

Rezistencija bakterija na antibiotike

Fatima Numanović

JZU UKC Tuzla



ESBL

MIRSA

MDRSP

VRE

MDR TB



ENTEROCOCCI Cause pneumonia and meningitis



MYCOBACTERIUM TB kills 3 million annually



MALARIA Malaria has infected 250 million

MEDICINE

ATTACK OF THE Superbugs



SALMONELLA Source of ear infections and shingles



GNORRHEA Drug-resistant gonorrhea is on the rise



MRSA No answer yet to the drug that causes skin



STAPHYLOCOCCUS Handy hospital bug

In the battle against old scourges, magic bullets are losing their power, as invisible legions of drug-resistant microbes are again on the march

By J. MADELINE HARRIS

THE APPEARANCE OF DRUG-RESISTANT superbugs is a global health crisis. In the United States, about 2 million people are infected with MRSA each year. In the United Kingdom, about 1 million people are infected with MRSA each year. In the United States, about 1 million people are infected with MRSA each year. In the United Kingdom, about 1 million people are infected with MRSA each year.

But now the invisible legions of superbugs are fighting back, and the stakes are escalating. In the United States, about 2 million people are infected with MRSA each year. In the United Kingdom, about 1 million people are infected with MRSA each year.

Drugs of various kinds are being used to fight the superbugs, but the results are mixed. In the United States, about 2 million people are infected with MRSA each year. In the United Kingdom, about 1 million people are infected with MRSA each year.

The drug-resistant superbugs are a global health crisis. In the United States, about 2 million people are infected with MRSA each year. In the United Kingdom, about 1 million people are infected with MRSA each year.

In the U.S., superbugs have a 50 percent fatality rate. The 100,000 deaths in 2005, however, are only a fraction of the total. The World Health Organization estimates that 10 million people are infected with MRSA each year.

Richard Kasper, a senior research advisor at the Centers for Disease Control and Prevention, says that the superbugs are a global health crisis. In the United States, about 2 million people are infected with MRSA each year. In the United Kingdom, about 1 million people are infected with MRSA each year.



Testiranje osjetljivosti stafilokoka

Uobičajenim rutinskim metodama (test koagulaze, po mogućnosti dodatni biohemijski profil nekim od komercijalnih testova) potrebno je identificirati vrstu *Staphylococcus aureus* od ostalih vrsta koagulaza negativnih staphylococca iz svih kliničkih izolata a posebno iz primarno sterilnih uzoraka.

Višestruka rezistencija na antibiotike se osim u *S. aureus* često nalazi i u *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. hominis* te u varijanti *S. aureus* male morfologije kolonija.

Opisana je rezistencija stafilokoka na različite grupe antibiotika:
beta laktamske antibiotike
aminoglikozide,
glikopeptide,
kinolone,
tetracikline,
makrolide,
linkozamide i
trimetoprim-sulfometoksazol.

-Penicilinski disk se koristi za testiranje svih
 β laktamaza labilnih penicilina!!!

ampicilin, amoxicilin, azlocilin, karbenicilin, mezlocilin, piperacilin i
tikarcilin.

-Penicilin-rezistentne, oksacilin-osjetljive vrste *Staphylococcus aureus*
koje proizvode β laktamaze testiraju se sa diskom penicilina od 10
jedinica umjesto sa ampicilinom.

-Penicilinaza - stabilni penicilini, se testiraju diskom oxacilina, a rezultat se može primjeniti na druge penicilinaza-stabilne peniciline, kloksacilin i dikloksacilin, meticilin i nafcilin.

MRSA-meticilin rezistentan *Staphylococcus aureus*

MRS -meticilin rezistentan *Staphylococcus*

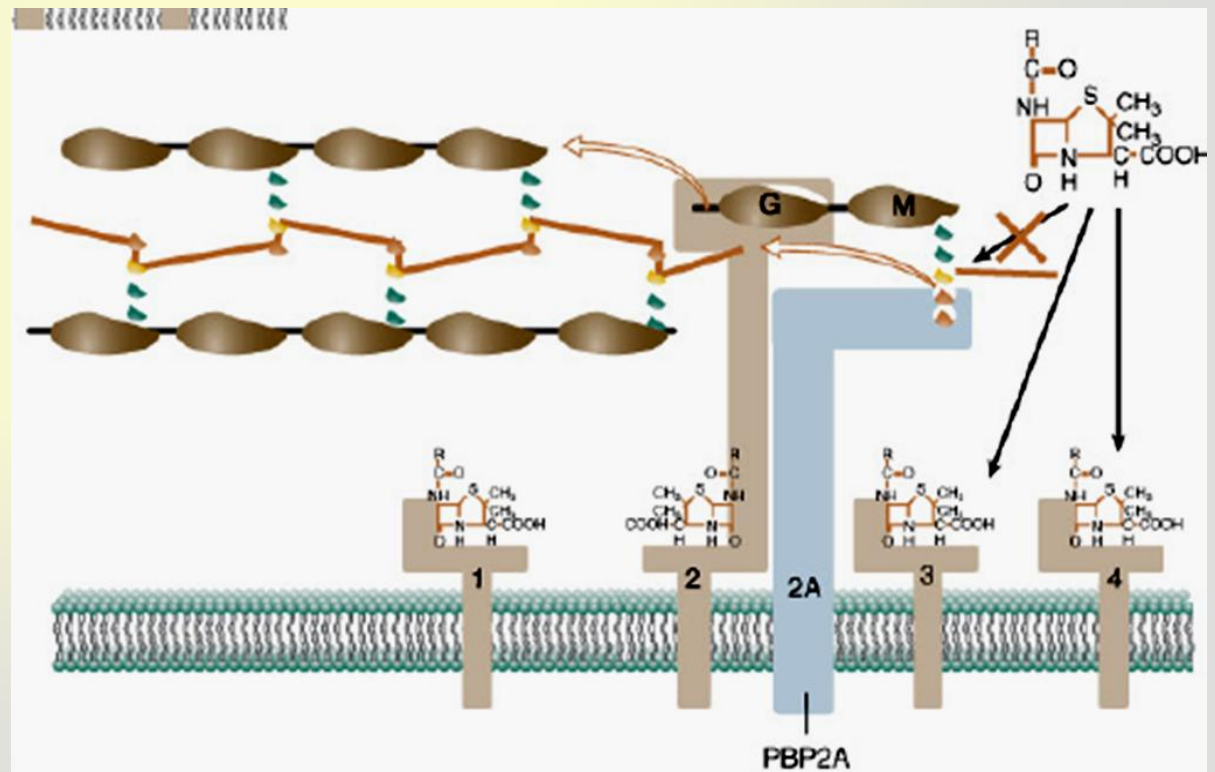
-Za oksacilin rezistentan Staphylococcus aureus i koagulaza negativne stafilokoke svi navedeni antibiotici mogu u in vitro uslovima biti aktivni ali u kliničkim uslovima su nedjelotvorni.

- penicilini,
- cefalosporini
- karbapenemi
- kombinacije amoksicilin+klavulonska kiselina
- ampicilin+sulbactam
- tikarcilin+ klavulonska kiselina
- piperacilin+tazobaktam
-

Rezultat za ove lijekove bi trebalo izvještavati kao rezistentne ili ih ne treba izvještavati.

Rezistencija na nafcilin (oxacilin) je nezavisna od produkcije β laktamaza.

MecA gen za rezistenciju na nafcilin (oxacilin) nalazi se na hromozomu. Mehanizam rezistencije je uslovljen nedostatkom ili nepristupačnosti određenih penicilin vezujućih proteina (PBPs) u mikroorganizmu.



Za testiranje rezistencije *S. aureusa* i *S. lugdunensis* na penicilinaza stabilne peniciline preporučuje se **cefoksitinski disk test**. On je uporediv sa oxacilinskim disk testom za predikciju *mecA* posredovane rezistencije na oxacilin.

Primjena cefoksitinskog disk test za predikciju posjedovanja *mecA* posredovane rezistencije na meticilin/oxacilin je preporučljiv i za druge koagulaza negativne stafilokoke.

-Izolati stafilokoka koji pokazuju da su nosioci mecA gena ili da proizvode PBP2a (produkt mecA gena) bi trebalo da se izvještavaju kao oksacilin rezistentni.

Testiranje na prisustvo mecA gena ili njihovog produkta, proteina PBP 2A su mnogo specifičnije metode za predikciju rezistencije na oxacilin i trebaju se izvoditi kod detekcije oxacilinske rezistencije izolata iz svih ozbiljnih infekcija.

Skrining test za *Staphylococcus aureus* -Oksacilin-Slani agar, oksacilinska ploča

Medium	MHA sa NaCl (4% w/v; 0,68 mol/L)
Koncentracija lijeka	6 µg/mL oxacilina
Inokulum	Napraviti suspenziju ispitivane kolonije turbiditeta od 0.5 McFarland
Uslovi inkubacije	35°C, aerobno
Dužina inkubacije	24 sata
Rezultati	>1 kolonije = rezistentan
Test sojevi	Staphylococcus aureus ATCC 29213-Osjetljiv Staphylococcus aureus ATCC 43300-Rezistentan

Disk difuzioni skrining test za predikciju mecA posredovane rezistencije u Staphylococca

Antibiotik	Vrsta mikroorganizma	Prečnik zone inhibicije-najbliže cijelom mm		Komentar
		R	S	
Cefoxitin (30 µg)	Staphylococcus aureus	≤19	≥20	S. aureus koji pokazuje zonu inhibicije ≤19 bi trebalo izvještavati kao oksacilin rezistentne. One koje pokazuju zonu inhibicije ≥20 bi trebalo izještavati kao oksacilin osjetljive.
	EUCAST	≤22	≥22	
	Koagulaza negativani Staphylococci	≤ 24	≥25	Koagulaza negativni staphylococci koji pokazuje zonu inhibicije ≤24 bi trebalo izvještavati kao oksacilin rezistentne. One koje pokazuju zonu inhibicije ≥25 bi trebalo izještavati kao oksacilin osjetljive.
	EUCAST	≤25	≥25	

Vrsta organizma	MIC $\mu\text{g/mL}$ za Oxacilin	
	R	S
Staphylococcus aureus	≥ 4	≤ 2
EUCAST	≥ 2	
Koagulaza negativan staphylococcus	≥ 0.5	≤ 0.25
EUCAST	≥ 0.25	

-Meticilin rezistentni staphylococcus (MRS) su često rezistentni na različite klase antibakterijskih lijekova uključujući
aminoglokozide,
klindamicin,
makrolide,
fenikole,
kinolone,
sulfonamide i
tetracikline.

-Vankomicin i teikoplanin su glikopeptidni antibiotici koji se koriste za liječenje sistemskih infekcija uzrokovanih MRSA.

Manje teške infekcije mogu se liječiti oralnim lijekovima kao što su:

linezolid,

rifampicin+fucidinska kiselina,

rifampicin+fluorokinoloni,

co-trimoksazol,

doksiciklin ili minociklin i

klindamicin.

-Svi izolati stafilokoka sa dijametrom zone inhibicije za vancomycin (30 μ g) od 14 mm ili manje trebalo bi testirati MIC metodom.

Disk difuziona procedura ne može da diferencira vrste sa redukovano osjetljivosti na vankomicin (MICs 4 do 16 μ g/mL), takozvanih VISA od osjetljivih vrsta (MICs od 0.5 do 2 μ g/mL) čak kada se inkubira 24 sata.

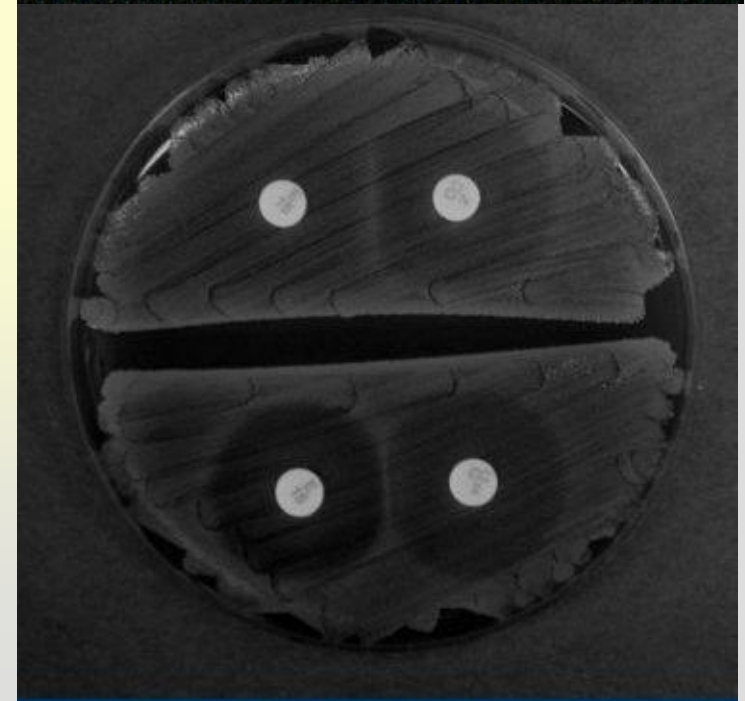
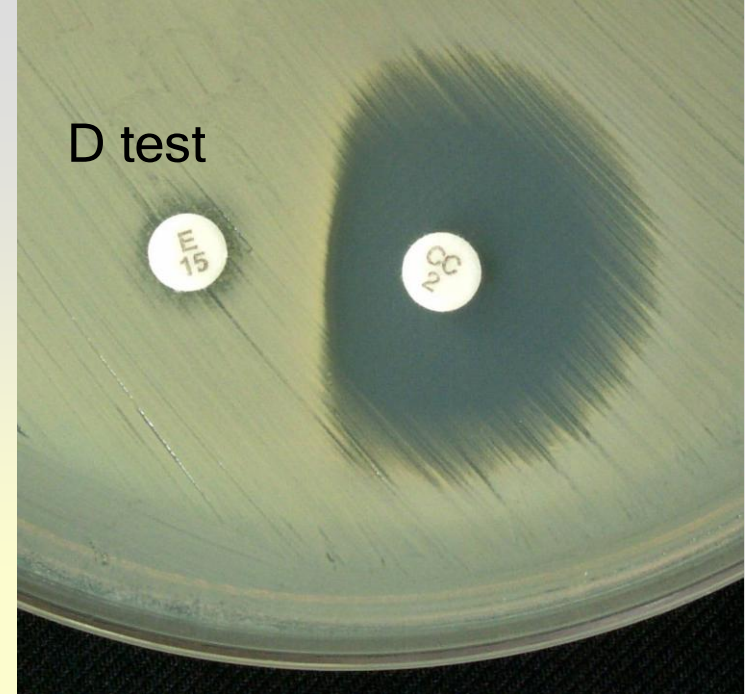
Vankomicin rezistentan *S. aureus* (VRSA) (MICs \geq 16 μ g/mL,) (EUCAST 2 μ g/mL) može oko diska vankomicina da napravi jedan jedva primjetan rast. Može se testirati **BHI vankomicin skrining** testom sa ugrađenim 6 μ g/mL vankomicina.

-Izolati *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus* spp. koji pokazuju rezistenciju na makrolide mogu imati konstitutivnu ili inducibilnu rezistenciju na klindamicin.

Uobičajenom disk difuzionom metodom inducibilna rezistencija na klindamicin može se detektovati stavljanjem klindamicin diska (2 μg), na udaljenost od 15-26 mm od diska eritromicina (15 μg).

Nakon inkubacije organizmi koji ne pokazuju izravnjenje zone inhibicije oko klindamicina izještavaju se kao klindamicin osjetljivi.

Organizmi koji pokazuju ravnu zonu inhibicije oko klindamicina koji se nalazi pored eritromicina pokazuje inducibilnu klindamicin rezistenciju.

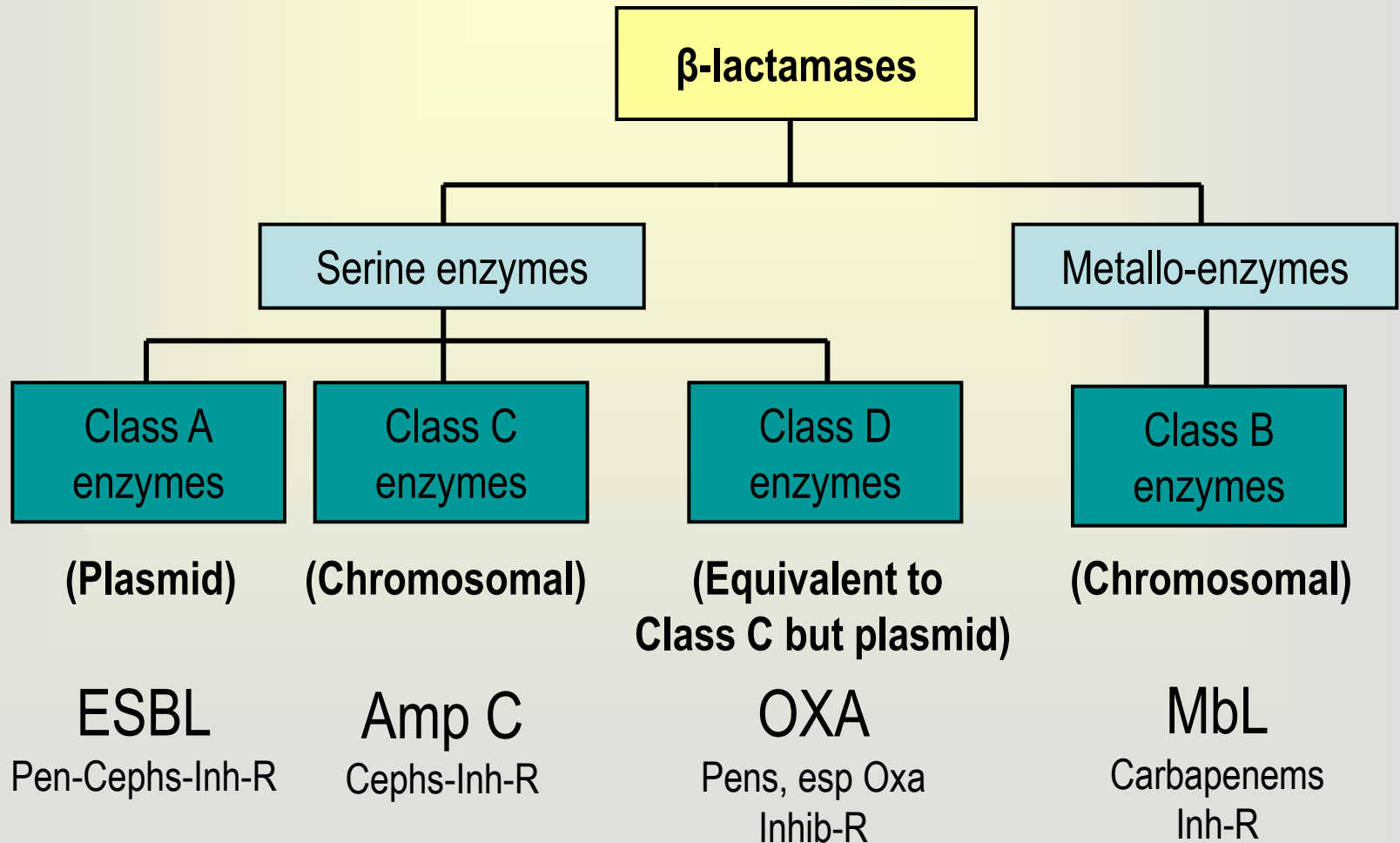




Interpretativni kriteriji za Enterobacteriaceae

Klasifikacija β -laktamaza Ambler

Zasnovana je na homologiji aminokiselinskih sekvenci.



Classification of betalactamases

<i>Ambler Class</i>	<i>Bush Group</i>	<i>Characteristics of betalactamases</i>	<i>Number of enzymes</i>
C	1	Often chromosomal enzymes in gram-negatives but some are plasmid-coded. Not inhibited by clavulanic acid.	51
A	2a	Staphylococcal and enterococcal penicillinases	23
	2b	Broad spectrum betalactamases including TEM-1 and SHV-1, mainly occurring in gram-negatives	16
	2be	Extended spectrum betalactamases (ESBL)	119
	2br	Inhibitor-resistant TEM (IRT) betalactamases	24
	2c	Carbenicillin-hydrolysing enzymes	19
	2d	Cloxacillin (oxacillin) hydrolysing enzymes	31
	2e	Cephalosporinases inhibited by clavulanic acid	20
	2f	Carbapenem-hydrolysing enzyme inhibited by clavulanic acid	4
B	3	Metallo-enzymes that hydrolyse carbapenems and other betalactams except monobactams. Not inhibited by clavulanic acid	24
D	4	Miscellaneous enzymes that do not fit into other groups	9

-Vrste *Klebsiella* spp. i *Escherichia coli* koje proizvode široko spektralne β laktamaze (ESBL) mogu da budu klinički rezistentne na terapiju sa penicilinom, cefalosporinima i aztreonamom a da su u in vitro uslovima osjetljive.

-Za sve potvrđene ESBL producente izdaje se rezultat da su rezistentni na sve peniciline, cefalosporine i aztreonam.

CLSI skrining za ESBL producente-disk difuzioni metod

Inicijalni skrining test za *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* i *E. coli*

Ceftazidime 30 μg

Cefotaxime 30 μg

Ceftriaxone 30 μg

Aztreonam 30 μg

Cefpodoxime 10 μg

Inicijalni skrining test za *Proteus mirabilis* (za klinički relevantne izolate)

Ceftazidime 30 $\mu\text{g}/\leq 22$ mm

Cefotaxime 30 $\mu\text{g}/\leq 27$ mm

Cefpodoxime 10 $\mu\text{g}/\leq 22$ mm

Kada su organizmi (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca* i *E. coli*) osjetljivi na cefoxitin i pokazuju sljedeću aktivnost na:

Ceftazidime ≤ 22 mm

Cefotaxime ≤ 27 mm

Ceftriaxone ≤ 25 mm

Aztreonam ≤ 27 mm

Cefpodoxime ≤ 17 mm

Dilucioni metod za skrining ESBL za *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* (CLSI)

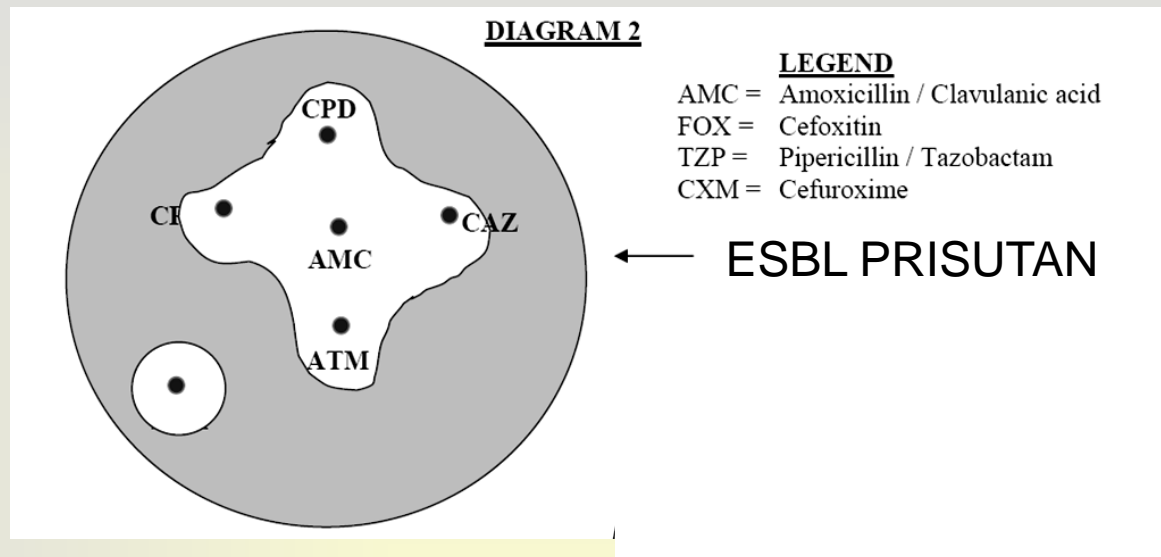
Za ovaj metod se koriste ceftazidim, aztreonam, cefotaksim ili ceftriakson u koncentraciji od 1 $\mu\text{g/ml}$.

Rast bakterija u ovoj skrining koncentraciji (MIC za cefalosporine je $\geq 2 \mu\text{g/ml}$) je sumnja na produkciju beta laktamaza proširenog spektra djelovanja i indikator za njegovu fenotipsku potvrdu.

-Algoritmi detekcije ESBL predloženi od strane EARSS-a prilagođeni su automatiziranom očitavanju antibiograma preko break point koncentracija.

Detektiranje ESBL preko diskova CAZ - AMC - CRO uključenih u rutinski antibiogram i dalje zadovoljava potrebe detektiranja ESBL producirajućih sojeva *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*.





ESBL prisutan: Kada postoji sinergistička aktivnost ubijanja između ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona ili aztreonama (kao i cefpodoxime) i beta-lactamasa inhibitora, klavulonska kiselina i da je organizam osjetljiv na cefoxitin.

Zona inhibicije za ceftazidim (30 µg) ≤ 20 mm ili cefotaksima (30 µg) ≤ 22 mm je potvrda ESBL soja.

-Potvrda ESBL produkcije (E-test ili jedna od double disk metoda) potrebna je samo u slučaju nejasno izraženog ESBL fenomena.

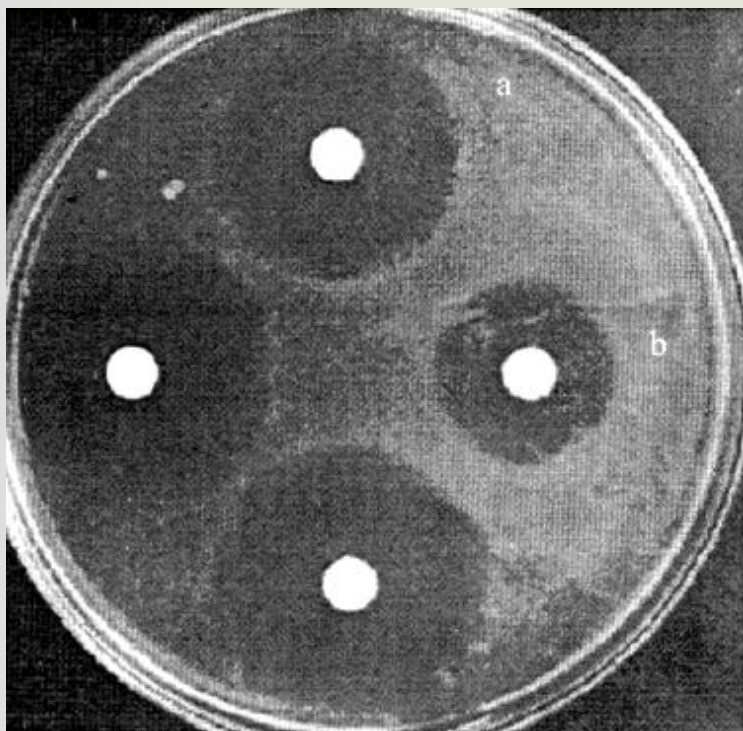


Figure 3. Extended-spectrum beta-lactamase producing *E. coli* strain. Confirmed with ceftazidime-clavulanate (a) versus ceftazidime alone (b).

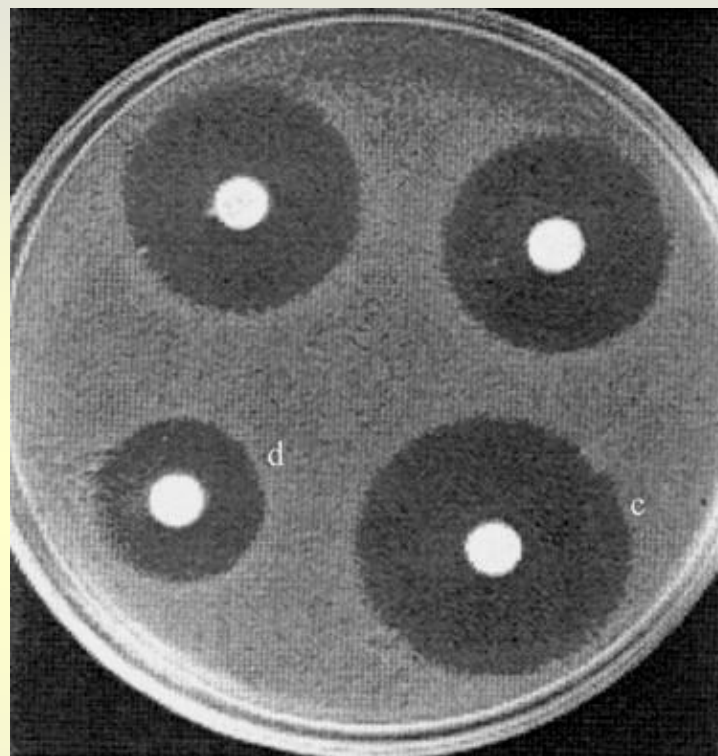


Figure 4. Extended-spectrum beta-lactamase producing *E. coli* strain. Confirmed with cefotaxime-clavulanate (c) versus cefotaxime alone (d).

ESBL prisutan

Zona inhibicije cefalosporina+klav.kiselina

Zona inhibicije cefalosporina = $\geq 1,5$

Zona inhibicije cefalosporina+klav.kiselina

- Zona inhibicije cefalosporina

= $\geq 5\text{mm}$

U fenotipskom potvrdnom testiranju za sve ESBL vrste MIC za jedan ili više široko spektralnih cefalosporina ili aztreonam trebalo bi da se smanjuje u prisustvu klavulonske kiseline.

Potvrđni test prisustva β laktamaza proširenog spektra djelovanja (ESBL) primjenom Etesta.

Strip lijevo sadrži cefotaxim + klavulonska kiselina (CTL) i cefotaxim (CT).

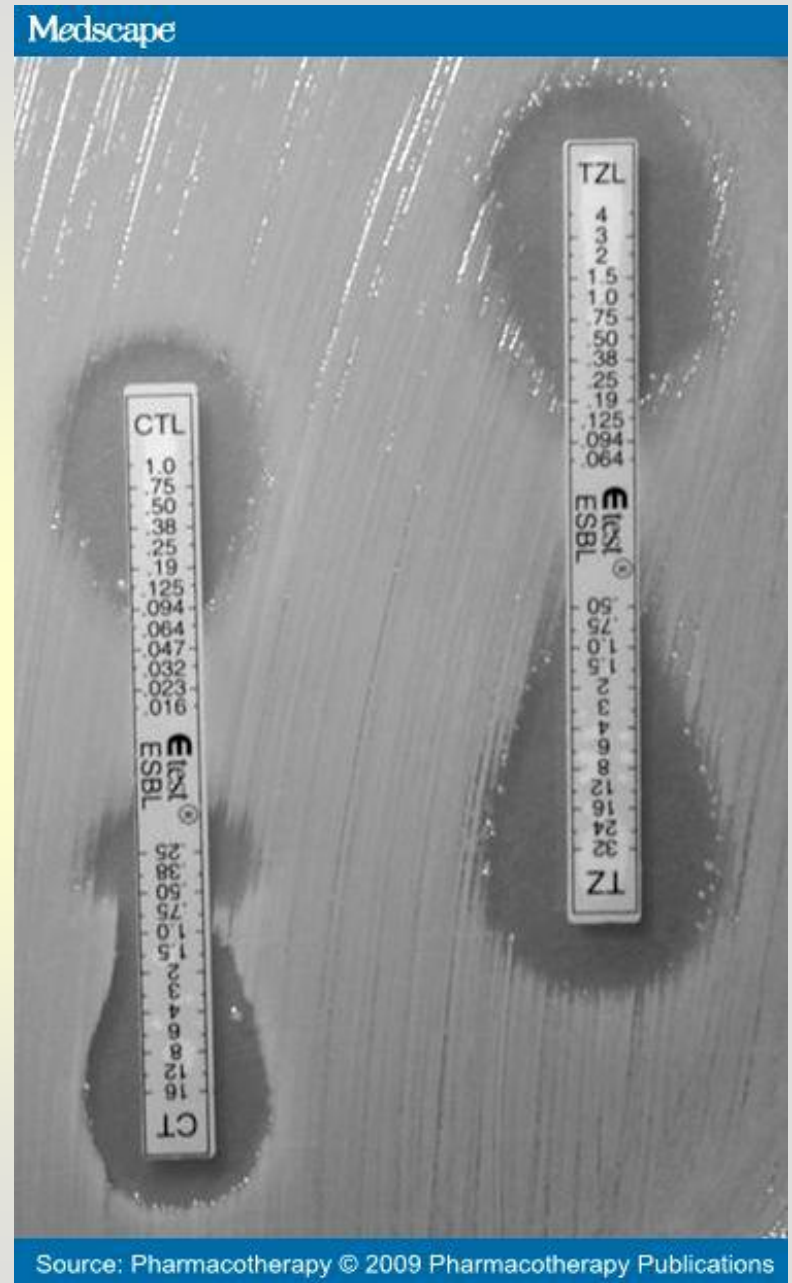
Strip desno sadrži ceftazidim + klavulonska kiselina (TZL) i ceftazidim (TZ).

Detekcija ESBL se postavlja prisustvom deformacije elipse cefotaksima ali i odnosom MICs cefalosporina (CT i TZ) i minimalne inhibitorne koncentracije (MICs) kombinacije cefotaxim + klavulonska kiselina (CTL) ili ceftazidim + klavulonska kiselina (TZL)

ESBL prisutan

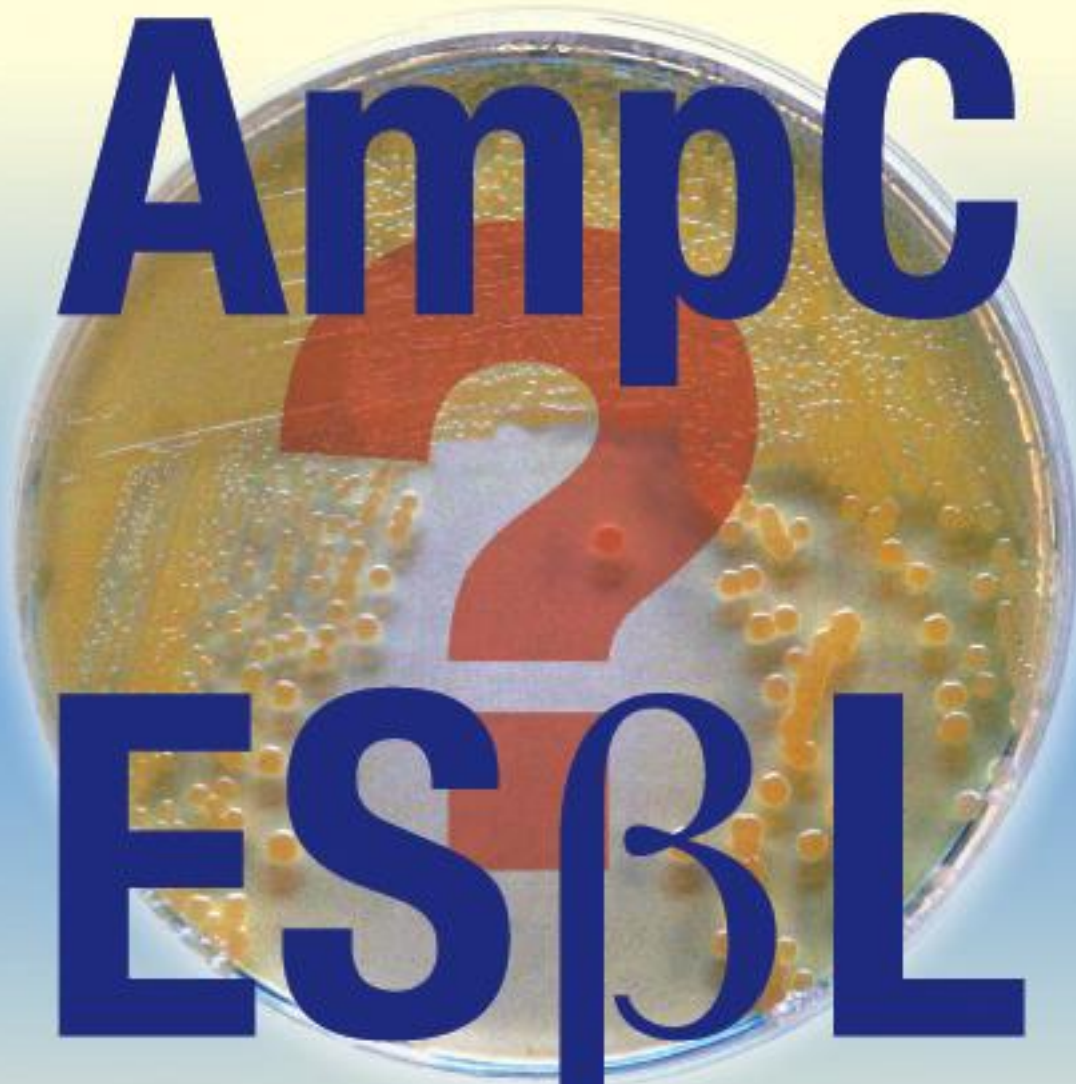
MIC cefalosporina

MIC cefalosporina+klav.kiselina ≥ 8



Amp^rC

ESβL



AmpC tip β -laktamaza je najčešće dokazan kod *Serratia*, *Enterobacter*, i *Citrobacter* species. Ovi enzimi vrše degradaciju cefalosporina, otporne su na djelovanje inhibitora β laktamaza kao što je klavulonska kiselina a osjetljive su na cloxacillin.

-Zbog mogućnosti istovremene hiperprodukcije ampC beta-laktamaza i ESBL u enterobakterija, preporučuje se u antibiogramu uz disk cefepima na koji visok stepen ekspresije AmpC ima minimalan efekat staviti disk piperacilin/tazobaktam PIP/TAZO.

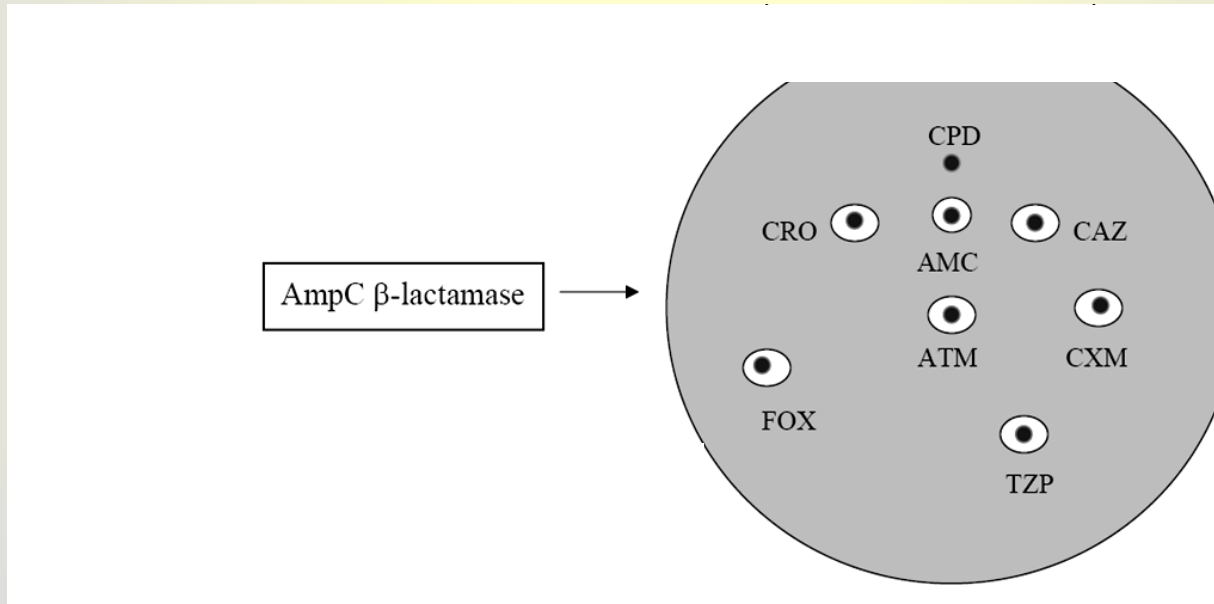
E test za detekciju AmpC β laktamaza

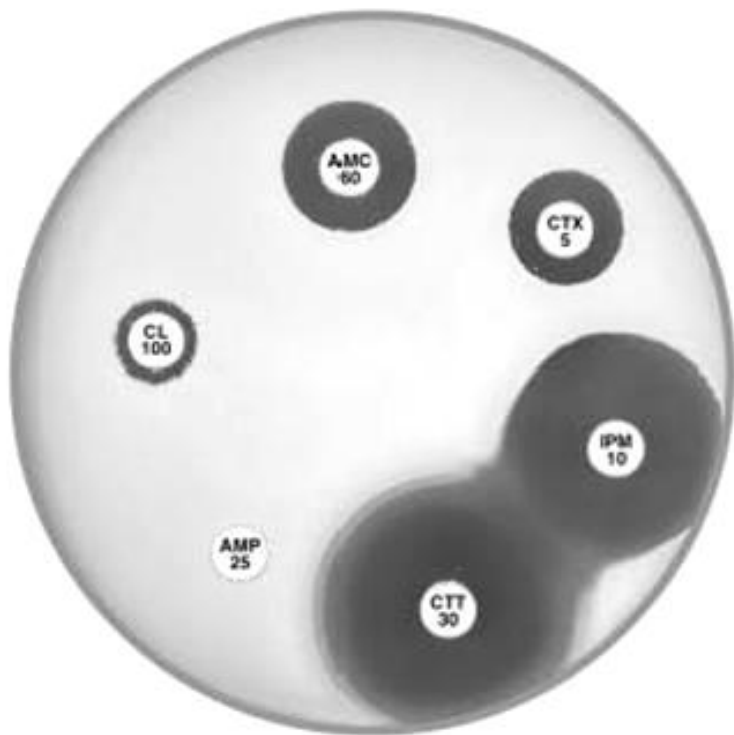
Na jednoj strani strip trake se nalazi cefamicin sam a na drugoj strani cefamicin sa cloxacillinom.

Povećanje vrijednosti MIC cefamicina tri ili više puta u odnosu na MIC cefamicina i cloxacillina ili deformacija zone inhibicije u vidu elipse oko E testa je znak postojanja AmpC β laktamaza.

AmpC- β laktamaze prisutne

Kada je dijametar zone za ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone ili aztreonam unutar zone rezistentnosti i kada nema sinergizma sa klavulonskom kiselinom i kada je organizam rezistentan na cefoxitin (dijametar zone inhibicije manji od 15 mm).

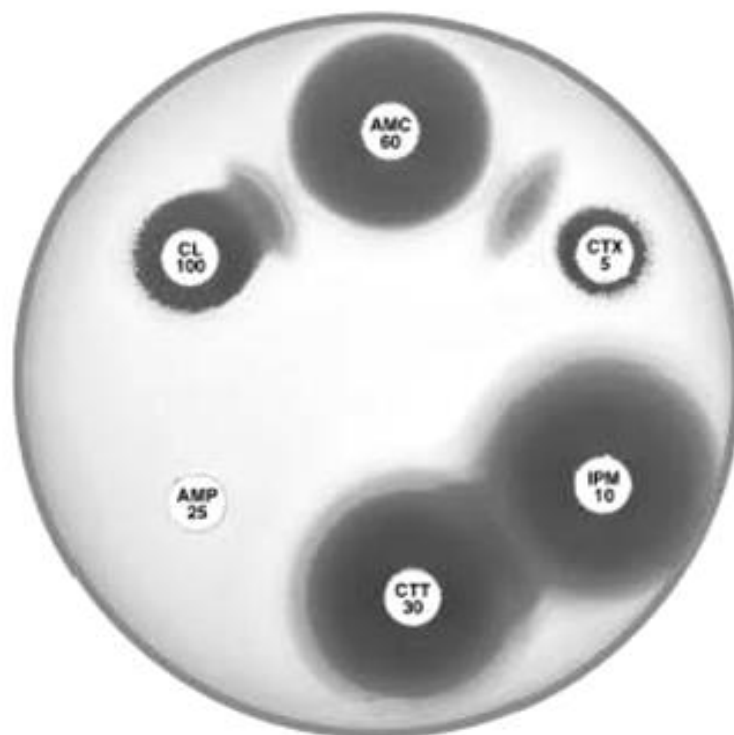




Klebsiella oxytoca koja proizvodi visok nivo K1 β -laktamaza.

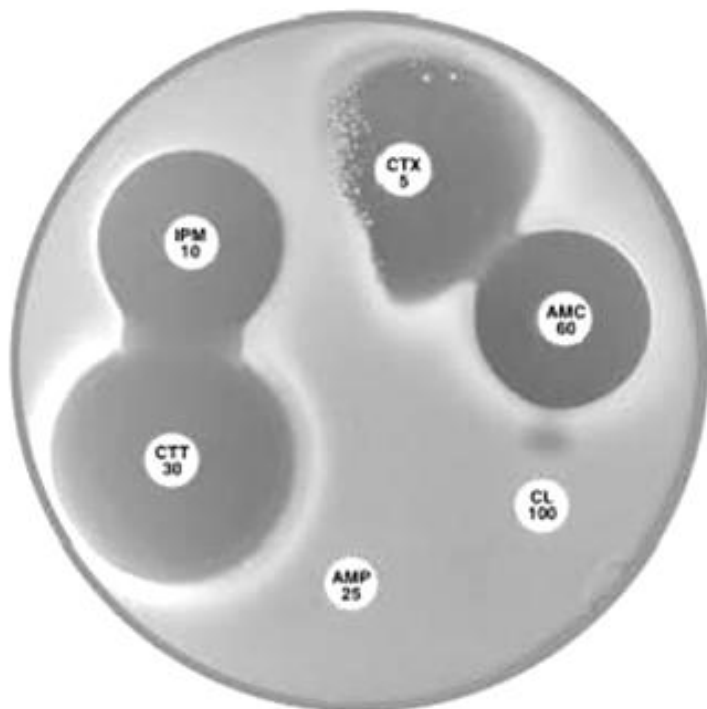
Ne postoji sinergizam između cefaleksina (CL 100) ili cefotaksima (CTX 5) i Augmentina (AMC -60).

Cefalosporinaza koja nije inhibirana klavulonskom kiselinom



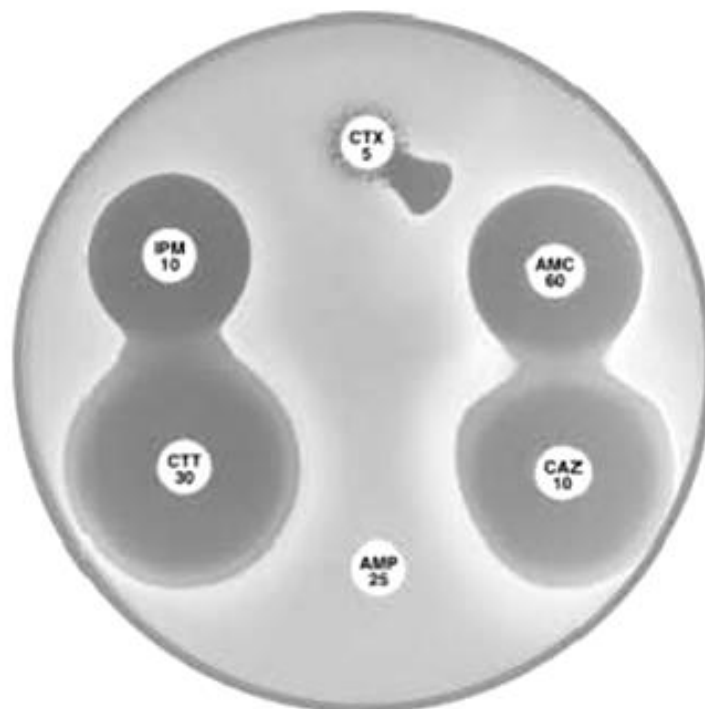
Klebsiella oxytoca sa niskim nivoom K1 β -laktamaza i sa produkcijom ESBL.

Postoji tipičan sinergizam između cefaleksina (CL 100), cefotaksima (CTX 5) i Augmentina (AMC 60).



Proteus penneri osjetljiv na Augmentin (AMC 60) ali sa spljoštenom zonom inhibicije oko cefotaksima (CTX 5) u blizini sa imipenemom (IPM 10) indicira prisustvo inducibilne 2e β laktamaze.

Cefalosporinaze inhibirane klavulonskom kiselinom



Proteus penneri koji produkuje visok nivo 2e β laktamaze.

Vidi se osjetljivost na ceftazidim (CAZ 10) i cefotetan (CTT 30) i fenomen "ključaonica" između Augmentin (AMC 60) i cefotaksim (CTX 5).

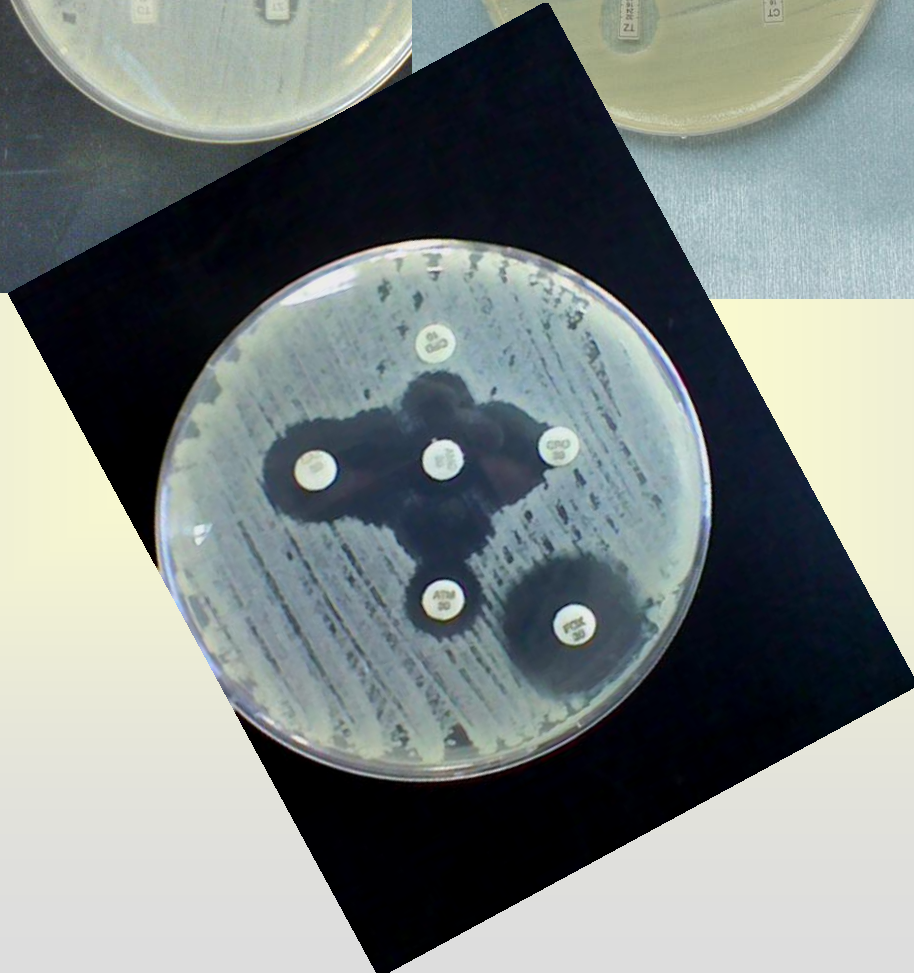
PROTOKOL SKRINING TESTA

Antibiotici koji će se testirati	Ceftazidim i cefotaksim/ceftriakson	
Potrebna informacija	Odrediti MIC vrijednost	
Rezultat	MIC ≤ 1 μg za sve gore pomenute cefalosporine 3 generacije	MIC ≥ 2 μg za bilo koji od gore pomenutih cefalosporina 3 generacije
Interpretacija	Vrsta nije suspekt na ESBL producenta	Vrsta je suspekt na ESBL producenta
Izvještaj ulazka za EARSS	ESBL negativan	
Dalja potvrda	-----	Potreban potvrdni test

Antibiotici koji
će se koristiti

Cefotaksim protiv cefotaksim+klavulonska kiselina
Ceftazidim protiv ceftazidim+klavulonska kiselina

ESBL E-test	<p><u>MIC cefalosporina</u> MIC cefalosporina+klav.kiselina ≤ 8</p>	<p><u>MIC cefalosporina</u> MIC cefalosporina+klav.kiselina ≥ 8</p>
MAST -DD	<p><u>Zona inhibicije cefalosporina+klav.kiselina</u> Zona inhibicije cefalosporina $\leq 1,5$</p>	<p><u>Zona inhibicije cefalosporina+klav.kiselina</u> Zona inhibicije cefalosporina $\geq 1,5$</p>
Oxoid kombinovani disk	<p>Zona inhibicije cefalosporina+klav.kiselina - Zona inhibicije cefalosporina $\leq 5\text{mm}$</p>	<p>Zona inhibicije cefalosporina+klav.kiselina -Zona inhibicije cefalosporina $\geq 5\text{mm}$</p>
	Nije ESBL producent	<p>ESBL producent U izvještaju za sve peniciline, cefalosporine i aztreonam se izvještava R čak iako je u in vitro testu S</p>



Metallo β laktamaze su enzimi koji hidroliziraju karbapeneme, i β laktamske antibiotike osim aztreonama. Nađene su kod *Enterobacteriaceae* i *Pseudomonas* species.

Skrining metod detekciju karbapenemaza je E test

Pošto su metalo beta laktamaze posredovane zinkom mogu biti suzbijene upotrebom ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

Jedna polovina E strip trake je impregnirana sa imipenemom a druga polovina sadrži imipenem plus EDTA. Smanjenje MIC imipenema tri ili više puta u prisustvu EDTA je pozitivan nalaz na metalobeta laktamaze.

Skrinin metod za detekciju Karbapenemaze koje proizvode Enterobacteriaceae (CPE)

Disk difuzion metoda

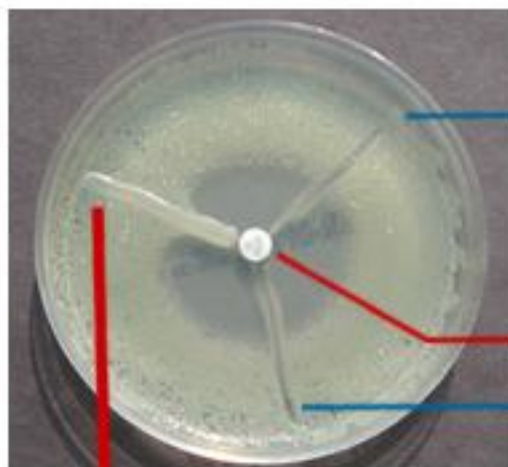
Zona inhibicije od 19-21 mm (EUCAST ≤ 18 mm) oko ertapenema (10 μg) ili 16-21 mm (EUCAST ≤ 16 mm) oko meropenema (10 μg) sugeriše na postojanje CPE.

Mikrodiluciona metoda

Za testiranje se koriste imipenem, meropenem, i ertapenem u koncentraciji od 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. MIC od 2-4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ za imipenem i meropenem ili MIC od 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ za ertapenem indicira prisustvo karbapenemaza.

Modifikovani Hodge test za detekciju karbapenemaza u Enterobacteriaceae

Produkcija karbapenemaza se detektuje upotrebom MHT kada izolat koji se testira proizvodi ovaj enzim i dozvoli rast karbapenem osjetljivoj vrsti *Escherichia coli* ATCC 25922 oko diska karbapenema. Pozitivan rezultat je kada je zona inhibicije između diska karbapenema i soja koji luči karbapenemaze ima izgled djeteline.



K. pneumoniae
Negative Control
MicroBioLogics® # 01006
ATCC® BAA-1706™*

Meropenem Disk

Negative Test Isolate

K. pneumoniae
Positive Control

MicroBioLogics® # 01005 ATCC® BAA-1705™*

MHT Using MicroBioLogics Quality Control Microorganisms

Fig. CDC

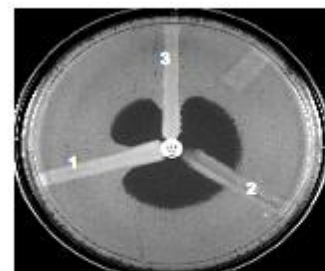


Figure 1. The MHT performed on a 100 mm MHA plate. (1) *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705, positive result (2) *K. pneumoniae* ATCC BAA 1706, negative result, and (3) a clinical isolate, positive result

-Fluorokinolon osjetljive vrste Salmonelle izolovane iz uzoraka izvan intestinalnog trakta koje su in vitro rezistentne na nalidiksinsku kiselinu mogu biti klinički neosjetljive na terapiju kinolonima.

Ekstraintestinalni izolati Salmonella se moraju testirati na osjetljivost prema nalidiksinskoj kiselinu.



Interpretativni kriteriji za Enterococcus

-Otpornost *Enterococcus* spp na cefalosporine, aminoglikozide (izuzev ako se testira visoki stepen rezistencije), klindamicin i trimetoprim -sulfometoksazol je njihova intrinzična karakteristika.

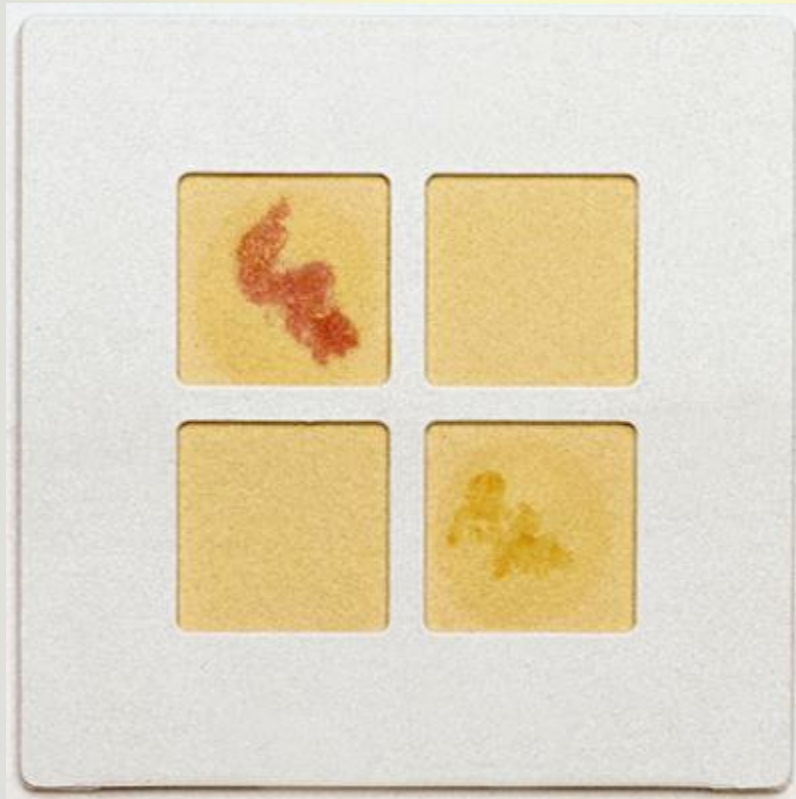
Navedeni antibiotici mogu biti osjetljivi in vitro no nedjelotvorni su u kliničkoj primjeni te se izolati *Enterococcus* spp. ne izvještavaju na navedene antibiotike ili se izvještavaju kao rezistentni bez prethodnog testiranja.

Rezistencija enterokoka na ampicilin i penicilin može biti usljed stvaranja PBP-a niskog afiniteta ili rijetko usljed produkcije β laktamaza.

Disk difuzionim testom se može veoma precizno dokazati prisustvo promjenjenih PBP-a ali ne i prisustvo β laktamaza.

Za izolate iz krvi ili likvora preporučuje se nitrocefim- β laktamaza test. Pozitivan β laktamaza test je prediktor rezistencije na penicilin, amino, karboksi i ureidopeniciline.

Brzi β laktamaza test daje pouzdane rezultate za detekcije ovih enzima kod *Neisseriae gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* i *Moraxellae catarrhalis*, a jedini je primjenljivi test za detekciju β laktamaza produkujućih izolata *Enterococcus* spp.



Određeni izolati Enterococca mogu da posjeduju visok stepen rezistenciju na penicilin (MIC \geq 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) i ampicilin (MIC \geq 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Disk difuzionim testom se ne mogu razlikovati enterokoki sa normalnom rezistencijom na penicilin i ampicilin od onih sa visokim stepenom rezistencije.

Enterokoki sa nižim stepenom rezistencije na penicilin (MIC \leq 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) i ampicilin (MIC \leq 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mogu biti osjetljivi na sinergističko ubijanje sa gentamicinom ili streptomycinom, dok enterokoki sa visokim stepenom rezistencije na penicilin i ampicilin nisu osjetljivi.

- Enterococci se dodatno testiraju i selektivno izvještavaju na gentamicin i streptomycin (**testom probira visokog stepena rezistencije**).
- Visoki stepen rezistencije na aminoglikozide je prisutan u većeg broja izolata enterokoka. Aminoglikozidi se ispituju diskovima koji sadrže veće koncentracije antibiotika (120 ug gentamicin, 300 ug streptomycin) jer se ta rezistencija ne može detektirati uobičajenim diskovima.

Ukoliko ima porasta oko navedenih diskova radi se o soju Enterococca sa visokim stepenom rezistencije, a ukoliko je zona inhibicije veća od 10 mm onda se nalaz tumači da sojevi ne posjeduju visok stepen rezistencije na aminoglikozide.

Prisustvo visokog stepena rezistencije za aminoglikozide kod enterokoka ukazuje na nemogućnost njihovog ubijanja sinergističkim djelovanjem aminoglikozida i inhibitora sinteze ćelijskog zida.

Rezistencija Enterococcus na glikopeptide može se klasificirati fenotipski i genotipski.

-VanA fenotip- visoki stepen inducibilne rezistencije na vankomicin i teikoplanin a kodiran je istoimenim genom;

-Van B fenotip- varijabilna inducibilna rezistencija na vankomicin određen vanB genom i

-VanC fenotip- neinducibilna rezistencija niskog stepena na vankomicin.

VanA i VanB fenotipovi su klinički najznačajniji i nalaze se u *E. faecalis* i *E. faecium*.

VanC se intrinzično nalazi u *E. gallinarum* i *E. casseliflavus*.

-Svaki vankomicin rezistentni enterokok treba identificirati do vrste jer je rezistencija na glikopeptide specijes specifična.

-Kada se ispituje osjetljivost enterokoka na vankomicin, primjenjuje se **vankomicin skrining probirna ploča** sa ugrađenim 6 µg/mL vankomicina. Ploča bi se trebala inkubirati puna 24 sata a osjetljivost očitavati upotrebom lampe.

Prisustvo ≥ 1 kolonije ili bilo kakvog sitnog rasta u vidu izmaglice unutar zone inhibicije indicira rezistenciju.

Organizmi sa intermedijernom zonom bi trebalo testirati i MIK metodom.

Ja sam super
rezistentna mutirana
bakterija! Ne možeš
mi ništa!



Interpretativni kriteriji za *Streptococcus pneumoniae*

Mehanizmi rezistencije Streptococcus pneumoniae

Penicilini	Višestruke izmjene u afinitetu penicilin vezujućih proteina
Cefalosporini	Dalje izmjene penicilin vezujućih proteina sa većim MIC za cefotaksim/ceftriakson nego za penicilin
Hloramfenikol	cat geni kodiraju acetyltransferazu za hloramfenikol, gubitak baktericidne sposobnosti kod penicilin rezistentnih, hloramfenikol osjetljivih vrsta
Eritromicin	ermAM geni kodiraju adenin dimetilazu koja djeluje na 23S rRNA, redukujući afinitet za makrolide i klindamicin mef geni kodiraju efluks pumpu za makrolide, što rezultira u rezistenciji na makrolide ali ne na klindamicin
Tetraciklini	tetM i terO geni kodiraju proteine koji se vežu na rRNA i blokiraju sintezu proteina

-Za liječenje pneumokoknih infekcija mogu da se koriste amoksisicilin, ampicilin, cefepim, cefotaksim, ceftriakson, cefuroksim, imipenem i meropenem. Ispitivanje osjetljivosti na ove lijekove se znatno bolje i realnije određuje primjenom MIK metode.

-Penicilin, cefotaksim ili ceftriakson i meropenem bi trebalo testirati primjeno MIK metode a izvještavati rutinski za izolate iz likvora. Takvi izolati bi se trebali takođe testirati i na vankomicin i to primjenom MIK metode.

-Izolati pneumokoka sa zonom inhibicije za oksacilin ≥ 20 mm su osjetljivi ($\text{MIK} \leq 0.06 \mu\text{g/mL}$) na penicilin što se podudara sa osjetljivošću na aminopeniciline, cefalosporine II, III i IV generacije, i karbapeneme.

-Za izolate pneumokoka čija je zona inhibicije za oksacilin ≤ 19 mm, moraju se testirati MIK metodom za penicilin, meropenem i cefotaksim ili ceftriakson, jer ova zona se može naći i kod penicilin rezistentnog ili intermedijernog soja.

OKSACILIN OX--R- uraditi E test za PENICILIN, AMOKSICILIN, CEFUROKSIM, CEFRTIAKSON i prema MIC-u upisati vrijednosti za te antibiotike

Penicilin	≤ 0.06 (S)	0.12-1.0 „soj je umjereno rezistentan na Pen“ ≥ 2.0 „soj je visoko rezistentan na Pen“
Ceftriakson	≤ 0.5 (S)	1.0 „soj je umjereno rezistentan na ceftriakson“ ≥ 2.0 „soj je visoko rezistentan na ceftriakson“
Cefuroksim	≤ 0.5 (S)	1.0 „soj je umjereno rezistentan na cefuroksim“ ≥ 2.0 „soj je visoko rezistentan na cefuroksim“
Amoksicilin	≤ 2.0 (S)	4.0 „soj je umjereno rezistentan na amoks.“ ≥ 8.0 „soj je visoko rezistentan na amoks.“

-Rezistenciju na kinolone u pneumokoka testirati diskom ciprofloksacina ali rezultate izdavati kao moksifloksacin osjetljive u slučaju CIP osjetljivih, a u slučaju za sada rijetkih CIP rezistentnih testiranje produžiti sa moksifloksacinom.

(interpretacija zone inhibicije kao za stafilokoke dok EUCAST ne odredi cut off vrijednosti)

-Umjesto eritromicina i azitromicina rezistenciju na makrolide testirati diskom klaritromicina, a rezultate izdavati za sva tri makrolida.

-Klindamicin se očitava kao osjetljiv bez obzira na fenomen indukcije rezistencije od strane makrolida.

Opisana su dva fenotipa rezistencije streptokoka na makrolide
"MLSB" i "M".

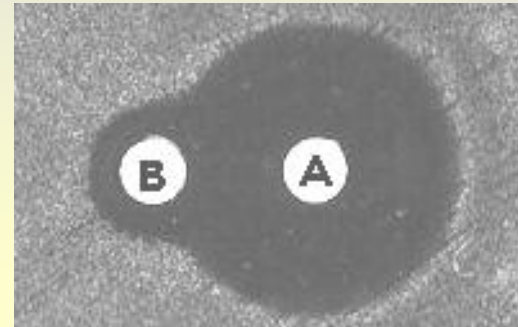
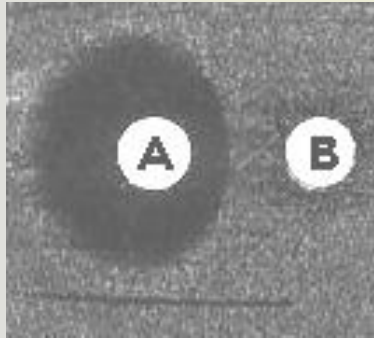
MLSB - Rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramin B.
Nastaje usljed metilacije jednog adenina u 50s podjedinici bakterijskog ribozoma na koji se veže eritromicin. Naziva se "erm"gen i može da bude inducibilan (iMLSB) ili konstitutivan (cMLSB)

M -Rezistencija na makrolide ali ne na linkozamid i streptogramin B.
Nastaje usljed makrolidne efflux pumpe i naziva se "mef"gen.

Primjeri MIC ($\mu\text{g/mL}$) vrijednosti za pojedine fenotipova rezistencije *S. pyogenes* na makrolide

fenitip	Divlji tip	M	iMLSb	cMLSb	ML	MSB
genotype		<i>mef(A)</i>	<i>erm(TR)</i>	<i>erm(B)</i>	Mutacija na 23S rRNA, ili na L4 ili L22 proteinima ribozoma	
erythromycin (14 ring)	0.03	4	1	>32	>32	>32
azithromycin (15 ring, azalide)	0.125	4	4	>32	>32	>32
clarithromycin (14 ring)	0.03	4	0.25	>32	>32	>32
roxithromycin (15 ring)	0.06	8	4	>32	>32	>32
clindamycin (lincosamide)	0.03	0.03	0.06	>32	0.8	0.1
telithromycin (ketolide)	0.03	0.25	0.06	1 to 16	0.01	0.1
clindamycin poslije izlaganja bakterije erythromycinu	0.03	0.03	>32	>32	?	?
rokitamycin (16 ring macrolide)	0.25	0.25	4	>32	>32	>32
streptogramin B	3	3	25	25	3	25

Double Disk - test osjetljivosti



iMLSB- zona inhibicije klindamicina je zatupljena prema eritromicinu jer eritromicin indukuje rezistenciju na klindamicin

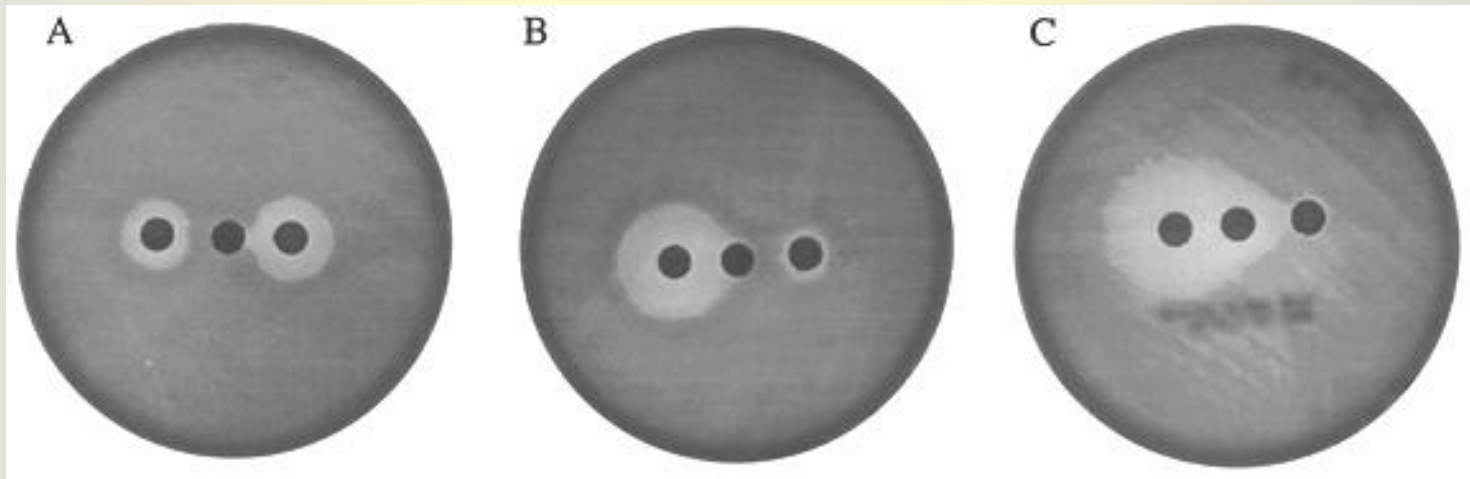
cMLSB- nema zone inhibicije niti oko eritromicina niti oko klindamicina jer je “erm” izražen cijelo vrijeme

M- nema izmjene zone inhibicije klindamicina indukovane prisustvom eritromicina jer “mef” ne izbacuje klindamicin napolje bez obzira na prisustvo eritromicina.

A= clindamycin i B=erythromycin

Disk lijevo –klindamicin
Disk u sredini-eritromicin
Disk desno-streptogramin B

Testiranje rRNA ili mutanta ribozomalnih proteina



Ploča A pokazuje ML (rRNA mutacija), ploča B i C pokazuje MSB (obje L4 mutacije).



Testiranje ne-fermentora

Mehanizmi rezistencije *Pseudomonas aeruginosae*

Kinoloni i aminoglikozidi

Mutaciona modifikacija ciljnog mjesta antibiotika kao što su gyraze, topoizomeraze ili ribozomalni proteini

β laktamski antibiotici

Konstitutivna ili inducibilna derepresija hromozomski kodirane AmpC β laktamaze

Imipenem

Gubitak vanjskog proteina membrane usljed mutacije sprječavajući prepoznavanje antimikrobne substance

β laktamski antibiotici, fluorokinoloni, tetraciklini, hloramfenikol, trimetoprim i aminoglikozidi

Efikasan efluks sistem

Karbapenemi i aminoglikozidi

Plazmidom kodirana ekspresija različitih beta laktamaza (metallo-beta laktamaze)

-Interpretacija disk difuzione metode testiranja osjetljivosti (NCCLS) je pouzdana samo za *P. aeruginosa* i *Acinetobacter* spp., dok za ostale rijetke, klinički značajne non-fermentore treba je određivati MIK metodom.

-Kod ozbiljnih infekcija, kompliciranih prisutnošću biofilma za *P. aeruginosa* preporučuje se odrediti MIK-ove za antipseudomonasne antibiotike pogotovo za beta-laktame.

Pseudomonas aeruginosa ima osobinu da brzo stiče rezistenciju na fluorokinolone. Kao pokazatelj osjetljivosti za sve fluorokinolone koristi se testiranje osjetljivosti na ciprofloksacin jer je dokazana ukrštena rezistencija između ciprofloksacina i levofloksacina.

Vrste Pseudomonasa koje imaju vrijednost MIC za ciprofloksacin ≥ 2 mg/L i levofloksacin ≥ 4 mg/L označavaju se kao vrste rezistentne na fluorokinolone.

Veoma značajne vrste Pseudomonas aeruginose su MDR fenotipovi koje pokazuju rezistenciju na fluorokinolone, ceftazidim, cefepim, imipenem i piperacilin/tazobaktam, gentamicin.

Table 1. Acceptable disk breakpoint correlates for *S. maltophilia*. (Extracted from NCCLS Document M100-S15)

Antimicrobial agent	Disk Conc. (mg)	Zone Diameter (mm)	Zone Diameter (mm)	Zone Diameter (mm)	MIC Interpretation (mg/L)	MIC Interpretation (mg/L)	MIC Interpretation (mg/L)
<i>S. maltophilia</i> and <i>B. cepacia</i>		S	I	R	S	I	R
TMP-SMX	1.25/23.75	³ 16	11-15	≤10	≤2/38	-	³ 4/76
Levofloxacin	5	³ 17	14-16	≤13	≤2	4	³ 8
Minocycline	30	³ 19	15-18	≤14	≤4	8	³ 16
Ticarcillin-clavulanate		NA	NA	NA	≤16/2	32/2-64/2	³ 128/2
<i>B. cepacia</i> only							
Ceftazidime	30	³ 21	18-20	≤17	≤8	16	³ 32
Meropenem	10	³ 20	16-19	≤15	≤4	8	³ 16

U p o z o r e n j e

Organizam	Antimikrobni lijekovi za koje ne bi smjeli davati izvještaj kao osjetljivi (S)
ESBL produkujuća Klebsiella oxytoca, Escherichia coli, Proteus mirabilis	Penicilini, cefalosporini ili aztreonam
Salmonella species, Shigella species	Prva i druga generacija cefalosporina, cefamicini i aminoglikozidi
Oxacillin rezistentan Staphylococcus species	Penicilini, kombinacije β laktama i β laktamaza inhibitora, cefemi i karbapenemi
Enterococcus species	Aminoglikozidi (sem onih visoke koncentracije), cefalosporini, klindamicin i trimetoprim/sulfametoksazol