporinler olarak sefotaksim (veya seftraikson) ile seftazidimin her ikisinin birden kullanılması gereklidir (14,22,23).

Tarama testlerinde pozitif bulunan Grup 1 Enterobacteriaceae için fenotipik GSBL doğrulama yöntemleri ve ilgili akış şeması Tablo 2 ve Şekil 1’de yer almaktadır.

Şekil 1 GSBL’lerin fenotipik yöntemlerle saptanması için akış şeması



¹Eğer sefoksitin MIC> 8 mg/L ise, sefepim +/-klavulanik asit doğrulama testi yapınız

²Pozitif veya negatif olarak değerlendirilemeyen grup (ör. Kapsadığı MİK düzeylerinin üzerinde üreme olması nedeniyle, gradiyent striplerin okunamaması veya kombinasyon testleri ve ÇDS

ile açıkça sinerji görülmemesi), sefepim +/- klavulanik asit ile konfirmasyon testi sonucu da belirsiz ise, genotipik test gerekir.

B- Grup 2 Enterobacteriaceae’de (*Enterobacter spp*, *Serratia spp*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia*, *Hafnia alvei*) Tarama

Grup 2 Enterobacteriaceae için Grup 1 için belirtilen şekilde (Şekil 1 Tablo 3) tarama testleri yapılır (19). Ancak bu türlerde, dereprese kromozomal AmpC β -laktamaz üretimi sefalosporin direncine yol açan mekanizmalar arasında, çok sık görülmektedir.

3.4.2 Fenotipik doğrulama yöntemleri

GSBL aktivitesinin in vitro şartlarda klavulanik asit ile inhibisyonu temeline dayanan fenotipik yöntemlerden dördü GSBL doğrulaması için önerilmektedir. Bunlar; kombinasyon disk testi (KDT), çift disk sinerji testi (ÇDS), GSBL gradiyent strip testi ve sıvı mikrodilüsyon testidir (Tablo 2 ve 3) (20,21,24). Bu testlerden KDT, çok merkezli bir çalışma sonucuna göre, GSBL gradiyent testiyle eşit duyarlılığa sahip, ancak bu teste kıyasla göre daha özgüdür (25). Otomatize sistem üreticileri, duyarlılık test panellerine, GSBL’lerin klavulanik asit ile inhibisyonunu gösterecek şekilde, saptama testleri eklemişlerdir. Sonuçlar, suş koleksiyonuna ve kullanılan sisteme göre değişmektedir (17-19).

A. Kombinasyon Disk Testi (KDT)

Her test için sadece sefalosporin (sefotaksim, seftazidime, sefepim) içeren diskler ile aynı sefalosporinin klavulanik asit eklenmiş kombinasyon diskleri kullanılır. Her ikisinin inhibisyon zonları ölçülerek kıyaslanır. Eğer kombinasyon diski çevresindeki zon, tek başına sefalosporin içeren diskin inhibisyon zonuna kıyasla ≥ 5 mm daha genişse, test pozitifdir (Tablo 3) (26,27).

B. Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST)

Sefalosporin (sefotaksim, seftazidime, sefepim) içeren diskler, plakta klavulanik asit içeren bir diskin (örneğin amoksisilin-klavulanik asit) yanına konur. Sefalosporin disklerinden herhangi birinin zon çapı klavulanik asit diskine bakan yüzünde genişlerse, veya arada üremenin olmadığı bir “anahtar deliği” görülürse, test pozitif olarak değerlendirilir. Diskler arasındaki uzaklık, ÇDS testi başarısında belirleyicidir ve sefalosporin 30 μ g diskleri için optimal uzaklık 20 mm (merkezden merkeze) olarak belirlenmiştir. Ancak, çok yüksek veya düşük direnç düzeyleri söz konusu ise, bu uzaklık azaltılabilir (15 mm) veya arttırılabilir (30 mm) (20). Bu önerinin, EUCAST disk difüzyon yönteminde yer alan ve daha düşük ilaç konsantrasyonları içeren diskler için, tekrar gözden geçirilmesi gereklidir.

C. Gradyent test (şerit) yöntemi

Gradyent şeritleri, üretici önerilerine göre hazırlanır, değerlendirilir ve yorumlanır. Klavulanik asit ile kombine edildiğinde sefalosporin MİK değerinde ≥ 8 kat düşüş gözleniyorsa veya bir “ hayalet zon” (“phantom zone”) ya da elips şeklinde bir bozulma varsa (lütfen üretici önerilerindeki resimleri inceleyiniz), test pozitifdir (Tablo 3). MİK’in stripteki en yüksek değerden daha fazla olması nedeniyle MİK belirlenemiyor ve oran değerlendirilemiyorsa, test sonucu belirsizdir (“Indeterminate”). Diğer bütün durumlarda, test negatiftir. GSBL gradyent şeritleri sadece GSBL doğrulaması için kullanılmalıdır; MİK saptanması için güvenilir değildir.

D. Sıvı mikrodilüsyon

Sıvı mikrodilüsyon; sefotaksim, seftazidim ve sefepimin 0.125-512 mg/L arasındaki seri iki katlı dilüsyonlarını tek başlarına veya sabit konsantrasyonda (4mg/L) klavulanik asit ile birlikte içeren Mueller–Hinton sıvı besiyeri kullanılarak uygulanır. Klavulanik asit ile kombine edilen sefalosporin MİK değeri, sefalosporin tek başına olduğunda ölçülen MİK değerinden ≥ 8 kat daha düşükse test pozitifdir. Diğer durumlarda test negatiftir (43).

E. Biyokimyasal (kolorimetrik) yöntemler

İlk kez 2012 yılında tarif edilen GSBL NDP testinde, sefotaksim indikatör antimikrobiyal, tazobaktam ise inhibitör olarak kullanılmaktadır (28). Test 96- kuyucuklu mikrolaklarda veya tüplerde uygulanabilir. Kırmızıdan sarıya renk değişimi sonucun pozitif olduğunu gösterir. Test ayrıca doğrudan hasta örneklerinde de uygulanmaktadır (29). Duyarlılık ve özgüllüğünün mükemmel olduğu belirtilse de henüz çok merkezli çalışmalarla değerlendirilmemiştir.

B-LACTA testi, kromojenik bir sefalosporinin (HMRZ-86) substrat olarak kullanıldığı, gerek kolonilerde, gerekse doğrudan klinik örneklerde uygulanabilen kolorimetrik bir testtir (30). Belçika ve Fransadaki bir prospektif çok merkezli çalışma ile değerlendirilmiş ve *E.coli* ile *K.pneumoniae*’de duyarlılık ve özgüllüğü mükemmel bulunmuştur (sırası ile %96 ve %100). Buna karşın indüklenabilir AmpCsi olan türlerde duyarlılık daha düşüktür (%67). *E.coli* ve *K.pneumoniae* için negatif prediktif değerin yüksek olması (3. Kuşak sefalosporin direnç prevalansının %10-30 olduğu bölgelerde %99), bu basit testi, özellikle de GSBL üreten suşların 3. Kuşak sefalosporin direncini öngörmede son derece etkin bir test haline getirmektedir.

F. Yorumlama sırasında dikkate alınması gereken hususlar

Sefotaksimin indikatör sefalosporin olarak kullanıldığı GSBL doğrulama testlerinde, kromozomal K1 veya OXY- benzeri β -laktamazları aşırı üreten *Klebsiella oxytoca* izolatları

yalancı pozitif sonuç verebilir (31). Yine klavulanik asit ile inhibe olan kromozomal β -laktamazlar üreten *Proteus vulgaris*, *Citrobacter koseri*, *Kluyvera spp* ve *C.sedlakii*, *C. farmeri* ve *C.amaloniticus* gibi *C.koseri* ile ilişkili bazı türlerde de benzer bir fenotip ile kaşılaşılabılır (32,33). Yalancı pozitifliğin olası nedenlerinden bir başkası da SHV-1, TEM-1 veya OXA-1- benzeri geniş spektrumlu β -laktamazlarının aşırı üretimi ile beraber geçirgenliğin bozulduğu durumlardır (18). Sadece sefepimin kullanıldığı doğrulama testleri uygulandığında, K1 üreten *K.oxytoca* ile de yalancı pozitif sonuç görülebilir (34) .

Tablo 2. GSBL tarama testinde pozitif olan Enterobacteriaceae (Tablo 1'e bakınız) için GSBL doğrulama yöntemleri. Grup 1 Enterobacteriaceae (Şekil 1'e bakınız)

Yöntem	Antimikrobiyal ajan (disk içeriği)	GSBL doğrulama kriteri
GSBL gradiyent şerit (strip) testi	Sefotaksim +/-klavulanik asit	MİK oranı ≥ 8 veya elips şeklinde bozulma varsa
	Seftazidim +/-klavulanik asit	MİK oranı ≥ 8 veya elips şeklinde bozulma varsa
Kombinasyon disk difüzyon testi (KDT)	Sefotaksim (30 μ g) +/-klavulanik asit (10 μ g)	İnhibisyon zonunda ≥ 5 mm artış
	Seftazidim (30 μ g) +/-klavulanik asit (10 μ g)	İnhibisyon zonunda ≥ 5 mm artış
Sıvı mikrodilüsyon	Sefotaksim +/-klavulanik asit (4mg/L)	MİK oranı ≥ 8
	Seftazidim +/-klavulanik asit (4mg/L)	MİK oranı ≥ 8
	Sefepim +/-klavulanik asit (4mg/L)	MİK oranı ≥ 8
Çift disk sinerji testi (ÇDS)	Sefotaksim, seftazim, sefepim	İndikatör sefalosporin zonunun amoksisilin-klavulanik asit diskine doğru genişlemesi

Tablo 3. GSBL tarama testinde pozitif olan Enterobacteriaceae (Tablo 1'e bakınız) için GSBL doğrulama yöntemleri. Grup 2 Enterobacteriaceae (Şekil 1'e bakınız)

Yöntem	Antibiyotik	GSBL doğrulama kriteri
GSBL gradiyent şerit (strip) testi	Sefepim +/- klavulanik asit	MİK oranı ≥ 8 veya elips şeklinde bozulma varsa
Kombinasyon disk difüzyon testi (KDT)	Sefepim (30 µg) +/- klavulanik asit (10 µg)	İnhibisyon zonunda ≥ 5 mm artış
Sıvı mikrodilüsyon	Sefepim +/-klavulanik asit (4mg/L)	MİK oranı ≥ 8
Çift disk sinerji testi (ÇDS)	Sefotaksim, seftazim, sefepim	İndikatör sefalosporin zonunun amoksisilin-klavulanik asit diskine doğru genişlemesi

3.4.3 Sinerjiyi maskeleyen diğer β -laktamazların varlığında GSBL enzimlerinin fenotipik olarak saptanması

GSBL varlığını maskeleyen yüksek düzey AmpC üretimi olduğunda belirsiz (gradiyent şerit) veya yalancı negatif (KDT, ÇDS, gradiyent şerit ve mikrodilüsyon) test sonuçları alınabilir (20,34,35). Yüksek düzey AmpC üreten izolatlar, genellikle 3. Kuşak sefalosporinlere dirençlidir. Ayrıca sefamisin direnci (sefoksitin MİK > 8 mg/L) de AmpC β -laktamazların yüksek düzey ekspresyonu için bir göstergedir (34). Sadece ACC β -laktamaz varlığında sefamisin direnci görülmeyebilir (36).

Yüksek düzey Amp C varlığında GSBL saptanması için, AmpC tarafından genellikle parçalanmayan sefepimin indikatör sefalosporin olarak kullanıldığı, ek bir doğrulama testi yapılması, önerilmektedir. Sefepim, KDT, ÇDS, gradiyent şerit ve sıvı dilüsyon testlerinin tümünde kullanılabilir (27,37-39). Diğer yaklaşımlar arasında iyi bir AmpC inhibitörü olan kloksasilin kullanımı yer almaktadır. Bu amaçla, hem kloksasilin, hem de klavulanik asit eklenmiş indikatör sefalosporin (sefotaksim VE seftazidim) diskleri ile KDT uygulanır. Ayrıca agar içerisine kloksasilin eklenerek (200-250 mg/L) ÇDS veya standart KDT yapılabilir (19). Bunlar yanı sıra, klavulanik asit ve kloksasilin içeren diskler ticari olarak da bulunmaktadır, ancak henüz bunlarla çok merkezli değerlendirme çalışmaları yapılmamıştır.

GSBL'ler ayrıca MBL veya KPC ve/veya geçirgenlik ile ilgili defektlerin varlığında da maskelenebilir (40,41). OXA-48 ise normalde sefalosporinleri etkilemediği için, bu duruma yol açmaz. Bu durumda GSBL'lerin epidemiyolojik önemi sorgulanabilir çünkü karbapenemaz varlığı, halk sağlığı açısından daha önemlidir. Ancak yine de saptanmaları isteniyorsa moleküler yöntemler uygulanması önerilir.

3.4.4 Genotipik doğrulama

GSBL genlerinin genotipik olarak tanımlanması PZR ve GSBL gen dizi analizinden tüm genom analizine kadar farklı seçenekler bulunmaktadır (3). Bunlar yanı sıra, bir DNA mikroarray – temelli yöntem de kullanılabilir. Hem ticari, hem de ev-yapımı yöntemler bulunmasına karşın, yeterli ve sistematik olarak denenmedikleri için bu dokümanda yer almayacaktır. Bir başka EUCAST dokümanında ise tüm genom analizi yaklaşımları tarif edilmiştir (42).

3.4.5 Kalite Kontrolü

GSBL saptama testlerinin kalite kontrolü için uygun izolatlar Tablo-4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. GSBL saptama yöntemlerinin kalite kontrolü amacıyla kullanılan uygun suşlar

Suş	Mekanizma
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603	SHV 18 GSBL
<i>E.coli</i> CCUG 62975	CTX-M-1 grubu GSBL ve plazmid kökenli CMY Amp C
<i>E.coli</i> ATCC 25922	GSBL-negatif

3.5 Kaynaklar

1. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:211-1233.
2. Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8:557-584.
3. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:933-951.
4. Naas T, Poirel L, Nordmann P. 2008. Minor extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):45-52.
5. Canton R, Novais A, Valverde A, Machoda E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamases-producing Enterobacteria in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008;14 (Suppl1):144-153.
6. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowich I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:165-174.
7. Carattoli A. Animal reservoirs for extended-spectrum β -lactamase producers. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):117-123.
8. European Centres for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual report European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).
9. Gniadkowski M. 2008. Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):11-32.
10. Livermore DM. Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):3-10.

11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. EUCAST; 2013. Version 3.0 http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/(last accessed 23 December 2012).
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first informational Supplement M 100-S21. Wayne,PA,USA:CLSI;2011.
13. Hope R, Rotz NA, Warner M, Fagan EJ, Arnold E, Livermore DM. Efficacy of practised screening methods for detection of cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother.2007;59(1):110-3.
14. Oliver A, Weigel LM, Rasheed JK, McGowan Jr JE, Raney P, Tenover FC. Mechanism of decreased susceptibility to cefpodoxime in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:3829-36.
15. Garrec H, Drieux –Rouzet L, Golmard JL, Jarlier V, Robert J. Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended spectrum beta-lactamase production by Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol 2011; 49: 1048-57.
16. Leverstein-van Hall MA, Fluit AC, Paauw A, Box AT, Brisse S, Verhoef J. Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-spectrum β -lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. J Clin Microbiol.2002;40(10):3703-11.
17. Spanu T, Sanguinetti M, Tumbarello M, D’Inzeo T, Fiori B, Posteraro B, Santangelo R, Cauda R, Fadda G. Evaluation of the new Vitek 2 ESBL test for rapid detection of ESBL production in Enterobacteriaceae isolates. J Clin Microbiol 2006; 44:3257-62.
18. Thomson KS, Cornish NE, Hong SG, Hemrick K, Herdt C, Moland ES. Comparison of Phoenix and Vitek 2 ESBL detection tests for analysis of *E.coli* and *Klebsiella* isolates with well-characterized beta-lactamases. J Clin Microbiol 2007; 45: 2380-4.
19. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. Clin Microbiol Infect.2008;14 Suppl 1:90-103.
20. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005;18(4):657-86.
21. Biedenbach DJ, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Analysis of *Salmonella* spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). Diagn Microbiol Infect Dis. 2006;54(1):13-21.
22. Hirakata Y, Matsuda J, Miyazaki Y, Kamihira S, Kawakami S et al. Regional variation in the prevalence of extended-spectrum β -lactamase –producing clinical isolates in the Asia-Pacific region (SENTRY 1998-2002). Diagn Microbiol Infect Dis. 2005;52(4):323-9.
23. Jeong SH, Song W, Kim HS, Lee KM. Broth microdilution method to detect extended-spectrum β -lactamases and AmpC β -lactamases in Enterobacteriaceae isolates by use of clavulanic acid and boronic acid as inhibitors. J Clin Microbiol. 2009;47(11):3409-12.
24. Platteel TN, Cohen Stuart JW, de Neeling AJ, Vorts GM, Scharringa J et al. Multi-centre evaluation of a phenotypic extended spectrum β -lactamase detection guideline in the routine setting. Clin Microbiol Infect.2013;19(1):70-6.
25. M’Zali FH, Chanawong A, Kerr KG, Birkenhead D, Hawkey PM. Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the MAST DD test, the double disc and the Etest ESBL. J Antimicrob Chemother.2000;45(6):881-5.
26. Towne TG, Lewis JS 2nd, Herrera M, Wickes B, Jorgensen JH. Detection of SHV-type extended-spectrum β -lactamase in *Enterobacter* isolates. J Clin Microbiol.2010;48(1):298-9.
27. Stürenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs R, Mack D. Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum β -lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection. J Antimicrob Chemother.2004;54(1):134-8.
28. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Rapid detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing

- Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2012;50(9):3016-22.
29. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of ESBL-producing Enterobacteriaceae in blood cultures. Emerg Infect Dis. 2015;21(3):504-7
 30. Renvoise A, Decre D, Amarsy-Guerle R, Huang TD, Jost C, et al. Evaluation of the β -Lacta test, a rapid test detecting resistance to third-generation cephalosporins in clinical strains of Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2013;51(12):4012-7
 31. Nukaga M, Mayama K, Crichlow GV, Knox JR. Structure of an extended-spectrum class A β -lactamase from *Proteus vulgaris* K1. J Mol Biol. 2002;317(1):109-17.
 32. Petrella S, Renard M, Ziental-Gelus N, Clermont D, Jarlier V, Sougakoff W. Characterization of the chromosomal class A β -lactamase CKO from *Citrobacter koseri*. FEMS Microbiol Lett. 2006;254(2):285-92.
 33. Sturenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs R, Mack D. Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL EtestR to detect extended-spectrum β -lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection. J Antimicrob Chemother. 2004; 54:134-8.
 34. Jacoby GA. AmpC β -lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009;22(1):161-82.
 35. Munier GK, Johnson CL, Snyder JW, Moland ES, Hanson ND, Thomson KS. Positive extended-spectrum- β -lactamase (ESBL) screening results may be due to AmpC β -lactamases more often than to ESBLs. J Clin Microbiol. 2010;48(2):673-4.
 36. Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Sahly H, Ullmann U. A novel type of AmpC β -lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43(8):1924-31.
 37. Polsfuss S, Bloemberg GV, Giger J, Meyer V, Böttger EC, Hombach M. Evaluation of a diagnostic flow chart for detection and confirmation of extended spectrum β -lactamases (ESBL) in Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Infect. 2012;18(12):1194-204.
 38. Yang JL, Wang JT, Lauderdale TL, Chang SC. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacter cloacae* in Taiwan and comparison of 3 phenotypic confirmatory methods for detecting extended-spectrum beta-lactamase production. J Microbiol Immunol Infect. 2009;42(4):310-6.
 39. Jeong SH, Song W, Kim JS, Kim HS, Lee KM. Broth microdilution method to detect extended-spectrum beta-lactamases and AmpC beta-lactamases in enterobacteriaceae isolates by use of clavulanic acid and boronic acid as inhibitors. J Clin Microbiol. 2009;47(11):3409-12.
 40. Tsakris A, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Voulgari E, Pittaras T, Sofianou D, Pournaras S, Petropoulou D. Use of boronic acid disk tests to detect extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemase-possessing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2009;47(11):3420-6.
 41. March A, Aschbacher R, Dhanji H, Livermore DM, Böttcher A et al. Colonization of residents and staff of a long-term-care facility and adjacent acute-care hospital geriatric unit by multiresistant bacteria. Clin Microbiol Infect. 2010 Jul;16(7):934-44.
 42. Ellington MJ, Ekelund O, Aarestrup FM, et al. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. Clin Microbiol Infect. 2017;23(1):2-22.

4.Kazanılmış AmpC β -laktamaz- üreten Enterobacteriaceae

Direnç mekanizması saptanmasının önemi	
Antibiyotik duyarlılığının sınıflandırılması için gerekli	Hayır
Enfeksiyon kontrolü için	Evet
Halk sağlığı için	Evet

4.1 Tanım

Amp C-tipi sefalosporinazlar, Ambler sınıf C'de yer alan, penisilinleri, sefalosporinleri ve monobaktamları hidrolize eden β -laktamazlardır. Bu β -laktamazlar, 3. kuşak sefalosporinleri parçalarken, 4. Kuşak sefalosporinleri genellikle etkilemezler. Genel olarak, AmpC- tipi enzimler, klavulanik asit başta olmak üzere klasik GSBL inhibitörleri ile inhibe olmazlar (1).

4.2 Klinik ve/veya epidemiyolojik önemi

Kazanılmış (= plazmid kökenli) AmpC üreten ilk izolatlar 1980'lerin sonlarında saptanmıştır. O tarihten bu yana da, gerek klonal yayılım gerekse AmpC genlerinin aktarımı ile tüm dünyada gözlenir olmuştur. Hareketli AmpC genleri, doğada kromozomal olarak bulundukları türler göz önüne alınarak, aileler şeklinde sınıflandırılmaktadır. Buna göre *Enterobacter* grubu (MIR, ACT), *C. freundii* grubu (CMY-2-benzeri, LAT, CFE), *M. organii* grubu (DHA), *Hafnia alvei* grubu (ACC), *Aeromonas* grubu (CMY-1 benzeri, FOX, MOX) ve *Acinetobacter baumannii* grubu (ADC), olarak adlandırılırlar. İndüklenebilir DHA-benzeri β -laktamazlar ve başkalarının da ileri derecede yayılmış olmasına rağmen, bu enzimler arasında en sık görülen ve en yaygın olanı CMY-2-benzeri enzimlerdir (1).

Kazanılmış AmpC üreten başlıca türler, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *Salmonella enterica* ve *P.mirabilis*'dir. Bu enzimleri taşıyan izolatlar, hem hastanede yatan hem de toplumdan gelen hastalarda üretilmiştir. Ayrıca bu enzimler, çiftlik hayvanları ve yiyecek ürünlerinde (*E.coli* ve *Salmonella enterica*'da) de klasik GSBL'lerden daha önce bulunmuştur. Kazanılmış AmpC tipi enzimler yayılmalarına ve enterobakteri türlerin 3.kuşak sefalosporin direncini inceleyen çok merkezli çalışmalarda gösterilmelerine rağmen, genel sıklıkları GSBL'lere kıyasla çok düşüktür. Ancak, yerel olarak veya bazı özel epidemiyolojik alanlarda, bu enzimleri üreten mikroorganizmaların epidemiyolojik önemi artabilir (1-5).

4.2 Direnç mekanizması

Birçok Enterobacteriaceae ve diğer Gram negatif basiller doğal AmpC'ler üretmektedir. Bu üretim, her zaman düşük düzeyde (ör. *E.coli*, *Shigella spp.*) veya indüklenebilir özellikte

(ör. *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *M. morganii*, *P. aeruginosa*) olabilmektedir. Doğal AmpC'lerin derepresyonu ya da aşırı üretimi, çeşitli genetik değişimlere bağlıdır ve sefalosporinler ile penisilin/ β -laktamaz inhibitörlerine karşı yüksek düzey direnç gelişmesine neden olur. Sınıf C sefalosporinazlarda özellikle Enterobacteriaceae üyelerinde, plazmid kökenli kazanılmış enzimler olarak karşımıza çıkabilir. Az sayıdaki bazı indüklenebilir tip (ör. DHA) dışında, kazanılmış AmpC sürekli olarak yüksek miktarlarda yapılır ve bunun sonucunda dereprese veya aşırı üretim yapan mutantlardaki ile aynı direnç profiline yol açar. Direnç düzeyleri eksprese edilen enzim miktarları yanı sıra, birlikte diğer direnç mekanizmalarının bulunmasına bağlıdır. GSBL'lere benzer şekilde, kazanılmış AmpC'ler genellikle plazmidlerle taşınan genler tarafından kodlanır (1-3).

4.3 Enterobacteriaceae türlerinde kazanılmış AmpC'lerin saptanması için önerilen yöntemler

Sefoksitin MİK değerinin > 8 mg/L olması (zon çapı <19 mm) ve bununla birlikte, seftazidim ve/veya sefotaksim MİK değerinin de > 1 mg/L olması (veya zon çapının dirençli sınırdaki bulunması), AmpC üretiminin araştırılması için bir fenotipik kriter olarak kullanılabilir. Ancak bu yöntem ile, sefoksitini parçalamayan bir plazmid kökenli β -laktamaz olan ACC-1, saptanmaz (6). Bunun yanı sıra, porin kaybının da sefoksitin direncine yol açabileceği unutulmamalıdır (1).

Fenotipik AmpC doğrulama testleri, genel olarak AmpC tipi enzimlerin kloksasilin veya boronik asit türevleri ile inhibisyonuna dayanmaktadır. Ancak boronik asit türevleri aynı zamanda sınıf A karbapenemazları ve *K. oxytoca*'daki K1 gibi bazı grup A penisilinazları da inhibe etmektedir. Bu yöntemleri inceleyen çalışmalar az sayıda olmakla birlikte, oldukça doğru tanımlama yapan yöntemler bildirilmiştir (8-10). Bunlardan başka, Mast AmpC Detection Disc Set (duyarlılık %96-100, özgüllük %98-100) (11, 12), AmpC gradiyent strip test (bioMérieux için duyarlılık %84-93, özgüllük %70-100) (12,13) ve sefotaksim/kloksasilin ile seftazidim/kloksasilin içeren Rosco tabletleri (duyarlılık %96, özgüllük %92) gibi ticari testler de bulunmaktadır (7,14). AmpC doğrulama testleri ile, *E. coli* 'de kazanılmış AmpC ve kromozomal AmpC'nin sürekli olarak aşırı yapımı ayırt edilemez.

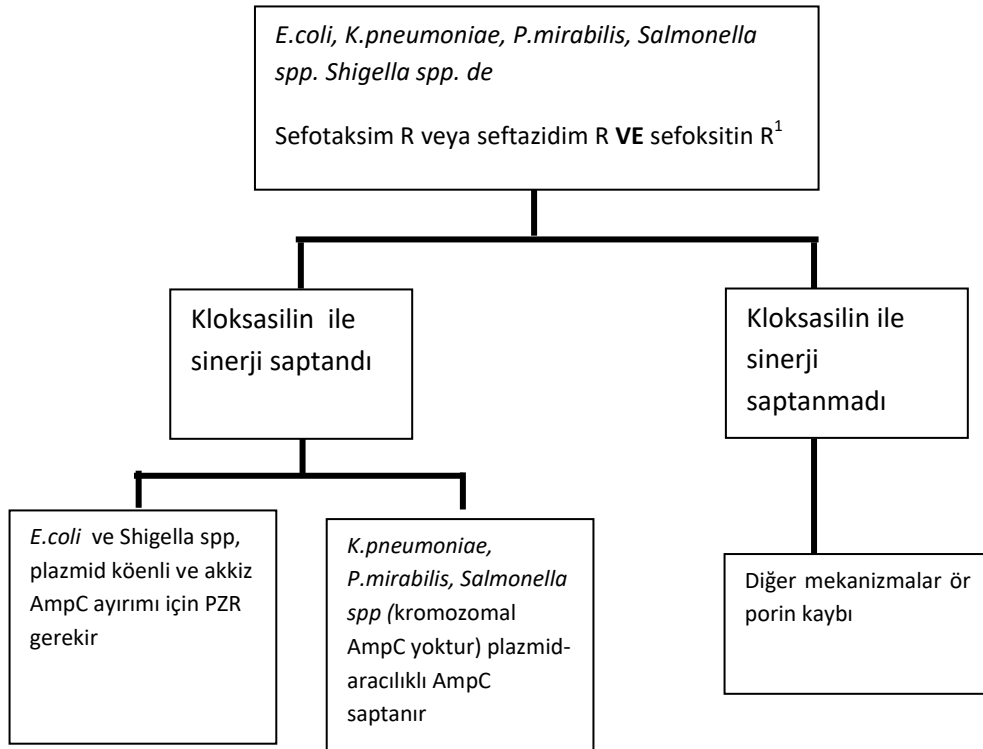
Kazanılmış AmpC varlığı ayrıca PZR tabanlı testlerle (15,16) veya bir mikroarray testi ile (17) doğrulanabilir.

Aşağıda genotipik ve fenotipik deneylerde olası kontrol suşu olarak kullanılabilecek bazı suşlar listelenmiştir. Ticari yöntem kullanıcıları, firma önerilerini dikkate almalıdır.

Tablo 1. AmpC saptanması için kullanılabilecek Kalite Kontrol suşu örnekleri

Suş	Mekanizma
<i>E.coli</i> CCUG 58543	Kazanılmış CMY-2 AmpC
<i>E.coli</i> CCUG 62975	Kazanılmış CMY AmpC ve CTX-M-1
<i>K.pneumoniae</i> CCUG58545	Kazanılmış DHA
<i>E.coli</i> ATCC 25922	AmpC ve GSBL negatif

Şekil 1. AmpC saptanması için akış şeması



¹Sefoksitin –R- burada sokak suşu (Wild type) olmayan (MİK>8 mg/L veya zon çapı <19 mm) izolat şeklinde tanımlanmaktadır. Sefoksitine dirençli izolatları yerine, seftoksime ve seftazidime duyarlı olmayan izolatların araştırılması, duyarlılığı yüksek ancak özgüllüğü düşük bir yaklaşımdır (7). Sefoksitini test etmeyen laboratuvarlarda seftoksime ve/veya seftazidime direnç, seftoksime duyarlılık ile birleştğinde, çok özgül olmamakla birlikte Amp C için bir başka belirteç olarak kullanılabilir.

4.5 Kaynaklar

1. Jacoby GA. AmpC β -lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009;22:161-82

2. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:1-11
3. Beceiro A, Bou G. Class C β -lactamases: an increasing problem worldwide. *Rev Med Microbiol.* 2004;15:141-152
4. Empel J, Hrabak J, Kozińska A, Bergerova T, Urbašková P, Kern-Zdanowicz I, Gniadkowski M. DHA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in the Czech Republic. *Microb Drug Resist.* 2010;16:291-295
5. D'Andrea MM, Literacka E, Zioga A, Giani T, Baraniak A, Fiett J, Sadowy E, Tassios PT, Rossolini GM, Gniadkowski M, Miriagou V. Evolution of a multi-drug-resistant *Proteus mirabilis* clone with chromosomal AmpC-type cephalosporinases spreading in Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:2735-2742
6. Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Sahly H, Ullmann U. A novel type of AmpC β -lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:1924-31.
7. Edquist P, Ringman M, Liljequist BO, Wisell KT, Giske CG. Phenotypic detection of plasmid-acquired AmpC in *Escherichia coli* - evaluation of screening criteria and performance of two commercial methods for the phenotypic confirmation of AmpC production. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013; 32:1205-10
8. Yagi T, Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K et al. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2551-8.
9. Tenover FC, Emery SL, Spiegel CA, Bradford PA, Eells S et al. Identification of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Proteus* spp. can potentially improve reporting of cephalosporin susceptibility testing results. *J Clin Microbiol.* 2009;47:294-9.
10. Tan TY, Ng LS, He J, Koh TH, Hsu LY. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:146-9
11. Martinez-Martinez L. Extended-spectrum β -lactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14 Suppl 1:82-9.
12. Halstead FD, Vanstone GL, Balakrishnan I. An evaluation of the Mast D69C AmpC Detection Disc Set for the detection of inducible and derepressed AmpC β -lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:2303-4.
13. Ingram PR, Inglis TJ, Vanzetti TR, Henderson BA, Harnett GB, Murray RJ. Comparison of methods for AmpC β -lactamase detection in Enterobacteriaceae. *J Med Microbiol.* 2011; 60(Pt 6):715-21.
14. Peter-Getzlaff S, Polsfuss S, Poledica M, Hombach M, Giger J et al. Detection of AmpC β -lactamase in *Escherichia coli*: comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. *J Clin Microbiol.* 2011;49:2924-32.
15. Hansen F, Hammerum AM, Skov RL, Giske CG, Sundsfjord A, Samuelsen O. Evaluation of ROSCO Neo-Sensitabs for phenotypic detection and subgrouping of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *APMIS.* 2012;120:724-32.
16. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2153-62.
17. Brolund A, Wisell KT, Edquist PJ, Elfstrom L, Walder M, Giske CG. Development of a real-time SYBRGreen PCR. *J Microbiol Methods.* 2010; 82:229-33.
18. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum β -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:1865-9.

5. Gram-negatif basillerde polimiksin direnci

Direnç mekanizması saptanmasının önemi	
Antibiyotik duyarlılığının sınıflandırılması için gereklidir	Evet
Enfeksiyon kontrolü için	Evet
Halk sağlığı için	Evet

Enterobacteriaceae üyelerinde kazanılmış polimiksin direnci son yıllarda tüm dünyada görülmektedir. Hayvanlar, hayvansal gıdalar ve insanlarda plazmid-aracılıklı direncin ortaya çıkması, yayılım potansiyeli nedeniyle özellikle endişe vericidir.

Daha önceleri polimiksin direncinin sadece kromozomal olduğu ve genellikle lipid A biyosentezini (ve dolayısıyla da LPS elektriksel yükünü) düzenleyen çeşitli genlerdeki mutasyonlardan kaynaklandığı bildirilmiş (1,2) olmasına rağmen, 2015 yılında, Lipid A'ya fosfoetanolamin grubu ekleyen ve plazmid tarafından kodlanan fosfoetanolamin transferaz enzimine bağlı plazmid kökenli kolistin direnci ilk kez bildirilmiştir (1). Fosfoetanolamin eklenmesi, LPS'nin net negatif yükünde azalmaya ve dolayısıyla da pozitif yüklü polimiksinlerle bağlanma kapasitesinde düşmeye yol açmaktadır. Bu yeni direnç mekanizması MCR-1 olarak adlandırılmıştır (3). İlk bildiri takiben bu yeni direnç mekanizmasının tüm kıtalarda bulunduğu gösterilmiştir. 1980'lerde izole edilmiş bir izolatta da bulunmasına rağmen bu mekanizma özellikle son 5 yıl içinde tüm dünyaya yayılmış gibi gözükmektedir (4). 2016 yılı içerisinde de bu enzimin, MCR1.2 ve MCR-2 olarak adlandırılan iki yeni varyantı bildirilmiştir (5,6) (Çevirmenin notu: Bu belge Türkçeye çevrilirken, MCR sayısı beşe, MCR-1 enziminin varyant sayısı ise 8'e (MCR-1.2-1.8) ulaşmıştı).

Avrupa'da invazif *K.pneumoniae* izolatlarının %8.6'sı kolistine dirençli iken, karbapenem dirençli izolatlar arasında bu oran %29'a ulaşmaktadır (7). Ülkeler arasında bu açıdan büyük farklar bulunabildiği ve yöntem ile ilgili sorunların da bu sayıları etkilediği göz önünde tutulmalıdır. Direncin çoğunun kromozomal mekanizmalardan kaynaklandığı düşünülmekle beraber, karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae'de MCR-1 varlığı ile ilgili de birçok ayın bulunmaktadır (4)

Günümüzde sıvı mikrodilüsyon ile belirlenen MİK dışında, direncin gösterilebildiği başka bir denenmiş ve güvenilir fenotipik yöntem bulunmamaktadır (gradiyent şerit ve disk difüzyon bu antibiyotik sınıfı için güvenilir değildir). Yakın zamanda MCR enzimlerinin hidroliz için çinkoya bağımlı olduğu saptanmıştır (8). Dolayısıyla, bu enzimler de diğer MBL'lerde olduğu gibi çinko iyonlarının şelatörlerle bağlanması ile inhibe olabilecekleri için, EDTA ve dipikolinik asit temelli inhibisyon testlerinin geliştirilmesi beklenmektedir. Ancak günümüzde araştırmaların odak

noktası, polimiksin direncinin mekanizmaya bağlı olmaksızın doğru olarak saptanmasıdır. Laboratuvarların kolistin duyarlılığına bakmak için her zaman mikrodilüsyon testi ve yine her zaman kolistin sülfat kullanması önerilmektedir. (9). Özellikle disk difüzyon ve gradient şerit yöntemleri, çok büyük ve büyük hatalara yol açtıkları için kullanılmamalıdır (10) . Son olarak, kolorimetrik bir yöntem de geliştirilmiştir, ancak tekrarlanabilirlik açısından birden fazla merkezde değerlendirilmemiştir (11). Eğer direnç mekanizması üzerinde çalışılacaksa, moleküler yöntemler kullanılmalıdır. Günümüzde bu yöntemlerin sadece kolistin dirençli izolatlarda uygulanması önerilmektedir.

Kalite kontrolü hem kolistin duyarlı (*E.coli* ATCC 25922 veya *Pseudomonas aeruginosa* 27853) hem de kolistin dirençli *E.coli* NCTC 13846 (*mcr-1* pozitif) suşları kullanılarak yapılmalıdır. *E.coli* NCTC 13846 için kolistin hedef MİK değeri 4 mg/L olup nadiren 2 veya 8 mg/L bulunmalıdır

5.1 Kaynaklar

1. Giske CG. Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomycin, mecillinam and nitrofurantoin. Clin Microbiol Infect. 2015;21(10):899-905
2. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. Front Microbiol. 2014; 5:643.
3. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016 ;16(2):161-8.
4. Skov RL, Monnet DL. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. Euro Surveill. 2016;21(9).
5. Di Pilato V, Arena F, Tascini C, Cannatelli A, Henrici De Angelis L, et al. *mcr-1.2*, a New *mcr* Variant Carried on a Transferable Plasmid from a Colistin-Resistant KPC Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain of Sequence Type 512. Antimicrob Agents Chemother. 2016; 60:5612-5.
6. Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. Euro Surveill. 2016; 21(27).
7. European Centres for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)
8. Hinchliffe P, Yang QE, Portal E, Young T, Li H, et al. Insights into the Mechanistic Basis of Plasmid-Mediated Colistin Resistance from Crystal Structures of the Catalytic Domain of MCR-1. Sci Rep. 2017;7:39392.
9. Bergen PJ, Li J, Rayner CR, Nation RL. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(6):1953-8.
10. Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, Hadjichristodoulou C, Gennimata V, Pournaras S, Tsakris A. Comparative evaluation of colistin susceptibility testing methods among carbapenem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Aug;59(8):4625-30.
11. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. 2016;22(6): 1038-43.

6. Karbapenemaz üreten *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter*

Direnç mekanizması saptanmasının önemi	
Antibiyotik duyarlılık sınıflaması için gereklidir	Hayır
Enfeksiyon kontrolü için	Evet
Halk sağlığı için	Evet

Karbapenemaz üreten *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* grubu bakteriler, Avrupa'nın birçok bölgesinde sık olarak görülmektedir (1). *P.aeruginosa*'da VIM özellikle VIM-2 Avrupa'da en sık üretilen enzimdir. Ancak Güney Amerika ülkelerinde KPC üreten izolatlar da bildirilmiştir (2). *Acinetobacter*'de ise, başta OXA-23, OXA 24/40-, OXA-58-, OXA-143-OXA-25- benzeri enzimler olmak üzere, OXA karbapenemazlar en sık saptanmaktadır (3).

Halen sınıf D OXA-karbapenemazlar için spesifik bir inhibitör veya bu enzimleri *Acinetobacter* türlerinde saptama/tanımlama açısından tatmin edici sonuç veren fenotipik bir test bulunmamaktadır. Kolorimetrik yöntemler denenmiş, ancak genel olarak bu cinste yeterli doğrulukta bulunmamıştır (4). *Acinetobacter*, ayrıca, metallo-beta laktamaz (MBL) sınıfından karbapenemaz üretebilir ve günümüzdeki yöntemler bu enzim grubunu daha başarılı bir şekilde saptayabilir.

P.aeruginosa için MBL Etest yanısıra disk tabanlı testler, uzun yıllardır kullanılmakta olmalarına rağmen, özgüllüklerinin düşük olması kullanımlarını kısıtlamaktadır (5-7). Birçok araştırmacı, saptama için kombinasyon disk yönteminin (imipenem veya meropenem ve sınıf B inhibitörleri EDTA, DPA gibi)çeşitli modifikasyonlarını önermişse de, bunlar genellikle tek merkezde geliştirilmiş ve valide edilmiş olup, başka merkezlerde tekrarlanabilirlikleri kesin değildir (8,9). Kolorimetrik yöntemler, *Acinetobacter*'e kıyasla *P.aeruginosa*'da daha iyi çalışmaktadır. Bu testler olasılıkla günümüzde özgüllüğü en iyi olan testlerdir. Ancak, moleküler doğrulama olmadan hiçbir test tek başına kullanılabilecek kadar özgül değildir.

Genel olarak karbapenemaz yapan *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter* tanımlanması için genotipik yaklaşımlar gerekliyse de, özellikle *P.aeruginosa* için yukarıda bahsedilen fenotipik testlerin bazıları ilk değerlendirme için yararlı olabilir.

P.aeruginosa'da karbapenem direnci değişik kromozomal mekanizmalara da bağlı olabildiğinden (aktifpompa, porin değişimi veya kaybı) yapılan karbapenemaz testleri klinik açıdan bu türde daha yararlıdır. Buna karşın *Acinetobacter*'de karbapenem direnci hemen daima OXA-karbapenemaz üretimine bağlıdır.

Önerilen bazı kontrol suşları *P.aeruginosa* NCTC 13437 (VIM-10 üreticisi), ve *A.baumannii* NCTC 13301 (OXA-23 üreticisi)'dir. Ancak bu suşlar için duyarlılık sınıfları/hedefleri bulunmamaktadır.

6.1 Kaynaklar

1. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. Int J Antimicrob Agents. 2010;36 Suppl 3:S8-14.
2. Labarca JA, Salles MJ, Seas C, Guzman-Bianco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. Crit Rev Microbiol. 2016; 42:276-92.
3. Higgins PG, Pérez-Llarena FJ, Zander E, Fernández A, Bou G, Seifert H. OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(5):2121-6
4. Noël A, Huang TD, Berhin C, Hoebeke M, Bouchahrouf W, Yunus S, Bogaerts P, Glupczynski Y. Comparative Evaluation of Four Phenotypic Tests for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria. J Clin Microbiol. 2017;55(2):510-518.
5. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2003; 41, 4623-4629
6. Hansen F, Hammerum AM, Skov R, Haldorsen B, Sundsfjord A, Samuelsen O. Evaluation of the total MBL confirm kit (ROSCO) for detection of metallo- β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;79(4):486-8
7. Samuelsen O, Buarp L, Giske CG, Simonsen GS, Aasnaes B, Sundsfjord A. Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country. J Antimicrob Chemother. 2008;61(4):827-30
8. Fournier D, Gamier P, Jeannot K, Mille A, Gomez AS, Plésiat P. A convenient method to screen for carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol. 2013;51(11):3846-8.
9. Heinrichs A, Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y. Evaluation of several phenotypic methods for the detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015;34(7): 1467-74.
10. Kabir MH, Meunier D, Hopkins KL, Giske CG, Woodford N. A two-centre evaluation of RAPIDEC® CARBA NP for carbapenemase detection in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. J Antimicrob Chemother.2016;71(5):1213-

7. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Direncin saptanmasının önemi	
Antibiyotik duyarlılığının sınıflandırılması için gerekli	Evet
Enfeksiyon kontrolü açısından	Evet
Halk sağlığı açısından	Evet

7.1 Tanım

β -laktam antibiyotiklerin düşük afinite gösterdiği yardımcı penisilin bağlayan proteinleri (*mecA* veya *mecC* genlerinin kodladığı PBP2a/PBP2c) olan *S.aureus* izolatları. Sadece anti MRSA aktivitesi olan sefalosporinler (seftarolin ve seftobiprol) etkilenmez.

7.2 Klinik ve/veya epidemiyolojik önemi

Metisiline dirençli *S.aureus*, tüm dünyada önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir (1,2). MRSA dolaşım yolu enfeksiyonlarının mortalitesi, gecikmiş tedavi veya yetersiz alternatif tedavi uygulanan, metisiline duyarlı izolatlar ile oluşan benzer enfeksiyonlardakinin iki katıdır (3). MRSA enfeksiyonları dünyanın bir çok yerinde hem hastane hem de toplumda endemiktir.

7.3 Direnç mekanizmaları

Direncin esas mekanizması yardımcı bir penisilin bağlayan protein olan PBP2a/PBP2c' nin sentezlenmesidir. Bu protein, izolatın "anti MRSA sefalosporinler" olarak tanımlanan yeni grup sefalosporinler dışında tüm β -laktamlara direnç kazanmasını sağlar. Bu grup antibiyotiklerin MRSA'ya karşı etkili olabilmesi için PBP2a'ya ve büyük olasılıkla *mecC*'nin kodladığı PBP'ye yüksek afinitesi vardır (4). Yardımcı PBP'ler *mecA* geni veya yakın zamanda tanımlanan *mecC* geni tarafından kodlanmaktadır (5). *mec* elementi *S.aureus*'a yabancıdır ve metisiline duyarlı *S.aureus*'da bulunmaz. *mecA* genini heterojen olarak ifade eden ve oksasilin MİK'inin çoğunlukla düşük olduğu izolatlar duyarlılık testlerinin doğruluğunu etkilemektedir (5). Bazı izolatlar oksasiline düşük düzeyde direnç gösterir ancak *mecA* veya *mecC* negatiftir ve alternatif PBP üretmemektedir [(borderline duyarlı *S.aureus* (BORSA)]. Bu izolatlar oldukça enderdir ve direnç mekanizması çok iyi tanımlanmamıştır; buna karşın β -laktamazların aşırı üretimi veya var olan PBP'lerde değişiklik olmasına bağlı olabilir (6).

Dünyanın farklı bölgelerinde *mecA*'nın inaktivasyonuna bağlı olarak sefoksitin ve oksasiline duyarlı olan *mecA* pozitif *S.aureus* izolatları (OS-MRSA) tanımlanmıştır. Bu suşlar oksasiline duyarlı olup

sefoksitine dirençli olan heterojen dirençli MRSA'lerden değişiktir (7, 8). Konvansiyonel fenotipik sonuçlar ve *mecA* için pozitif olan PCR sonuçlarına göre böyle izolatların sıklığının yaklaşık %3 olduğu tahmin edilmektedir. Bir olguda uzamış tedavi sırasında metisiline duyarlılıktan dirençli hale geçiş gösterilmiştir (9), ancak başka olgularda da olabileceği düşünülmektedir ve dönüşebilen tipteki bu direncin sıklığı henüz bilinmemektedir. Bu izolatlar sadece moleküler testler ile saptanabilir. Belirtilmelidir ki bu, tüm suşlarda moleküler analiz yapılmasını gerekli kılmaz, sadece tedavide başarı sağlanamayan durumlarda bu fenomen önemli olabilir. Eğer rastgele teslerde veya tedavide başarısızlık nedeniyle yapılan tarama testi sonucu *mecA* geni saptandıysa izolat her zaman dirençli olarak bildirilmelidir.

7.4 *S.aureus*' da metisilin direncini saptamada önerilen yöntemler

Metisilin/oksasilin direnci MİK belirlenerek ve disk difüzyonla saptanabilir. Aglütinasyon PBP2a 'yı saptamada kullanılabilir ancak PBP2c' yi doğru olarak saptamayabilir. PCR ile genetik saptama güvenilir bir yöntemdir.

7.4.1 MİK veya disk difüzyon ile saptama

Direncin heterojen ifadesi özellikle oksasilin MİK'lerini etkileyerek duyarlı görünmesine neden olabilir. Sefoksitin heterojen direnç de dahil, *mecA/mecC*'ye bağlı metisilin direncinin çok duyarlı ve özgül bir göstergesidir ve seçilmesi gereken ilaçtır. Oksasilin ile disk difüzyon önerilmemektedir ve *mecA* varlığıyla iyi korelasyon göstermediği için EUCAST sınır değer tablosunda zon çapı yorumlama sınırları artık yer almamaktadır.

A. Sıvı mikrodilüsyon

Standart yöntem (ISO 20776-1) kullanılır ve sefoksitin MİK'leri >4mg/L olan suşlar metisiline dirençli olarak bildirilir.

B. Disk difüzyon

EUCAST disk difüzyon yöntemi kullanılır. Sefoksitin (30 µg disk) zon çapı <22mm olan suşlar metisiline dirençli olarak bildirilir.

7.4.2 Genotipik ve latex aglütinasyon yöntemleri ile saptama

mecA ve *mecC* genlerinin PCR ile genotipik olarak (10, 11), PBP2a proteininin latex aglütinasyon kiti ile saptanması ticari veya ev yapımı testler ile olanaklıdır. PBP2c ticari testlerin çoğunda saptanamamaktadır.

7.4.3 Kontrol suşları

Aşağıda fenotipik ve genotipik testler için bazı kontrol suşları verilmektedir. Bu suşlar için kalite kontrol aralıkları bulunmamaktadır. Ticari yöntem kullanıcıları hangi kontrol suşlarının kullanılacağına ilişkin paket içindeki açıklamayı okumalıdır.

Tablo 1. MRSA testleri için bazı kontrol suş örnekleri

Suş	Mekanizma
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	Metisiline duyarlı
<i>S.aureus</i> NCTC 12493	Metisiline dirençli (<i>mecA</i>)
<i>S.aureus</i> NCTC 13552	Metisiline dirençli (<i>mecC</i>)

7.5 Kaynaklar

1. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a metaanalysis. Clin Infect Dis. 2003; 36:53-9.
2. de Kraker ME, Wolkewitz M, Davey PG, Koller W, Berger J, et al. Clinical impact of antimicrobial resistance in European hospitals: excess mortality and length of hospital stay related to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:1598-605.
3. de Kraker ME, Davey PG, Grundmann H; BURDEN study group. Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe. PLoS Med. 2011;8(10):e1001104.
4. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol. 2009;7:629-41.
5. Garcia-Alvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis. 2011;11:595-603
6. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 1997;10:781-91.
7. Hososaka Y, Hanaki H, Endo H, et al. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. J Infect Chemother 2007; 13:79–86.
8. Andrade-Figueiredo M, Leal-Balbino TC. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. BMC Microbiol. 2016; 16:115

9. Proulx MK, Palace SG, Gandra S, Torres B, Weir S, Stiles T, Ellison RT 3rd, Goguen JD. Reversion From Methicillin Susceptibility to Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* During Treatment of Bacteremia. J Infect Dis. 2016; 213:1041-8.
10. Stegger M, Andersen PS, Kearns A, Pichon B, Holmes MA, Edwards G, Laurent F, Teale C, Skov R, Larsen AR. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecALGA251*. Clin Microbiol Infect. 2012; 4:395-400.
11. Pichon B, Hill R, Laurent F, Larsen AR, Skov RL, Holmes M, Edwards GF, Teale C, Kearns AM. Development of a real-time quadruplex PCR assay for simultaneous detection of *nuc*, Panton-Valentine leucocidin (PVL), *mecA* and homologue *mecALGA251*. J Antimicrob Chemother. 2012; 67:2338-41.

8. Vankomisine dirençli *Staphylococcus aureus*

Direncin saptanmasının önemi	
Antibiyotik duyarlılığının sınıflandırılması için gerekli	Evet
Enfeksiyon kontrolü açısından	Evet
Halk sağlığı açısından	Evet

8.1 Tanım

S.aureus'da vankomisine direnç için EUCAST MİK sınır değeri $>2\text{mg/L}$ dir. Son yıllarda vankomisin sınır değerleri düşürülmüş ve "orta" grubu kaldırılmıştır. Buna karşın, Van-A kökenli yüksek düzeyde vankomisin dirençli *S.aureus* (VRSA) ile VanA içermeyen düşük düzey dirençli izolatlar arasında önemli değişiklikler vardır. Bu nedenle, vankomisine düşük düzeyde direnç gösterip non-Van A olan izolatlar için vankomisin intermediate (orta) dirençli *S.aureus* (VISA) ve heterodirençli vankomisin orta dirençli *S.aureus* (hVISA) tanımları kalmıştır. Ağır bir *S.aureus* enfeksiyonu geçirmekte olan hastada vankomisin tedavisi uygulandığında mutlaka MİK belirlenmelidir. Belirli olgularda, örneğin, tedavi başarısızlığı şüphesinde hVISA için test yapılması önerilir. hVISA'nın doğrulanması karmaşık bir işlem olduğundan antibiyotik sürveyansı VISA ve VRSA saptanmasına odaklıdır.

VRSA: Vankomisine dirençli *S.aureus*

Vankomisine yüksek düzeyde (MİK $>8\text{mg/L}$) direnç gösteren *S.aureus* izolatları

VISA: Vankomisine orta dirençli *S.aureus*

Vankomisine düşük düzeyde (MİK $4-8\text{mg/L}$) direnç gösteren *S.aureus* izolatları

hVISA: Vankomisine heterojen düşük-düzeyde dirençli *S.aureus*

Vankomisine duyarlı olan (MİK $\leq 2\text{mg/L}$) *S.aureus* toplumunda az sayıda (10^6 hücrede 1) vankomisin MİK'i $>2\text{mg/L}$ olan izolat bulunması; popülasyon analizi profili (PAP) araştırması ile saptanır.

Bu terimlerin olmasına karşın yukarıdaki tüm kategorilerin klinik olarak dirençli kabul edilmesi gerekir.

8.2 Klinik ve/veya epidemiyolojik önemi

Avrupa'da glikopeptidlere azalmış duyarlılık gösteren izolatların sıklığına ilişkin son yıllarda yapılmış araştırma yoktur. Tek merkezlerden alınan bildirimlere göre Avrupa'da MRSA içinde hVISA'nın sıklığının $\leq 2\%$ olduğu, VISA'nın 0.1% in altında olduğu tahmin edilmektedir (1). Avrupa'da henüz VRSA bildirilmemiştir (1) ve dünyada da çok nadirdir (2). hVISA'nın sıklığı bölgesel olarak yüksek olabilir (1) ve çoğunlukla belirli klonal tiplerin yayılımıyla ilişkilidir (2). MİK'leri yükselmiş (VISA) veya dirençli alt popülasyon içeren (hVISA) lerin çoğu MRSA'dır.

hVISA'nın klinik öneminin saptanması güçtür çünkü iyi kontrollü prospektif çalışma yapılmamıştır. Buna karşın, en az iki ağır enfeksiyonda hVISA varlığının tedavi başarısını azalttığı düşünülmüştür (2, 3). Bu nedenle, tedaviye yanıt vermeyen kan dolaşımı enfeksiyonlarında hVISA varlığının araştırılması uygun olur. Son zamanlarda sokak tipi aralığın üst bölümünde (MİK $>1\text{mg/L}$) MİK'lere sahip izolatların tedavide başarısızlıkla ilişkili olduğu ve en azından kan dolaşımı enfeksiyonlarında mortalitenin artmasına yol açabileceklerine ilişkin kanıtlar artmıştır (3-8). Bu gözlemlerin olası nedeni kesin olmamakla beraber vankomisin tedavisi dozlarının yetersiz olmasıyla ilgili olabilir (9, 10). Ayrıca, bu bulguların yorumu farklı test yöntemleri uygulanarak belirlenen MİK'lerin farklı olması nedeniyle güçleşmektedir (8, 9).

hVISA'nın mekanizması karmaşıktır ve saptanması PAP analizi ile yapılabilir (11). Bu da son derece külfetli bir iş olup, özel ekipmana ve yüksek düzeyde teknik deneyime gereksinime gösterir. hVISA'nın saptanması için yöntemler özetlenecektir, ancak sürveyans amacıyla bildirimler VISA ve VRSA'ya yöneliktir; her ikisi de MİK $>2\text{mg/L}$ olan izolatlar olarak tanımlanır.

8.3 Direnç mekanizması

VRSA'da direnç enterokoklardan ekzojen olarak alınan *vanA* genine bağlıdır. VISA ve hVISA'da direnç endojendir (yani, kromozomal mutasyonlar) ve mekanizması oldukça karmaşıktır; tek bir gen sorumlu değildir. VISA/hVISA fenotipinde glikopeptid bağlanma hedeflerinin artışına bağlı olarak bakteri hücre duvarında kalınlaşma vardır. hVISA fenotipi laboratuvarında çoğunlukla değişkendir, bununla birlikte hVISA in vivo olarak VISA'ya dönüşebilir (2).

8.4 Vankomisine duyarlı olmayan *S.aureus'* un saptanması için önerilen yöntemler

Disk difüzyon hVISA veya VISA'yı saptamada kullanılamaz ancak destekleyecek çalışmanın sınırlı olmasına karşın VRSA için kullanılabilir (12).

8.4.1 MİK belirlenmesi

EUCAST (ISO 20776-1) tarafından önerilen sıvı mikrodilüsyon testi altın standarttır. Gradyent şerit yöntemleri ile alınan sonuçların sıvı mikrodilüsyon ile alınan sonuçlardan 0.5-1 kat daha yüksek olduğu akılda tutulmalıdır (8, 9). *S.aureus*' da vankomisine direnç için EUCAST sınır değeri MİK >2mg/L'dir. MİK'in >2mg/L olduğu (sıvı mikrodilüsyon ile) kesinleşen izolatların referans laboratuvara gönderilmesi gerekir. MİK belirlenerek hVISA saptanamamaktadır.

8.4.2 VRSA, VISA ve hVISA saptanan testler

hVISA'nın saptanması güçtür, bu nedenle saptama, tarama ve doğrulama olarak ayrılmıştır. Tarama için birkaç özgül test geliştirilmiştir. Doğrulama, izolatın değişik vankomisin konsantrasyonu içeren bir dizi agar plağında popülasyon profili analizini yaparak (PAP-AUC) sağlanır (11). Bu yöntem yeterli deneyim olmadıkça teknik olarak güçtür ve çoğunlukla referans laboratuvarlarında yapılmaktadır. Vankomisin ve kazein tarama agarında (13) uygulanan yöntemde yüksek duyarlılık ve özgüllük bulunmakla birlikte sadece bir çalışmada değerlendirilmiştir ve henüz önerilmesi olanaklı değildir. Sıradaki yöntemlerin tümünde VRSA ve VISA saptanabilmektedir ve çok merkezli çalışmalarda değerlendirilmişlerdir (14, 15).

A. Makro gradiyent test

Bu test azalmış vankomisin duyarlılığını gösterir ancak okunan sonuçların MİK değeri olmadığı bilinmelidir. Ayrıca, bu test hVISA, VISA ve VRSA'yı ayırdetmemektedir. Testin yapılışı üreticinin önerileri doğrultusundadır. Ayrıca inokulumun (2.0 McFarland) standart gradiyent testlerden daha yüksek olduğu ve Mueller Hinton agar yerine Brain heart Infusion (BHI) da yapıldığı bilinmelidir. Bundan başka, test 48 saat sonra okunmaktadır. Vankomisin ve teikoplanin için MİK ≥ 8 mg/L VEYA sadece teikoplanin için ≥ 12 mg/L, pozitif sonuç olarak kabul edilir.

Her iki kriterde teikoplanin bulunduğu için vankomisinin test edilmesi teikoplanin sonucuna dayanmaktadır. Algoritma şu şekilde olmalıdır:

- Teikoplanin sonucu ≥ 12 mg/L; VRSA, VISA veya hVISA
- Teikoplanin sonucu 8mg/L; vankomisini test et. Eğer vankomisin sonucu ≥ 8 mg/L ise, o zaman VRSA, VISA veya hVISA.
- Teikoplanin sonucu <8mg/L; VRSA, VISA veya hVISA değil

B. Glikopeptid direncinin saptanması için gradient test (G-test)

Test, üreticinin önerileri doğrultusunda yapılır. Eğer G-test sonucu vankomisin veya teikoplanin için ≥ 8 mg/L ise test sonucu pozitifdir.

C. Teikoplanin tarama agarı

5mg/L teikoplanin içeren Mueller Hinton agarı kullanılır (14). 2.0 McFarland standardına eşdeğer bulanıklık elde etmek için bakteri %0.9 serum fizyolojik içinde süspanse edilir. Agar yüzeyine 10µL inokulum damlatılır ve plak 24-48 saat 35 °C'da inkübe edilir. 48 saatte üreme olması glikopeptidlere azalmış duyarlılığa işaret eder.

D. hVISA/VISA için doğrulama testleri

Tarama testinde azalmış duyarlılık gösteren ve MİK testinde VRSA veya VISA olarak tanımlanmayan her izolat hVISA olabilir ve referans bir merkezde PAP-AUC testi ile araştırılmalıdır (9).

8.4.3 Kontrol suşlar

Aşağıda fenotipik testler için bazı kontrol suşları verilmektedir. Bu suşlar için kalite kontrol aralıkları bulunmamaktadır. Ticari yöntem kullanıcıları hangi kontrol suşlarının kullanılacağına ilişkin paket içindeki açıklamayı okumalıdır.

Tablo 1. *S.aureus*'da vankomisin direncini test etmek için bazı kontrol suş örnekleri

Suş	Mekanizma
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	Glikopeptide duyarlı
<i>S.aureus</i> NCTC 700698	hVISA (Mu3)
<i>S.aureus</i> NCTC 700699	VISA (mU50)

8.5 Kaynaklar

1. Melo-Cristino J, Resina C, Manuel V, Lito L, Ramirez M. First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Lancet. 2013;382(9888):205
2. Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-

intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection and clinical implications. Clin Microbiol Rev 2010;1: 99-139

3. Van Hal SJ, Lodise TP, Paterson DL. The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis. Clinical Infectious Diseases 2012; 54: 755-771.

4. Chang HJ, Hsu PC, Yang CC, Siu LK, Kuo AJ, et al. Influence of teicoplanin MICs on treatment outcomes among patients with teicoplanin-treated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a hospital based retrospective study. J. Antimicrob Chemother 2012, 67:736-41.

5. Honda H, Doern CD, Michael-Dunne W Jr, Warren DK. The impact of vancomycin susceptibility on treatment outcomes among patients with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. BMC Infect Dis. 2011; 5:11:335.

6. Lodise TP, Graves J, Evans A, Graffunder E, Helmecke M, et al. Relationship between vancomycin MIC and failure among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia treated with vancomycin. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 3315-20

7. Rojas L, Bunsow E, Munoz P, Cercenado E, Rodriguez-Creixems, Bouza E. Vancomycin MICs do not predict the outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in correctly treated patients. J. Antimicrob Chemother 2012; 7: 1760-8.

8. Sader HS, Jones RN, Rossi KL, Rybak MJ. Occurrence of vancomycin tolerant and heterogeneous vancomycin resistant strains (hVISA) among *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infections in nine USA hospitals. Antimicrob Chemother. 2009; 64: 1024-8.

9. Holmes NE, Turnidge JD, Munckhof WJ, Robinson JO, Korman TM, O'Sullivan MV, Anderson TL, Roberts SA, Warren SJ, Gao W, Howden BP, Johnson PD. Vancomycin AUC/MIC ratio and 30-day mortality in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Apr;57(4):1654-63.

10. Holmes NE, Turnidge JD, Munckhof WJ, Robinson JO, Korman TM, O'Sullivan MV, Anderson TL, Roberts SA, Warren SJ, Gao W, Johnson PD, Howden BP. Vancomycin minimum inhibitory concentration, host comorbidities and mortality in *Staphylococcus aureus* bacteraemia. Clin Microbiol Infect. 2013 Dec;19(12):1163-8.

11. Wootton M, Howe RA, Hillman R, Walsh TR, Bennett PM, MacGowan AP. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. J Antimicrob Chemother. 2001; 47: 399-403.
12. Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, McDougal LK, Chaitram J, McAllister S, Clark N, Killgore G, O'Hara CM, Jevitt L, Patel JB, Bozdogan B. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48:275-80.
13. Satola SW, Farley MM, Anderson KF, Patel JB. Comparison of Detection Methods for Heteroresistant Vancomycin- Intermediate *Staphylococcus aureus*, with the Population Analysis Profile Method as the Reference Method. J Clin Microbiol. 2011; 49: 177–183.
14. Wootton M, MacGowan AP, Walsh TR, Howe RA. A multicenter study evaluating the current strategies for isolating *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides. J Clin Microbiol. 2007;45:329-32.
15. Voss A, Mouton JW, van Elzakker EP, Hendrix RG, Goessens W, et al. A multi-center blinded study on the efficiency of phenotypic screening methods to detect glycopeptide intermediately susceptible *Staphylococcus aureus* (GISA) and heterogeneous GISA (hGISA). Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2007; 6:9.

9. Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*

Direncin saptanmasının önemi	
Antibiyotik duyarlılığının sınıflandırılması için gerekli	Evet
Enfeksiyon kontrolü açısından	Evet
Halk sağlığı açısından	Evet

9.1 Tanım

Vankomisine dirençli olan (MİK >4mg/L) *Enterococcus faecium* veya *Enterococcus faecalis* (VRE)

9.2 Klinik ve /veya epidemiyolojik önemi

Enterokoklar, özellikle *E.faecium*, genellikle klinikte kullanımda olan birçok antibiyotiğe dirençlidir. Bu nedenle vankomisine dirençli enterokoklara (VRE) bağlı enfeksiyonların tedavisi güçtür ve tedavi seçenekleri kısıtlıdır. VRE'ler hastane ortamında çok çabuk yayılır ve kalır. Birçok kişide kolonize olur, bunlardan çok az bölümünde enterokok enfeksiyonu çıkar (1,2). VanB içeren izolatlar genellikle fenotipik olarak teikoplanine duyarlıdır. Enterokoklarda *vanB* içerip tedavi sırasında teikoplanin direnci çıkmış olan iki olgu (3, 4) ve yakınlarda tedavide başarısızlık gözlenen dört olgu bildirilmiştir (5). Bu da, teikoplaninin VanB içeren enterokoklarda dikkatli kullanılması gerektiğini göstermektedir. Klinik olarak önemli olan Van enzimleri için tipik MİK değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. VanA veya VanB ifadesi olan enterokoklarda glikopeptidlerin MİK değerleri

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

9.3 Direnç mekanizması

Klinikte önemli olan mekanizma çoğunlukla plazmid kaynaklı VanA ve VanB ligazlara bağlıdır. Bunlar peptidoglikanın ucundaki D-Ala(nin)' i D-Lac(tat) ile değiştirmektedir. Bu değişiklik glikopeptidlerin hedefe bağlanmasını azaltır. VanA üreten suşlar hem vankomisin hem de teikoplanine direnç

oluştururken, VanB üreten suşlar direnç operonunda indüksiyon olmaması nedeniyle teikoplanine duyarlıdır. Daha az sıklıkta görülen diğer Van enzimleri; VanD, VanE, VanG, VanL, VanM ve VanN'dir (6-9). Bununla birlikte *vanM*'nin Çin'de *E.faecium*'da önemli bir artış gösterdiği bildirilmiştir (10).

Diğer enterokok türlerinde de (*E.raffinosis*, *E. gallinarum*, ve *E. casseliflavus* gibi) *vanA*, *vanB* veya yukarıda söz edilen enzimleri içerebilir, buna karşın bu suşlar oldukça enderdir. *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus*' da kromozomal VanC enzimleri bulunur. VanC düşük düzeyde vankomisin direncine (MİK 4-16mg/L) yol açar ancak enfeksiyon kontrolü açısından önemli kabul edilmez (11).

Van genlerinin ifadesinin genetik olarak sessiz olduğu ve glikopeptidlerin seçici baskısı altında dönüşebilen VRE için "Vankomisin değişken enterokok" (VVE) terimi kullanılır (12, 13). Ayrıca, "düşük-MİK 'li VRE", vankomisin ile indüksiyonun düşük olması nedeniyle başta *vanB* genlerinin ifadesinin düşük olduğu ve sınır değerlerin altında MİK değerleri veren *vanB* izolatları için kullanılan bir terimdir. Bu düşük-MİK VRE'lar vankomisinle uzun temas sonrasında MİK'lerini sınır değerin üzerine çıkarabilir (14). Hem VVE, hem de düşük-MİK VRE suşları sadece moleküler analiz ile saptanabilir. Şu anda değişik coğrafi bölgelerdeki sıklıkları bilinmemektedir.

9.4 *E. faecium* ve *E. faecalis*'de glikopeptidlere direncin saptanması için önerilen yöntemler

Vankomisin direnci, MİK saptanması, disk difüzyon ve agarda sınır değer yöntemi ile belirlenebilir. Her üç yöntemde de indüklenebilen direnci olan izolatların saptanabilmesi için plakların tam 24 saat inkübe edilmesi önemlidir.

Her üç yöntemde *vanA*'ya bağlı direnç belirlenebilir. *vanB*'ye bağlı direncin saptanması daha güçtür. Agar veya buyyonda MİK saptanması *vanB* için her zaman güvenilir değildir (15-17). Daha eski bildirimlerde *vanB*'ye bağlı direncin otomatize yöntemlerde sorunlu olduğu gözlenmektedir (18). O zamandan beri otomatize sistemlerde güncellemeler yapılmış olmakla birlikte bu yöntemlerin performanslarının *vanB*'ye bağlı direncin saptanmasında ne kadar arttığını ölçen araştırmalar yapılmamıştır. 5µg'lık vankomisin diski ile yapılan disk difüzyon testi güç olabilir ancak sonuçların değerlendirilmesinde EUCAST'ın belirlediği adımlara kesin uyulması koşuluyla iyi sonuç vermektedir (19).

MİK veya disk difüzyon test sonuçları yorumlanırken izolatın *E. gallinarum* veya *E. casseliflavus* olmadığından emin olunmalıdır; arabinoz testinin pozitif olması nedeniyle *E. faecium* ile karışabilirler. Enterokoklarda tür ayrımı için MALDI-TOF mass spektrometre testi çok kullanışlıdır (20). MALDI-TOF

olmayan yerlerde MGP (metil-alfa-D-glukopironidaz) testi veya hareket testi *E.gallinarum*/*E.casseliflavus*' u *E.faecium*' dan (MGP negatif, hareketsiz) ayırmak için kullanılabilir.

9.4.1 MİK saptanması

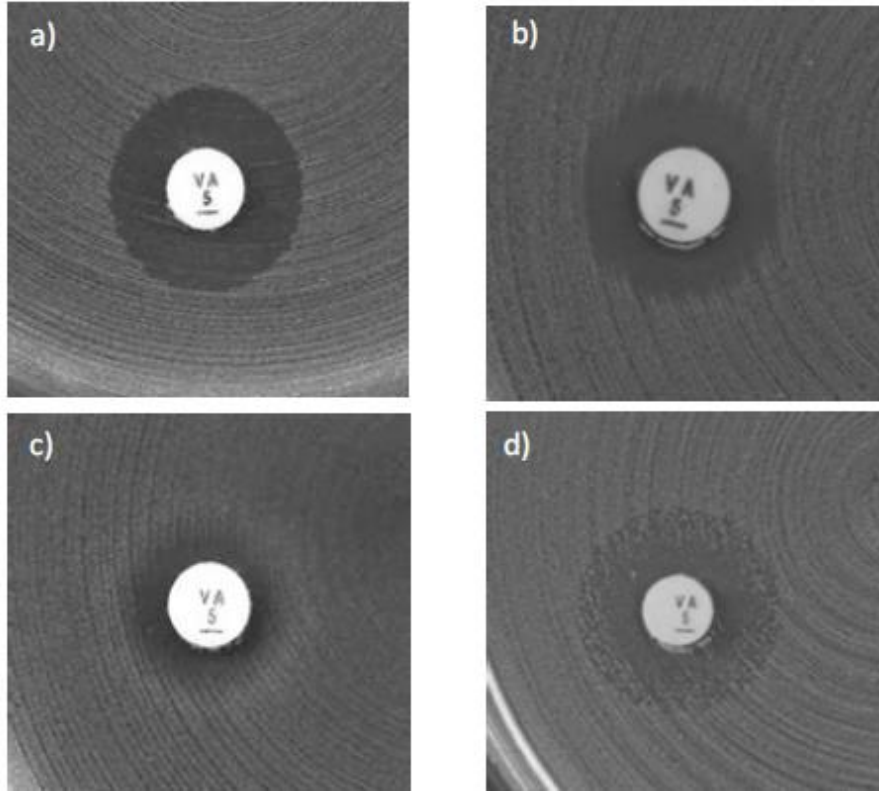
MİK' ler agar dilüsyon, sıvı mikrodilüsyon veya Gradiyent MİK yöntemleri ile saptanabilir.

Sıvı mikrodilüsyon EUCAST'ın önerdiği gibi ISO 20776-1 standardına göre yapılır.

9.4.2 Disk difüzyon testi

Disk difüzyon için EUCAST'ın önerdiği yöntem titizlikle uygulanmalıdır. Zonlar ışığa karşı tutularak belirsiz kenarlar ve/veya mikrokoloniler yönünden incelenir. Belirgin zon kenarları izolatin duyarlı olduğunu gösterir, ve keskin zonlara sahip olup zon çapları sınır değerlerin üstünde olan isolatlar vankomisine duyarlı olarak bildirilebilir. Zon kenarları belirgin olmayan veya zon içinde üreme gözlenen isolatlar (Şekil 1) zon çapı ne olursa olsun dirençli olabilir ve MİK ile doğrulanmadıkça duyarlı olarak bildirilmemelidir. Yeni yapılan çok merkezli bir araştırmada, özellikle belirsiz zonları yorumlamada deneyimli olan laboratuvarlarda disk difüzyon yöntemi, *vanB* üreten enterokokların saptanmasında VITEK2'den üstün bulunmuştur (19). Disk difüzyon, kolay üreyen bakteriler için EUCAST disk difüzyon yöntemine göre uygulanmıştır. İndüklenebilir direnci olan bazı isolatlar için direnci saptamada 24 saatlik inkübasyon gereklidir.

Şekil 1. *Enterococcus* spp. de vankomisin disk difüzyon testlerinin okunuşu



a). Keskin zon kenarları ve zon çapı ≥ 12 mm. “Duyarlı” bildir.

b-d). Belirsiz zon kenarları ve/veya zon içinde koloniler. Zon çapı ne olursa olsun “dirençli” bildir.

9.4.3 Sınır değer agarı

Brain heart Infusion agarda 6mg/L vankomisin ile yapılan sınır değer agar testleri *vanA* ve *vanB* pozitif izolatların saptanması için güvenilir testlerdir (19). Sınır değer agarları ticari üreticiden sağlanabilir veya laboratuvarda hazırlanabilir. Sınır değer agar testi, 6mg/Lvankomisin içeren Brain heart infusion agara 1×10^5 - 1×10^6 cfu (10 μ L 0.5 McFarland süspansiyonu) damlatılarak yapılır. İndüklenebilir direnci olan bazı izolatların belirlenebilmesi için inkübasyon $35^\circ \pm 1^\circ \text{C}$ da 24 saat olmalıdır. Birden fazla koloni üremesi pozitif test olarak kabul edilir.

9.4.4 Genotipik test

vanA ve *vanB*'ye yönelik PCR kullanımı ile vankomisin direncinin saptanması da laboratuvar veya ticari yöntemler ile yapılabilir (20-22).

9.4.5 Kalite kontrol

Aşağıda fenotipik ve genotipik testler için bazı kontrol suşları verilmektedir. Bu suşlar için kalite kontrol aralıkları bulunmamaktadır. Ticari yöntem kullanıcıları hangi kontrol suşlarının kullanılacağına ilişkin paket içindeki açıklamayı okumalıdır.

Tablo 1. Enterokokları test etmek için bazı kontrol suş örnekleri

Suş	Mekanizma
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	Vankomisine duyarlı
<i>E.faecalis</i> ATCC 51299	Vankomisine dirençli (<i>vanB</i>)
<i>E.faecium</i> ATCC 12202	Vankomisine dirençli (<i>vanA</i>)

9.5. Kaynaklar

1. Mazuski JE. Vancomycin-resistant enterococcus: risk factors, surveillance, infections, and treatment. Surg Infect. 2008;9:567-71.
2. Tenover FC, McDonald LC. Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control. Curr Opin Infect Dis. 2005;18:300-5.
3. Hayden MK, Trenholme GM, Schultz JE, Sahm DF. In vivo development of teicoplanin resistance in a VanB *Enterococcus faecium* isolate. J Infect Dis. 1993;167:1224-7.
4. Kawalec M, Gniadkowski M, Kedzierska J, Skotnicki A, Fiett J, Hryniewicz W. Selection of a teicoplanin-resistant *Enterococcus faecium* mutant during an outbreak caused by vancomycin-resistant enterococci with the *vanB* phenotype. J Clin Microbiol. 2001;39:4274-82.
5. Holmes NE, Ballard SA, Lam MM, Johnson PD, Grayson ML, Stinear TP, Howden BP. Genomic analysis of teicoplanin resistance emerging during treatment of vanB vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infections in solid organ transplant recipients including donor-derived cases, J Antimicrob Chemother. 2013;68(9):2134-9.
6. Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the *van* alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2004;42:5857-60.
7. Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06- 0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, *vanL*. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:2667-72.
8. Xu X, Lin D, Yan G, Ye X, Wu S, Guo Y, Zhu D, Hu F, Zhang Y, Wang F, Jacoby GA, Wang M. *vanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:4643-7.

9. Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, Leclercq R, Courvalin P, Cattoir V. DALa- d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(10):4606-12.
10. Chen C, Sun J, Guo Y, Lin D, Guo Q, et al. High Prevalence of *vanM* in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(12):7795-8.
11. Ramotar K, Woods W, Larocque L, Toye B. Comparison of phenotypic methods to identify enterococci intrinsically resistant to vancomycin (VanC VRE). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000;36:119-24.
12. Sivertsen A, Pedersen T, Larssen KW, Bergh K, Ronning TG, et al. A Silenced *vanA* Gene Cluster on a Transferable Plasmid Caused an Outbreak of Vancomycin-Variable Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(7):4119-27.
13. Thaker MN, Kalan L, Waglehner N, Eshaghi A, Patel SN, et al. Vancomycin-variable enterococci can give rise to constitutive resistance during antibiotic therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(3):1405-10.
14. Grabsch EA, Chua K, Xie S, Byrne J, Ballard SA, Ward PB, Grayson ML. Improved Detection of *vanB2*-Containing *Enterococcus faecium* with Vancomycin Susceptibility by Etest Using Oxgall Supplementation. *J. Clin. Microbiol* 2008; 46; 1961-4
15. Swenson JM, Clark NC, Sahm DF, Ferraro MJ, Doern G, Hindler J, Jorgensen JH, Pfaller MA, Reller LB, Weinstein MP, et al. Molecular characterization and multilaboratory evaluation of *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 for quality control of screening tests for vancomycin and high-level aminoglycoside resistance in enterococci. *J Clin Microbiol*. 1995;33:3019-21.
16. Klare I, Fleige C, Geringer U, Witte W, Werner G. Performance of three chromogenic VRE screening agars, two EtestR vancomycin protocols, and different microdilution methods in detecting *vanB* genotype *Enterococcus faecium* with varying vancomycin MICs. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;74:171-6.
17. Wijesuriya TM, Perry P, Pryce T, Boehm J, Kay I, Flexman J, Coombs GW, Ingram PR. Low vancomycin MICs and fecal densities reduce the sensitivity of screening methods for vancomycin resistance in Enterococci. *J Clin Microbiol*. 2014 Aug;52(8):2829-33
18. Endtz HP, Van Den Braak N, Van Belkum A, Goessens WH, Kreft D, Stroebel AB, Verbrugh HA. Comparison of eight methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *J Clin Microbiol*. 1998;36:592-4.
19. Hegstad K, Giske CG, Haldorsen B, Matuschek E, Schonning K, et al. Performance of the EUCAST disk diffusion method, the CLSI agar screen method, and the Vitek 2 automated antimicrobial susceptibility testing system for detection of clinical isolates of Enterococci with low- and medium-level VanB-type vancomycin resistance: a multicenter study. *J Clin Microbiol*. 2014;52(5):1582-9
20. Fang H, Ohlsson AK, Ullberg M, Ozenci V. Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS, VITEK MS and the VITEK2 system for the identification of clinical *Enterococcus* isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31: 3073-.

21. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1434.
22. Dahl KH, Simonsen GS, Olsvik O, Sundsfjord A. Heterogeneity in the *vanB* gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:1105-10.
23. Gazin M, Lammens C, Goossens H, Malhotra-Kumar S; MOSAR WP2 Study Team. Evaluation of GeneOhm VanR and Xpert *vanA/vanB* molecular assays for the rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:273-6.

10. Penisiline duyarlı olmayan (sokak tipi dışındaki) *Streptococcus pneumoniae*

Direncin saptanmasının önemi	
Antibiyotik duyarlılığının sınıflandırılması için gerekli	Evet
Enfeksiyon kontrolü açısından	Hayır
Halk sağlığı açısından	Evet

10.1 Tanım

Değişikliğe uğramış, β -laktamlara karşı afiniteleri azalmış penisilin bağlayan proteinler (PBP'ler) nedeniyle penisiline azalmış duyarlılık (sokak tipinin üstünde MİK'lere sahip; $>0.06\text{mg/L}$) gösteren *S.pneumoniae* izolatları.

10.2 Klinik ve/veya epidemiyolojik önemi

S.pneumoniae tüm dünyada pnömoninin en yaygın etkenidir. Morbidite ve mortalitesi yüksektir ve her yıl yaklaşık üç milyon kişinin pnömokokal enfeksiyonlardan öldüğü tahmin edilmektedir. Penisiline düşük düzeyde duyarlı olmama durumu menejit benzilpenisilin ile tedavi edildiğinde mortalitenin artmasına neden olmaktadır (1). Diğer enfeksiyonlarda yüksek dozlar verilirse düşük düzeyde dirence bağlı bir mortalite artışı olmaz. Birçok ülkede çeşitli pnömokok serotiplerine karşı aşılama programı yürütülmektedir ve bu da invazif izolatlarda gözlenen direnç düzeylerini etkileyebilir (2). Bununla birlikte, bu dokümanda tanımlanan diğer birçok patojenden farklı olarak sağlık kurumlarında yayılım göstermemelerine karşın, duyarlı-olmayan *S.pneumoniae* halk sağlığı açısından önemli bir klinik sorun yaratmaya devam etmektedir.

10.3 Direnç mekanizması

S.pneumoniae'de altı PBP vardır ve PBP 2x penisilin birincil hedefidir (3). Düşük afiniteli PBP'leri kodlayan "mozayik genler" kommensal viridans streptokoklardan yatay olarak gen transferinin sonucudur (3). β -laktam direncinin düzeyi izolatta bulunan düşük afiniteli mozayik PBP'lerin yanında *S.pneumoniae* için esansiyel olan belirli PBP'lerin değişimine bağlıdır (84). Benzilpenisilin için MİK değerleri $0.12\text{-}2\text{mg/L}$ olanlar yüksek dozda penisilin kullanıldığında menenjit dışındaki enfeksiyonlarda duyarlı kabul edilir; buna karşın menenjit etkeni olan suşlar her zaman dirençli olarak bildirilmelidir (5).

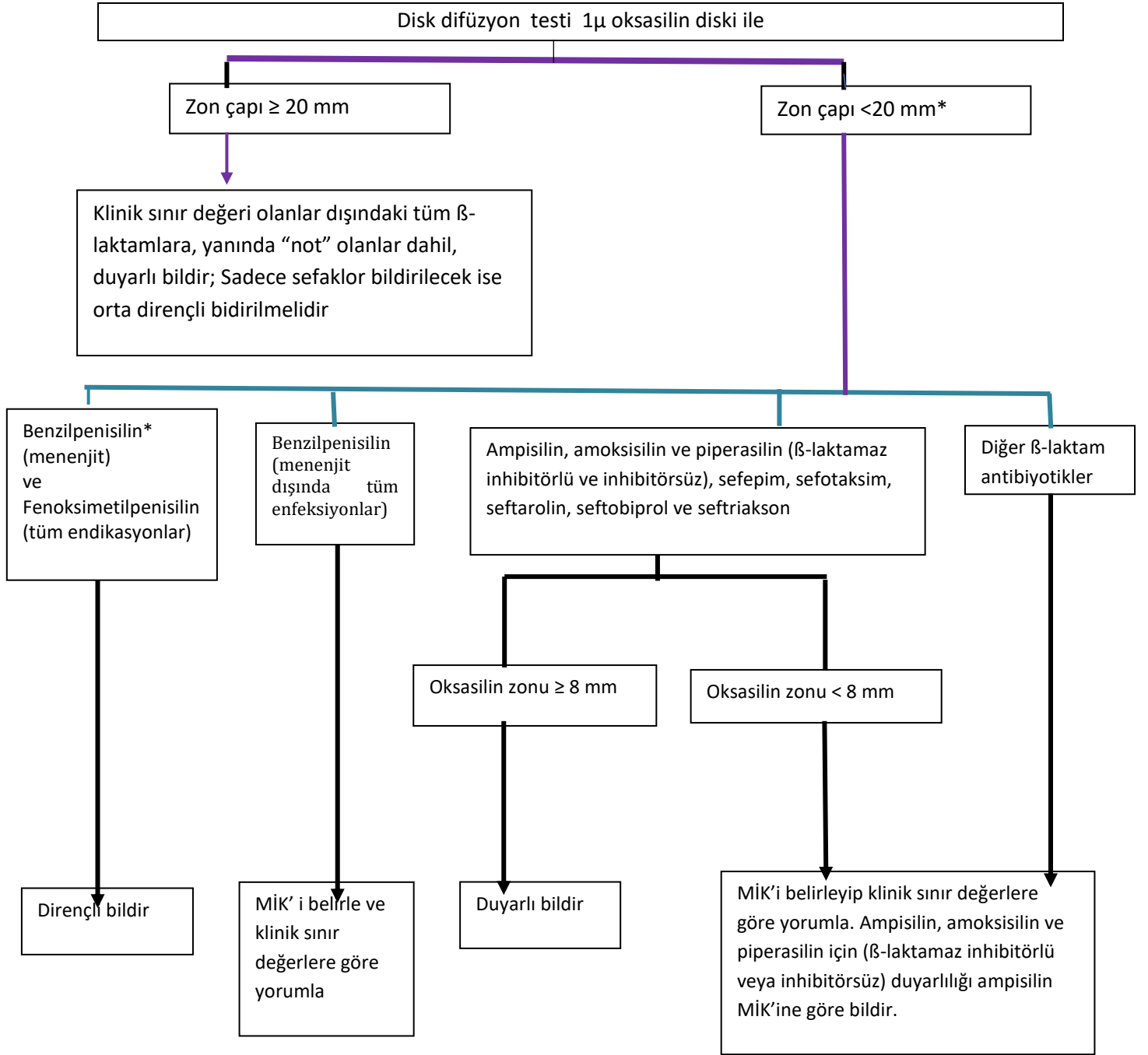
10.4 Penisiline duyarlılığı azalmış *S.pneumoniae*'ların saptanması için önerilen yöntemler

Penisiline azalmış duyarlılık fenotipik olarak MİK veya disk difüzyon yöntemleriyle saptanabilir.

10.4.1 Disk difüzyon yöntemi

1 µg oksasilin diskleri ile yapılan disk difüzyon yöntemi penisiline azalmış duyarlılığı olan izolatların saptanması için etkili bir tarama yöntemidir (6-8). Yöntem çok duyarlı olmakla birlikte özgüllüğü çok yüksek değildir çünkü zon çapı ≤ 19 mm olan suşların benzilpenisiline duyarlılıkları değişkendir ve tarama yöntemi ile sokak tipi dışında bulunan tüm suşlarda benzilpenisilin MİK'i saptanmalıdır (8).

Benzil penisilin dışındaki beta-laktamlara duyarlılığın tahmin edilmesi için, oksasilin zon çapı Şekil-1'de açıklandığı gibi kullanılabilir.



Şekil 1. *S.pneumoniae*' de β-laktam direnci tarama (*Oksasilin 1 µg <20mm: Her zaman benzilpenisilin MİK'ini belirleyin, ancak diğer β-laktamları yukarıdaki önerilere göre bildirmeyi ve menenjitte benzilpenisilin bildirimini ertelemeyin)

Tablo 1. *S. pneumoniae*'da β -laktam direncinin taranması.

Oksasilin (1 μ g) zon ϕ apı (mm)	Antimikrobiyal ajan	İleri test ve/veya yorumlama
≥ 20 mm	Klinik sınır değerleri listelenmiş olan ("Not" uyarısı bulunanlar dahil) tüm β -laktam ajanlar	Klinik endikasyona bakmaksızın duyarlı olarak raporla
< 20 mm	Benzilpenisilin (menenjit) ve fenoksimetilpenisilin (tüm endikasyonlar)	Dirençli olarak raporla
	Ampisilin, amoksisilin ve piperasilin (β -laktamaz inhibitörlü veya inhibitörsüz), sefotaksim, seftriakson ve sefepim	Oksasilin zon ϕ apı ≥ 8 mm: Duyarlı olarak raporla Oksasilin zon ϕ apı < 8 mm: Klinik kullanımı düşünülen β -laktam ajanın MİK değerini belirle ancak ampisilin, amoksisilin ve piperasilin (β -laktamaz inhibitörlü veya inhibitörsüz) için duyarlılığı ampisilin MİK değerinden kestir
	Diğer β -laktam ajanlar (menenjit dış enfeksiyonlar için kullanılan benzilpenisilin dahil)	Klinik kullanımı düşünülen ajanı bir MİK yöntemi ile test et ve sonuçları klinik sınır değerlere göre yorumla

*Oksasilin 1 μ g < 20 mm: Her zaman benzilpenisilin MİK değerini belirle, ancak diğer β -laktamların yukarıda önerildiği şekilde raporlanmasını geciktirme.

8.4.2 Klinik sınır değerler

Penisilin sınır değerleri birincil olarak pnömokokkal menenjitte tedavi başarısını garanti etmek amacıyla planlanmıştı. Ancak klinik çalışmalar penisilin orta duyarlı suşlarla gelişen pnömokokkal pnömonilerde parenteral penisilin tedavisi sonucunun diğer ajanlarla tedavi edilen hastalarla farklılık göstermediğini ortaya koymuştur. Mikrobiyolojik, farmakokinetik ve farmakodinamik veriler dikkate alınarak menenjit dış izolatlar için benzilpenisilin klinik sınır değerleri tekrar gözden geçirilmiş ve güncel EUCAST sınır değerleri Tablo 2'de listelenmiştir.

Tablo 2. Menenjit ve menenjit dış durumlarda benzilpenisilin duyarlılığının raporlanması

Endikasyonlar	MİK sınır değer (mg/L)		Notlar
	S $\leq$	R >	
Benzilpenisilin (menenjit dışı)	0.06	2	Pnömonide , 1.2 g x 4 doz uygulandığında, MİK $\leq$ 0.5 mg/L olan izolatlar benzilpenisilin duyarlı olarak değerlendirilmelidir. Pnömonide , 2.4 g x 4 veya 1.2 g x 6 doz uygulandığında, MİK $\leq$ 1 mg/L olan izolatlar benzilpenisilin duyarlı olarak değerlendirilmelidir. Pnömonide , 2.4 g x 6 doz uygulandığında, MİK $\leq$ 2 mg/L olan izolatlar benzilpenisilin duyarlı olarak değerlendirilmelidir.
Benzilpenisilin (menenjit)	0.06	0.06	

Not: 1.2 g benzilpenisilin 2 MU (milyon ünite) benzilpenisiline eşittir.

8.4.3 Kalite kontrol

Tablo 3. Benzilpenisilin duyarlılık testi için uygun olan kontrol suşları.

Suş	Mekanizma
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	PBP'de değişim, benzilpenisilin MİK 0.5 mg/L

8.5 Kaynaklar

1. Hakenbeck R, Kaminski K, König A, van der Linden M, Paik J, Reichmann P, Zähler D. Penicillin-binding proteins in beta-lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Microb Drug Resist 1999; 5: 91-99.
2. Grebe T, Hakenbeck R. Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of beta-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 829-834.
3. Weinstein MP, Klugman KP, Jones RN. Rationale for revised penicillin susceptibility breakpoints versus *Streptococcus pneumoniae*: Coping with antimicrobial susceptibility in an era of resistance. Clin Infect Dis 2009; 48: 1596 – 1600.
4. Dixon JMS, Lipinski AE, Graham MEP. Detection and prevalence of pneumococci with increased resistance to penicillin. Can Med Assoc J 1977; 117: 1159-61.
5. Swenson JM, Hill BC, Thornsberry C. Screening pneumococci for penicillin resistance. J Clin Microbiol 1986; 24: 749-52.
6. Jetté LP and C Sinave. Use of an oxacillin disk screening test for detection of penicillin- and ceftriaxone-resistant pneumococci. J Clin Microbiol 1999; 37: 1178-81.