



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

V 1.0

(Temmuz 2013)

EUCAST Klinik ve/veya epidemiyolojik önemi olan direnç mekanizmaları ve özel direncin saptanması Alt Komitesi

Christian G Giske (İsveç, EUCAST Yönetim Kurulu ve EARS-Net Koordinasyon Grubu; Başkan)

Louis Martinez Martinez (İspanya, EUCAST Yönetim Kurulu), Rafael Canton (İspanya, EUCAST başkanı), Stefania Stefani (İtalya), Robert Skov (Danimarka, EUCAST Yönetim Kurulu) Youri Glupczynski (Belçika), Patrice Nordmann (Fransa), Mandy Wootton (UK), Vivi Miragou (Yunanistan), Gunnar Skov Simonsen (Norveç, EARS-Net Koordinasyon Grubu)

Çeviri: Burçin Şener, Zeynep Gülay

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	
Antimikrobiyal duyarlılık saptanması için gereklidir	Hayır
Enfeksiyon kontrolü	Evet
Halk sağlığı	Evet

2.1 Tanım

Karbapenemazlar; penisilinleri, çoğu zaman sefalosporinleri ve değişen derecelerde olmak üzere karbapeemleri 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). Daha sonraları, 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. Günümüzde KPC, Avrupa ülkelerinde Enterobacteriaceae üyelerinde en sık bulunan karbapenemazdır (1). İnvazif *K.pneumoniae* izolatlarının Yunanistan için yaklaşık %60'ı, İtalya için yaklaşık %15'i, karbapenemlere duyarlı bulunmamaktadır (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 metallo beta-laktamazı (new Delhi metallo- β -lactamase ; NDM) ve Türkiye'den köken almış olan OXA-48-benzeri β -laktamazlardır. OXA-48- benzeri enzimler, çeşitli Avrupa ülkelerinde salgınlar yapmıştır, şimdi de hızla yayılmaktadır (1).

Karbapenemazlar, tüm beta-laktamlara dirence yol açmaları nedeniyle bir endişe kaynağı oluşturmaktadır, çünkü karbapenemaz üreten suşlar genellikle diğer direnç mekanizmalarını da taşıdıkları için çoklu dirençlidirler ve karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae enfeksiyonları yüksek mortalite hızları ile ilişkilidir (4-6).

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 (7,8). Enterobacteriaceae üyelerinde karbapenem duyarlılığında azalma, GSBL veya AmpC enzim üretimi ve porin değişimleri veya kaybı ile birlikteyse de görülebilmektedir (9)

Karbapenemaz üreten izolatların çoğu genişlemiş spektrumlu (oksimino) sefalosporinlere de dirençlidir (10). 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 duyarlıkta azalmaya neden olmuşsa, epidemiyolojik açıdan yüksek önem taşıdığı kabul edilir (11).

2.4 Enterobacteriaceae üyelerinde karbapenemaz üretiminin saptanması için önerilen yöntemler

2.4.1 Karbapenemaz üretiminin taranacağı fenotipler

Karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae üyelerinde karbapenem MİK'leri klinik sınır değerlerin altında olabilir (10,11,13). Ancak, EUCAST tarafından belirlenen ECOFF değerleri karbapenemaz üreticilerinin saptanması için kullanılabilir. Meropenem, karbapenemaz üreticilerinin saptanmasında duyarlılık ve özgüllük dengesi açısından en iyi ajandır (10,14). 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 (10). Karbapenemaz taranması için uygun eşik değerler Tablo 1'de gösterilmiştir. Özgüllüğü arttırmak için, imipenem ve ertapenem eşik değerleri, ECOFF'larından bir dilüsyon yüksektir.

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

Karbapenem	MİK (mg/L)		Disk difüzyon zonları (mm) (10 μ g diklerle)	
	S/I sınır değeri	Tarama eşik değeri	S/I sınır değeri	Tarama eşik değeri
Meropenem ¹	≤ 2	> 0.12	≥ 22	$< 25^2$
İmipenem ³	≤ 2	> 1	≥ 22	< 23
Ertapenem ⁴	≤ 0.5	> 0.12	≥ 25	< 25

¹Duyarlılık ve özgüllük dengesi en iyi olan

²Bazı durumlarda OXA-48 üreten izolatlar için zon çapı 26 mm'ye kadar ulaşabilmektedir. Bu nedenle, OXA-48 üreten Enterobacteriaceae salgınlarında, özgüllükte düşüş göze alınarak < 27 mm tarama eşik değeri olarak kullanılabilir.

³İmipenem ile sokak tipi (Wild type;WT) ve karbapenemaz üreticileri arasındaki ayırım göreceli olarak zayıftır. Bu nedenle imipenemin tek tarama bileşiği olarak kullanılması, önerilmemektedir.

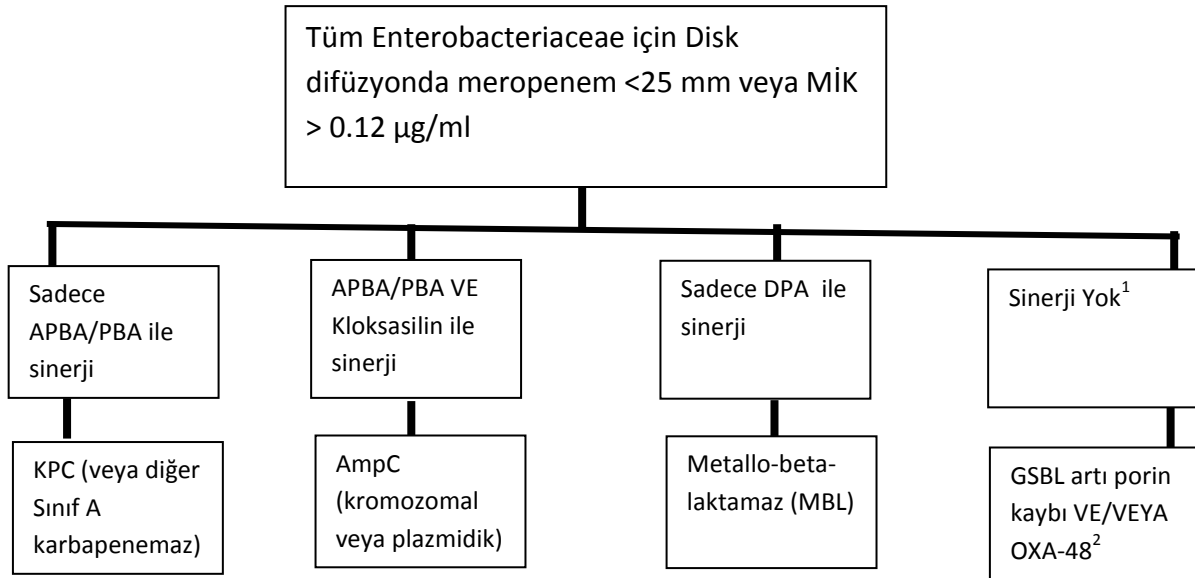
⁴Yüksek duyarlılık ancak düşük özgüllük, bu nedenle rutin tanımlama için önerilmemektedir.

2.4.2 Karbapenemaz üretiminin doğrulanma yöntemleri

Rutin duyarlılık testlerinde, karbapenemlere duyarlılıkta azalma saptandığında, karbapenemazların saptanması için fenotipik yöntemler uygulanmalıdır. Kombinasyon disk yöntemi, çeşitli çalışmalarla valide edilmiş olması ve ticari olarak bulunabilmesi (Mast, ROSCO) gibi avantajlara sahiptir. Diskler veya tabletler meropenem yanı sıra, 2.4.3 bölümünde belirtilen çeşitli inhibitörleri içerirler. Kısaca, boronik asit sınıf A karbapenemazları inhibe ederken, dipikolinik asit sınıf B karbapenemazları inhibe eder. Sınıf D karbapenemazlar için kullanılan bir inhibitör bulunmamaktadır. Kloksasilin testlere aşırı AmpC üretimi ve porin kaybı birlikteliği ile ortaya çıkan karbapenem direnci ile karbapenemaz üretiminin ayrılması amacıyla eklenir.

Inhibitör testlerinin yorumlanması ile ilgili akış şeması Şekil-1’de görülmektedir. Bu yöntemlerle ilgili temel dezavantaj, yapılması için 18 saat (pratikte bir gecelik inkübasyon) gerekmesidir. Bu nedenle de yeni hızlı yöntem arayışları sürmektedir.

Şekil 1



Kısaltmalar: APBA=Aminofenil boronik asit, PBA= fenil boronik asit, DPA= Dipikolinik asit (tümü kombinasyon diski testlerinde, meropenem içeren disk veya tabletlere eklenen β -laktamaz inhibitörleridir)

¹KPC ve MBL birlikteliği de sinerji görülmemesine neden olur. Normal olarak bu izolatların karbapenemlere yüksek düzeyde dirençlidir. En kolay moleküler yöntemlerle saptanırlar. ²Yüksek düzey temosilin direnci (MIC > 32 mg/L (12,18) veya temosilin diski (30µg) ile ≤ 10 mm zon (17), OXA-48 için fenotipik belirleyicidir.

Tanımlama da kullanılan PZR tabanlı genotipik yöntemler de bildirilmiştir (22). Ancak bu yöntemlerin yeni β -laktamazları tanımlayamama veya rutin için pahalı olma gibi dezavantajları bulunmaktadır (10). Geliştirilmekte olan ticari DNA mikroarray yöntemleri bu tip testlerin kullanıcı dostu olma özelliğini arttırabilirse de genotipik yöntemlerin genel kısıtlılıkları bunlar için de geçerlidir (23). Sürveyans için mutlak gerekli olmamakla birlikte, en azından referans laboratuvarlarının genotipik doğrulama yöntemlerini uygulayabilir olması, önerilir.

2.4.3 Fenotipik saptama yöntemlerinin yorumlanması

Tablo 2’de belirtilen akış şemasında metallo-beta-laktamazlar, sınıf A karbapenemazlar, sınıf D karbapenemazlar ve karbapenemaz dışı mekanizmalar ayırt edilmektedir. Testler, güç üreyenler dışındaki bakteriler için EUCAST disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapılabilir. Bu amaçla kullanılacak diskler (Mast, Birleşik Krallık) ve tabletler (Rosco, Danimarka) ticari olarak bulunmaktadır (15-17). Testler üretici önerilerine uyularak uygulanmalıdır.

Günümüzde OXA-48 benzeri enzimler için herhangi bir inhibitör bulunmamaktadır. Temosiline yüksek düzey direnç (MİK>32 mg/L) OXA-48 üreten suşlar için bir fenotipik belirleyici olarak önerilmiştir (12, 17, 18). Buna karşın, diğer direnç mekanizmaları da benzer fenotipe yol açabildiği için, temosilin direnci OXA-48 –tipi karbapenemazlara özgül değildir. Bu nedenle de OXA-48 varlığı genotipik yöntemlerle doğrulanmalıdır.

Modifiye Hodge Testi (Yonca yaprağı testi), hem sonuçların yorumunun zor olması hem de duyarlılık ve özgüllüğünün düşük olması nedeniyle, önerilmemektedir (10). 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 çözülmemektedir.

Tablo-2 Disk veya tabletlerle uygulanan fenotipik testlerin yorumu (karbapenemazlar **koyu font** ile yazılmıştır)

B-laktamaz	Meropenem (10 μ g) disk/tableti ile zon çapında artış				Temosilin MİK>32mg/L
	DPA/EDTA	APBA/PBA	DPA+APBA	CLX	
MBL	≥ 5	-	-	-	Uygulanmaz ¹
KPC	-	≥ 4	-	-	Uygulanmaz ¹
MBL+KPC²			≥ 5		Uygulanmaz ¹
OXA-48-benzeri	-	-	-	-	Evet
AmpC+porin kaybı	-	≥ 4	-	≥ 5	Uygulanmaz 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. ²İki inhibitörü (DPA veya EDTA +APBA/PBA) bir arada içeren tabletlerin kullanıldığı 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.

2.4.4 Carba NP testi

Bu testin çalışma prensibi, karbapenem hidrolizinin pH değişimine yol açması ve bunun sonucunda fenol kırmızısı solüsyonunun renk değiştirmesidir (test pozitifse kırmızıdan sarıya döner) (20,21). 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 uygulanamaz. Tekrarlanabilir sonuçlar alınabilmesi için, yöntem basamakları ile ilgili detaylar dikkatle izlenmeli ve uygulanmalıdır.

2.4.5 Kontrol suşları

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, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. Clin Microbiol Infect. 2012;18(5):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:p11:8023
3. European Centres for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)
4. 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.
5. 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(12):1430-5.

6. 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(4):1413-8
7. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases : the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:440-58
8. 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.
9. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapebem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63:659-67
10. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poriel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(5):432-8.
11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Website with MIC-distributions. (<http://mic.eucast.org/>, accessed on 23 December 2012)
12. Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, Rezende de Castro R, Bauraing C et al. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39(2):168-72.
13. 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- β -lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis.* 2007;45(9):1171-8:
14. Vading M, Samuelsen Ø, Haldorsen B, Sundsfjord AS, Giske CG. Comparison of disk diffusion, E test and VITEK2 for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint system. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(5):668-74.
15. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(4):552-6.
16. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol.* 2012; (50)12:3877-80.
17. van Dijk K, Voets G, Scharringa J, Voskuil S, Fluit A, Rottier W, Leverstein-Van Hall M, Cohen Stuart J. A disk diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenyl boronic acid, dipicolinic acid, and temocillin. *Clin Microbiol Infect* 2013. In pres
18. Hartl R, Widhalm 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 (5):E230-2.
19. Hrabak J, Studentova 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(7):2441-3.

20. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(9):1503-7.
21. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid Identification of carbapenemase Types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by Using a Biochemical Test. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(12):6437-40:
22. Millillo M, Kwak YI, Snesrud E, Waterman PE, Lesho E, McGann P. Rapid and simultaneous detection of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} by use of multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2013;51(4):1247-9.
23. 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(8): 1865-9.

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

Direnç mekanizması saptanmasının önemi	
Antimikrobiyal duyarlılık saptanması için gereklidir	Hayır
Enfeksiyon kontrolü	Evet
Halk sağlığı	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) ile inhibe olur.

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 aktarılması ve nadiren de yeni enzimlerin ortaya çıkmasının bir sonucudur. GSBL'ler içerisinde en önemli grup CTX-M enzimleridir. Bu grubu, SHV ve TEM-türevi GSBL'ler izlemektedir (2-5). Sınıf A β-laktamaz inhibitörlerinden A grubuna göre düşük düzeyde etkilenseler de, bazı sınıf D OXA-türevi enzimler de GSB grubu içinde yer almaktadır.

GSBL üretimi en sık Enterobacteriaceae'de, önce hastane ortamında, sonraki 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 %10u geçmiştir ve bazı ülkelerde %50'den yüksektir. 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 (1-4,9,10).

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 ve seftazidim için EUCAST ve CLSI rehberleriyle uyumlu olarak, tarama sınır değerinin MİK >1mg/L olması, önerilmektedir (Tablo 1) (11,12). Enterobacteriaceae için EUCAST’ın önerdiği klinik sınır değeri de $S \leq 1\text{mg/L}$ ’dir (11). Sefpodoksım 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 (12-16)

Yöntem	Antibiyotik	GSBL testi uygulanması için sınır değeri
Sıvı veya agar dilüsyon ¹	Sefotaksim ve seftazidim	MİK > 1mg/L
	Sefpodoksım	MİK > 1mg/L
Disk difüzyon ¹	Sefotaksim (5µg)	İnhibisyon zonu <21 mm
	Seftriakson (30 µg)	İnhibisyon zonu <23 mm
	Seftazidim (10 µg)	İnhibisyon zonu <22 mm
	Sefpodoksım (10 µg)	İnhibisyon zonu <21 mm

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

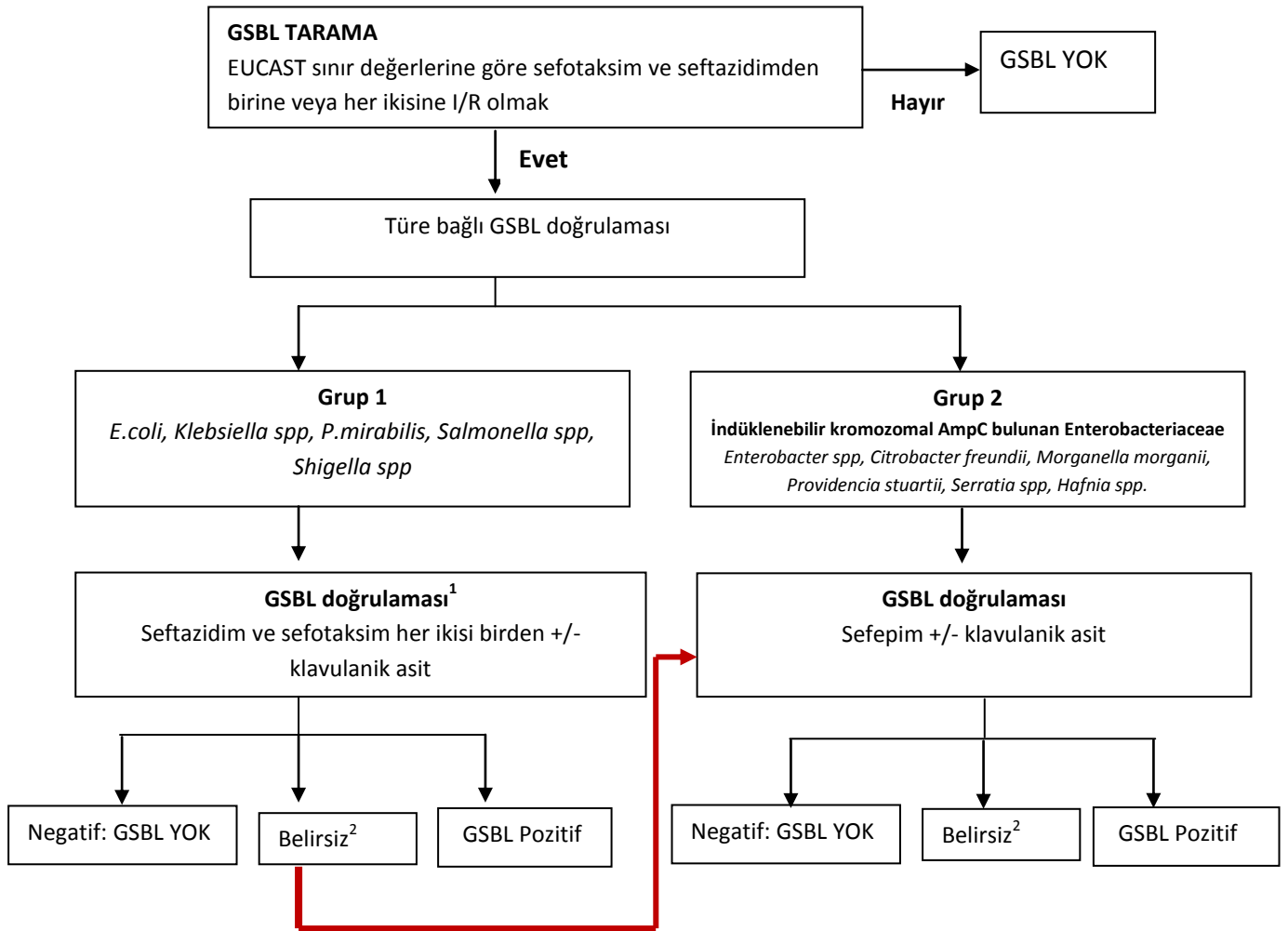
3.4.1. Enterobacteriaceae üyelerinde GSBL saptama yöntemleri

A- Grup 1 Enterobacteriaceae (*E.coli*, *Klebsiella 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 kullanımınıdır (12,17,18). Sefotaksim (veya seftriakson) ve seftazidim MİK değerleri farklı GSBL pozitif izolatlarda çok fazla değişkenlik gösterebildiği için, indikatör sefalosporinler olarak sefotaksim (veya seftriakson) ile seftazidimin her ikisinin birden kullanılması gereklidir (13,19,20).

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, sefepim +/-klavulanik asit doğrulama testi yapınız

²Pozitif veya negatif olarak değerlendirilemeyen grup (ör. Kapsadığı Mik düzeylerinin üzerinde üreme olması nedeniyle, gradiyent striplerin okunamaması)

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

Grup 2 Enterobacteriaceae için Grup 1 için belirtilen şekilde (Şekil 1 Tablo 3) tarama testleri yapılır (18). 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) (17,18,21). . Bu testlerden KDT, çok merkezli bir çalışma sonucuna göre, GSBL gradiyent testiyle eşit duyarlılığa sahip, ancak bu teste kıyasla göre daha özgündür (22). Otomatize sistem üreticileri, duyarlılık test panellerine, GSBL’lerin klavulanik asit ile inhibisyonunu gösterecek şekilde, saptama testleri eklemiştir. Sonuçlar, suş koleksiyonuna ve kullanılan sisteme göre değişmektedir (14-6).

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 zonunz kıyasla ≥ 5 mm daha genişse, test pozitifdir (Tablo 3) (23,24).

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, test pozitif olarak değerlendirilir. Diskler arasındaki uzaklık, ÇDS testi başarısında belirleyicidir ve sefalosporin 30µg 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) (17). Bu önerinin, EUCAST disk difüzyon yönteminde yer alan ve daha düşük ilaç konsantrasyonları içeren diskler için, tekrar gözden geçirilmesi gereklidir.

C. Gradyent test yöntemi

Gradyent testleri, üretici önerilerine göre hazırlanır, değerlendirilir ve yorumlanır. Klavulanik asit ile kombine edildiğinde sefalosporin MİK değerinde ≥ 8 kat düşük gözleniyorsa veya bir “ hayalet zon” (“phantom zone”) ya da elips şeklinde 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 gradiyent testi 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.

E. Yorumlama sırasında dikkate alınacak 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 (25). 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 kaşılaşılabilir (26,27). 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 (15).

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
Etest GSBL stripleri	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
Etest GSBL stripleri	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 -laktamazlar varlığında GSBL enzimlerinin fenotipik olarak saptanması

GSBL varlığını maskeleyen yüksek düzey AmpC üretimi olduğunda belirsiz (Etest) veya yalancı negatif (KDT, ÇDS, Etest ve mikrodilüsyon) test sonuçları alınabilir (17,28,29). 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 (28). Sadece ACC β -laktamaz varlığında sefamisin direnci görülmeyebilir (30).

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, Etest ve sıvı dilüsyon testlerinin tümünde kullanılabilir (25,31-33). 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 (17). 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 (34,35). 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. Sınıf D grubundan (OXA-tipi) GSBL'lerin klavulanik asit ile inhibe olmadığı, bu nedenle de yukarıda yer alan yöntemlerle saptanamayacağı da hatırlanmalıdır (4,17). Bu enzimler günümüzde Enterobacteriaceae üyelerinde nadir olarak bulunmaktadır.

3.4.4 Genotipik doğrulama

GSBL genlerinin genotipik olarak tanımlanması PZR ve GSBL gen dizi analizi basamaklarını içermektedir (3). Bunlar yanı sıra, bir DNA mikroarray –temelli yöntem de kullanılabilir. Check-KPC GSBL mikroarray (Check-Points, Wageningen, Hollanda) ve bilinen GSBLlerin çoğunu kapsayan bir suş koleksiyonu ile yapılan yakın zamanlı değerlendirme çalışmalarında yöntemin performansı başarılı bulunmuştur (36-40). Bu yöntem ile test sonuçları genellikle 24 saat içinde tamamlanmaktadır. Ancak, sporadik gruptan bazı GSBL'ler ile yeni GSBL'lerin bu yöntem ile saptanmayacağı hatırlanmalıdır.

3.4.5 Kalite Kontrolü

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. 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.
15. Spanu T, Sanguinetti M, Tumbarello M, D'Inzeo
16. Thomson KS, Cornish NE, Hong SG, Hemrick K, Herdt C, Moland ES. Comparison of Phoenix
17. Driex 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.
18. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005;18(4):657-86.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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 a Enterobacteriaceae strain collection. J Antimicrob Chemother. 2004;54(1):134-8.
26. 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.
27. 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.
28. Jacoby GA. AmpC β -lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009;22(1):161-82.
29. 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.
30. 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.
31. 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.

32. 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.
33. 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.
34. 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 beta-lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemase-possessing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2009;47(11):420-6.
35. 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.
36. Cohen Stuart J, Dierix C, Al Naiemi N, Karczmarek A, Van Hoek AH et al. SHV and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae using ligation-mediated amplification with microarray analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(7):1377-81
37. Endimiani A, Hujer AM, Hujer KM, Gatta JA, Schriver AC et al. Evaluation of a commercial microarray system for detection of SHV-, TEM-, CTX-M; and KPC type beta-lactamase genes in Gram-negative isolates. *J Clin Microbiol.* 2010;48(7):2618-22.
38. Naas T, Cuzon G, Truong H, Bernabeu S, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray, the Check-Points ESBL/KPC array, for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases and KPC carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(8):3086-92.
39. Platteeuw TN, Stuart JW, Voets GM, Scharringa J, van de Sande N et al. Evaluation of a commercial microarray as a confirmation test for the presence of extended-spectrum beta-lactamases in isolates from the routine clinical setting. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(9):1435-40.
40. Willemsen I, Overvest I, Al Naiemi N, Rijnsburger M, Savelkoul P et al. New diagnostic microarray (Check-KPC ESBL) for detection and identification of extended-spectrum beta-lactamases in highly resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2011;49(8):2985-7.

4. Kazanılmış AmpC β -laktamaz- üreten Enterobacteriaceae

Direnç mekanizması saptanmasının önemi	
Antimikrobiyal duyarlılık saptanması için gereklidir	Hayır
Enfeksiyon kontrolü	Evet
Halk sağlığı	Evet

4.1 Tanım

Amp C-tipi sefalosporinazlar, Ambler sınıf C'de yer alan β -laktamazlardır. Penisilinler ve sefalosporinleri ve monobaktamları hidrolize ederler. 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 buldukları türler göz önüne alınarak, aileler şeklinde sınıflandırılmaktadır. Buna göre *Enterobacter* grubu (MIR, ACT), *C. freundii* grubu (CMY-2-benzeri, LAT, CFE), *M. morgani* grubu (DHA), *Hafnia alvei* grubu (ACC), *Aeromonas* grubu (CMY-1 benzeri, FOX, MOX) ve *Acinetobacter baumannii* grubu (ABA), 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 toplumdaki 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 türlerinin 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).

4.3 Direnç mekanizması

Birçok Enterobacteriaceae ve diğer Gram negatif basiller doğal AmpC'ler üretmektedir. Bu üretim, her zaman düşük düzeyde (ör. *E.coli*, *Acinetobacter baumannii*) veya indüklenebilir özellikte (ör.*Enterobacter* spp., *C.frendii*, *M.morgani*, *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 yapılı ve bunun sonucunda dereprese veya aşırı üretim yapan mutantlardaki ile aynı direnç profiline yol açar. GSBL'lere benzer şekilde, kazanılmış AmpC'ler genellikle plazmidlerle taşınan genler tarafından kodlanır (1-3).

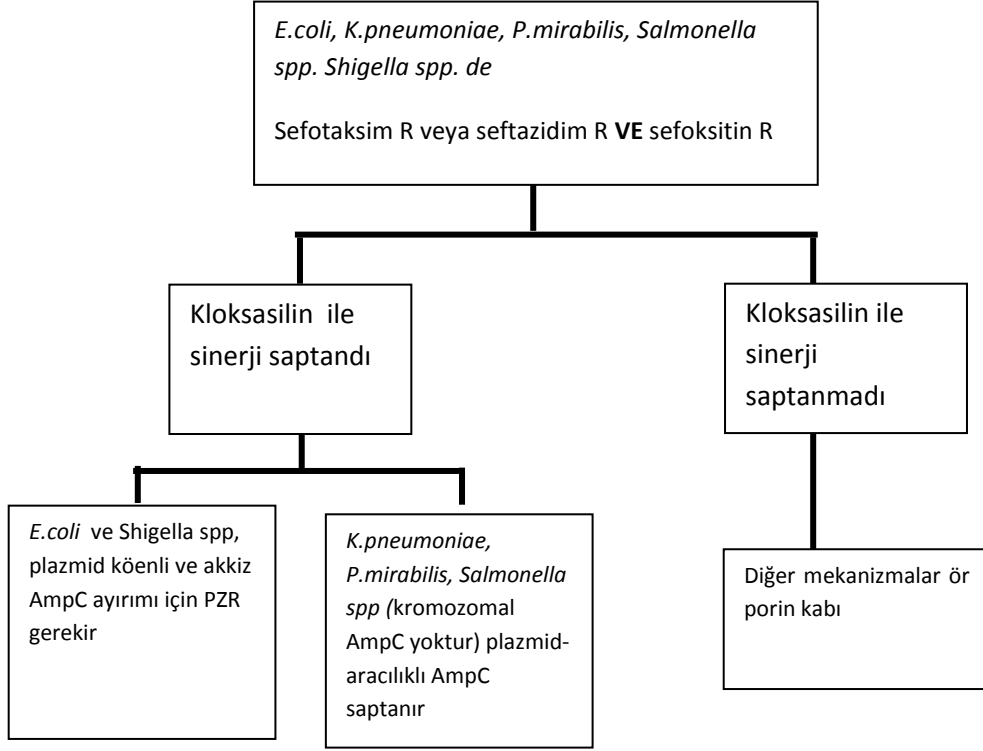
4.4 Enterobacteriaceae türlerinde kazanılmış AmpC'lerin saptanması için önerilen yöntemler

Sefoksitin MİK değerinin > 8 mg/L olması ve bununla birlikte, seftazidim ve/veya sefotaksim MİK değerinin de > 1 mg/L olması, 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 da inhibe etmektedir. Bu yöntemleri inceleyen çalışmalar az sayıda olmakla birlikte, oldukça doğru tanımlama yapan yöntemler bildirilmiştir (7-9). Bunlardan başka, Mast AmpC Detection Disc Set (duyarlılık %96-100, özgüllük % 98-100) (10,11), AmpC gradiyent strip test (Etest için duyarlılık %84-93, özgüllük %70-100) ve sefotaksim/kloksasilin ile seftazidim/kloksasilin içeren Rosco tabletleri (duyarlılık %96, özgüllük %92) gibi ticari testler de bulunmaktadır (13,14). 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 (Check –Points) (17) doğrulanabilir.

Şekil 1. AmpC taranması için uygun kriterleri gösteren akış şeması



¹AmpC ayrıca GSBL üreten izolatlarda da bulunabilir (klavulanik asitle sinerji). Bu nedenle de GSBL-testinin sonucundan bağımsız olarak test yapılması önerilir.

Tablo 1. AmpC saptanması için uygun Kalite Kontrol suşları

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>E.coli</i> ATCC 25922	AmpC negatif

4.5 Kaynaklar

- 1.Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009;22(1):161-82.
2. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother.2002;46:1-11.
3. Becerio A, Bou G. Class C β -lactamases: an increasing problem worldwide. Rev Med Microbiol.2004;15:141-152

4. Empel J, Hrabak J, Kozinska A, Bergerova T, Urbaskova 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, Fielt J, Sadowy E, Tassios PT, Rossolini GM, Gniadkowski M, Miriagou V. Evolution of a multi-drug-resistant *Proteos 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(8):1924-31.
7. Yagi T, Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamene K et al. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(6):2551-8.
8. 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(2):294-9.
9. 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(19):146-9.
10. 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(9):2303-4.
11. 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.
12. 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(8):2924-32.
13. Hansen F, Hammerum AM, Skov RL, Giske CG, Sundsfjord A, Samuelsen O. Evaluation of ROSCO Neo-Sentitabs for phenotypic detection and subgrouping of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *APMIS.* 2012;120(9):724-32.
14. 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 Apr 3. (Epub ahead of print)
15. 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(6):2153-62.
16. Brouland A, Wisell KT, Edquist PJ, Elfsröm L, Walder M, Giske CG. Development of a real-time SYBRGreen PCR assay for rapid detection of acquired AmpC in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol Methods.* 2010;Sep;82(3):229-33.
17. 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(8):1865-9.

5. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)

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

5.1 Tanım

Anti-MRSA aktivitesine sahip özel sefalosporinler dışındaki β -laktam ajanların düşük afinite gösterdiği ek bir penisilin-bağlayan proteine (PBP2a veya yeni keşfedilen PBP2c) sahip *S. aureus* izolatları

5.2 Klinik ve/veya epidemiyolojik önem

Metisilin-dirençli *S. aureus* tüm dünyada morbidite ve mortalitenin başlıca nedenleri arasındadır (1,2). Metisilin duyarlı suşların neden olduğu kan dolaşımı enfeksiyonlarıyla karşılaştırıldığında MRSA'nın etken olduğu benzer enfeksiyonlarda tedavide gecikme ve yetersiz alternatif tedavi rejimleri nedeniyle mortalite iki katına çıkmaktadır (1,2). MRSA enfeksiyonları dünyanın her tarafında hem hastane hem de toplumda endemiktir.

5.3 Direnç mekanizmaları

Başlıca direnç mekanizması anti-MRSA aktivitesine sahip özel sefalosporinler dışındaki β -laktam ajanların düşük afinite gösterdiği ek bir penisilin-bağlayan protein, PBP2a veya yeni keşfedilen PBP2c, üretimidir. Anti-MRSA aktivitesine sahip sefalosporinler PBP2a ve olasılıkla PBP2c'ye yeterli ölçüde yüksek afiniteye sahip olup MRSA suşlarına karşı etkindirler (3). PBP2a ve PBP2c, sırasıyla, *mecA* geni veya yeni tanımlanan *mecC* (daha önceden *mecA*_{LG251} olarak bilinen) geni tarafından kodlanırlar (4). *Mec* elemanı *S. aureus*'a yabancıdır ve metisilin duyarlı *S. aureus*'da bulunmaz. *mecA* gen ekspresyonu belirgin ölçüde heterojen olan ve düşük oksasilin MİK'ine sahip olan suşlar duyarlılık testlerinin doğruluğunu etkilerler (5). Ayrıca bazı izolatlar oksasiline düşük düzey direnç gösterirler ancak *mecA* ve *mecC* negatiftirler ve farklı PBPlar üretmezler (sınır duyarlı "borderline" *S. aureus* (BORSA)). Bu suşlar nadir görülürler ve direnç mekanizmaları tam tanımlanmamakla birlikte β -laktamazların aşırı üretimi veya varolan PBP'lerde değişiklik gelişmesi ile ilgili olabilir (5).

5.4 *S. aureus*'da metisilin direnci saptanması için önerilen yöntemler

Metisilin/oksasilin direnci hem fenotipik olarak MİK belirlenmesi, disk difüzyon testi veya PBP2a lateks aglütinasyon testi ile hem de genotipik olarak PCR ile saptanabilir.

5.4.1 MİK belirlenmesi veya disk difüzyonla saptama

Direncin heterojen ifadesi özellikle oksasilin MİK'lerini etkiler. Sefoksitin *mecA/mecC* tarafından kodlanan metisilin direncinin çok duyarlı ve özgül bir göstergesidir ve disk

difüzyon için tercih edilen seçenektir. Oksasilin disk difüzyon yöntemi artık önerilmemektedir ve yorumlayıcı zon çapları EUCAST sınır değer tablosunda yer almamaktadır. Artmış oksasilin MİK'i (MİK>2 mg/L) olan ancak halen sefoksitine duyarlı (zon çapı ≥ 22 mm, MİK ≤ 4 mg/L) olan suşlar nadirdir. Eğer oksasilin duyarlılığı bakılıyorsa ve sefoksitinden farklı bir sonuç alınıyorsa, yorum aşağıda verildiği şekilde yapılmalıdır. Bu tür suşların *mecA* veya *mecC* açısından fenotipik veya genotipik olarak incelenmesi önerilmektedir.

Tablo 1. Oksasilin ve sefoksitin sonuç uyumsuzluğu durumunda yorumlama.

	Sefoksitin sonucu (MİK veya disk difüzyon)	
	S	R
Oksasilin sonucu (MİK)	S	Oksasilin duyarlı olarak raporla
	R	Oksasilin dirençli olarak raporla

A. Buyyon mikrodilüsyon:

Standart yöntem (ISO 20776-1) kullanılır ve MİK > 4 mg/L olan suşlar metisilin dirençli olarak rapor edilmelidir.

B. Disk difüzyon:

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

5.4.2 Genotipik yöntemler veya lateks aglütinasyon yöntemi ile saptama

mecA geninin ticari veya "in-house" PCR yöntemleri ile genotipik olarak ve PBP2a proteininin lateks aglütinasyon kitleri kullanılarak saptanması mümkündür. Ancak günümüzde *mecC* ve PBP2C genotipik veya fenotipik olarak ticari yöntemlerle saptanamamaktadır. *mecC* saptanması için kullanılan primerler ve yöntemler yayınlanmıştır (6,7).

5.4.3 Kontrol suşları

Tablo 2. Metisilin duyarlılık testi için uygun olan kontrol suşları.

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

5.5 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 meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2003;36(1):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(4):1598-605.
3. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(9):629-41.
4. 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.
5. García-Álvarez 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(8):595-603
6. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10(4):781-91.
7. 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 *mecA_{LGA251}*. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 4:395-400.
8. 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 *mecA_{LGA251}*. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67:2338-41.

6. Glikopeptidlere duyarlılığı azalmış *Staphylococcus aureus*

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

6.1 Tanım

S. aureus'da vankomisin direnci için EUCAST klinik MİK sınır değeri > 2 mg/L'dir. Son yıllarda daha önceden tanımlanan "intermediate" (ortada) grup kaldırılarak, vankomisin sınır değerleri düşürülmüştür. Ancak VanA tarafından kodlanan yüksek düzey glikopeptid dirençli *S. aureus* (GRSA) izolatlarında ve VanA dışı kodlanan düşük düzey dirençli izolatlarda görülen direnç mekanizmaları arasında önemli farklar vardır. Bu nedenle glikopeptid "intermediate" *S. aureus* (GISA) ve heterodirençli glikopeptid "intermediate" *S. aureus* (hGISA) terimleri VanA dışı kodlanan düşük düzey vankomisin dirençli izolatlar için korunmuştur. Ağır *S. aureus* enfeksiyonu olan bir hastanın tedavisinde vankomisin kullanmak için MİK değeri mutlaka belirlenmelidir. Bazı olgularda, özellikle tedavi başarısızlığından şüphelenildiğinde hGISA da araştırılmalıdır. hGISA doğrulamasının zorluğu nedeniyle antimikrobiyal süveyans GISA ve GRSA saptanmasına odaklanmıştır.

GRSA: Glikopeptid dirençli *S. aureus*

Yüksek düzey vankomisin (MİK > 8 mg/L) direnci olan *S. aureus* izolatları.

GISA: Glikopeptid "intermediate" *S. aureus*

Düşük düzey vankomisin (MİK 4-8 mg/L) direnci olan *S. aureus* izolatları.

hGISA: Heterojen glikopeptid "intermediate" *S. aureus*

Vankomisin duyarlı (MİK ≤ 2 mg/L) ancak popülasyon analizi profili ile çok küçük bir popülasyonda ($1/10^6$ hücre) vankomisin MİK'i > 2 mg/L olan hücrelerin gösterildiği *S. aureus* izolatları.

6.2 Klinik ve/veya epidemiyolojik önem

Azalmış glikopeptid duyarlı izolatların Avrupa'daki prevalansı ile ilgili yeni araştırmalar bulunmamaktadır. Tekli merkezlerden kaynaklanan verilere göre Avrupa'da MRSA izolatları arasında hGISA prevalansı ≤ %2 olup GISA %0.1'den düşüktür (1). GRSA Avrupa'da henüz rapor edilmemiştir ve tüm dünyada da şimdilik çok nadirdir (1). hGISA prevalansı belli bir klonun yayılımına bağlı olarak lokal ölçüde yüksek olabilir (2). Yükselmiş MİK'i olan (GISA) veya dirençli alt popülasyonları (hGISA) olan hemen hemen tüm izolatlar MRSA'dır.

İyi kontrol edilmiş prospektif çalışmaların olmaması nedeniyle hGISA'nın klinik öneminin belirlenmesi zordur. Ancak en azından ciddi enfeksiyonlarda hGISA fenotipinin daha kötü sonuçlara neden olduğu söylenebilir (1,2). Bu nedenle tedaviye yanıt vermeyen kan dolaşımı enfeksiyonlarında hGISA araştırılması akılcıdır. Son zamanlarda duyarlılık üst sınırına yakın

(MİK>1 mg/L) MİK'lere sahip olan izolatların kötü sonuçlara ve daha yüksek mortaliteye yol açtığına dair kanıtlar artmaktadır (2-7). Bu durumun dirençli alt popülasyonlardan mı kaynaklandığı konusu henüz kesinlik kazanmamıştır, çünkü bu tabloya bu suşlarda gözlenen hafif yükselmiş vankomisin MİK'leri de neden olabilir.

hGISA mekanizması karışıktır ve laboratuvarında hGISA saptanması emek yoğun, özel ekipman ve yüksek teknik uzmanlık gerektiren popülasyon analizi metoduna dayanmaktadır (8). hGISA saptanması için kullanılan yöntem kabaca açıklanacaktır ancak sürveyans için raporlama GISA ile sınırlıdır ve bu da MİK>2 mg/L olan izolatları işaret etmektedir.

6.3 Direnç mekanizması

GRSA'da direnç enterokoklardan ekzojen yolla kazanılan *vanA* geni aracılığıyla gelişmektedir. GISA ve hGISA izolatlarında direnç endojendir (kromozomal mutasyonlar) ve birden fazla genin sorumlu olduğu karışık bir mekanizmadır. GISA/hGISA fenotipi bakteri hücre duvarının kalınlaşması ve glikopeptid bağlanma hedeflerinin aşırı üretimi ile ilişkilidir. hGISA fenotipi laboratuvarında sıklıkla değişkendir, ancak hGISA in vivo koşullarda GISA'ya dönüşme kapasitesine sahiptir (1).

6.4 Glikopeptidlere duyarlı olmayan *Staphylococcus aureus* saptanması için önerilen yöntemler

Disk difüzyon hGISA veya GISA saptanması için kullanılamaz.

6.4.1 MİK belirlenmesi

EUCAST (ISO 20776-1) tarafından önerilen buyyon mikrodilüsyon yöntemi altın standarttır, ancak MİKler gradyan şerit yöntemleri, agar dilüsyon veya otomatize sistemlerle de belirlenebilir. Gradyan şerit yöntemleri ile elde edilen sonuçların buyyon mikrodilüsyonla elde edilenlere göre 0.5 – 1 iki-kat dilüsyon basamağı daha yüksek olabileceği bilinmelidir (7). *S. aureus*'da vankomisin direnci için EUCAST sınır değeri MİK>2 mg/L'dir. Doğrulanmış MİK değeri ≥ 2 mg/L olan izolatlar bir referans merkeze yollanmalıdır.

6.4.2 hGISA için özel testler

hGISA saptanmasının zorluğu bilinmektedir ve bu nedenle saptama, tarama ve doğrulama olarak ikiye ayrılmıştır. Tarama için çeşitli özel yöntemler geliştirilmiştir. Doğrulama ise izolatın farklı vankomisin konsantrasyonu içeren agar plaklarında popülasyon profilinin analizi (PAP-AUC) ile yapılmaktadır (8). Bu yöntem yeterli deneyim olmadığında teknik olarak zor olup daha çok referans laboratuvarlarında yapılmaktadır. Vankomisin ve kazein tarama agarı (9) kullanımına dayanan bir yöntemin yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu gösterilmekle beraber, bu yöntem şimdiye dek sadece bir çalışmada değerlendirilmiştir ve bu

nedenle yöntemler arasına alınmamıştır. Aşağıda verilen yöntemler çok merkezli bir çalışmada değerlendirilmiştir (10).

A. Makro gradyan testi:

Bu test azalmış vankomisin duyarlılığının bir göstergesidir ancak sonuçların MİK değeri olarak belirlenmediği bilinmelidir. Bunun yanı sıra bu test hGISA ve GISA ayırımını yapmamaktadır. Test üreticinin önerileri doğrultusunda gerçekleştirilir. Kullanılan inokulum standart gradyan testlere göre daha yüksektir (2,0 McFarland). Okumaların hem vankomisin hem de teikoplanin için ≥ 8 mg/L veya sadece teikoplanin için ≥ 12 mg/L olması pozitif sonuç olarak değerlendirilir.

Her iki okuma kriteri de teikoplanini içerdiğinden vankomisin test edilmesine teikoplanin test sonucuna göre karar verilebilir. Bu durumda izlenecek algoritma şu şekilde olacaktır:

- Teikoplanin sonucu ≥ 12 mg/L: GISA veya HGISA
- Teikoplanin sonucu 8 mg/L: Vankomisini test edin. Eğer vankomisin sonucu ≥ 8 mg/L ise GISA veya hGISA'dır.
- Teikoplanin sonucu < 8 mg/L: GISA veya hGISA değildir.

B. Glikopeptid direnci saptanması (GRD) için gradyan testi:

Test üreticinin önerileri doğrultusunda yapılır. GRD şerit testinde vankomisin veya teikoplanin sonucu ≥ 8 mg/L ise pozitif olarak değerlendirilir.

C. Teikoplanin tarama agar:

5 mg/L teikoplanin içeren Mueller Hinton plağı kullanılır. 2.0 McFarland standarda eşit inokulum elde etmek için birkaç koloni %0.9 serum fizyolojik içinde süspansedilir. Bu inokulumdan 10 mikrolitre agar yüzeyine bir nokta şeklinde aktarılır ve plak normal atmosferde 35°C'de 24-48 saat inkübe edilir. 48 saat sonunda iki koloniden fazla üreme görülmesi azalmış glikopeptid duyarlılığı şüphesini uyandırır.

D. hGISA/GISA için doğrulama testi:

hGISA tarama testi sonucu pozitif çıkan her izolat bir referans laboratuvara başvurularak, eğri altındaki popülasyon profil analiz alanı (PAP-AUC) (8) yöntemi ile araştırılmalıdır.

6.4.3 Kontrol suşları

Tablo 1. Glikopeptid duyarlılık testi için uygun olan kontrol suşları

Suş	Mekanizma
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Glikopeptid duyarlı
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	hGISA (Mu3)
<i>S. aureus</i> ATCC 700699	GISA (Mu50)

6.5 Kaynaklar

1. 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
2. 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.
3. 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, Vol 67(3):736-41.
4. 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.
5. 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
6. 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.
7. 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.
8. 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
9. 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.
10. 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(2):329-32.

7. Vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*

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

7.1 Tanım

Vankomisin dirençli (vankomisin MİK >4 mg/L) *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*.

7.2 Klinik ve/veya epidemiyolojik önem

Enterokoklar, özellikle *E. faecium* genellikle kullanımda olan antimikrobiyal ajanların çoğuna dirençlidirler. Bu nedenle vankomisin dirençli enterokok (VRE) enfeksiyonlarının tedavisi güç olup birkaç tedavi seçeneği bulunmaktadır. VRE kolaylıkla yayılır, hastane ortamında uzun süre kalır ve ancak çok azı enterokokkal enfeksiyon geliştirse de çok sayıda bireyi kolonize edebilir (6, 7). *VanB* geni taşıyan izolatlar fenotipik olarak teikoplanine duyarlıdır. *VanB* taşıyan enterokların tedavisi sırasında teikoplanin direncinin seçilmesiyle ilgili iki olgu raporu bulunmaktadır (8, 9), ancak klinik başarısızlıkla ilgili raporlar yetersizdir ve halen geçerli olan EUCAST önerisi teikoplanin sonucunun bulunduğu gibi raporlanmalıdır. Klinik olarak en önemli olan Van enzimleri için tipik olan MİK değerleri Tablo 1'de verilmektedir.

Tablo 1. VanA ve VanB içeren izolatlar için tipik glikopeptid MİK değerleri.

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

7.3 Direnç mekanizması

Klinik olarak anlamlı direnç en sık olarak peptidoglikan zincirinde terminal D-Ala'yı D-Lac ile değiştiren ve plazmid tarafından kodlanan VanA ve VanB ligazlar aracılığıyla gelişir. Bu yer değiştirme glikopeptidlerin hedefe bağlanmasını azaltır. VanA suşları hem vankomisin hem teikoplanin dirençli iken VanB suşları direnç operonunun indüklenmemesi nedeniyle genellikle teikoplanin duyarlılıklarını korurlar. Daha düşük prevalansa sahip olan diğer Van enzimleri ise VanD, VanE, VanG, VanL, VanM ve VanN'dir (1-4).

Ek enterokok türleri (örn. *E. raffinosus*, *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus*) *vanA*, *vanB* veya yukarıda listelenen enzimleri kodlayan diğer *van* genlerini içerebilir ancak bu suşlar daha azdır. Kromozomal olarak kodlanan VanC enzimleri tüm *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus*

izolatlarında bulunur. VanC düşük düzey vankomisin direncine (MİK 4-16 mg/L) yol açar ancak genellikle enfeksiyon kontrol açısından önemli görülmemektedir (5).

7.4 E. faecium ve E. faecalis'de glikopeptid direncinin saptanması için önerilen yöntemler

Vankomisin direnci MİK belirlenmesi, disk difüzyon ve agar sınır değer yöntemleri ile saptanabilir. Her üç yöntem için de önemli olan indüklenebilir dirençli izolatların da saptanabilmesi için plakların tam 24 saat inkübe edilmesidir.

Üç yöntem de *vanA* tarafından kodlanan direnci kolaylıkla saptar. *vanB* tarafından kodlanan direncin saptanması daha zordur. Agar veya buyyon dilüsyon yöntemiyle MİK belirlenmesi doğru sonuç verir ancak rutin laboratuvarlarda nadiren kullanılır. Eski raporlar *VanB* tarafından kodlanan direncin otomatize yöntemlerle saptanmasının problemlili olduğunu ileri sürmektedir (10, 11). İlerleyen dönemde otomatize yöntemlerde çeşitli güncellemeler yapılmakla birlikte halen *VanB* tarafından kodlanan direncin bu yöntemlerle saptanma performansının iyileştiğine dair çalışmalar yetersizdir. EUCAST tarafından belirtilen okuma kurallarına titizlikle uyulduğunda 5 µg vankomisin diski ile yapılan disk difüzyon yöntemi iyi performans göstermektedir.

MİK veya disk difüzyon sonuçları yorumlanırken izolatın *E. gallinarum* veya *E. casseliflavus* olmadığından emin olmak gerekir. Bu izolatlar arabinoz pozitif olmaları nedeniyle yanlışlıkla *E. faecium* olarak tanımlanabilir. *E. gallinarum* / *E. casseliflavus*'u *E. faecium*'dan ayırt edebilmek için MGP (metil-alfa-D-glukopiranosid) testi veya hareket testi yapılabilir (*E. faecium* MGP negatif, hareketsiz). Enteroklarda tür düzeyinde tanımlama için MALDI-TOF kütle spektrometre yöntemi de kullanılabilir (13).

7.4.1 MİK belirlenmesi

MİK değerleri agar dilüsyon, buyyon dilüsyon veya gradyan MİK yöntemleri ile belirlenebilir. Buyyon mikrodilüsyon için EUCAST kuralları, gradyan testler için ise üretici firmanın önerileri izlenmelidir.

Buyyon mikrodilüsyon ISO 20776-1 standartına göre uygulanır. Gradyan testlerle MİK belirlenmesi ise üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılır. MİK gradyan şeritleri bazen vankomisin direncini tarama amacıyla yüksek inokulumda (McFarland 2 standardı) zengin bir besiyerinde (Beyin Kalp İnfüzyon agarı) de kullanılmaktadır ancak bu yöntem MİK değeri saptamamaktadır.

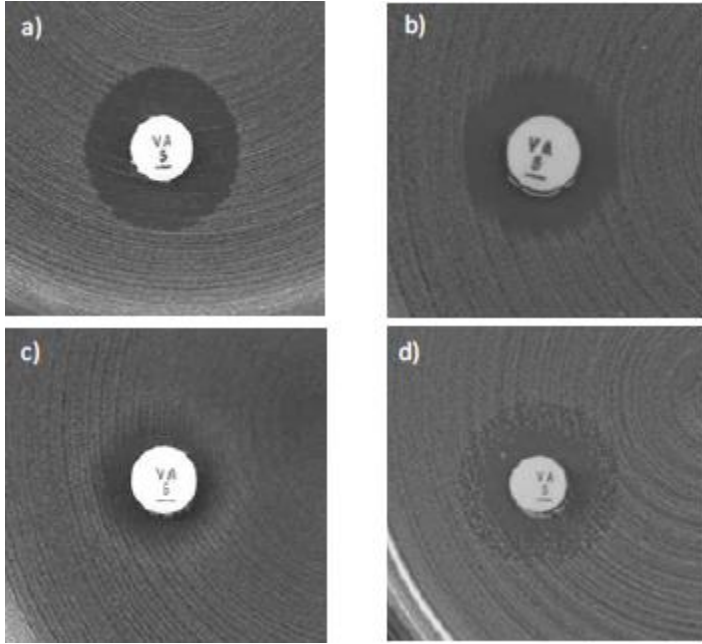
7.4.2 Disk difüzyon testi

Disk difüzyon için EUCAST tarafından belirlenen kurallar titizlikle izlenmelidir. Arkadan gelen ışık yardımıyla belirsiz zon kenarları ve/veya zon içi mikrokoloniler araştırılır. Keskin zon kenarları izolatın duyarlı olduğuna işaret eder ve keskin kenarlı zonu olan ve zon çapı sınır

değerin üzerinde olan izolatlar vankomisin duyarlı olarak rapor edilebilir. Belirsiz zon kenarları olan veya zon içi mikrokoloniler olan izolatlar dirençli olabilir ve bu izolatlar zon çapları ne olursa olsun, MİK ile doğrulanmadan “duyarlı” olarak rapor edilmemelidir (Şekil 1).

- Disk difüzyon EUCAST’ın kolay üreyen organizmalar için önerdiği disk difüzyon yöntemine göre yapılır. İndüklenebilir dirençli izolatları saptayabilmek için 24 saat inkübasyon gereklidir.

Şekil 1. *Enterococcus* spp. ve vankomisin kombinasyonu için bazı okuma örnekleri.



a) Keskin zon kenarları ve zon çapı ≥ 12 mm. Duyarlı olarak raporlanır.

b-d) Belirsiz zon kenarları ve/veya zon içi koloniler. Zon çapına bakmaksızın dirençli olarak raporlanır.

7.4.3 Agar sınır değer testleri

6 mg/L vankomisin içeren Beyin Kalp İnfüzyon agar kullanılarak yapılan agar sınır değer testleri *vanA* –ve *vanB*-pozitif izolatları saptamada güvenilir yöntemlerdir. Agar sınır değer plakları ticari olarak elde edilebilir veya hazırlanabilir. Agar sınır değer testi 6 mg/L vankomisin içeren Beyin Kalp İnfüzyon agar üzerine 1×10^5 – 1×10^6 kob (0.5 McFarland süspansiyondan 10 μ l) aktarılması ile gerçekleştirilir. İndüklenebilir dirençli izolatları saptayabilmek için 24 saat $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de normal atmosferde inkübasyon gereklidir. Bir koloniden fazla üreme olması pozitif olarak değerlendirilir.

7.4.4 Genotipik testler

Vankomisin direnci *vanA* ve *vanB* genlerini hedefleyen ev-yapımı veya ticari PCR temelli yöntemlerle de saptanabilir (14-16).

7.4.5 Kalite kontrol

Tablo 2. Vankomisin duyarlılık testi için uygun olan kontrol suşları.

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

7.5 Kaynaklar

1. 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(12):5857-60.
2. 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(7):2667-72.
3. 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(11):4643-7.
4. Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, Leclercq R, Courvalin P, Cattoir V. D-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(10):4606-12.
5. 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(2):119-24.
6. Mazuski JE. Vancomycin-resistant enterococcus: risk factors, surveillance, infections, and treatment. Surg Infect. 2008;9(6):567-71.
7. Tenover FC, McDonald LC. Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control. Curr Opin Infect Dis. 2005;18(4):300-5.
8. 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.
9. 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(12):4274-82.
10. 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(11):3019-21.
11. 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(2):592-4.
12. Klare I, Fleige C, Geringer U, Witte W, Werner G. Performance of three chromogenic VRE screening agars, two Etest vancomycin protocols, and different microdilution methods in detecting *vanB* genotype *Enterococcus faecium* with varying vancomycin MICs. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;74(2):171-6.
13. 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(5):1434.
14. Fang H, Ohlsson AK, Ullberg M, Özenci 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: 3073-7
15. 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(5):1105-10.

16. 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(3):273-6.

8. Penisilin duyarlı olmayan *Streptococcus pneumoniae*

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

8.1 Tanım

β -laktamlara düşük afinitesi olan farklı penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) varlığına bağlı olarak penisiline azalmış duyarlılık (vahşi tip suşlardan daha yüksek MİK değerleri, >0.06 mg/L) gösteren *S. pneumoniae* izolatları.

8.2 Klinik ve/veya epidemiyolojik önem

Daha sonra eklenecektir.

8.3 Direnç mekanizması

S. pneumoniae altı adet PBP içerir ve bunlardan PBP2x penisilin birincil hedefidir (1). Düşük afiniteli PBP'leri kodlayan "mozaik genler" in varlığı kommensal viridan streptokoklardan horizontal gen aktarımının sonucudur (1). β -laktam direnç düzeyi sadece izolatta bulunan düşük afiniteli mozaik PBP'lerin sayısına değil, *S. pneumoniae* için çok önemli olan her PBP'deki modifikasyona da bağlıdır (2). Benzilpenisilin MİKleri 0.12-2 mg/L arasında olan suşlar daha yüksek doz penisilin kullanıldığında menenjit dışı enfeksiyonlarda duyarlı olarak kabul edilmektedir. Menenjit durumunda ise bu tür suşlar mutlaka dirençli olarak raporlanmalıdır (3).

8.4 Penisilin duyarlı olmayan *S. pneumoniae* saptanması için önerilen yöntemler

Penisilin duyarlı olmayan *S. pneumoniae* fenotipik olarak MİK veya disk difüzyon yöntemleri ile saptanabilir.

8.4.1 Disk difüzyon yöntemi

Penisilin duyarlı olmayan *S. pneumoniae* saptanması için 1 μ g oksasilin diski ile yapılan disk difüzyon testi en etkin tarama yöntemidir (4, 5, 6). Bu yöntem çok duyarlıdır, ancak zon çapı ≤ 19 mm olan suşların benzilpenisilin duyarlılığı değişkenlik gösterebileceğinden yeterince yüksek özgüllükte değildir. Bu nedenle tarama yöntemi ile duyarsız bulunan tüm izolatların benzilpenisilin MİKleri belirlenmelidir (6).

Benzilpenisilin dışındaki β -laktamların duyarlılığını kestirmek için Tablo 1'de verilen oksasilin zon çapları kullanılabilir.

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 dışı 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 dışı izolatlar için benzilpenisilin klinik sınır değerleri tekrar gözden geçirilmiş ve güncel EUCAST sınır değerleri Tablo 2'de listelenmiştir.

Tablo 2. Menenjit ve menenjit dışı 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.