

GRAM NEGATİF BAKTERİLERDE ANTİBİYOGRAF YORUMU

Deniz GÜR

Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ANKARA
dgur@hacettepe.edu.tr

ÖZET

Antibiyotik duyarlılık testlerinde "yorumlayarak okuma" antibiyotikleri grup olarak ele alıp, altta yatan direnç mekanizmasını da tahmin ederek analiz etmeyi amaçlamaktadır. Yorumlu antibiyogram direnç mekanizmalarının tanımlanmasında biyokimyasal tanı yöntemlerinin yerini tutmamakla birlikte klinik mikrobiyologlar için laboratuvarında sürekli bir kalite kontrolü oluşturmakta, klinisyenler için antibiyotik tedavisini yönlendirecek önemli veriler sağlamakta, ayrıca tedavinin riskli olduğu bakteri ve antibiyotik kombinasyonlarına dikkatlerini çekmektedir. Bu hem daha iyi bir tedavinin uygulanmasını sağlayacak hem de bakteri direncinin seleksiyonunu azaltacak bir uygulamadır.

Anahtar sözcükler: antibiyotik direnci, Gram negatif bakteri, yorumlu antibiyogram

SUMMARY

Interpretive Reading of the Antibigram in Gram-negative Bacteria

"Interpretive reading" in antibiotic susceptibility tests aims to analyze the susceptibility test results of antibiotics in groups, taking into account the underlying mechanisms of resistance. This method can not replace the biochemical or molecular methods in identification of the mechanisms of resistance; however it has the benefits of offering significant data for the clinicians for guiding therapy and drawing attention to the microorganism and antibiotic combinations which may be risky, as well as constituting a continuous quality control in the clinical microbiology. As a result, it helps the implementation of appropriate therapy as well as decreasing the selection of antimicrobial resistance.

Keywords: antimicrobial resistance, gram-negative bacteria, interpretive reading

Rutin testlerde antibiyotik duyarlılık test sonuçları klinisyene genel olarak 3 grupta bildirilmektedir. Bunlar: "duyarlı", "dirençli" veya "orta derecede duyarlı" gruplarıdır⁽²⁾. Bu sonuçlara göre klinisyenler bir infeksiyon etkeninin duyarlı olduğu bir antibiyotiği uyguladıklarında tedavinin başarılı olacağını öngörmektedirler.

Buna karşın, bu şekilde bir sonuç verme birbiri ile ilişkili antibiyotiklere karşı direncin sıklıkla aynı mekanizma ile oluştuğunu göz ardı etmektedir. Oysa beta-laktamlar, kinolonlar, aminoglikozidler gibi aynı gruptaki antibiyotiklerin etki mekanizmaları aynıdır ve aynı direnç mekanizmalarından farklı derecelerde de olsa etkilenmeleri beklenir. "Yorumlayarak okuma" antibiyotiklere duyarlılık paternini antibiyotikleri tek tek değil, grup olarak ele alarak, altta yatan direnç mekanizmasını da tahmin ederek

analiz etmeyi amaçlamaktadır⁽³⁾.

Yorumlayarak okuma için izolatların tür düzeyinde kesin olarak tanımlanmaları ve çok sayıda farklı grup antibiyotik ile karşılaştırılmaları gerekmektedir. Antibiyotik duyarlılık testleri, beklenmeyen sonuçların ve belirli patojenlerde direnç seleksiyonuna yol açma riski olan ilaçların bilinmesi ve "indikatör" ilaçların kullanılmasına dikkat edilerek yorumlanmalıdır.

Beklenmeyen direncin saptanması

Antibiyotik duyarlılık testlerinde ender direnç şekilleri saptandığında bu izolatlar mutlaka bir referans laboratuvara gönderilmelidir. Tablo 1'de Gram negatif bakterilerde çok ender gözlenen ve bir referans merkez tarafından onaylanmayı gerektiren direnç mekanizmaları gösterilmiştir^(2,6).

Tablo 1. Gram negatif bakterilerde hiç bildirilmemiş veya ender gözlenen direnç mekanizmaları.

Mikroorganizma	Doğrulanması gereken direnç
Enterobacteriaceae	Meropenem, imipenem (Proteus spp. hariç)
Haemophilus influenzae	3. kuşak sefalosporin, karbapenem, aztreonam, florokinolonlar
Moraxella catarrhalis	Siprofloksasin
Neisseria meningitidis	Penisilin (yüksek düzey), 3. kuşak sefalosporinler, siprofloksasin, minosiklin, florokinolonlar, rifampin
Neisseria gonorrhoeae	3. kuşak sefalosporinler
Acinetobacter spp., Pseudomonas aeruginosa	Kolitsin
Anaerobik bakteriler	Metronidazol
Bacteroides spp.	Metronidazol, amoksisilin/klavulanat veya karbapenemler

Tablo 2. Çeşitli Gram negatif bakterilerin doğal direnç gösterdiği antibiyotikler.

Mikroorganizma	Doğal dirençli olduğu antibiyotik
Enterobacteriaceae'lerin tümü	Penisilin G, glikopeptidler, fuzidik asit, makrolidler, klindamisin, linezolid, streptograminler, mupirosin
Acinetobacter baumannii	Ampisilin, amoksisilin, 1. kuşak sefalosporinler
P.aeruginosa	Ampisilin, amoksisilin, amoksisilin/klavulanat, 1.kuşak sefalosporinler, 2. kuşak sefalosporinler, sefotaksim, seftriakson, nalidiksik asit, trimetoprim.
Burkholderia cepacia	Ampisilin, amoksisilin, 1.kuşak sefalosporinler, kolistin, aminoglikozidler
Stenotrophomonas maltophilia	Tikarsilin/klavulanat dışındaki tüm beta-laktamlar, aminoglikozidler.
Flavobacterium (Chryseobacterium/Myroides)	Ampisilin, amoksisilin, 1. kuşak sefalosporinler
Salmonella spp.	Sefuroksim (in-vitro olarak aktif, in-vivo olarak değil)
Klebsiella spp., Citrobacter diversus	Ampisilin, amoksisilin, karbenisilin, tikarsilin
Enterobacter spp., Citrobacter freundii	Ampisilin, amoksisilin, amoksisilin/klavulanat, 1.kuşak sefalosporinler, sefoksitin
Morganella morganii	Ampisilin, amoksisilin, amoksisilin/klavulanat, 1.kuşak sefalosporinler, sefuroksim, kolistin, nitrofurantoin
Providencia spp.	Ampisilin, amoksisilin, amoksisilin/klavulanat, 1.kuşak sefalosporinler, sefuroksim, gentamisin, netilmisin, tobramisin, kolistin, nitrofurantoin
Proteus mirabilis	Kolistin, nitrofurantoin
Proteus vulgaris	Ampisilin, amoksisilin, sefuroksim, kolistin, nitrofurantoin
Serratia spp.	Ampisilin, amoksisilin, amoksisilin/klavulanat, 1.kuşak sefalosporinler, sefuroksim, kolistin
Yersinia enterocolitica	Ampisilin, amoksisilin, karbenisilin, tikarsilin, 1.kuşak sefalosporinler
Campylobacter jejuni	Trimetoprim
Campylobacter coli	Trimetoprim
H.influenzae	Penisilin G, eritromisin, klindamisin
M.catarrhalis	Trimetoprim

Bazı mikroorganizmalar çeşitli antibiyotiklere doğal olarak dirençlidir ve bu mikroorganizmaların o antibiyotiklere “duyarlı” olarak bildirilmesi doğrulanması gereken bir durumdur. Bu nedenle bu direnç paternlerinin bilinmesi gerekmektedir^(2,6). Tablo 2’de bazı Gram negatif mikroorganizmaların doğal olarak dirençli olduğu antibiyotikler gösterilmektedir.

Eğer söz konusu mikroorganizmaların bu antibiyotiklere duyarlı olduğu saptanırsa bakteri tanımlanması ve duyarlılık testinin tekrar edilmesinde yarar vardır^(2,6).

İndikatör antibiyotikler

İndikatör, sadece kendine değil, aynı zamanda aynı grup antibiyotiklere direnç oluşturan mekanizmayı saptamak için kullanılan bir antibiyotiktir. Bu antibiyotik, bir antibiyotik

grubunun direnci en belirgin yansıyan üyesidir. Bu nedenle bazı antibiyotiklerin klinikte kullanılması bile indikatör olarak antibiyogramda kullanılmaları önerilmektedir. Örneğin, azalmış siprofloksasin duyarlılığına karşın bu antibiyotiğin uygulandığı ancak yanıt alınamayan *Salmonella* olguları bildirilmektedir^(5,7). *Salmonella* spp.'de siprofloksasine azalmış duyarlılık rutin disk testlerinde saptanamayabilir ve bu izolatlar "duyarlı" olarak bildirilebilir. Nalidiksik asit, disk yönteminde siprofloksasine azalmış duyarlılığı saptamak için önerilmektedir⁽⁴⁾. Gram negatif bakterilerde seftazidim ve sefpodoksım *Klebsiella* spp. ve *Escherichia coli*'de GSBL'lerin saptanması için kullanılmaktadır⁽²⁾. İndikatör antibiyotiklerin Gram negatif bakterilerde kullanılabilmesi diğer durumlar Tablo 3'de gösterilmektedir.

İzolatlar tür düzeyinde tanımlanır ve farklı çok sayıda antibiyotik ile karşılaştırılırlar ise çoğunlukla direnç profilinde altta yatan mekanizmanın tahmin edilmesi olasıdır. Antibiyogramların yorumlanarak okunması için yorumlayan kişinin antibiyotikler ve direnç mekanizmaları ile ilgili ayrıntılı bilgisi olması gerekmektedir. Bu amaçla son yıllarda geliştirilmiş olan "expert rules (uzman kuralları)" içeren otomatik zon okuyucu sistemler ve otomatize sistemler kullanılmaktadır^(3,6).

Yorumlu antibiyogram örnekleri

Aminoglikozid grubu antibiyotikler: Gram negatif bakterilerde aminoglikozidlere karşı kazanılan dirençte en önemli mekanizma "aminoglikozidleri değiştiren enzimler" ile bu antibiyotiklerin amino ya da hidroksil gruplarının enzimatik olarak değiştirilmesidir⁽¹⁾. Değişim sonucu aminoglikozid molekülü ribozomlara iyi bağlanamadığından bakteri aminoglikozide direnç göstermektedir. Aminoglikozid molekülünü değiştiren üç enzim ailesi tanımlanmıştır. Bunlar, aminoglikozid fosfotransferazlar (APH), aminoglikozid asetiltransferazlar (AAC) ve aminoglikozid nükleotidiltransferazlardır (ANT). Enzimin aminoglikozid molekülündeki etki bölgesi parantez içinde bir rakamla belirtilmektedir; örneğin, AAC(2''), 2''-amino grubunun asetile edildiğini göstermektedir. Benzer etki gösteren enzimlerin ayırılması için buna Romen rakamları eklenmektedir; örneğin AAC(3) enzimi, AAC(3)-I' den AAC(3)-VII 'ye kadar numaralanmıştır. Bir aminoglikozid molekülü birden fazla bölgede değişikliğe uğrayabilirken bir enzim bir çok farklı aminoglikozidi de değiştirebilir. Bu enzimlerden bazılarının oluşturduğu fenotipler ülkemizde yapılan bir araştırmanın sonuçlarından derlenen Tablo 4'de gösterilmiştir⁽⁸⁾. Bu enzimlerden bir kaçını aynı bakteride bir arada bulunduğunda direnç bir çok molekülü kapsayacağından altta yatan mekanizmaya ilişkin yorum yapmak güçleşmektedir. Örneğin

Tablo 3. Gram negatif bakterilerde indikatör olarak kullanılan antibiyotikler⁽⁶⁾.

Mikroorganizma	Dirençli olduğu antibiyotik	Yorum/ yapılması gereken
H.influenzae	Sefaklor	Büyük olasılıkla beta-laktamaz dışı mekanizma ile ampisilin direnci (ampisilinden daha iyi bir indikatör)
N.gonorrhoeae/ H.influenzae	Nalidiksik asit	Florokinolonlara duyarlılıkta azalma veya direnç
Klebsiella spp./E.coli	Seftazidim veya sefpodoksım	GSBL olasılığı, sefamisin dışındaki sefalosporinlerden kaçınılmalı
Enterobacteriaceae	2.kuşak sefalosporinlerden herhangi biri	Etkili bir beta-laktamaz olasılığı, 1. kuşak sefalosporinlerden kaçınılmalı
Enterobacteriaceae	3.kuşak sefalosporinlerden herhangi biri	Etkili bir beta-laktamaz olasılığı, sefamisinler dışında 1. ve 2. kuşak sefalosporinlerden kaçınılmalı
Enterobacteriaceae	Üreidopenisilinlerden herhangi biri	Penisilinaz bulunma olasılığı, amino ve karboksipenisilinlerden (örneğin piperasilin) kaçınılmalı
Enterobacteriaceae	Herhangi bir beta-laktamaz/inhibitör kombinasyonuna direnç	Kombinasyondaki penisiline de dirençli kabul edilir

Tablo 4. Aminoglikozid antibiyotiklere karşı direnç fenotiplerine örnekler.

Enzimler	Fenotip*	Klebsiella spp. n= 221 (%)	Enterobacter spp. n=121 (%)	E.coli n=93 (%)
AAC(3)-II	GTN	9 (4)	12 (9.9)	30 (32.2)
AAC(6')-I	TNA	5 (2.3)	3 (2.5)	3 (3.2)
AAC(6')-III	TNAI	4 (1.8)	8 (6.6)	1 (1.1)
AAC(6')-IV	GTNA	78 (35.3)	20 (16.5)	10 (10.7)
ANT(2'')-I	GT	14 (6.3)	16 (13.2)	3 (3.2)

* G:gentamisin, T:tobramisin, N:netilmisin, A:amikasin, I:isepamisin.

AAC(3)-II, AAC(6')-I ve AAC(6')-III aynı bakteride bulunduğu bakteride test edilen tüm aminoglikozidlere dirençli görünmektedir.

Beta-laktam grubu antibiyotikler: Beta-laktamlar yorumlu antibiyogram için en uygun ilaçlardır çünkü bir çok değişik fenotipe yol açan çok sayıda direnç mekanizmasından etkilenmektedirler⁽⁶⁾. Bununla birlikte sayı ve çeşitleri son yıllarda büyük artış gösteren, geniş spektrumlu beta-laktamlara dirençten sorumlu olan genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) ve plazmid kaynaklı AmpC enzimlerinin rutin testler ile tanımlanmaları güçtür. İn-vitro olarak duyarlı görünseler bile bu enzimlerin saptandığı izolatlarda tüm beta-laktamlara "dirençli" olarak bildirilmesi gerekmektedir ve ilk bakışta bazı antibiyogramlar bu enzimleri düşündürse bile (örneğin seftazidime dirençli, beta-laktamaz inhibitör kombinasyonuna veya sefoksitine duyarlı ise GSBL; beta-laktamaz inhibitör kombinasyonuna veya sefoksitine dirençli ise AmpC olasılığı) bu beta-laktamazların rutin laboratuvarıda saptanması sadece özel testlerin uygulanması ile olasıdır^(2,9).

Yorumlu antibiyogramın önemi ve sınırlamaları

Yorumlu antibiyogramın klinik mikrobiyologlar için en büyük yararı laboratuvarıda sürekli bir kalite kontrol sağlamasıdır. Duyarlılık sonuçlarının yorumlanabilmesi için bakterilerin tür düzeyinde tanımlanmaları gerektiği gibi bu bakterilerin doğal direnç gösterdiği antibiyotikler de bakteride tanısını doğrulamaktadır.

Antibiyogramların yorumlanarak okunması klinisyenlere antibiyotik tedavisine karar vermek için önemli veriler sağlamakta, ayrıca tedavinin riskli olduğu bakteride ve antibiyotik kombinasyonlarına dikkatlerini çekmektedir. Bu

hem daha iyi bir tedavinin uygulanmasını sağlayacak hem de bakteride direncinin seleksiyonunu azaltacak, böylece antimikrobik ilaçların yarı ömrünü uzatacak bir uygulamadır⁽³⁾.

Yorumlu antibiyogram direnç mekanizmalarının tanımlanmasında hiçbir zaman moleküler ve biyokimyasal tanı yöntemlerinin yerini dolduramaz. Birden çok direnç determinantı içeren bakterilerin sıklığı gün geçtikçe arttığından, aynı fenotipte dirence yol açan mekanizmaların ayırılması güçtür^(6,8). Bunlara ek olarak, yorumlu antibiyogram ile, bilinen bir direnç profili oluşturan yeni bir direnç mekanizmasının tanımlanması olanaksızdır⁽⁶⁾.

Sonuç

Rutin laboratuvarlarda sonuçlar yorumlayarak irdelenmeli, inandırıcı olmayan antibiyogram sonuçlarının alındığı durumlarda sonuçlar klinisyene bildirilmeden önce testler mutlaka yeniden gözden geçirilmeli, yine aynı sonuç alınrsa yeni bir direnç mekanizması olasılığı üzerinde durulmalıdır. Eğer yeni bir direnç mekanizması düşünülüyorsa, duyarlılık testlerinde kullanılan antibiyotik diski veya tozu, besiyeri, pH gibi antibiyotik duyarlılık testlerinde sonucu etkileyen faktörler yeniden gözden geçirilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Boehr DD, Moore IF, Wright GD: Aminoglycoside resistance mechanisms, "White DG, Alekshun MN, McDermott PF (eds): Frontiers in Antimicrobial Resistance, first ed." kitabında s.85-100, ASM Press, Washington, DC (2005).
2. Clinical and Laboratory Standards Institute/ NCCLS: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing-Nineteenth Informational

- Supplement. CLSI/NCCLS Document M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania (2009).
3. Courvalin P: Interpretive reading of in vitro antibiotic susceptibility tests (the antibiogramme), *Clin Microbiol Infect* 1996;2(Suppl 1):26-34.
 4. Ercis S, Erdem B, Hasçelik G, Gür D: Nalidixic acid resistance in *Salmonella* strains with decreased susceptibility to ciprofloxacin isolated from humans in Turkey, *Jpn J Infect Dis* 2006;59(2):117-9.
 5. Le Lostec ZL, Fegueux S, Jouve P, Cheron M, Mornet P, Boisivon A: Reduced susceptibility to quinolones in *Salmonella typhi* acquired in Europe: a clinical failure of treatment, *Clin Microbiol Infect* 1997;3(5):576-7.
 6. Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP: Interpretive reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes, *J Antimicrob Chemother* 2001;48(Suppl 1):S87-102.
 7. Mehta G, Randhawa VS, Mohapatra NP: Intermediate susceptibility to ciprofloxacin in *Salmonella typhi* strains in India, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20(10):760-1.
 8. Över U, Gür D, Ünal S, Miller GH, Aminoglycoside Resistance Study Group: The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and prevalence of newly recognized resistance mechanisms in Turkey, *Clin Microbiol Infect* 2001;7(9):470-8.
 9. Yang K, Guglielmo BJ: Diagnosis and treatment of extended-spectrum and AmpC beta-lactamase-producing organisms, *Ann Pharmacother* 2007;41(9):1427-35.