

Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Yorumu

Zeynep Gülay

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

ÖZET

In vitro antibiyotik duyarlılık testleri, bir bakteriyel patojenin bir antibiyotiğin tedavi sırasında ulaşılan *in vi - vo* düzeylerine duyarlı olup olmadığının değerlendirilmesi amacıyla uygulanmaktadır. Rutin duyarlılık testle - ri, doğru antibiyotik seçiminde yardımcı olmasına karşın, yüksek düzeyde dirence yol açmayan, sessiz direnç mekanizmalarını gözden kaçırabilmektedir. Bu durumda, bazı özel testlerin de katkısıyla antibiyotik duyarlı - lık test sonuçlarının yorumu, bu mekanizmaların ve bunlardan etkilenen diğer antibiyotiklerin ortaya konul - masında yardımcı olmaktadır. Antibiyotik duyarlılık testlerinin yorumlanması, belirli antimikrobiklere direnç veya duyarlılığa göre direnç mekanizmasının ve bu direnç mekanizmasından etkilenecek diğer antibiyotikle - rin tahmin edilmesidir. Bu yaklaşım doğal direnç özellikleri ile birleştiğinde bakterinin tanınmasına yardımcı olduğu gibi, duyarlılık test sonuçlarının doğruluğunun denetlenmesinde de bir kalite kontrolü işlevi görmek - tedir. Duyarlılık testlerinin yorumlanması ve antibiyogram sonuçlarının buna göre değiştirilmesi mikrobiyo - logların görevi olmasına rağmen, doğru tedavi seçimi için, bu sonuçlarla sık karşılaşan ve antibiyotik tedavi - si uygulayan kliniklerde görevli hekimlerin de direnç mekanizmalarının epidemiyolojik ve terapötik önemi ile duyarlılık testlerinin kısıtlılıkları konusunda fikir sahibi olmaları gerekmektedir.

Anahtar sözcükler: antibiyotik duyarlılık testleri, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, pnömokok peni - silin direnci, genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar, antibiyogram yorumu

Toraks Dergisi, 2002;3(1):75-88

ABSTRACT

Interpretive Reading of Susceptibility Tests

In vitro antibiotic susceptibility tests are performed in order to assess whether a bacterial pathogen is suscepti - ble to an antibiotic at therapeutically achievable drug levels. Unfortunately, routine susceptibility testing may miss subtle mechanisms which cause lower levels of resistance. In this case interpretive reading of the antibi - ogramme results combined with special tests is helpful in guessing other antibiotics to which the strain is resis - tant. Interpretive reading of the susceptibility testing results consists of the deduction of the resistance mecha - nism by routine susceptibility tests and some special tests and the inference from the deduced mechanism, other agents that are likely to be affected. When combined with intrinsic resistance mechanisms this approach would aid bacterial identification and serve as a complementary quality control for susceptibility tests. Although inter - pretation of the susceptibility testing results is done by the hospital microbiologist who changes the antibi - ogramme results accordingly, the clinicians who use these results and prescribe antibiotics frequently, should also have an idea about the epidemiological and therapeutic implications of a conferred resistance mechanism and also the limitations of susceptibility testing in order to choose the best therapy for their patients.

Key words: antibiotic susceptibilty tests, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, penicillin resistance in pneumococci, extended spectrum β -lactamases, interpretive reading

Antibiyotik direnci gerek toplum gerekse hastane kökenli enfeksiyonların tedavisinde sorun oluşturan ve giderek büyü - yen bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Yeni antibakteri - yel ilaçların klinik tedaviye girmesi kaçınılmaz olarak bunla - ra dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkması ile sonlan -

maktadır. Direnç nedeniyle tedavi başarısızlıklarının en aza indirilmesi, ancak duyarlılık testlerinin standart bir yön - tem ile uygulanması ve sonuçlarının doğru yorumlanması ile mümkündür. Antibiyotik duyarlılık sonuçlarının yorumu, uygulamayı yapan Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarının gö - revidir. Ancak, sık antibiyotik tedavisi uygulayan bir klinik - te çalışan hekimlerin de fazla ayrıntılı olmasa bile, antibiyog - ram yorumuna ilişkin genel bilgilerinin olması doğru tedavi seçeneklerinin uygulanması açısından yararlı olacaktır.

Yazışma adresi: Prof. Dr. Zeynep Gülay
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik
Mikrobiyoloji AD, Inciraltı, İzmir 35340
e-posta: gulayz@hotmail.com

Son 10-15 yıl içinde klinik açıdan önemli bakteri türlerinin çoğu, infeksiyonlarının tedavisinde ilk seçenek olarak kullanılan antibiyotiklere direnç geliştirmiştir (Tablo I) [1,2]. Örneğin, *Staphylococcus aureus* suşları vankomisin dışında hemen tüm antibiyotiklere direnç kazanmış, stafilokok ve streptokok türlerinin makrolid direnci dikkat çekici boyutlara ulaşmıştır. Yine antibiyotiklerin en yaygın olarak kullanıldığı infeksiyonlar olan solunum yolu infeksiyonlarının önde gelen etkenlerinden *Streptococcus pneumoniae* penisilin direncinin bazı ülkelerde %50'ye ulaştığı, *Haemophilus influenzae* izolatlarının yaklaşık üçte biri ile *Moraxella catarrhalis* izolatlarının %90'ının ise β -laktamaz üretimi nedeniyle aminopenisilinlere direnç kazandığı gözlenmektedir [3-6].

Antibiyotik duyarlılık testleri

Bir infeksiyonun sağaltımı ile ilgili uygun antimikrobik ajanın seçiminde; olası infeksiyon etkeni, infeksiyon etkeninin antibiyotik duyarlılığı, ilacın *in vivo* aktivitesini etkileyebilecek konak faktörleri, infeksiyonun yeri, ilacın farmakodinamik ve farmakokinetik özellikleri gibi bir dizi faktörün değerlendirilmesi gereklidir [7-10].

Antimikrobik ajanın etken mikroorganizma üzerinde *in vitro* aktivitesi tedavide göz önüne alınması gereken faktörlerden biridir. Bir antibiyotığın antimikrobik aktivitesinin saptanması için uygulanan *in vitro* işlemlere genel olarak **duyarlılık testleri** adı verilmektedir [11,12]. Duyarlılık testleri, klinik açıdan önemli, hızlı üreyen aerop ve fakültatif anaerop bakterilerin tedavide uygulanacak antibakteriyel ajana du-

yarlılığının öngörülemediği durumlarda yapılır. Başka bir deyişle, mikroorganizmanın sağaltımında ilk seçenek olan antibiyotiğe duyarlılığı biliniyorsa test uygulanmamaktadır. Örneğin *Streptococcus pyogenes* suşlarının tümü penisiline duyarlı olduğu için, bu antibiyotiğe karşı duyarlılığın *in vitro* testlerle değerlendirilmesine gerek yoktur. Ancak, aşırı duyarlılık gibi bir nedenle penisilin kullanılmıyorsa, direnç bulunabilmesi nedeniyle ikinci seçenek olan eritromisine karşı duyarlılığın saptanması uygun olur.

Antimikrobik ilaçlara karşı duyarlılık birçok yöntem ile saptanabilmektedir. Rutin laboratuvarlarda uygulanan testlerle genellikle ilaçların inhibitör (bakteriyostatik) aktivitesi değerlendirilir. Bu amaçla uygulanan yöntemler:

1. Katı veya sıvı besiyerlerinde seyreltme (dilüsyon) yöntemleri
2. Disk difüzyon yöntemi
3. Gradyent difüzyon (Etest®) yöntemi
4. Antimikrobik ajanları inaktive eden enzimlerin saptanması olarak sıralanabilir [11,12].

Seyreltme yöntemlerinde standart sayıda bakteri topluluğu (inokulum), iki katlı dilüsyonlar şeklinde değişen yoğunluklarda antimikrobik ajan ile karşılaştırılır. İnkübasyon süresi sonunda gözle görünür üremeyi engelleyen en düşük antimikrobik ilaç yoğunluğu saptanır. Buna **Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK)** denir ve (mg/L) şeklinde ifade edilir. MİK değerinin duyarlılığı mı yoksa direnci mi temsil ettiğini belirlemek için, bulunan konsantrasyon **duyarlılık sınırı** adı verilen bir değer ile karşılaştırılır. MİK, bu sınırdan düşük ise

Tablo I. Klinik açıdan önemli bakteri türlerinde güncel direnç problemleri

Patojen mikroorganizma	Antibakteriyel ajan(lar)
Gram pozitif bakteriler	
Stafilokoklar	Penisilin, metisilin (tüm β -laktam ajanlar), makrolidler, kloramfenikol, trimetoprim- sulfametoksazol (SXT), fluorokinolonlar, vankomisin
Streptokoklar	Makrolidler, tetrasiklin, penisilin ve türevleri, kloramfenikol, SXT
Enterokoklar	Vankomisin dahil tedavide kullanılan antibakteriyellerin tümü
<i>Corynebacterium</i> spp.	Penisilin, klindamisin
<i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>	Vankomisin
<i>Listeria</i>	Penisilin (görece)*
Gram negatif bakteriler	
<i>Enterobacteriaceae</i> üyeleri (<i>E.coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>)	Genişlemiş spektrumlu β -laktam ajanlar, kinolonlar
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sefalosporinler, karbapenemler, kinolonlar, tüm antibakteriyellere direnç
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Karbapenemler, sefalosporinler, kinolonlar
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Karbapenemler, sefalosporinler
<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampisilin, amoksisilin, makrolidler, SXT
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Ampisilin, amoksisilin
*: Henüz direnç bildirilmemiştir.	

Tablo II. Antibiyogram yorumlanmasına ilişkin örnekler

Grup	Gözlenen fenotip	Çıkarılan mekanizma	Yorumlanan fenotip
Gram pozitif kok	Km ^R , Tb ^S , AK ^S , Gm ^S Km ^R , Tb ^R , AK ^S , Gm ^S Gm ^R	APH(3 ^I) ANT (4 ^I) APH(2 ^{II})-AAC (6 ^I)	Km ^R , Tb ^S , AK ^{I/R} , Gm ^S Km ^R , Tb ^R , AK ^{I/R} , Gm ^S Tüm aminoglikozidlere dirençli
<i>Streptococcus</i>	Em ^R	rRNA metilaz	Tüm makrolidlere dirençli
Enterobacteriaceae	Amino ve karboksipenisilin ^R Amino ve karboksipenisilin ^R , 3. kuşak sefalosporinlerden birine azalmış duyarlılık + klavulanat ile sinerji	TEM-1-2, SHV-1 (Grup 2b) Genişlemiş spektrumlu β-laktamazlar (GSBL) (Grup 2be)	Diğer penisilin türevleri (β-laktamaz inhibitörü olanlar hariç), 1-2. kuşak sefalosporinlere (sefamisinler hariç) dirençli Sefamisinler, karbapenemler ve β-laktamaz inhibitörü kombinasyonları dışındaki tüm β-laktamlara dirençli
Kaynak 17 ve 19'dan yararlanılmıştır. AK, amikasin; Gm, gentamisin; Em, eritromisin; Km, kanamisin, Tm, tobramisin; R, dirençli; I, "ortada"; S, duyarlı; AAC, aminoglikozit asetil transferaz; ANT, aminoglikozid nükleotidiltransferaz; APH, aminoglikozid fosfotransferaz			

mikroorganizma söz konusu ajana "duyarlı" olarak değerlendirilir. Bunun dışında "orta" ve "dirençli" kategorileri de saptanır. Duyarlılık sınırları, sağaltım sırasında ulaşılan serum ve doku düzeyleri ile, duyarlılık özelliği kesin olarak bilinen bakterilerin MİK değerleri göz önüne alınarak belirlenmektedir. Her antimikrobik ajan için bakteri türüne göre de değişen ayrı bir sınır değer söz konusudur. Genel olarak sağaltımın başarısı için MİK değerinin serum düzeyine (C_{max}) kıyasla 4-16 kez düşük olması istenmektedir [10]. Seyreltme temeline dayanan testler kantitatif sonuç verdiği için yeğlenmektedir. Sıvı besiyerindeki seyreltme yöntemleri, tüpte uygulanıyorsa makro (tüp) dilüsyon, mikrodilüsyon plaklarında uygulanıyorsa mikrodilüsyon olarak adlandırılır [11-13].

Disk difüzyon yönteminde belirli bir miktar antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler, test mikroorganizmasından hazırlanan standart süspansiyonun yayıldığı agar plakları yüzeyine yerleştirilir. Böylelikle, diskteki antibiyotik agar içerisine yayılır ve bakteriyeye etkili olduğu düzeylerde üremeyi engeller. Bunun sonucunda, disk çevresinde bakterilerin üremediği dairesel bir inhibisyon alanı oluşur. Bu alanın çapı ölçülerek "duyarlı", "orta" ve "dirençli" olacak şekilde duyarlılık kategorileri belirlenir. Bu kategoriler ile ilgili sınır değerleri, her antimikrobik ajan için MİK ile korele edilerek ve erişilebilir serum düzeyleri göz önüne alınarak saptanır [11,12,14].

Est: Difüzyon temeline dayanan ancak diskler yerine belirli ve sürekli bir konsantrasyon değişimi olacak şekilde antibiyotik içeren plastik striplerin kullanıldığı bir yöntemdir. İnkübasyon süresi sonunda, elips şeklindeki inhibisyon alanının stripi kestiği konsantrasyon MİK olarak belirlenir. Bu yöntem özellikle *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* gibi güç üreyen bakteri türlerinin MİK değerlerinin saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır [11,15].

Enzim üretiminin saptanması: *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *N. gonorrhoeae* gibi türlerde nitrosefin ile β-laktamaz aktivitesinin saptanması ya da *H. influenzae* izolatlarında kloramfenikol asetil transferaz enzimi aktivitesinin biyokimyasal yöntemlerle gösterilmesi, antibiyotik direncinin klasik yöntemlere kıyasla daha hızlı saptanabilmesini sağlamaktadır [11].

Bakteriyostatik aktiviteyi gösteren testler dışında bakteriyel aktiviteyi gösteren testler de bulunmaktadır.

Antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarının tekrarlanabilir olması, yani aynı koşullarda tekrarlandığında sonuçların aynı veya birbirine yakın olması gereklidir. Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları birçok faktörden etkilenmektedir. Bu nedenle testlerin uygun koşullarda yapıp yapılmadığı kalite kontrol suşları ile denetlenir. Kalite kontrol suşları, sonuçlarının tekrarlanabilirliği %95'in üzerinde olan suşlardır. Bu suşlarla beklenen sonuçlar elde edilemezse antibiyotik duyarlılık testlerinin tekrarlanması gerekir [13,14,16].

Bazı direnç mekanizmaları ise rutin duyarlılık testleri ile saptanamaz. Bunlar için özel ölçütler ve testler uygulanması gerekir. Örneğin, enterik bakterilerin 3.-4. kuşak sefalosporinler ve monobaktamlara dirençli olmasına yol açan GSBL'ler, özel duyarlılık kategorileri ve enzimin klavulanik asit ile inhibisyonuna dayanan özel yöntemlerle saptanabilmektedir [17,18].

Antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarının yorumlanması

Yeni antibakteriyellerin ve bunlara karşı direnç oranlarının gelişimine paralel olarak, son 10 yıl içerisinde bakterilerin direnç mekanizmaları ile ilgili bilgilerin de çok arttığı görülmektedir. Direnç mekanizmalarının daha iyi anlaşılması,

standart antibiyotik duyarlılık testlerinin yorumlanmasına ve dolayısıyla akılcı tedavi seçimine katkıda bulunmaktadır.

Sürekli yeni antibiyotikler geliştirilmesine rağmen, genel olarak, bir antibiyotik ailesindeki üyelerden birine karşı duyarlılık veya direnç bulunması, diğerleri ile ilgili yorum yapılabilmesini sağlamaktadır (Tablo II). Örneğin, başta streptokoklar olmak üzere Gram pozitif koklarda eritromisin direnci, klaritromisin, azitromisin gibi yeni makrolidlere karşı da direnç bulunduğunu göstermektedir [19]. Benzer şekilde antibiyotiğin hedefini değiştiren bir direnç mekanizması yapı olarak farklı, ancak aynı hedefe etkili tüm antibiyotiklere direnç gelişimine neden olmaktadır. Yine Gram pozitif koklarda eritromisin ve klindamisin direncinin birlikte saptanması, rRNA'daki hedef bölgesinin metilasyonunu ve bunun sonucunda, yapı olarak makrolidlerle ilişkisiz, ancak aynı hedefe etkili linkozamidler ve streptogramin B'ye karşı da direnç varlığını göstermektedir [20]. Bunlardan başka, Gram pozitif koklarda gentamisin direnci bulunması, 2^{II} fosfotransferaz/6^I asetil transferaz enzimi varlığını gösterir ki, *in vitro* olarak duyarlı bulunsa da bu suş tüm aminoglikozidlere dirençli olarak yorumlanmalıdır. Gram pozitif koklarda amikasin ve netilmisin ile alınan *in vitro* sonuçlar klinik sonuçlarla uyumsuz olduğu için duyarlılık testlerinde kullanılması anlamsızdır. Bu tip mikroorganizmalarda kanamisin direnci, amikasin için de değerlendirilebilir [19].

Duyarlılık test sonuçları mutlaka identifikasyon sonuçları ile birlikte değerlendirilmelidir. Bazı bakteri türleri genetik özellikleri açısından bir antibiyotiğin hedefi olan yapıyı hiç içermeyen ya da antibiyotiğin hedefe ulaşmasını engelleyecek bir yapıyı veya antibiyotiği inaktive edecek enzimleri taşıdığı için o antibiyotiğe dirençlidir. Buna **doğal direnç** adı verilmektedir [12]. Örneğin Gram negatif bakteriler hücre duvarındaki dış membran yapıları nedeniyle vankomisin gibi glikopeptidlere doğal olarak dirençlidir. Benzer şekilde, stafilokokların hücre duvar sentezinde görevli enzimleri (PBP) aztreonamı bağlamadığı için, stafilokoklar bu antibiyotiğe doğal olarak dirençlidir. Aminoglikozidlerin hücre içine alınması oksijene bağımlı aktif transport sistemi aracılığıyla olduğu için bu antibiyotikler anaerob bakterilere karşı etkisizdir. Çeşitli bakteri türlerinin doğal direnç özellikleri Tablo III'te özetlenmiştir.

Bakterilerin doğal direnç özelliklerinin bilinmesi, laboratuvarlarda karşılaşılan değişik bir direnç fenotipinin teknik bir hatadan mı yoksa yeni bir direnç mekanizmasından mı kaynaklandığını anlamamızı sağlar [11,19]. Yine bazı türlerde bazı direnç özellikleri sık olarak görülürken bazı türlerde görüldüğünde mutlaka hem identifikasyon hem de antibiyogram testlerinin tekrarlanması gerektiğini gösterir (Tablo IV).

National Committee for Clinical Laboratory Standarts (NCCLS) önerileri

Ülkemiz Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarlarında antibiyotik

Tablo III. Bakteri türlerinin doğal direnç özelliklerine ilişkin bazı örnekler

Bakteri genusu/türü	Dirençli olduğu antibiyotik
Anaerob bakteriler, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Burkholderia cepacia</i>	Aminoglikozidler
<i>Clostridium difficile</i>	Sefoksitin
<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Listeria</i> , <i>Haemophilus</i> <i>Neisseria</i> ve diğer Gram negatif bakteriler	Linkomisin
<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> <i>Leuconostoc</i> Gram negatif bakteriler	Vankomisin
<i>S. maltophilia</i>	Karbapenemler
<i>Enterococcus gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. flavescens</i>	Vankomisin
<i>Listeria</i>	Sefalosporinler
Kaynak 11, 19, 21'den yararlanılmıştır.	

duyarlılıklarının saptanmasında yaygın olarak National Committee for Clinical Laboratory Standarts (NCCLS) önerileri uygulanmaktadır. Bu nedenle, bu yazıda antibakteriyel duyarlılık değerlendirilmesinde NCCLS yönteminin uygulanması ve yorumlanması üzerinde durulacaktır.

Gram pozitif bakterilerin duyarlılık testleri için antibiyotik seçimi

Tedavide kullanılacak antibakteriyel ajanların sayısının her geçen gün artması, rutin duyarlılık testleri için denene-

Tablo IV. Seyrek görülen ve testlerin tekrarlanması gereken direnç fenotipleri

Fenotip	Mikroorganizma
Teikoplanin direnci Sadece tobramisin direnci	<i>Staphylococcus aureus</i>
Sefotaksim, seftriakson direnci Glikopeptid direnci	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i>
Karbapenem direnci Amino-, karboksipenisilin duyarlılığı	Enterobacteriaceae üyeleri <i>Klebsiella spp.</i>
SXT direnci 3. kuşak sefalosporin ve aztreonam direnci	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus spp.</i> <i>Providencia spp.</i>
Kaynak 18, 19, 21'den yararlanılmıştır	

cek antibiyotikler arasında bir seçim yapılmasını gerekli kılmıştır. Bu seçimde, klinik etkinliğinin kanıtlanmış olması, teste uygulanabilir formunun bulunması, rutin test ve saklama koşullarında dayanıklılık, değerlendirme ölçütlerinin ve alınan sonuçların aynı aileden diğer ajanlara uygulanabilirliğinin bilinmesi gibi antibakteriyel ajana ait özelliklerin yanı sıra, hastanın yaşı, infeksiyon bölgesi, hastane formülleri gibi bilgiler etkili olmaktadır [7]. NCCLS listelerinde etki spektrumları açısından eşdeğer ajanlar “veya” bağlacı ile ve genellikle aynı bölümde yer alır. Bu şekilde belirtilen ajanlar için duyarlılık test sonuçları ortak değerlendirilmelidir. Sonuçlar duyarlı (S), orta düzeyde (intermediate; I) veya dirençli (R) olarak belirtilir. Duyarlı kategorisi, başka bir kontrendikasyon yoksa belirtilen etkene bağlı olan infeksiyonun denenen ilacın uygun dozları ile tedavi edilebileceğini gösterir. I kate-

gorisi, MİK değerlerinin ilacın doku veya kan düzeylerine yakın olduğunu belirtir. Bu tip ilaçlar fizyolojik olarak konsantr edildikleri vücut bölgelerindeki infeksiyonların tedavisinde kullanılabilir (ör., kinolonlar ve β -laktamlar için idrar yolu infeksiyonlarında olduğu gibi). R kategorisi ise, bu izolatların ilacın normal sistemik düzeyleri ile inhibe edilemeyeceğini gösterir [13,14,22].

NCCLS'nin bu genel ilkeler içerisinde bazı Gram pozitif bakteriler için önerdiği liste Tablo V'te özetlenmiştir.

S. aureus ve koagülaz negatif stafilokoklarda (KNS) antibiyotik duyarlılık testleri ve yorumu

A. S. aureus için disk difüzyon ve dilüsyon testleri

1880'li yıllarda bir yara akıntısından izole edildiğinden beri

Tablo V. Gram pozitif bakterilerin duyarlılık testleri için antibiyotiklerin seçiminde NCCLS önerileri*

	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Diğer <i>Streptococcus spp.</i>	<i>Listeria spp.</i>
Direnç sorunu	<ul style="list-style-type: none"> • Metisilin direnci • Glikopeptidlere azalmış duyarlılık 	<ul style="list-style-type: none"> • Vankomisine direnç • Yüksek düzey aminoglikozid direnci 	<ul style="list-style-type: none"> • Penisilin ve Sefalosporinlere direnç 	<ul style="list-style-type: none"> • Penisilin ve türevlerine direnç 	<ul style="list-style-type: none"> • Penisilin duyarlılığında azalma
Antibiyotik kategorisi¹:					
A	Oksasilin Penisilin	Penisilin/ampisilin	Oksasilin diski Eritromisin SXT	Eritromisin Penisilin/ampisilin	Penisilin/ampisilin
B	Makrolidler (eritromisin, azitromisin veya klaritromisin) Klindamisin SXT Vankomisin	Vankomisin	Kinolonlar (ofloksasin, levofloksasin) Tetrasiklin Vankomisin	Kloramfenikol Klindamisin Vankomisin	
C	Kloramfenikol Kinolonlar (ofloksasin, siprofloksasin, levofloksasin) Rifampisin Tetrasiklin Gentamisin	Gentamisin (sadece yüksek düzey direnç tanımlaması için) Streptomisin (sadece yüksek düzey direnç tanımlaması için)	Kloramfenikol Rifampisin	Sefotaksim/seftriakson Ofloksasin	
U	Norfloksasin Nitrofurantoin Sulfisakzol Trimetoprim	Kinolonlar (siprofloksasin, norfloksasin, levofloksasin) Nitrofurantoin Tetrasiklin			

*: *Corynebacterium* ve *Bacillus* türleri için henüz duyarlılık test standartları belirlenmemiştir.

¹Kategoriler: Rutin olarak antibiyogramda yer alması ve bildirilmesi gereken antibakteriyel ajanlar **A** kategorisinde; başta hastane kökenli infeksiyonlar olmak üzere klinik açıdan önemli, antibiyogramda ön planda yer alması gereken, ancak sonuçları seçilerek bildirilen ajanlar **B** kategorisinde; ilk planda kullanılan antibakteriyellere direnç prevalansının yüksek olması ya da bunlara karşı aşırı duyarlılık bulunması durumunda test edilmesi gereken alternatif ajanlar veya epidemiyolojik açıdan duyarlılığın bilinmesinin önemli olduğu ajanlar ise **C** kategorisinde yer almaktadır. **U** Kategorisi ise idrar yolu infeksiyonlarında kullanılabilir olan ajanları kapsamaktadır.

önemli bir insan patojeni olarak bilinen *S. aureus*, içerdiği virulans faktörleri nedeniyle, tüm organ sistemlerinde infeksiyona neden olabilmektedir [23]. Bu mikroorganizmanın nozokomiyal patojenler arasında da ön sıralarda bulunması ve antibakteriyel ajanlara direnç özelliğinin giderek artması, hastane kökenli infeksiyonların tedavisinde önemli bir sorun oluşturmaktadır. Günümüzde *S. aureus* suşlarındaki direnç sorununun odağını metisilin direnci oluşturmaktadır [1,2,23-25].

Metisilin, nafsilin, oksasiline gibi penisilinazlara dirençli penisilinlere duyarlılığı azalmış olan *S. aureus* suşları 3 gruba ayrılabilir [24-26]:

- Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA): Bu suşlar *mecA* genince kodlanan yeni ve düşük afiniteli bir penisilin bağlayan protein (PBP2a) yapan suşlardır.
- PBP'lerinde nokta mutasyonu veya aşırı üretim gibi bir değişiklik olan suşlar.
- Aşırı β -laktamaz üretimi sonucunda metisilin duyarlılığı sınırda olan suşlar (Borderline methicilline susceptible [BSSA] veya borderline oxacilline resistant *S. aureus* [BORSA]).

Metisilin (oksasiline) direncinin saptanması

NCCLS önerilerine göre [22], stafilokok suşlarının penisilin ve oksasiline duyarlılıklarının saptanması ile tüm β -laktam ajanlar için yorum yapılabilmesi sağlanmaktadır. Bu nedenle bunlar dışındaki β -laktam ajanların, duyarlılık testlerinde yer almasına gerek yoktur:

- Eğer izolat penisiline duyarlı ise, tüm penisilin türevleri, sefamler, karbapenemlere duyarlıdır.
- İzolat penisiline dirençli, oksasiline duyarlı ise, β -laktamaz varlığı düşünülür. Bu tip suşlar, penisilin G, ampisilin, amoksisilin, azlosilin, karbenisilin, mezlosilin, piperasilin, tikarsiline dirençli, penisilinazlara dirençli penisilinler, β -laktamaz inhibitörlü β -laktam kombinasyonları, sefamler ve karbapenemlere duyarlıdır.

Nitrosetin hidrolizi gibi direkt β -laktamaz testi uygulaması ile de β -laktamaz üretimi ve yukarıda sayılan ajanlara direnç saptanabilir.

- İzolat oksasiline dirençli ise tüm β -laktam ajanlara dirençlidir. Bu tip suşlar, *in vitro* olarak sefamlere, β -laktam/ β -laktamaz inhibitör kombinasyonlarına, imipeneme duyarlı olarak görünebilir. Ancak bu ajanlarla klinik tedavi sonuçları başarısız olduğu için tüm β -laktam ajanlara **dirençli** olarak rapor edilmelidir.

Stafilokoklarda disk difüzyon ve dilüsyon testleri ile ilgili uygulama koşulları ve oksasiline duyarlılık sınırları Çizelge 1'de yer almaktadır.

- Disk difüzyonda direnç değerlendirilirken disk etrafındaki silik veya tek koloni şeklindeki üremeler de dikkate alınır.

- Test sonucu 'orta düzeyde' ise sadece *S. aureus* suşları için oksasiline-tuz agar tarama testi (Çizelge 1) uygulanır. Bu test KNS için önerilmemektedir [22].
- Metisiline dirençli suşların birçoğu diğer β -laktamlar, aminoglikozidler, makrolidler, klindamisin, tetrasiklin gibi ajanlara da dirençlidir. Bu nedenle, stafilokoklarda çoğul dirençlilik saptanması metisilin direncini düşündürmelidir.
- mecA* geni içermeyen, ancak oksasiline MİK değeri 2-8 mg/L olan suşlar BORSA olarak değerlendirilmektedir. BORSA suşlarının daha çok laboratuvar şartlarına bağlı olarak gözlenen bir fenotip olduğuna ilişkin bulgular mevcuttur ve bu fenotipin klinik tedavi açısından önemi de kesin değildir [27].

Glikopeptidlere duyarlılığı azalmış aureus (GISA) suşlarının saptanması

Glikopeptid grubu antibakteriyel ajanlar, çoğul dirençli Gram pozitif bakteriler ile gelişen ciddi infeksiyonların tedavisinde en güvenilir seçenekler olmalarına rağmen, 1997 yılında ilk kez Japonya'da daha sonra da Avrupa ve ABD'de vankomisine duyarlılığı azalmış (MİK 8 mg/L) *S. aureus* suşları bildirilmiştir [28-30]. GISA saptanması için:

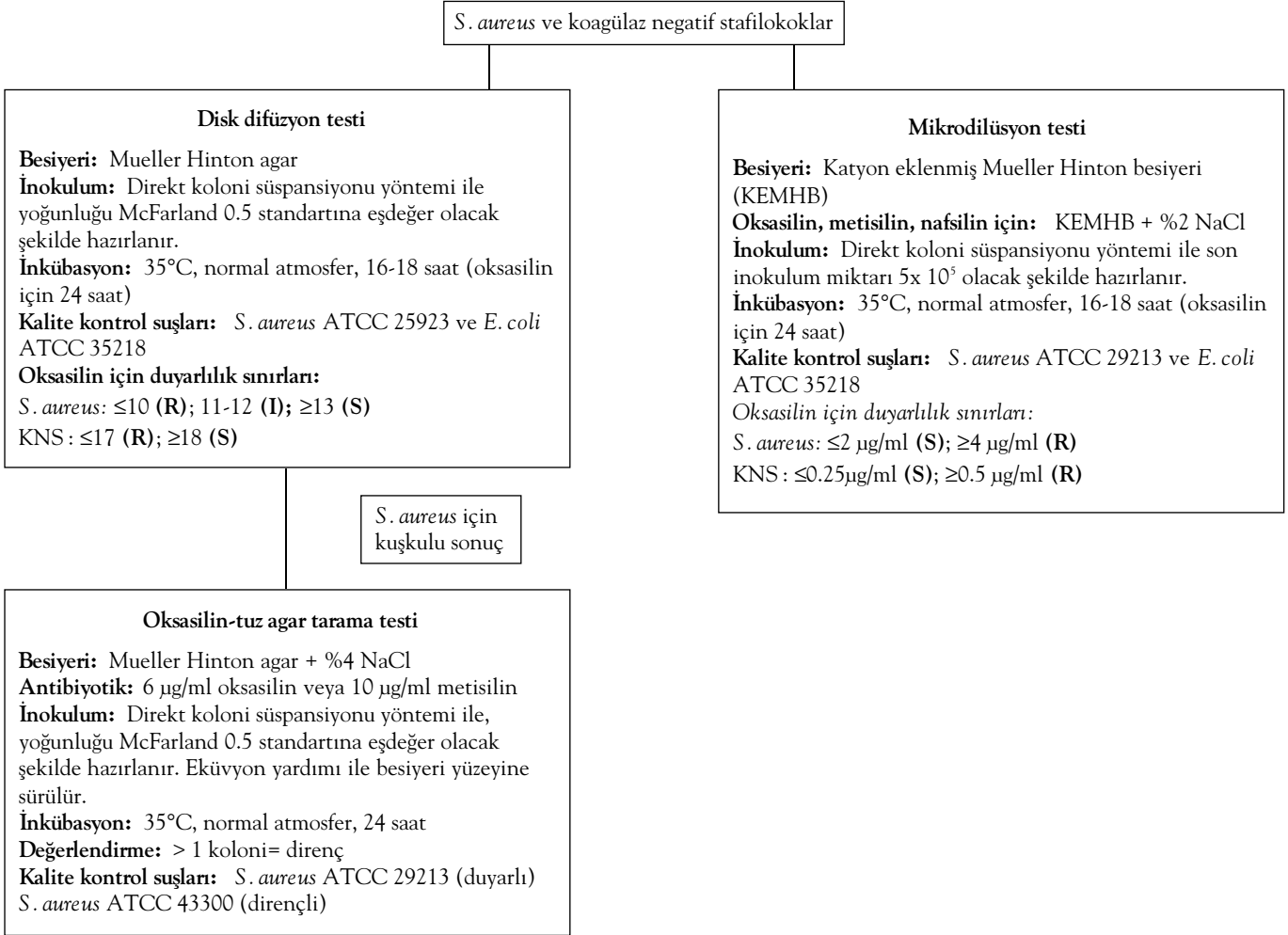
- Vankomisinli (6 mg/L) beyin-kalp infüzyon agarda tarama testi [22]
- Vankomisinli (5 mg/L) Mueller Hinton agarda tarama testi yapılması, bunlarda üreme olursa MİK değerlerinin saptanması önerilmektedir [37].

B. Koagülaz negatif stafilokoklarda (KNS) duyarlılık testleri

Koagülaz negatif stafilokoklar, özellikle yabancı cisimlerle ilişkili bakteriyemi etkeni olan geniş bir grubun ortak adıdır [24]. KNS türleri arasında *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*da *mecA* geni varlığı bildirilmiştir. Bu türler için önerilen duyarlılık testleri *S. aureus* ile benzer olmakla birlikte, 1999 yılında metisilin direnci ile ilgili duyarlılık sınırları değiştirilmiştir (bkz. Çizelge 1).

Enterokoklarda antibiyotik duyarlılık testleri ve yorumu

Enterokoklar özellikle hastane kökenli kan, yara ve idrar yolu infeksiyonlarının önde gelen etkenlerindedir. Son yıllarda enterokok türlerinde penisilinler, aminoglikozidler ve vankomisine dirençli suşların çıkması ve giderek artan oranlarda bildirilmesi, infeksiyonlarının tedavisi açısından sorun yaratmaktadır [32-34]. Ayrıca, bu bakterilerin *S. aureus*'a laboratuvar koşullarında bile olsa, vankomisin direncini aktarabilmesi, tehlikenin bir başka boyutunu oluşturmaktadır. Bu nedenle, özellikle vankomisine dirençli enterokokların

Çizelge 1. Stafilokoklarda metisilin direncinin saptanması için disk difüzyon ve mikrodilüsyon testlerinin uygulanımı ve değerlendirilme ölçütleri^{13,14}

(VRE) hastane ortamlarında gelişmesinin ve yayılmasının önlenmesi için sürekli olarak duyarlılık paternlerinin izlenmesi gereklidir. Ülkemizde VRE infeksiyonlarının oranı düşük olmakla birlikte, bu konudaki bildirimler yayılma açısından düşündürücüdür [35].

Enterokokların duyarlılık testlerinin yorumunda genel ilkeler

1. Sefalosporinler, aminoglikozidler (yüksek düzeyde direnç taraması hariç), klindamisin, trimetoprim-sülfametoksazol *in vitro* olarak etkin görünseler de klinik olarak enterokoklara etkisizdir. Bu nedenle enterokoklar bu ajanlara duyarlı olarak rapor edilmemelidir.
2. β-laktamaz üretmeyen enterokok suşları için penisilin duyarlılığı ampisilin, amoksisilin, sulbaktam/ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, piperasilin ve piperasilin/tazobaktam için genelleştirilebilir.
3. Beyin omurilik sıvısı ve kan izolatları için mutlaka nitrosefin hidrolizi ile β-laktamaz üretimi değerlendirilmelidir.

β-laktamazı pozitif bulunan suşlar, açılmino, karboksi ve üredopenisilinlere dirençlidir.

4. İzolat, penisiline veya ampisiline duyarlı bile olsa endokardit gibi ciddi bir infeksiyon söz konusu ise tedavide mutlaka bir hücre duvarı sentez inhibitörü ile bir aminoglikozid birarada kullanılmalıdır. Aminoglikozid kombinasyonunun etkin olup olmayacağını anlaşılması için yüksek düzey gentamisin veya streptomisin direnci belirlenir. Bu amaçla, 120 µg'lık gentamisin ve 300 µg'lık streptomisin diskleri kullanılarak difüzyon testi ya da gentamisin (500 mg/L) veya streptomisin (1000 mg/L) içeren beyin-kalp infüzyon (BKİ) besiyeri kullanılarak mikrodilüsyon testi uygulanır. Bu ajanlara karşı yüksek düzeyde direnç söz konusu ise sinerjik etki ortadan kalkar.
5. Vankomisin duyarlılığı 24 saat inkübasyondan sonra değerlendirilir. Disk difüzyonda plak ışığa tutularak inhibisyon zonu içerisindeki ince üreme de değerlendirilmelidir.

Ayrıca vankomisine direnç araştırılmasında vankomisin-agar tarama testi de uygulanabilir. Bu amaçla 6 mg/L vankomisin içeren BKİ agarı kullanılmaktadır.

Bazı enterokok türleri (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*) vankomisine doğal olarak dirençlidir (Van C1-C3 tipi direnç) [12,36]. Bu türler *in vitro* testlerde vankomisine duyarlı da olsa 'orta düzeyde' kategoride kabul edilmelidir. Vankomisine dirençli bulunan enterokoklarda doğru tür tanımının yapılması enfeksiyon kontrolü açısından önem taşımaktadır. Van C tipi direnç elemanlarını taşıyan türler, ancak kısıtlı olarak yayılmakta, hastane salgınları açısından tehlike oluşturmamaktadır. Buna karşın, tür identifikasyonunun kazanılmış ve hareketli direnç elemanları içeren *E. faecalis* veya *E. faecium* olması, enfeksiyon kontrolü için hızla önlem alınmasını gerektirmektedir.

Enterokoklarda yüksek düzey aminoglikozid direnci ve vankomisin direncinin saptanması için NCCLS tarama testi önerileri Tablo VI'da gösterilmiştir [22].

Pnömonoklarda antibiyotik duyarlılık testleri ve yorumu

Başta penisilin grubu olmak üzere β -laktam ajanlara dirençli *Streptococcus pneumoniae* kökenleri tüm dünyada giderek artan oranlarda bildirilmektedir [37]. Bu türde β -laktam direncinin rutin testlerle ve erken olarak tanınabilmesi klinik tedavi açısından çok önemlidir. Çünkü pnömonok enfeksiyonlarının tedavisinde ilk seçenek penisilindir ve penisiline duyarlılık azalmışsa, özellikle menenjit gibi enfeksiyonlarda, tedavi başarısızlıklarının oranı çok artmaktadır [38,39].

Pnömonoklarda penisilin direncinin taranması amacıyla oksasilin (1 μ g) ile disk difüzyon testi uygulanmaktadır. Ancak sefalosporin duyarlılığının taranması için kullanılacak yöntem arayışları sürmektedir.

Oksasilin disk tarama testinde inhibisyon zon çapı ≥ 20 mm olan suşlar, penisiline duyarlıdır (MİK ≤ 0.06 mg/L); buna karşın inhibisyon zon çapı ≤ 19 mm olan suşlar, penisiline

Tablo VI. Enterokoklarda yüksek düzey aminoglikozid direnci ve vankomisin direnci saptanmasında önerilen tarama testleri

	Gentamisin (Yüksek düzey direnç)	Streptomisin (Yüksek düzey direnç)	Vankomisin direnci
Besiyeri	BKİ sıvı besiyeri veya agarı	BKİ sıvı besiyeri veya agarı	BKİ agar
Antibiyotik konsantrasyonu	500 μ g/ml	Sıvı besiyeri: 1000 μ g/ml Agar: 2000 μ g/ml	6 μ g/ml
İnokulum hazırlanması	Sıvı besiyerinde üretme veya direkt koloni süspansiyonu yöntemi ile 0.5 McFarland bulanıklığında bir süspansiyon hazırlanır. Agar taramada: Bu süspansiyondan 10 μ l agar yüzeyine damlatılır. Sıvı besiyeri ile tarama yönteminde ise standart sıvı dilüsyon önerilerine uyulmalıdır.	Gentamisin için belirtilen öneriler geçerlidir.	Sıvı besiyerinde üretme veya direkt koloni süspansiyonu yöntemi ile 0.5 McFarland bulanıklığında bir süspansiyon hazırlanır. Bu süspansiyondan 10 μ l agar yüzeyine damlatılır.
İnkübasyon koşulları	35°C, normal atmosfer	35°C, normal atmosfer	35°C, normal atmosfer
İnkübasyon süresi	24 saat	24-48 saat (24 saatte duyarlı ise inkübasyon sürdürülür)	24 saat
Sonuçlar	Agar: >1 koloni üreme=dirençli Sıvı: Tüm üremeler= dirençli Dirençli- hücre duvarına etkili ajanlarla beraber kullanıldığında sinerjistik etki göstermesi beklenmez. Duyarlı-hücre duvarına etkili ajanlarla beraber kullanıldığında sinerjistik etki gösterir.	Agar: >1 koloni üreme=dirençli Sıvı: Tüm üremeler= dirençli Dirençli-hücre duvarına etkili ajanlarla beraber kullanıldığında sinerjistik etki göstermesi beklenmez. Duyarlı-hücre duvarına etkili ajanlarla beraber kullanıldığında sinerjistik etki gösterir.	>1 koloni üreme= olası direnç Vankomisin MİK değeri belirlenir. Ayrıca, hareket, pigment üretimi vb değerlendirilerek kazanılmış direnç (van A, van B, van D, van E) ile intrinsik direnç (van C) ayırt edilmeye çalışılır.
Kalite kontrol suşları	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (duyarlı) <i>E. faecalis</i> ATCC 54299 (dirençli)	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (duyarlı) <i>E. faecalis</i> ATCC 54299 (dirençli)	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 <i>E. faecalis</i> ATCC 54299

dirençli (MİK ≥ 2 mg/L), orta (düşük düzeyde dirençli) (MİK 0.12-1 mg/L) veya duyarlı olabilmektedir. Bu nedenle inhibisyon zonu çapı 19 mm ve daha küçük olan suşlarda penisilin ve ayrıca seftriakson veya sefotaksim MİK değerleri güvenilir bir seyreltme yöntemi ile ölçülmelidir. Kanada'da yapılan bir çalışmada, ancak disk etrafında hiç inhibisyon zonu bulunmadığı durumlarda suşların yüksek ya da düşük düzeyde dirençli olduğu, bu nedenle de böyle bir durumla karşılaşıldığında sonucun "penisiline dirençli" olarak kabul edilebileceği öne sürülmektedir [14]. ABD'de yapılan bir çalışmada ise, penisilin MİK değerlerinin amoksisilin, amoksisilin/klavulanik asit ve seftriakson MİK değerlerini de yansıttığı belirtilmektedir.

Pnömonoklar için NCCLS'ce önerilen duyarlılık test yöntemleri Tablo VII'de gösterilmiştir.

Pnömonoklarda antibiyogram sonuçlarının yorumunda genel ilkeler

1. Pnömonok infeksiyonlarının tedavisinde amoksisilin, amipisilin, sefepim, seftriakson, sefotaksim, sefuroksim, imipenem/meropenem kullanılabilir. Ancak bunlar için henüz güvenilir bir disk difüzyon testi bulunmamaktadır. Oksasilin diski ile tarama yapılır. İnhibisyon zonu çapı 19 mm ve daha darsa penisilin MİK değerleri saptanır. Buna karşın zonu çapı 20 mm ve üzerinde olanlar penisilin G ve amoksisilin, amipisilin, sefepim, seftriakson, sefotaksim, sefuroksim, imipenem/meropenem, seftibuten, sefaklor, sefdinir, seftizoksim, lorakarbefe duyarlı kabul edilir. Bu ajanlar ayrıca test edilmemelidir.
2. Kan ve BOS izolatları için penisilin, seftriakson/sefotaksim, meropenem/imipenem ve vankomisin MİK değerleri rutin olarak bildirilmelidir.

3. Penisiline düşük veya yüksek düzeyde direnç saptandığında sefotaksim ve seftriakson MİK değerleri belirlenmelidir.
4. Pnömonoklarda eritromisin duyarlılığı diğer makrolidlere duyarlılık veya direncin yorumlanması için kullanılabilir.
5. Ofloksasin duyarlılığı, levofloksasin duyarlılığını da göstermektedir.

Penisilin MİK değerleri ile ilgili olarak solunum yolu izolatları için duyarlılık sınırlarının $S \leq 1$ $\mu\text{g/ml}$; $I 2$ $\mu\text{g/ml}$; $R \geq 4$ $\mu\text{g/ml}$ olarak değiştirilmesi önerilmektedir [42].

S. pneumoniae dışı streptokok türlerinde antibiyotik duyarlılık testleri

S. pneumoniae dışındaki streptokok türleri için önerilen duyarlılık testi uygulama koşulları, agar seyreltme yöntemi dışında *S. pneumoniae* için bildirilenlerle genel olarak aynıdır [22].

β -hemolitik streptokoklar içerisindeki en önemli tür olan *S. pyogenes* için penisilin duyarlılığına bakılması gerekmez. Çünkü *S. pyogenes* suşları halen penisiline duyarlıdır. Buna karşın *S. agalactiae* suşlarında penisilinlere azalmış duyarlılık söz konusudur.

Streptokok suşları penisiline duyarlı ise, diğer β -laktamlara da duyarlı kabul edilir. Eğer penisilin veya amipisilin duyarlılığı "orta düzeyde" çıkarsa, tedavide bakterisidal etkinliğin gerektiği durumlarda bir aminoglikozid ile kombinasyon uygulanması önerilir.

Steril boşluklardan üretilen viridans streptokokların penisilin duyarlılığı seyreltme yöntemleriyle saptanmalıdır.

Pnömonoklarda olduğu gibi diğer streptokoklarda da eritromisin duyarlılığı ile ilgili sonuçlar tüm makrolidler için genelleştirilebilir.

Ayrıca son yıllarda gerek pnömonoklar gerekse diğer streptokok türlerinde makrolid direncinin dikkate değer boyutlara ulaştığı gözlenmektedir. Bu nedenle *S. pyogenes* ve diğer β -hemolitik streptokoklarla *S. pneumoniae* izolatlarında eritromisin için duyarlılık testi yapılmalıdır. Bilindiği gibi streptokok türlerinde makrolid direnci ribozomal hedefin değişiminden kaynaklanıyorsa, makrolidlerle aynı hedefe bağlanan linkozamidleri ve streptograminleri (B) de etkilemektedir. Seppala ve arkadaşları tarafından önerilen basit bir disk difüzyon testi streptokok türlerinde makrolid direncinin hedef değişiminden mi (*erm* metilazlarına bağlı

Tablo VII. NCCLS'ye göre pnömonoklar için önerilen disk difüzyon ve seyreltme test koşulları

	Disk difüzyon	Mikrodilüsyon
Besiyeri	%5 koyun kanlı Mueller Hinton agar	KEMHB + %2-5 lize at kanı
İnokulum hazırlanması	Direkt koloni süspansiyonu yöntemi ile 0.5 McFarland yoğunluğunda hazırlanır.	Direkt koloni süspansiyonu ile son hacimde 5×10^5 koloni/ml olacak şekilde hazırlanır.
İnkübasyon koşulları	35°C, %5-10 CO ₂ , 24 saat	35°C, normal atmosfer, 20-24 saat
Yorum	≥ 20 mm (S) ≤ 19 mm (R) (oksasilin [1 μg] diski ile yapılır)	≥ 2 mg/L (R) 0.12-1 mg/L (I) ≤ 0.06 mg/L (S)
Kalite kontrol suşları	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619 <i>E. coli</i> ATCC 35218

Tablo VIII. Gram negatif bakteriler için duyarlılıklarının değerlendirilmesi gereken antibiyotikler

	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve <i>Acinetobacter</i> türleri *	<i>Haemophilus</i> türleri
Direnç sorunu	GSBL üretimi İnhibitörlere dirençli β -laktamaz (IRT) üretimi Amp C tipi enzim varlığı Kinolon direnci	Karbapenem hidrolize eden enzimler Kromozomal β -laktamazlar Aktif pompa sistemlerine bağlı çoğul direnç	β -laktam direnci (TEM-1, ROB-1 üretimi, PBP 3 değişimleri)
Antibiyotik kategorisi:			
A	Ampisilin Sefazolin veya sefalotin Gentamisin	Seftazidim Gentamisin Mezlosilin veya tikarsilin Piperasilin	Ampisilin Trimetoprim/sülfametoksazol
B	Amikasin Amoksisilin/klavulanat veya sulbaktam ampisilin Piperasilin/tazobaktam Tikarsilin/klavulanat Sefuroksim veya sefamandol Sefepim Sefotetan veya sefoksitin Sefotaksim veya seftizoksım veya seftriakson Siprofloksasin veya levofloksasin İmipenem veya meropenem Piperasilin veya mezlosilin Tikarsilin SXT	Amikasin Aztrenam Sefoperazon Sefepim Siprofloksasin İmipenem veya meropenem Tobramisin	Sefotaksim veya seftazidim veya seftizoksım veya seftriakson Sefuroksim sodyum (parenteral) Kloramfenikol Meropenem
C	Aztreonam ve seftazidim (GSBL için önemli) Kloramfenikol Kanamisin Tetrasiklin Tobramisin	Sefotaksim veya seftriakson Kloramfenikol Netilmisin Trimetoprim/sülfametoksazol	Azitromisin veya klaritromisin Aztreonam Sefaklor veya sefprozil veya lorakarbef veya sefiksim veya sefpodoksım Sefuroksim aksetil (oral) Siprofloksasin veya grepfloksasin veya levofloksasin veya ofloksasin İmipenem Rifampisin Tetrasiklin
U	Karbenisilin Nitrofurantoin Norfloksasin veya ofloksasin veya lomefloksasin Sulfisaksazol Trimetoprim	Karbenisilin Seftizoksım Levofloksasin veya norfloksasin veya ofloksasin veya lomefloksasin Sulfisaksazol Tetrasiklin	

* Diğer non enterik bakteriler için (*S. maltophilia*, *Burkholderia cepacia*) aynı ajanlar uygulanarak, ancak sadece seyreltme temeline dayanan yöntemler kullanılmalıdır. Mukoid *P. aeruginosa* için referans yöntem mikrodilüsyon olmasına rağmen disk difüzyon ve Etest ile korelasyonu yüksektir. *B. cepacia* için imipenem yerine meropenem yeğlenmelidir.

MLS_B tipi direnç) yoksa aktif pompa sistemlerinden mi (*mef* genlerine bağlı M tipi direnç) kaynaklandığını anlamak için kullanılabilir [43]. Testte eritromisin (15

μg) ve klindamisin (2 μg) diskleri, duyarlılığı incelenecek suşun yayıldığı koyun kanlı agar yüzeyine, diskler arası mesafe 15-20 mm olacak şekilde yerleştirilir. Her iki disk etra-

finda inhibisyon zonunun bulunmaması *erm* metilazlarının sürekli olarak yapıldığını gösterir (cMLS) [44]. Bu tip suşlar 14, 15, 16 üyeli makrolidlere, ketolidlere, linkozamidlere ve streptogramin B'ye dirençlidir. Eritromisin diski etrafında inhibisyon alanı bulunmaması ve klindamisin zonunun eritromisine bakan tarafta düzleşmesi indüklenbilir tipte MLS direncini göstermektedir. Bu suşlar da yukarıda sayılan antibiyotiklere dirençli olarak bildirilmelidir. Buna karşın, eritromisine direnç olduğu halde klindamisin zonunda herhangi bir daralma görünmüyorsa makrolid direncinin aktif pompa sistemlerine bağlı olduğu düşünülür (M tipi). Bu direnç mekanizmasından sadece makrolidler etkilenmektedir [45].

Gram negatif bakterilerin duyarlılık testleri için antibiyotik seçimi

Gram negatif bakterilerdeki güncel direnç mekanizmaları ve NCCLS'nin bunlar için önerdiği liste Tablo VIII'de özetlenmiştir.

Haemophilus türleri için genel öneriler:

1. Duyarlılık testi *Haemophilus* Test Medium (HTM) kullanılarak uygulanmalıdır. İnokulum direkt koloni süspansiyonu ile hazırlanmalıdır. İnkübasyon koşulları, %5 CO₂'li ortamda, 35°C'de, 16-18 saat şeklinde düzenlenmelidir.
2. Menenjit, bakteriyemi, epiglotit gibi yaşamı tehdit edici nitelikteki infeksiyonlarda elde edilen *H. influenzae* kan ve BOS izolatları için sadece ampisilin, 3. kuşak sefalosporinlerden biri ve kloramfenikol duyarlılık sonuçları rutin olarak bildirilmelidir.
3. Amoksisilin/klavulanat, azitromisin, klaritromisin, sefaklor, sefprozil, sefuroksim aksetil gibi oral ajanlar solunum yolu infeksiyonlarının sağaltımında empirik olarak uygulanmaktadır. Genellikle bu ajanlarla duyarlılık test uygulamasının hasta açısından bir yararı yoktur ama epidemiyolojik açıdan yapılabilir.
4. Ampisilin testi sonuçları amoksisilin için de göstergedir. Ayrıca, direkt β-laktamaz testi uygulanarak bu ajanlara karşı direnç saptanabilir.
5. Nadir olmakla birlikte β-laktamaz negatif, ancak ampisiline dirençli suşlar (BLNAR) amoksisilin/klavulanat, ampisilin/sulbaktam, sefaklor, sefuroksim, lorakarbefe dirençli olarak rapor edilmelidir.

Bush grup I β-laktamaz üreten Gram negatif bakteriler

Kromozomal Bush Grup I β-laktamazları (Amp C tipi enzimler) yüksek oranda üreten bazı Gram negatif bakterilerde geniş spektrumlu penisilinlere ve sefalosporinlere direnç görül-

mektedir. Bu durum en sık *Enterobacter* türleri, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* da görülmektedir [17,46]. Grup I β-laktamazlar indüklenbilir özelliktedir [47]. Yani normalde bakteri tarafından az miktarda sentezlenen enzim, ortamda bulunan bir indükleyicinin etkisi ile yüksek miktarlarda sentezlenmeye başlar. Farklı β-laktam ajanların bu β-laktamazları indükleme yeteneği ve indükledikleri enzimlere dayanıklılıkları farklıdır. Normalde indüksiyon etkisi geçici olup indükleyicinin etkisi kalkınca tekrar bazal düzeye döner. Ancak bu tip β-laktamazları üreten türlerde esas sorun, indüksiyona gerek olmaksızın yüksek oranda β-laktamaz üreten (dereprese) mutantların bulunmasıdır. Bu mutantlar bakteri topluluğunda 10⁻⁵-10⁻⁸ sıklığında bulunur. 2. kuşak, 3. kuşak sefalosporinler, aztreonam ve üreidopenisilinler bu tip β-laktamazlar için zayıf indükleyiciler olmalarına karşın, üretilen enzim tarafından parçalanır. Dolayısıyla, bu ajanlar, tedavide tek başlarına kullanılmaları halinde dereprese mutantları seçme özelliğindedir. Bunun sonucunda tedavi başarısızlıkları ortaya çıkmaktadır. Üçüncü kuşak sefalosporinlerle bakteriyemi tedavisi sırasında dereprese mutantların seçilme sıklığı %20-40 olarak bildirilmektedir [47]. İndüklenbilir β-laktamaz (İBL) varlığı disk indüksiyon testi ile gösterilebilir [48]. Bu testte kuvvetli indükleyiciler olan imipenem veya sefoksitin diskleri 3. kuşak sefalosporin diskleri ile aralarındaki mesafe 1.5-2 cm olacak şekilde yan yana agar yüzeyine yerleştirilir. Sefalosporin diskinin zonunda indükleyiciye bakan tarafta bir düzleşme olması İBL varlığı açısından pozitif olarak değerlendirilir.

- Laboratuvarından İBL varlığı bildirilmese bile yukarıdaki türlerin bu özellikte olduğu bilinmelidir.
- Bu türlerle gelişen infeksiyonlarda 2.-3. kuşak sefalosporinlerin ve aztreonamın tek başına kullanılmasından kaçınılmalıdır.
- Uzun süreli tedavi söz konusu ise bu türlerin antibiyotik duyarlılık testleri 3-4 günde bir tekrarlanmalıdır.

Genişlemiş spektrumlu β-laktamaz üreten *Enterobacteriaceae* üyeleri

Genişlemiş spektrumlu β-laktamazlar, TEM-1, TEM-2, SHV-1 gibi enzimlerden birkaç nokta mutasyonu ile gelişmiş ve penisilinler, 3. ve 4. kuşak sefalosporinlerle monobaktamları inaktive edebilme özelliğinde enzimlerdir [46, 49-51].

Günümüzde TEM 3-69, SHV 2-24 olmak üzere 90 civarında GSBL bulunmaktadır. GSBL üreten suşlarla gelişen infeksiyonların sağaltımında genişlemiş spektrumlu β-laktamazların kullanılması halinde tedavi başarısızlıkları görülmektedir [42]. Bu nedenle GSBL'lerin saptanabilmesi önemlidir.

- GSBL üretimi normal duyarlılık testleri ile saptanamayabi-

- lır. Bu nedenle etkilenen antibiyotiklere azalmış duyarlılık GSBL göstergesi olarak kabul edilir.
- GSBL üreten suşlar bazı genişlemiş spektrumlu β -laktam ajanlara duyarlı gibi görünmeler de MİK değerlerinde **inokulum etkisi** görülür. İnokulum etkisi, GSBL üreten mikroorganizmaların bakteri sayısının yüksek olduğu durumlarda, direnç düzeylerinin de yükseldiğini açıklayan bir tanımdır. Önerilen inokulum düzeylerinde (5×10^5 bakteri/ml) MİK değerleri düşüktür, ancak inokulum bir infeksiyon bölgesinde olduğu gibi 10^7 'ye çıkarıldığında MİK değerleri 100-500 kat yükselmektedir. Bu durum, neden *in vitro* testlerde duyarlı gibi görünmeler de GSBL yapan bakterilerin etken olduğu infeksiyonlarda genişlemiş spektrumlu β -laktam kullanımından kaçınılması gerektiğini gösterir.
 - Enzimin substrat profili değişik olabildiği için tutarsız veya mantıksız sonuçlar görülebilir. Bu nedenle antibiyogramlarda indikatör antibiyotiklerin hemen hemen tümünün yer alması önerilmektedir [17].
 - 3. kuşak sefalosporinlerden herhangi birinin MİK değeri ≥ 2 mg/L olarak saptandığında ya da seftazidim ve sefpodoksim inhibisyon zon çaplarının ≤ 22 mm; aztreonam ve sefotaksim zon çaplarının ≤ 27 mm; seftriakson zon çapının ≤ 25 mm olduğu durumlarda GSBL varlığı için doğrulama testi yapılmaktadır [22].
 - Doğrulama testlerinde söz konusu enzimlerin klavulanik asit ile inhibisyonu temeline dayanan yöntemler uygulanır [17,22,53]:
1. Çift disk sinerji testi: GSBL varlığı araştırılan mikroorganizmanın yayıldığı Mueller-Hinton besiyeri yüzeyine bir amoksisilin/klavulanik asit diski ile bundan 2 cm uzaklıkta olacak şekilde sefotaksim, seftazidim, aztreonam ve sefepim diskleri yerleştirilir. 35°C 'de 18 saat inkübasyondan sonra genişlemiş spektrumlu β -laktam disklerinden herhangi birinin inhibisyon zonuunun AMC diskinde doğru genişlemesi,
 2. Mikrodilüsyon testinde 4 mg/L klavulanik asit eklenmesiyle genişlemiş spektrumlu β -laktam ajanların MİK değerlerinde ≥ 8 kat azalma saptanması,
 3. Bir tarafında seftazidim diğer tarafında seftazidim ve klavulanik asit bulunan E-Test striplerinde klavulanik asit etkisiyle MİK değerinde ≥ 8 kat azalma saptanması,
 4. Üzerine klavulanik asit (10 μg) damlatılan genişlemiş spektrumlu β -laktam disklerinin zon çaplarında ≥ 5 mm genişleme saptanması GSBL üretimi açısından pozitif kabul edilir.
 - Doğrulama testleri bu suşların Amp C tipi üreten suşlardan ayırımı için önemlidir. Amp C tipi β -laktamazlar β -laktamaz inhibitörlerinden etkilenmez. Ayrıca daha önce de belirtildiği gibi Amp C tipi β -laktamazlar 3. kuşak se-

- falosporinlerin yanı sıra, sefoksitin direncine de yol açar.
- GSBL üreten suşlar genellikle gentamisin ve SXT'ye de dirençlidir. Çoğul direnç özelliği de bu tip enzimler için bir diğer ipucu olabilir.
 - Bir izolatin GSBL ürettiği saptandığında *in vitro* duyarlılık sonucu ne olursa olsun, tüm sefalosporinler, penisilin türevleri ve monobaktamlara dirençli olarak rapor edilmelidir [22]. Ancak β -laktamaz inhibitör kombinasyonları ve sefamisinler bu enzimlerden etkilenmedikleri için duyarlılık sınırlarına göre değerlendirilirler [17].

Metalloenzim üreten Gram negatif bakteriler

Metalloenzimler karbapenemler dahil olmak üzere tüm β -laktam ajanları parçalayabilen enzimlerdir [44]. Sadece aztreonam üzerinde etkileri daha azdır. Karbapenemlerin yaygın olarak kullanılması bu tip enzimleri üreten mutantların seçilmesi ile sonlanmıştır. Metalloenzimler *Stenotrophomonas maltophilia*da intrinsik olarak bulunmaktadır. Bunun dışında *P. aeruginosa* A. *baumanni* ve *S. marcescens* suşlarında da bildirilmiştir.

Metalloenzimler aktif bölgelerinde bir Zn iyonu taşıdığından tanımlanmalarında bu çinko iyonuna bağlanarak enzimi inaktive eden EDTA, 2-merkaptopropionik asit gibi bileşikler kullanılır [45,56].

Hastane salgınları açısından önemli bakteri türlerinde buldukları için tanımlanmaları infeksiyon kontrolü açısından önemlidir.

Sonuç olarak; sık karşılaşılan, klinik açıdan önemli bakteri türlerinin antibakteriyellere direnç mekanizmaları ile ilgili bilgilerimiz ışığında, doğru uygulanan ve doğru yorumlanan antibiyotik duyarlılık test sonuçlarının klinik tedavi açısından en akılcı seçimin yapılmasına olanak sağlayacağı görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Bassetti D, Bassetti M, Montero E. Strategies for antibiotic selection in empirical therapy. Clin Microbiol Infect 2000; 6 (suppl 3):98-100.
2. Moellering RC Jr. Problems with antimicrobial resistance in Gram positive cocci, Clin Infect Dis 1998; 26: 1177- 8.
3. Lister PD. Emerging resistance problems among respiratory tract pathogens. Am J Manag Care 2000; 6 (suppl 8):S409-18.
4. Blondeau JM, Tilloran GS. Antimicrobial susceptibility patterns of respiratory pathogens; a global perspective. Semin Respir Infect 2000; 15:195-207.
5. Hsueh PR, Liu YC, Shyr M et al. Multicenter surveillance of antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* & *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* in Taiwan during 1998-1999 respiratory season. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:1342-5.
6. Gür D, Özalp M, Sümerkan B, et al. Prevalance of antimicrobial resistance in respiratory tract pathogens from five centers in Turkey. 8th International Congress of Infectious Diseases, Boston, 1998; Abst.no. 82011.
7. Arman D. Etkene göre antibiyotik seçimi. Türk Mikrobiyoloji Ce-

- miyeti Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu (ADTS) Çalışma Grubu, Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı kitabında, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No. 33, İstanbul, 1998, s: 9.
8. Moellering RC. Principles of antinfective therapy. In: Mandell GL, Bennett JG, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases, 4th ed, New York, Churchill Livingstone, 1995, pp:199-212.
 9. Kaygusuz A. Antibiyotik seçimini etkileyen faktörler ANKEM Derg 2000;14: 497-581.
 10. Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. Clin Infect Dis 1998;26:1
 11. Jorgensen JH. Laboratory issues in the detection and reporting of antibacterial resistance. Infect Dis Clin North Am 1997; 11:785-802.
 12. Gülay Z. Antimikrobiyal ilaçlara direnç. In: Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö (editörler). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara. Güneş Kitabevi. 1999, 91-108.
 13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically. Approved standart M7-A4, Wayne Pa, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997
 14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standarts for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standart M2-A5, Wayne Pa, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997
 15. Baker CN, Stocker SA, Culver DM et al. Comparison of E-test to agar dilution, broth microdilution and agar difusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. J Clin Microbiol 1991;29:533-8.
 16. Kaygusuz A. Hastanede sık rastlanılan antibiyogram örnekleri. ANKEM Derg 2000; 14:512-7.
 17. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: special needs for fastidious organisms and difficult-to-detect resistance mechanisms. Clin Infect Dis 2000;30:799-808.
 18. Tenover FC, Mohammed MJ, Gorton TS, Dembek ZF. Detection and reporting of organisms producing extended spectrum β -lactamases: survey of laboratories in Connecticut. J Clin Microbiol 1999;37:4065-70.
 19. Courvalin P. Interpretive reading of *in vitro* antibiotic susceptibility tests (the antibiogramme). Clin Microbiol Infect 1996; 2(suppl 1): S26-34.
 20. Seppala H, Skurnik M, Soini H, Roberts MC, Huovinen P. A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes* Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 257-62.
 21. Kaygusuz A. Antibiyogram duyarlılık sonuçlarının doğru yorumu. Flora 2000;5:13-23.
 22. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standarts for antimicrobial susceptibility testing; 11th informational supplement M 100- S11, Villanova, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2001.
 23. Archer GL. *Staphylococcus aureus* a well armed pathogen. Clin Infect Dis 1998; 26: 1179-81 .
 24. Hackbarth CJ, Kocagöz T, Kocagöz S, Chambers HF. Point mutations in *Staphylococcus aureus* *BFP 2* gene affect penicillin-binding kinetics and are associated with resistance. Antimicrob Agents Chemother 1995;39: 103-6.
 25. HenzeUU, Berger-Bachi B. Penicillin binding protein 4 overproduction increases β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* Antimicrob Agents Chemother 1996;40: 2121-5.
 26. Song M, Wachi M, Doi M, Ishimo F, Matsubashi M. Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. FEMS Lett 1987;221: 167 -70.
 27. Petersson AC, Kamme C, Miörner H. Disk with high oxacillin content discriminates between methicillin-resistant and borderline methicillin –susceptible *Staphylococcus aureus* strains in disk diffusion assays using a low salt concentration. J Clin Microbiol 1999;37: 2047-50.
 28. Centers for Disease Control and Prevention. Update: *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin- United States, 1997. Morbid Mortal Weekly Rep 1997;46: 813.
 29. Hiramatsu K, Hanaki T, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother 1997;40: 135 –136.
 30. Howe RA, Bowker KE; Walsh TR, Feest TG, MacGowan AP. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* Lancet 1998; 351: 602.
 31. Hubert SK, Mohammed JM, Fridkin SK, Gaynes RP, Gowan JE, Tenover FC. Glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* evaluation of a novel screening method and results of a survey of selected US hospitals. J Clin Microbiol 1999;37: 3590-3.
 32. Handwerker S, Raucher B, Altarac D et al. Nosocomial outbreak due to *Enterococcus faecium* highly resistant to vancomycin, penicillin and gentamicin. Clin Infect Dis 1993; 16: 750-5.
 33. Montecalvo MA, Horowitz H, Gedris C et al. Outbreak of vancomycin, ampicillin, and aminoglycoside resistant *Enterococcus faecium* bacteremia in an adult oncology unit. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 1363-7.
 34. National Nosocomial Infections Surveillance System. National Nosocomial Infections Surveillance System report, data summary fro October 1986-April 1996. Am J Infect Control 1996; 24: 380.
 35. Gültekin M, Günseren F. Vankomisin dirençli enterokoklar. Hastane İnfeksiyon Derg 2000;4:195-204.
 36. Kaye KS, Fraimow HS, Abrutyn E. Pathogens resistant to antimicrobial agents; epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. Infect Dis Clin North Am 2000; 14: 293-319.
 37. Campbell GC, Silberman R. Drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Clin Infect Dis 1998; 26: 1188-95.
 38. Klugman KP, Madhi SA. Emergence of drug resistance; impact on bacterial meningitis. Infect Dis Clin North Am 1999;637-46.
 39. Kaplan SL, Mason EO. Management of infections due to antibiotic resistant *Streptococcus pneumoniae* Clin Microbiol Rev 1998;11: 628-44.
 40. Jette LP, Sinave C. Use of an oxacillin disk screening test for detection of penicillin and ceftriaxone-resistant pneumococci. J Clin Microbiol 1999; 37: 1178-7.
 41. Brueggemann AB, Pfaller MA, Doern GV. Use of penicillin MICs to predict *in vitro* activity of other β -lactam antimicrobial agents against *Streptococcus pneumoniae* Clin Microbiol 2001;39:367-9.
 42. Heffelfinger JD, Dowell SF, Jorgensen JH, et al. Management of community acquired pneumonia in the era of pneumococcal resistance; a report from the Drug Resistant *Streptococcus pneumoniae* Therapeutic Working Group. Arch Intern Med 2000; 160:1399-1408.
 43. Seppala H, Nissinen A, Yu Q, Huovinen P. Two different phenotypes of erythromycin resistant *Streptococcus pneumoniae* in Finland. J Antimicrob Chemother 1993;32:885-91.
 44. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:577-81.
 45. Sutcliffe J, Tait-Kamradt D, Wondurack L. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin a common resistance pattern mediated by an efflux system. Antimicrob Agents Chemother 1995;40:1817-24.
 46. Bush K. New β -lactamases in Gram negative bacteria, diversity and impact on selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis 2001; 32:1085-9.
 47. Livermore DM. β -lactamases: quantity and resistance. Clin Microbiol Infect 1997; 3(suppl 4): 4S10-19.
 48. Sanders CC, Sanders W Jr. β -lactam resistance in Gram negative bacteria global trends and clinical impact. Clin Infect Dis 1992; 15: 824-39.

49. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1211-33.
50. Rahal JJ. Extended spectrum β -lactamases; how big is the problem. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6 (suppl 2): 2-6.
51. Rice L. Evolution and clinical importance of extended spectrum β -lactamases. *Chest* 2001; 119: 391S-396S.
52. Paterson DL, Kow C, Gottberg A, et al. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended spectrum β -lactamases; implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2206-12.
53. Jarlier V, Nicoles MM, Fournier G, Philippon A. Extended broad spectrum β -lactamases conferring resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae; hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 867-71.
54. Bush K. Metallo β -lactamases; a class apart. *Clin Infect Dis* 1998; 27 (suppl 1): S49-53.
55. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yun JH. Modified Hodge and EDTA synergy tests to screen metallo β -lactamase producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 88-102.
56. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K et al. Convenient test for screening β -lactamase producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000;38:40-43.