

ÇOK İLACA DİRENÇLİ MİKROORGANİZMALARIN LABORATUVAR TANISI: GÜNCEL DURUM VE SORUNLAR

M. Ufuk HASDEMİR

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL
ufukhasdemir@marmara.edu.tr

ÖZET

Çoklu ilaç direnci gösteren mikroorganizmaların neden olduğu infeksiyonların tedavisi günümüzün çok ciddi sağlık sorunlarından biridir. Morbidite ve mortalitede artışa, hastanede yatış süresinin uzamasına ve tedavi masraflarının yükselmeye sebep olan bu infeksiyonların erken laboratuvar tanısının, tedaviyi doğru yönlendirmede ve dolayısıyla yukarıda sözü edilen olumsuzlukları en aza indirmede etkin role sahip olduğu gösterilmiştir. Bu yazının amacı, çoklu ilaç direnci gösteren bakterilerin erken laboratuvar tanısı ile ilgili güncel durumu ve sorunları gözden geçirmektir.

Anahtar sözcükler: karbapenem direnci, metisilin direnci, vankomisin dirençli enterokok,

SUMMARY

Laboratory Detection of Multidrug Resistant Microorganisms: Current Status and Challenges

Currently, the treatment of infections caused by multidrug-resistant organisms (MDROs) is one of the major health problems. Early laboratory diagnosis of such infections which increase the morbidity and mortality, cost of therapy, and duration of hospitalization, has an effective role in the appropriate management of these infections thereby reduce the poor clinical outcomes mentioned above. The aim of this article is to review the current status and challenges in the early laboratory diagnosis of infections caused by MDROs.

Keywords: carbapenem resistance, methicillin resistance, vancomycin resistant enterococci

Sağlıklı kişilerin barsakları zararsız komensaller olarak birçok bakteriyi barındırır ve bu bakteriler arasında *Enterobacteriaceae* ailesine mensup Gram negatif basillerin, enterokok türlerinin ve anaeroplarn sayıları oldukça yüksektir. *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinin ve enterokokların önemli bir özellikleri, hızla antibiyotik direnci geliştirme yetileridir. Barsakta yaygın olarak bulunan antibiyotik dirençli bakteriler, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretenleri, karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* üyelerini, vankomisin, ampisilin ve yüksek düzey aminoglikozit dirençli enterokokları kapsamaktadır. Günümüzde farklı sınıflardan antibiyotiklere karşı kazanılmış ilaç direnç mekanizmalarını bir arada barındıran bu çok ilaca dirençli bakterilerin bizzat kendilerinin ya da direnç mekanizmalarını aktardıkları diğer bakterilerin neden olduğu infeksiyonların giderek yaygınlaşması, bu infeksiyonların kontrolünü ciddi

olarak tehdit etmektedir. Çoklu ilaç direncine yol açan mekanizmalardan bazılarının, elde kalan sınırlı sayıdaki etkin antibiyotikleri (karbapenem, vankomisin vb.) kapsamı endişenin boyutunu daha da arttırmaktadır. Çoklu ilaç direnci gösteren bakteriler ve klinik sonuç arasındaki ilişki iyi dokümanite edilmiş olup direncin erken laboratuvar tanısının, ciddi infeksiyonlarda tedaviyi doğru yönlendirerek morbidite ve mortalitede düşüşe yol açmada, hastanede yatış süresini kısaltmada ve tedavi masraflarını düşürmede önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca hastaların dirençli bakterilerle kolonizasyonunun takibinin de, ampirik tedavide kullanılacak antimikrobiyallerin doğru seçimi ve ilaç direncinin diğer bakterilere yayılımının önlenmesinde etkin olduğu bilinmektedir^(1,15). Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae*'ya bağlı bakteremilerde, yedi gün içinde mikrobiyolojik eradikasyonun sağlanması olumlu prog-

noz ile ilişkili bulunmuştur⁽¹⁴⁾. Hastane ilişkili pnömonili hastalarda ampirik antimikrobiyal tedavinin uygun olmamasının, yaşam süresini kısalttığı; toplum kaynaklı pnömonili hospitalize hastalarda doğru antibiyotik tedavisine hastaneye yatışın 4. saatinde başlananlarda ise mortalitenin düşük olduğu gösterilmiştir⁽¹⁰⁾.

Bakterilerde çoklu ilaç direncinin laboratuvar tanısı

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının temel sorumluluklarından biri ilaç direncini ve mümkünse bu dirence yol açan mekanizmaları doğru ve erken bir şekilde saptamak ve raporlamaktır. Günümüzde bakterilerde kazanılmış çoklu ilaç direncini saptamada kullanılan yöntemleri başlıca kültür bazlı konvansiyonel fenotipik yöntemler ve direnç genlerini saptamaya yönelik moleküler bazlı (PCR, hibridizasyon, DNA dizileme) yöntemler olarak gruplayabiliriz⁽¹⁵⁾.

Kültür bazlı fenotipik yöntemler: Bu yöntemlerdeki temel algoritma mikroorganizmanın klinik örnekten izolasyonu, tanımlanması ve fenotipik duyarlılık testinin (disk difüzyon, sıvı dilüsyon, agar dilüsyon, E-test) yapılmasıdır (Tablo 1). Hızlı üreyen bakteriler için bile bu süre en az 48-72 saate ihtiyaç göstermektedir. Otomatize sistemlerle izolatın tanımlama ve duyarlılık testinin aynı anda yapılması, bu süreyi bir ölçüde kısaltsa da, ciddi infeksiyonlarda doğru tedaviye bir an önce başlanması için bu süre de uzun olabilir. Son yıllarda geliştirilen bazı yaklaşımlar ve yöntemlerle, kültür bazlı fenotipik testler kullanılarak daha hızlı sonuç almak mümkün olabilmektedir.

Pozitif kan kültüründen direkt duyarlılık testi: Pozitif kan kültüründen izole edilen organizmaların antibiyotik duyarlılıklarının saptanması genellikle 48 saat almakta ve bu gecikme, ciddi infeksiyonu olan hastalarda kritik sonuçlara yol açmaktadır. Pozitif kan kültüründen doğrudan duyarlılık testi yapmanın en önemli avantajı, duyarlılık test sonucu elde etme süresini kısaltmasıdır. Ancak miks infeksiyonlarda ya da maya infeksiyonlarında uygulanamaması, elde edilen sonuçların konvansiyonel yöntemle konfirmasyona yani bakterinin kan kültür şişesinden izolasyonunu takiben duyarlılık testi yapıl-

masına ihtiyaç göstermesi, direkt duyarlılık yönteminin başlıca dezavantajlarıdır. Vitek 2 sisteminin kullanıldığı bir çalışmada, doğrudan duyarlılık testi yapmanın, rapor süresini 3.3-17.5 saate kadar kısalttığı bildirilmiştir⁽¹¹⁾. Chapin ve Musgung Gram pozitif izolatları kapsayan çalışmalarında, pozitif kan kültürü şişesinden yapılan direkt ve konvansiyonel duyarlılık testleri arasında 'gerekli uyum'u (essential agreement) % 98, minör hatayı % 0.3, çok büyük hatayı % 1.7 oranında saptamışlardır⁽⁴⁾. Chen ve ark.'nın⁽⁵⁾ Gram negatif bakterileri kapsayan çalışmalarında, doğrudan duyarlılık testi ile saptadıkları toplam hata oranı % 5.4'dür (% 0.9 çok büyük hata; % 0.9 büyük hata; % 3.6 minör uyumsuzluklar). Aynı çalışmada *Staphylococcus* spp.'de, çok büyük hata % 6 büyük hata % 2.6 ve minör uyumsuzluklar % 1.7 oranında tespit edilmiştir. Doğrudan duyarlılık test sonuçlarının değerlendirme süresinin ve sınır değerlerin yorumlanmasında kullanılan standartların da, hata oranlarında farklılığa neden olduğu tespit edilmiştir^(3,8).

Kültür bazlı direnç saptama yöntemleri: Son yıllarda yayılımı ve çeşitliliği endişe yaratan direnç mekanizmalarının en önemlilerinden biri hiç şüphesiz Enterobacteriaceae üyelerindeki karbapenemaz üretimidir. Karbapenemlerin ve diğer tüm beta-laktam antibiyotiklerin tedavide kullanımını sınırlayan bu direnç mekanizması, kültür bazlı yöntemlerle (Modifiye Hodge Testi, inhibisyon bazlı karbapenemaz saptama testleri) tespit edilebilir. Ancak bu yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri düşük olup en önemlisi bakterinin tanımlanmasından sonra en az 24 saate daha ihtiyaç göstermeleridir. Yeni geliştirilen bazı fenotipik yöntemler, karbapenemaz üretimini daha erken saptamak üzere rutin laboratuvarlarda yerlerini almaya başlamışlardır. Bunlar arasında biyokimyasal olarak veya 'matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry' (MALDI-TOF MS) ile karbapenem hidrolizinin saptanması prensibine dayalı yöntemler sayılabilir. Örneğin bunlardan CarbaNP testinin duyarlılığının çok yüksek (% 100) olduğu ve sadece bilinen karbapenemazları değil yeni ortaya çıkan karbapenemazları da saptama özelliğinin bulunduğu bildirilmiştir^(15,16). Öte yandan yeni geliştirilen bazı kromo-

Tablo 1. Çoklu ilaç direnci gösteren bakterilerin erken tanısında kullanılan yöntemler.

Strateji	ÇİDB tipi	Örnek tipi	Laboratuvar metodu	Ortalama sonuç verme süresi
Tanı	Kan kültürü veya vücut sıvısı kültüründen direkt antibiyotik duyarlılık testi	Kan kültürü şişesinde kan veya steril vücut sıvısı	Pozitif şişeden direkt duyarlılık testi	Pozitif sinyal alındıktan 1 gün sonra
Tarama	MRSA	Burun, boğaz yara, deri sürüntüsü	Kültür, PCR. Ticari PCR örneği: BD, Cepheid	Kültür: 3 g; PCR: aynı gün
Tarama	VRE	Dışkı, rektal sürüntü	Kültür, PCR. Ticari PCR örneği: BD, Cepheid	Kültür: 4-5 g; PCR: aynı gün
Tarama	GSBL	Dışkı, rektal sürüntü	Kültür	Kültür: 4-5 g
Tarama	MBL/KRKP	Dışkı, rektal sürüntü	Kültür; PCR	Kültür: 4-5 g PCR: aynı gün

ÇİDB; Çok ilaca dirençli bakteri, MRSA; metisilin-dirençli *Staphylococcus aureus*, VRE; vankomisin dirençli enterokok, GSBL; genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, MBL; metallo beta-laktamaz, KRKP; karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae*

jenik besiyerleri de (CHROMagar, Paris, France), daha çok kolonize hastalarda dirençli mikroorganizmaları taramak üzere kullanılmaya girmiştir. Ancak bu tarama besiyerlerinin, düşük düzey karbapenemaz (Ör.MBL ve OXA-48 gibi) üretimini saptamada duyarlılıklarının düşük olduğu bildirilmiştir⁽²⁾.

Moleküler bazlı yöntemler: Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve 'micro-array' bazlı moleküler metotlar, konvansiyonel kültür bazlı tekniklere göre hızlı tanıda umut vaat eden yöntemlerdir (Tablo 1). Çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin tür bazında tayinine ek olarak antibiyotik direnç genlerinin ve virülans faktörlerinin de bu teknikler sayesinde hızlı bir şekilde saptanması, enfeksiyon hastalıklarının tedavisine doğru yaklaşımda önem taşımaktadır. Fujita ve ark.⁽⁹⁾, pozitif kan kültürüne doğrudan uyguladıkları PCR ve mikroçip jel elektroforezi yöntemlerinin, Gram negatif bakteri tanımlamasında ve bla(CTX-M), bla(SHV) ve bla(TEM) enzimlerinin saptanmasında fenotipik yöntemlerle yüksek derecede uyum gösterdiklerini ve 1.5 saat gibi çok kısa bir sürede sonuç alınabildiğini bildirmişlerdir. DNA 'microarray' yönteminin kullanıldığı bir başka çalışmada, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*'de genotipik antibiyotik direnci ile konvansiyonel duyarlılık test sonuçları arasında mükemmel yakın bir uyum saptanmıştır. Bu çalışmada, *Staphylococcus aureus*'ta mecA, aacA-aphD, blaZ; *E.coli*'de blaTEM-106 ve aacC2 direnç problemleri

kullanılmıştır⁽⁶⁾. Naas ve ark.⁽¹³⁾, ticari bir 'micro-array' (check-points ESBP/KPC array) yönteminin, Enterobacteriaceae ve non-fermenter bakterilerin kültür izolatlarında tüm TEM, SHV ve CTX-M genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların ve KPC karbapenemazların hızlı tanısında etkin olduğunu göstermişlerdir. Aynı grup, 144 Gram negatif izolatı kapsayan bir başka çalışmalarında, GSBL (SHV, TEM ve CTX-M) ve karbapenemaz (KPC, OXA-48, VIM, IMP ve NDM-1) üreten bakterilerde, Check-MDR CT 102 'microarray' yönteminin duyarlılık ve özgüllüğünü % 100 olarak bulmuşlardır⁽¹²⁾. Antimikrobiyal direncin saptanmasında moleküler yöntemlerin kullanımına ilişkin bir diğer yaklaşım, antibiyotik varlığında bakteri yükünü tayin ederek direncin saptanmasıdır. Yöntem olarak Real-time PCR'in kullanıldığı bu çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır. Waldstein ve ark.⁽¹⁷⁾, farklı antimikrobiyal ajanlara maruz kalmış kan örneklerindeki patojenik bakteri yüklerini real-time PCR ile kıyaslayarak izolatın antimikrobiyal direncini belirlemişler ve kliniğe duyarlılık sonucu verme süresini 24 saatten az olarak bildirmişlerdir. Kanda mecA DNA düzeyinin kantitatif saptandığı bir başka çalışmada da, prognozun kötü olduğu grupta mecA DNA düzeyinin, iyi olan gruba kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir⁽⁷⁾. Moleküler bazlı yöntemler, ilaç direncini hızlı olarak saptayarak hasta tedavisini erken ve doğru yönlendirmeleri dışında, kolonize hastaların dirençli mikroorganizmalar açısından hızlı taranmasında ve böyle-

ce direncin yayılımının önlenmesinde de kültür bazlı yöntemlere göre daha avantajlı gözükmedirler. Rutin laboratuvarlarda hastane infeksiyonlarının kontrolüne yönelik olarak MRSA, VRE tarama amaçlı kullanımı yaygınlaşan sistemlerden biri Cepheid'in GeneXpert (Sunnyvale, California) sistemidir. Belirtilen tüm avantajlarına karşın moleküler yöntemlerin tümüyle kültür bazlı yöntemlerin yerini almasını engelleyen başlıca dezavantajları yeni ortaya çıkan direnç genlerini, bilinen direnç kasetlerini saptamadaki kısıtlılıkları ve maliyetlerinin yüksekliğidir.

Sonuç olarak, ilaç direncini saptamada yöntem seçerken duyarlılık, özgülük ve maliyet etkinliğin dikkate alınması ve bu konudaki gelişmelerin takibi, ciddi infeksiyonların tedavisini doğru yönlendirme ve direnç genlerinin yayılımını önlemede mikrobiyoloji laboratuvarlarının etkin rolünü oynamasına katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

1. Bhattacharya S. Early Diagnosis of resistant pathogens: how can it improve antimicrobial treatment? *Virulence* 2013;4(2):172-84.
<http://dx.doi.org/10.4161/viru.23326>
PMid:23302786
2. Carrer A, Fortineau N, Nordmann P. Use of ChromID Extended-Spectrum β -Lactamase Medium for detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *J Clin Microbiol* 2010;48(5):1913-4.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02277-09>
PMid:20237104 PMCid:2863866
3. Coyle MB, McGonagle LA, Plorde JJ, Clausen CR, Schoenknecht FD. Rapid antimicrobial susceptibility testing of isolates from blood cultures by direct inoculation and early reading of disk diffusion tests, *J Clin Microbiol* 1984;20(3):473-7.
PMid:6490830 PMCid:271353
4. Chapin KC, Musgnug MC. Direct susceptibility testing of positive blood cultures by using Sensititre broth microdilution plates, *J Clin Microbiol* 2003;41(10):4751-4.
PMid:14532215
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.10.4751-4754.2003>
5. Chen JR, Lee SY, Yang BH, Lu JJ. Rapid identification and susceptibility testing using the VITEK 2 system using culture fluids from positive BacT/ALERT blood cultures, *J Microbiol Immunol Infect* 2008;41(3):259-64.
PMid:18629422
6. Cleven BE, Palka-Santini M, Gielen J, Meembor S, Krönke M, Krut O. Identification and characterization of bacterial pathogens causing bloodstream infections by DNA microarray, *J Clin Microbiol* 2006;44(7):2389-97.
PMID:16825354;
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02291-05>
7. Clinical trials: Establish Quantitative PCR to Measure Bacteria Load of the VRE Bacteremia. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01265095> (last accessed on August 02, 2012).
8. Edelmann A, Pietzcker T, Wellinghausen N. Comparison of direct disk diffusion and standard microtitre broth dilution susceptibility testing of blood culture isolates, *J Med Microbiol* 2007;56(Pt 2):202-7.
PMID:17244801
<http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46937-0>
9. Fujita S, Yosizaki K, Ogushi T, Uechi K, Takemori Y, Senda Y. Rapid identification of gram-negative bacteria with and without CTX-M extended-spectrum β -lactamase from positive blood culture bottles by PCR followed by microchip gel electrophoresis, *J Clin Microbiol* 2011;49(4):1483-8.
PMid:21289149 PMCid:3122828
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01976-10>
10. Houck PM, Bratzler DW, Nsa W, Ma A, Bartlett JG. Timing of antibiotic administration and outcomes for Medicare patients hospitalized with community acquired pneumonia, *Arch Intern Med* 2004;164(6):637-44.
PMID:15037492
<http://dx.doi.org/10.1001/archinte.164.6.637>
11. Ling TK, Liu ZK, Cheng AF. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid direct identification and susceptibility testing of gram-negative bacilli from positive blood cultures, *J Clin Microbiol* 2003;41(10):4705-7.
PMID:14532207;
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.10.4705-4707.2003>
12. Naas T, Cuzon G, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum β -lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases, *J Clin Microbiol* 2011;49(4):1608-13.
PMid:21325547 PMCid:3122838
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02607-10>
13. 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. PMID:20547813; <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01298-09>
14. Nguyen M, Eschenauer GA, Bryan M, O'Neil K, Furuya EY, Della-Latta P et al. Carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: factors correlated with clinical and microbiologic outcomes, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;67(2):180-4. PMID:20356699; <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.02.001>
15. Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *J Antimicrob Chemother*, 2013;68(3):487-9. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks426>
16. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2012;18(9):1503-7. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1809.120355> PMID:22932472 PMCID:3437707
17. Waldeisen JR, Wang T, Mitra D, Lee LP. A realtime PCR antibiogram for drug-resistant sepsis, *PLoSOne* 2011;6(12):e28528. PMID:22164303; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028528>.