

Μηχανισμοί Αντοχής των Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων στα β-λακταμικά αντιβιοτικά

Ευαγγελία Λεμπέση

Διευθύντρια ΕΣΥ

Μικροβιολογικό Εργαστήριο

Ν. Παίδων Αθηνών “Π. & Α. Κυριακού”

Πρόγραμμα Μετεκπαιδευτικών Μαθημάτων
Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας 2012-13

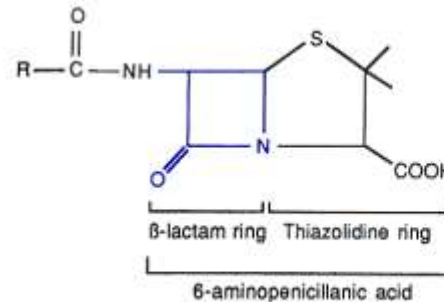
β-λακταμικά αντιβιοτικά.....

.....70 χρόνια ιστορία

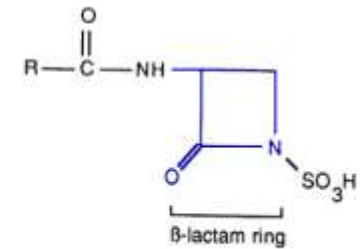


1. Πενικιλίνες
2. Κεφαλοσπορίνες
3. Αναστολείς των β-λακταμασών
4. Μονοβακτάμες (αζτρεονάμη)
5. Καρβακεφές (λορακαρμπέφη)
6. Καρβαπενέμες (ιμιπενέμη, μεροπενέμη, ερταπενέμη, ντοριπενέμη)

a) Penicillins



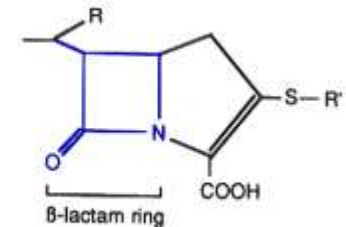
c) Monobactams



b) Cephalosporins



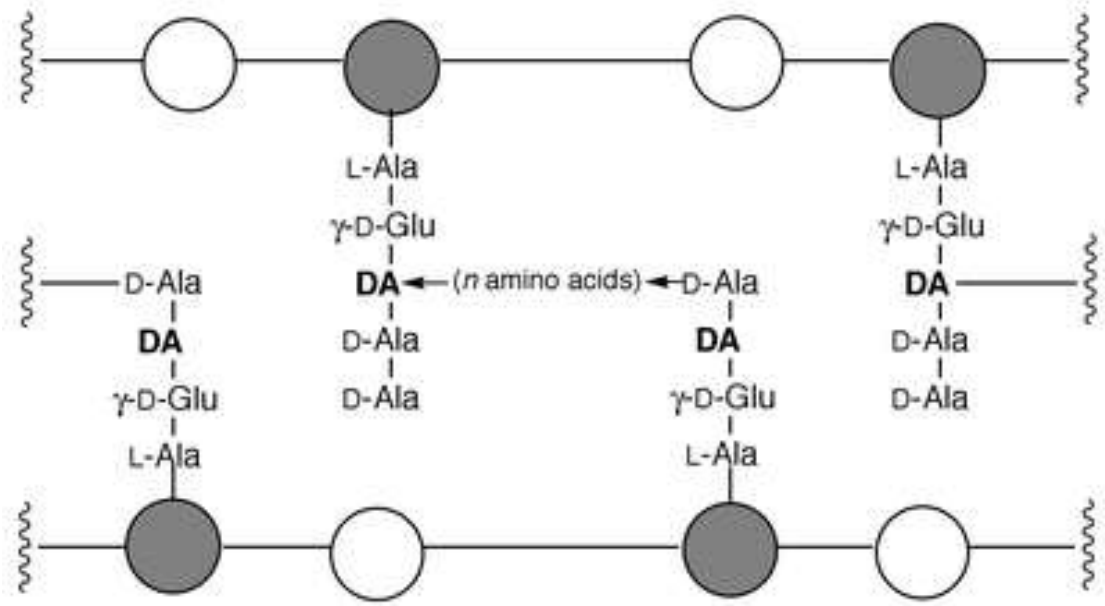
d) Carbapenems



Κοινό χαρακτηριστικό ο δακτύλιος της β-λακτάμης και Στόχος δράσης οι Πενικιλινοδεσμευτικές Πρωτεΐνες -PBPs

PBPs - Σύνθεση πεπτιδογλυκάνης

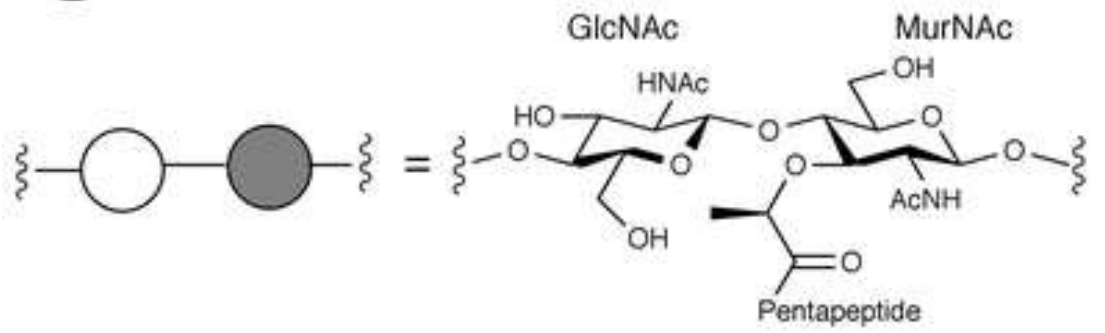
PBPs: Penicillin Binding Proteins



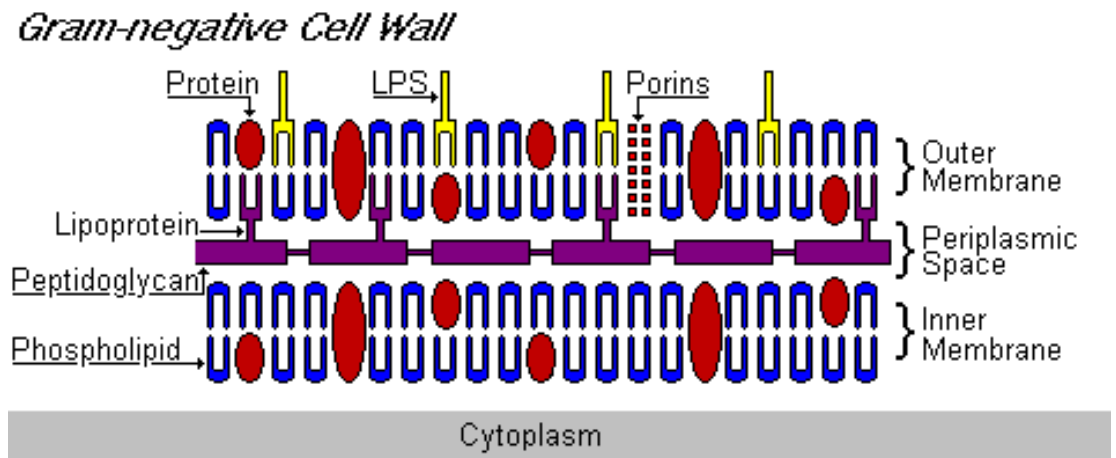
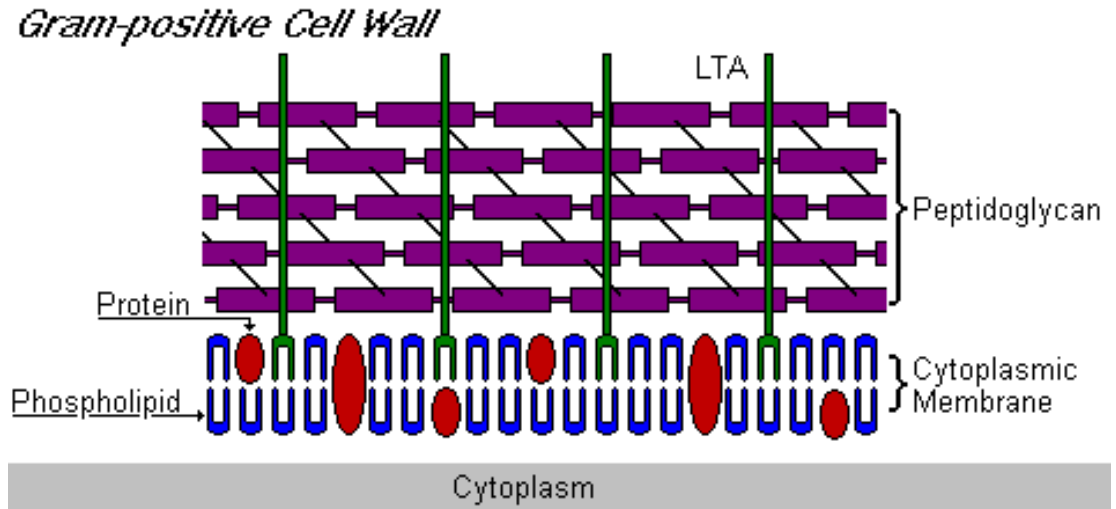
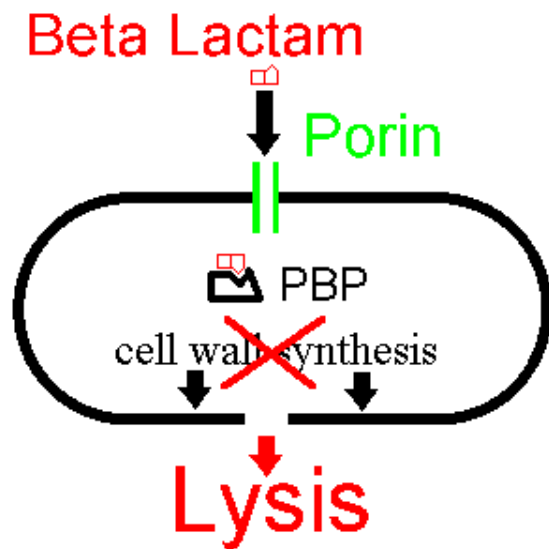
DA = diamino acid

- = N-acetylmuramic acid (MurNAc)
- = N-acetylglucosamine (GlcNAc)

Οι PBPs ως
 τρανσπεπτιδάσες
 καταλύουν την
 τρανσπεπτιδίωση
 της
 πεπτιδογλυκάνης



β-λακταμικά – μηχανισμός δράσης



PBPs: Penicillin Binding Proteins
Καταλύουν την σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης

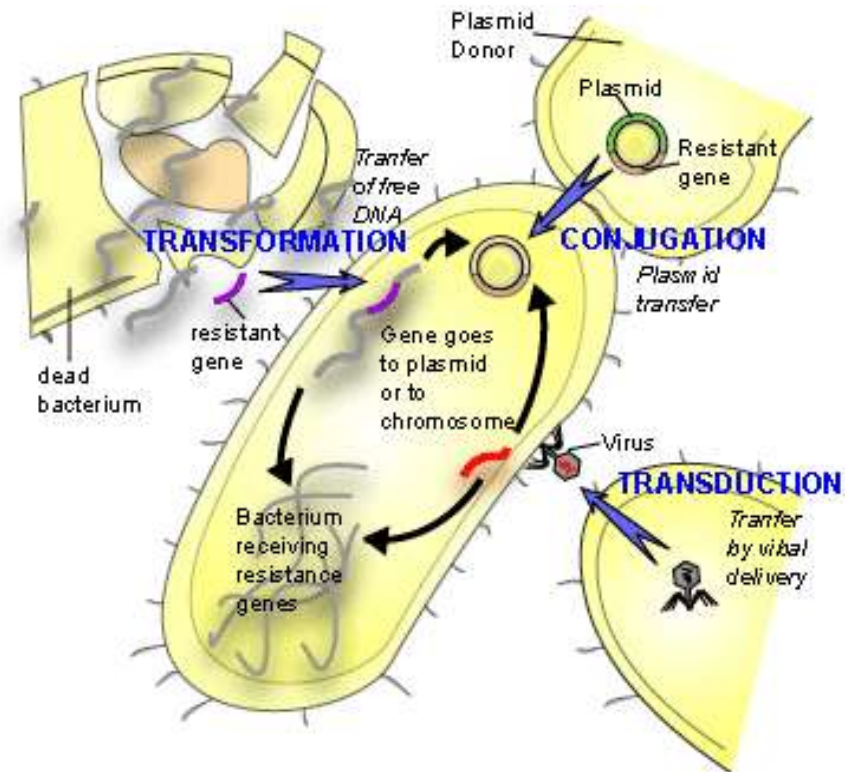
Αντοχή των μικροβίων στα αντιβιοτικά

- Φυσική ή ενδογενής (intrinsic)
 - Εξαρτάται από το είδος των βακτηρίων και καθορίζεται γενετικά
- Επίκτητη (acquired)
 - Αναπτύσσεται σε αρχικά ευαίσθητα μικρόβια με διάφορους μηχανισμούς

Γενετικοί μηχανισμοί επίκτητης αντοχής

Η επίκτητη αντοχή οφείλεται σε:

- αλλαγές (mutations) στη δομή του χρωσωματικού DNA ή / και
- απόκτηση γενετικού υλικού από άλλα βακτήρια:
 - Μεταμόρφωση (transformation)
 - Σύζευξη (conjugation)
 - Μεταγωγή (transduction)



Η επίκτητη αντοχή αποτελεί το καλύτερο παράδειγμα ταχύτατης προσαρμογής των βακτηρίων στο νέο οικοσύστημα

Βιοχημικοί μηχανισμοί επίκτητης αντοχής στα β-λακταμικά

- **Τροποποίηση του στόχου δράσης – PBP_s**
 - Απαντάται συνήθως στα Gram (+) βακτήρια και συμβαίνει με:
 1. Απόκτηση νέων – ξένων PBP_s
 2. Ανασυνδυασμό PBP_s “μεταμόρφωση”
 3. Σημειακές μεταλλαγές στις υπάρχουσες PBP_s
 4. Υπερπαραγωγή PBP (σχετικά σπάνια)
- **Παραγωγή β-λακταμασών**
 - Απαντάται συνήθως στα Gram (-) βακτήρια
- Μειωμένη διαπερατότητα – απώλεια πορινών (πχ IMP)
- Συστήματα αντλιών ενεργητικής αποβολής του αντιβιοτικού (πχ MEM)

Gram θετικά βακτήρια

Σταφυλόκοκκοι

Εντερόκοκκοι

Πνευμονιόκοκκοι

Σταφυλόκοκκοι



Οι σταφυλόκοκκοι αποκτούν εύκολα αντοχή, γιατί εύκολα ενσωματώνουν στο χρωμόσωμα βακτηριοφάγους, πλασμίδια, τρανσποζόνια και αλληλουχίες εισδοχής

Η ανταλλαγή γενετικού υλικού γίνεται κυρίως με μεταγωγή και σύζευξη

Αντοχή στις β-λακτάμες – ιστορική αναδρομή

- 1941: Ανακάλυψη της πενικιλίνης
- 1942: Αντοχή στην πενικιλίνη, λόγω πενικιλινάσης
- 1959: Ανακάλυψη των πενικιλινασοάντοχων πενικιλινών (oxacillin, methicillin, cloxacillin, dicloxacillin)
- 1961: Αντοχή στη Μεθικιλίνη - **MRSA**
“**Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus***”
ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ Β-ΛΑΚΤΑΜΕΣ
Εξαιρούνται οι νέες αντι-MRSA κεφαλοσπορίνες:
Κεφτομπιπρόλη, Κεφταρολίνη
- '70s –'80s: Τα περισσότερα MRSA είναι νοσοκομειακά
“Hospital – Acquired/Associated MRSA” **HA-MRSA**
- Τέλη '90s: **CA – MRSA** “Community - Acquired MRSA”

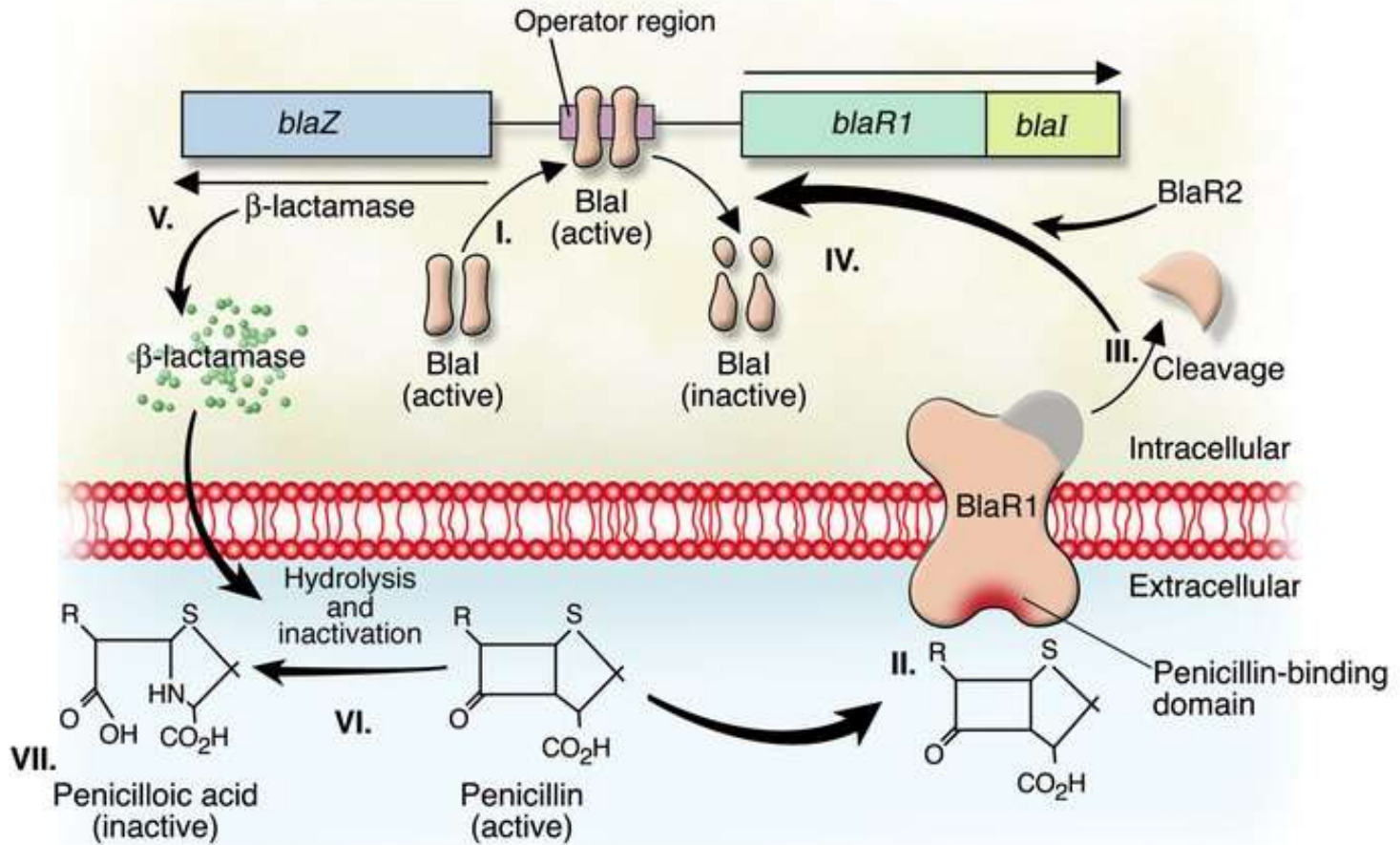
Η αντοχή στις β-λακτάμες μπορεί να οφείλεται:

- Παραγωγή β-λακταμάσης - πενικιλινάσης
 - Αντοχή στην PEN και αμινο-, καρβοξυ-, ουρέϊδο-πενικιλίνες
- Σύνθεση μιας νέας PBP (PBP2a) - **Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus “MRSA”**
 - Αντοχή σε όλα τα β-λακταμικά και τους αναστολείς – ανιχνεύεται με τον έλεγχο της OXACILLIN και CEFOXITIN
- Τροποποίηση των φυσιολογικώς παραγομένων PBPs 1-4 “MOD (modification) strains” (σπάνια)
 - Αντοχή στην OXACILLIN ($\geq 4\mu\text{g/ml}$) και σε όλα τα β-λακταμικά (πιθανόν δίσκος CEFOXITIN E)

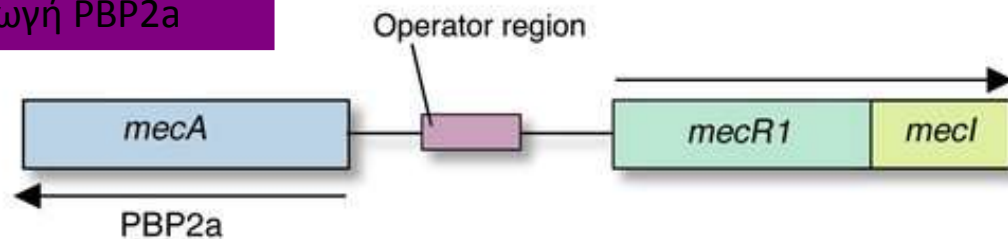
I. Αντοχή στην πενικιλίνη - Παραγωγή πενικιλινάσης

- Συμβαίνει σχεδόν σε όλα τα κλινικά στελέχη >90%
 - Η παραγωγή της πενικιλινάσης κωδικοποιείται από το γονίδιο *bla_Z* και τα ρυθμιστικά γονίδια *bla_I* και *bla_{R1}*.
 - Η αντοχή θεωρείται επαγώγιμη
 - Ο έλεγχος γίνεται:
 - *S. aureus*: με δίσκο PEN ($S \geq 29\text{mm}$) ή MIC_{PEN} ($S \leq 0.12\text{mg/L}$)
 - *S. aureus*, *S. lugdunensis*, SCN*: με Νιτροσεφίνη (παίρνοντας καλλιέργημα γύρω από την ΟΧΑ ή FOX και διάβασμα μετά 1 ώρα)
 - Στελέχη με αυξημένη παραγωγή πενικιλινάσης, μπορεί να εμφανιστούν ως ανθεκτικά στην ΟΧΑ

a Παραγωγή πενικιλλινάσης



b Παραγωγή PBP2a

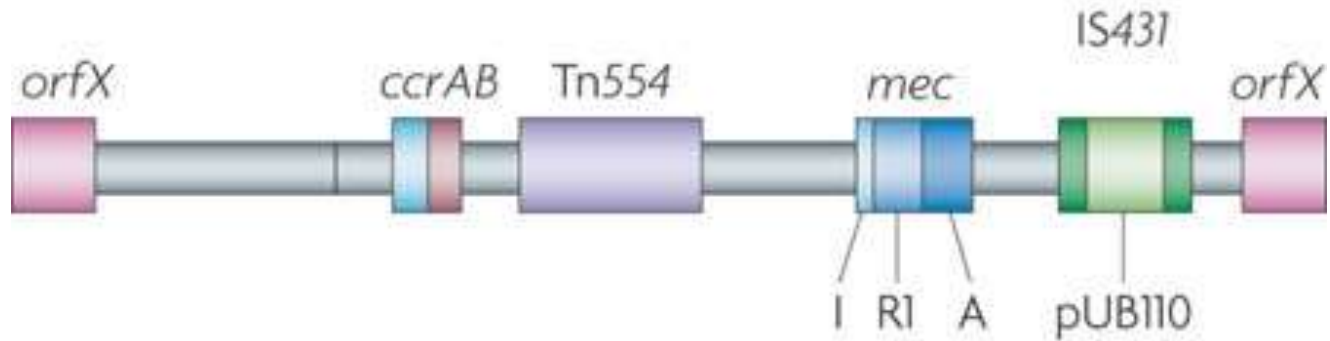


II. Αντοχή σε όλα τα β-λακταμικά - MRSA

- Οφείλεται στην παραγωγή της **PBP2a**
 - Η PBP2a είναι μια νέα PBP με μειωμένη τάση σύνδεσης με όλες τις β-λακτάμες
 - Κωδικοποιείται από το mecA γονίδιο και τα ρυθμιστικά mecI και mecR1, τα οποία αποτελούν βασικά στοιχεία της χρωμοσωματικής σταφυλοκοκκικής κασέτας (Staphylococcal Cassette Chromosome, SCCmec)
 - Υπάρχουν 9 τύποι *SCCmec*: I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX
 - Το επίπεδο αντοχής εξαρτάται από το παραγόμενο ποσό της PBP2a - Η αντοχή είναι επαγωγίμη
 - Ετεροαντοχή ($1/10^4$ - 10^8) Οριακές οι MICs στην OXA: 2-8μg/ml

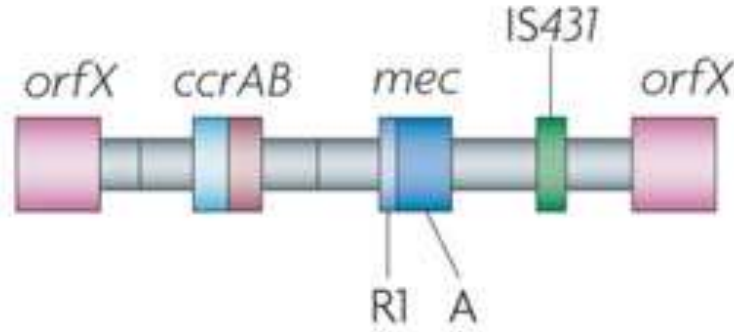
HA-MRSA

a *SCCmecII*



CA-MRSA

b *SCCmecIV*



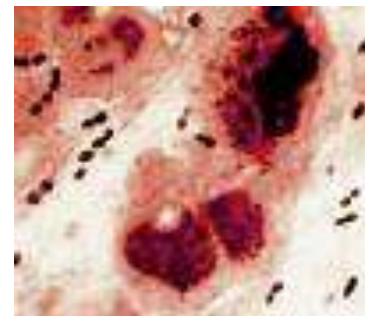
Nature Reviews | Microbiology

Γονίδια αντοχής σε άλλα αντιβιοτικά μπορούν να ενσωματωθούν στην *SCCmec* περιοχή (τύποι II, III) – πολυανθεκτικά στελέχη

Ανίχνευση των MRSA

- Οι MRSA ανιχνεύονται με:
 - Έλεγχο της CEFOXITIN ή OXACILLIN (CLSI)
 - Ανίχνευση της PBP2a (latex test)
 - Ανίχνευση του *mecA* γονιδίου (μοριακή μέθοδος)

ΠΝΕΥΜΟΝΙΟΚΟΚΚΟΙ



Αντοχή στην Πενικιλίνη – ιστορική αναδρομή

- 1967: Νέα Γουινέα - Το 1^ο στέλεχος με μειωμένη ευαισθησία (IS) στην πενικιλίνη (MIC 0.5mg/l)
- 1970s: Ν. Αφρική - 1977: επιδημία με πολυανθεκτικά στελέχη
- 1980s: Ευρώπη - Παγκόσμια διασπορά!
- 1990s: ΗΠΑ και Ελλάδα
- Τελευταία έχει εμφανιστεί αντοχή και στις κεφαλοσπορίνες γ' γενιάς
- Ελλάδα: Αντοχή στην PEN 1990-2000 / 10,3-38,5%

MDR – multidrug resistant

Μηχανισμός Αντοχής σε Πενικιλίνη και Κεφαλ/ρίνες

Οφείλεται σε Τροποποιημένες PBP's, μειωμένης συγγένειας με τις β-λακτάμες, οι οποίες προκύπτουν με ανασυνδυασμό των φυσικών *pbp* γονιδίων με ξένα *pbp* γονίδια από συγγενή είδη – “μωσαϊκά” γονίδια – “μεταμόρφωση”

- PBP's (φυσιολογικές): 1a, 1b, 2a, 2b, 2x, 3
- Αλλαγές σε μια μόνο PBP οδηγούν σε χαμηλού επιπέδου αντοχή
- Η ανάπτυξη της αντοχής συμβαίνει σταδιακά “step by step” με συνέπεια την αύξηση του επιπέδου αντοχής
- Αλλαγές σε:
 - PBP2x, PBP2b, PBP1a: Penicillin^R
 - PBP2x, PBP1a: Cephalosporin^R

Ανίχνευση της αντοχής του *S.pneumoniae* στην Penicillin

– Με δίσκο OXA 1μg

- $\geq 20\text{mm}$: Ευαισθησία στην PEN (MIC $\leq 0.06\mu\text{g/ml}$)
- $\leq 19\text{mm}$: Ενδιάμεση ευαισθησία ή Αντοχή ή Ευαισθησία (σπάνια).

Γι' αυτό συνιστάται:

Προσδιορισμός MICs για PEN, CRO ή CTX ή MEM

Στελέχη ευαίσθητα στην PEN, είναι συνήθως ευαίσθητα σε όλα τα β-λακταμικά

Η Απάντηση στο Πρόβλημα της Αντοχής

- 2000: 7-δύναμο εμβόλιο (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) με
 - Αποτελεσματικότητα >95%
 - Μείωση των διεισδυτικών λοιμώξεων
 - Μείωση της αντοχής
- 2009: 10-δύναμο εμβόλιο (..... 1, 5, 7F)
- 2010: 13-δύναμο εμβόλιο (..... 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A)
- Ανησυχεί η αυξημένη επίπτωση του 19A – πολυανθεκτικό και λοιμογόνο στέλεχος

Εντερόκοκκοι

Αντοχή των Εντεροκόκκων στα β-λακταμικά

- Οι Εντερόκοκκοι διαθέτουν την PBP5, χαμηλής συγγένειας με τα β-λακταμικά, με συνέπεια:
 - Ενδογενή αντοχή σε:
 - κεφαλοσπορίνες,
 - αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες (OXA) και
 - αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες (TIC, CARB)
 - Σχετικά υψηλές MICs σε AMP και PIP, σε σχέση με τους στρεπτοκόκκους:
 - *E. faecalis* 1-8μg/ml, *E. faecium* 16-64μg/ml

Επίκτητη αντοχή

Συμβαίνει συχνά στον *E. faecium* και σπανιότατα στον *E. faecalis*.
Οφείλεται σε:

1. Υπερπαραγωγή ή τροποποίηση της PBP5 με “σημειακές μεταλλαγές”
 - Υψηλού επιπέδου αντοχή στην PEN >1000μg/ml
 - Διασταυρούμενη αντοχή σε όλα τα β-λακταμικά
2. Παραγωγή β-λακταμάσης (εξαιρετικά σπάνια)
 - Αντοχή σε PEN, AMP, AMX, PIP και Ευαισθησία σε αναστολείς β-λακταμασών
 - Έλεγχος με νιτροσεφίνη: απαραίτητος σε σοβαρές λοιμώξεις, ανεξάρτητα από την in vitro ευαισθησία

Ευαισθησία στην PEN σημαίνει και ευαισθησία στην AMP, ενώ
Ευαισθησία στην AMP δεν σημαίνει και ευαισθησία στην PEN

Απαιτητικά βακτήρια

Αιμόφιλος
Μηνιγγιτιδόκοκκος
Γονόκοκκος
Μοραξέλλα

Αντοχή του *Haemophilus influenzae* στα β-λακταμικά

- Παραγωγή β-λακταμάσης
 - TEM-1 >95%, ROB-1 <1%
 - Πλασμιδιακή
 - Αντοχή μόνο σε αμπικιλίνη, αμοξικιλίνη
 - Υψηλού επιπέδου: MIC $\geq 16\text{mg/L}$
 - Έλεγχος με νιτροσεφίνη απαραίτητος στις σοβαρές λοιμώξεις
- Τροποποιημένες PBPs: PBP3a, PBP3b (σπάνια)
 - BLNAR (β -Lactamase Negative Ampicillin Resistant)
 - Χρωμοσωματική
 - Αντοχή σε αμπικιλίνη, αναστολείς και α' , β' γενιάς κεφαλοσπορίνες
 - Χαμηλού επιπέδου: MIC $\sim 4\text{mg/L}$
- BLPACR: β -Lactamase Positive Amox/Clav Resistant
 - Οφείλεται σε συνύπαρξη των δύο μηχανισμών (σπανιότατα)

Αντοχή του μηνιγγιτιδοκόκκου στα β-λακταμικά

- Η αντοχή στην πενικιλίνη και τις κεφαλοσπορίνες είναι εξαιρετικά σπάνια και μπορεί να οφείλεται:
 1. Σύνθεση τροποποιημένων PBP2, PBP3 με ανασυνδυασμό
 - Χρωμοσωματική
 - Μειωμένη ευαισθησία σε PEN, AMP, AMOX
 - MIC^{AMP} >0.1-1.0μg/ml
 2. Παραγωγή β-λακταμάσης (σπανιότατα)
 - Πλασμιδιακή
 - Αντοχή στην PEN, AMP, AMOX
 - MIC^{AMP} >256μg/ml
 - Έλεγχος με νιτροσεφίνη

Αντοχή του Γονοκόκκου στην Πενικιλίνη

Απαντάται συχνά με τους δύο παρακάτω μηχανισμούς:

- Παραγωγή β-λακταμάσης TEM-1 (**PPNG**, penicillinase positive *N. gonorrhoeae*)
 - Πλασμιδιακή
 - Αντοχή στην PEN, AMP, AMOX
 - Υψηλού επιπέδου ($\geq 16\mu\text{g/ml}$) και ζώνη αναστολής στην PEN-10units $\leq 19\text{mm}$
 - Συνιστάται η δοκιμή της νιτροσεφίνης (ταχεία – ακριβής)
- Σύνθεση τροποποιημένης PBP2b (*penA* γονίδιο) ή
- Μειωμένη διαπερατότητα (*penB* γονίδιο)
(**CMRNG**, chromosomal mediated resistance *N. gonorrhoeae*)
 - Χρωμοσωματική
 - Αντοχή σε PEN, AMP, AMOX, AMC
 - Συνήθως χαμηλού επιπέδου $\leq 4\text{mg/L}$
- Αντοχή στις κεφαλοσπορίνες 3ης γενιάς δεν αναφέρεται, ενώ σπάνια παρατηρείται μειωμένη ευαισθησία

Αντοχή των ειδών *Moraxella* στην Πενικιλίνη

- Οι Μοραξέλλες είναι γενικά ευαίσθητες στην πενικιλίνη και τα άλλα β-λακταμικά
- Μόνο η *M. catarrhalis* είναι ανθεκτική (>90%) στην PEN, AMP, AMOX λόγω παραγωγής β-λακταμάσης (BRO-1,-2)
- Η αντοχή είναι επαγώγιμη
- Συνιστάται η δοκιμή της νιτροσεφίνης
- Η μέθοδος διάχυσης των δίσκων, όταν το εναιώρημα δεν είναι πυκνό, μπορεί να δώσει ψευδώς ευαίσθητα στελέχη στην AMP

Gram αρνητικά βακτήρια

Εντεροβακτηριακά – μη ζυμωτικά

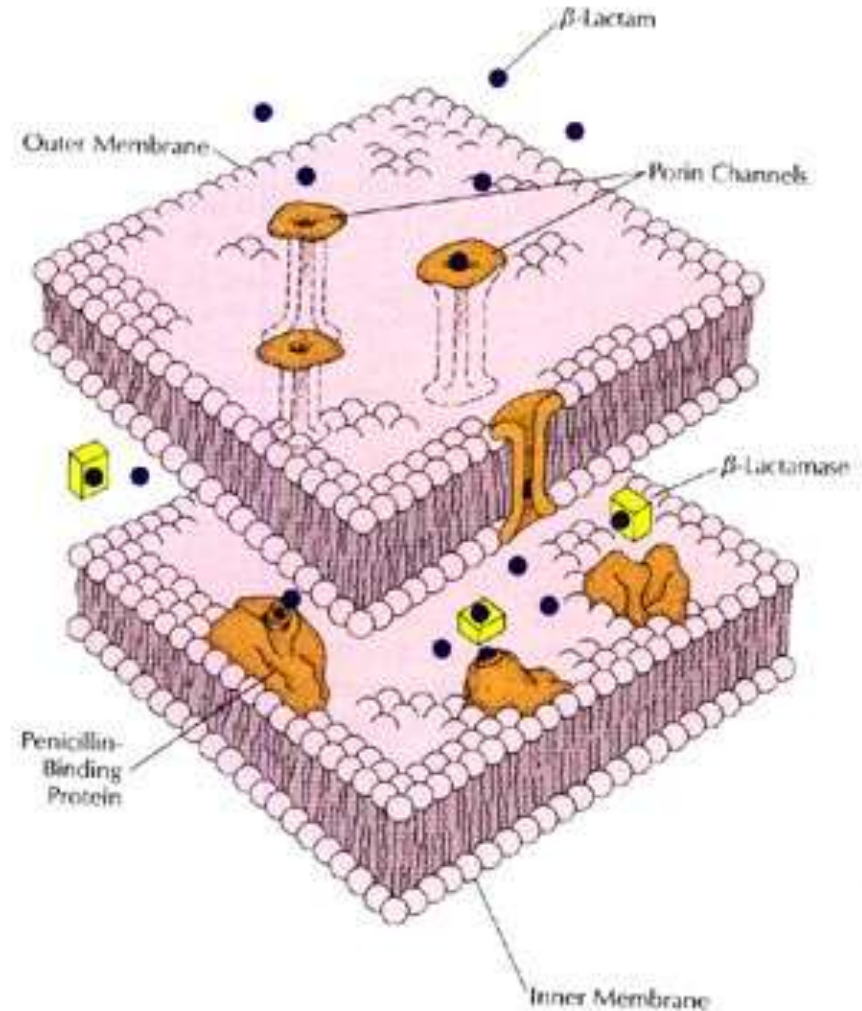
- ◆ Αντοχή στις κεφαλοσπορίνες
 - ◆ Αντοχή στις καρβαπενέμες
- ◆ XDR – έξτρα πολυανθεκτικά
 - ◆ Παν-ανθεκτικά

Μηχανισμοί αντοχής στα β-λακταμικά

1. Παραγωγή β-λακταμασών
2. Μειωμένη διαπερατότητα – απώλεια πορινών
 1. Παράδειγμα: Απώλεια πορίνης OprD στην *P. aeruginosa* προκαλεί αντοχή στην Ιμιπενέμη
3. Συστήματα αντλιών ενεργητικής αποβολής του αντιβιοτικού
 1. Παράδειγμα: Υπερέκφραση αντλίας στην *P. aeruginosa* προκαλεί αντοχή σε Μεροπενέμη και άλλες τάξεις αντιβιοτικών
4. Τροποποίηση του στόχου δράσης – PBPs (σπάνια)

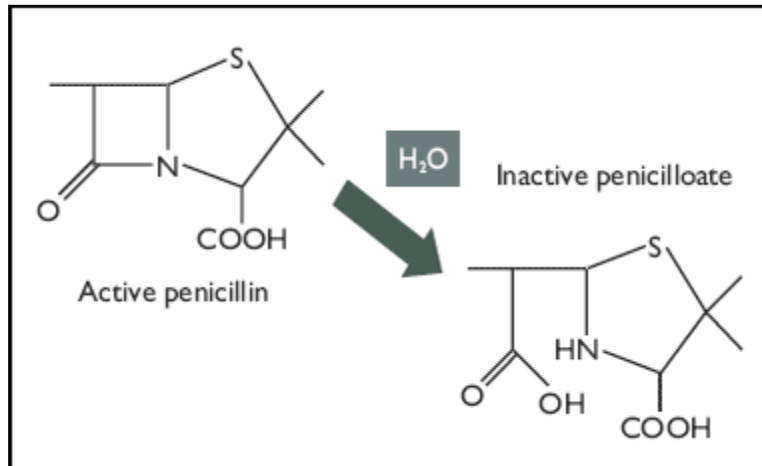
β-λακταμάσες

- Βακτηριακά ένζυμα πρωτεϊνικής φύσης
- Εκκρίνονται στο περιβάλλον του μικροβιακού κυττάρου [**Gram(+)**βακτήρια] ή στον περιπλασμικό χώρο [**Gram(-)** βακτήρια]
- Κωδικοποιούνται από γονίδια που φέρονται στο χρωμόσωμα ή σε πλασμίδια

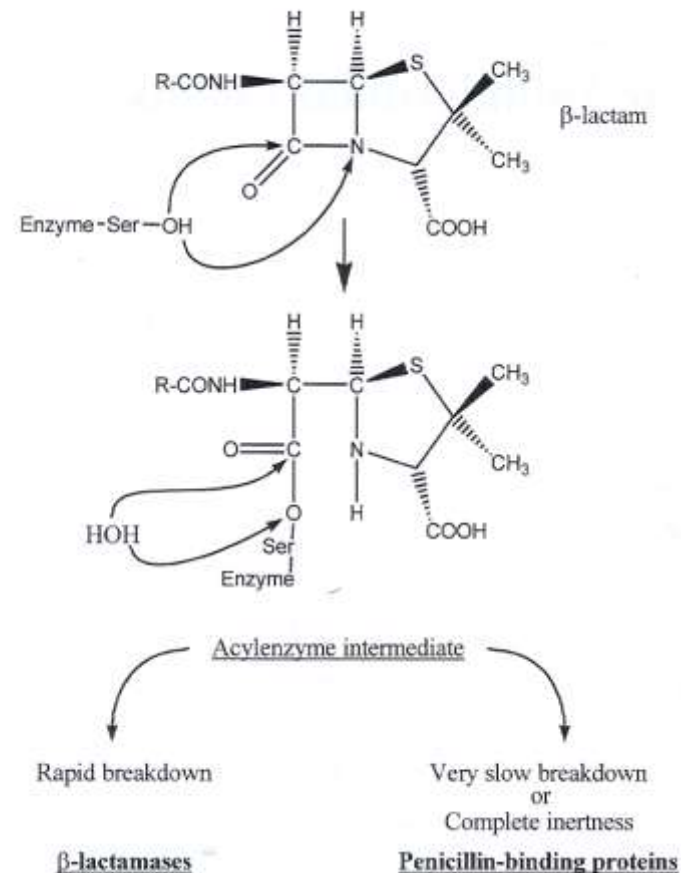


Μηχανισμός δράσης β-λακταμασών

◆ Αδρανοποιούν τις β-λακτάμες, υδρολύοντας τον αμιδικό δεσμό O=C-N του β-λακταμικού δακτυλίου



1509 ■ ANTIMICROBIAL AGENTS AND SUSCEPTIBILITY



Διάκριση των β-λακταμασών

- Χρωμοσωματικές ή Πλασμιδιακές
- Ενδογενείς ή Επίκτητες
- Ιδιοσυστασιακές ή επαγώγιμες
- Σερινο-τρανσφεράσες (εστέρας σερίνης) ή Μεταλλο-β-λακταμάσες (ιόν Zn^{2+})

Ταξινόμηση των β-λακταμασών

- Λειτουργική ταξινόμηση (1995) κατά Bush-Jacoby-Medeiros
 - σε ομάδες (groups) 1, 2, 3, 4 και
 - υποομάδες (subgroups) 2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2d, 2e, 2f
- Μοριακή ταξινόμηση (1980) κατά Ambler
 - σε τάξεις (classes) A, B, C, D

Bush <i>et al</i>	Ambler	Αναστολή Clav/EDTA	Βασικά χαρακτηριστικά
1	C	-	Κεφαλοσπορινάσες - AmpC
2a	A	Clav	Πενικιλινάσες (Σταφυλοκοκκικές/Εντεροκοκ)
2b	A	Clav	TEM-1,-2 & SHV-1
2be	A	Clav	ESBL (TEM- & SHV-)
2br	A	Clav μικρή	Inhibitor Resistant TEM (IRT)
2c	A	Clav	Καρμπενικιλινάσες PSE-
2e	A	Clav	Κεφουροξιμάσες
2f	A	Clav	Καρβαπενεμάσες -KPC
2d	D	Clav ποικίλη	Οξακιλ/άσες –ESBL-Καρβ/σες
3	B	EDTA	Μεταλλο-Καρβαπενεμάσες

A, C, D: Σερινοτρανοσφεράσες

B: Μεταλλοένζυμα (Zn)

Ευρέος φάσματος (broad spectrum)
β-λακταμάσες (group 2b κατά Bush *et al*)

- Οι αρχικές TEM-1, -2 και SHV-1 και ορισμένες τύπου OXA
 - Πλασμιδιακές (*E. coli*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*)
 - Χρωμοσωματικές (SHV-1 *K. pneumoniae*)
- Η πρώτη πλασμιδιακή (TEM-1) βρέθηκε στην Ελλάδα (1965)
- Ευθύνονται για την επίκτητη αντοχή στις “broad-spectrum” πενικιλίνες
- Αναστέλλονται από τους αναστολείς

E. coli – παραγωγή TEM-1
(broad – spectrum β - lactamase)



Εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (Extended Spectrum Beta-Lactamases, **ESBLs**)

- Εμφανίστηκαν το **1983** – παγκόσμια διασπορά (~400 ένζυμα)
- Προέρχονται από τις αρχικές **TEM-1, -2** (>160 ένζυμα) και **SHV-1** (100 ένζυμα)
- Συχνότερες σε *K. pneumoniae* και *E. coli*
- **1995**: Νεότερες ESBLs –τύπου **CTX-M** (>65 ένζυμα) – **Λοιμώξεις της Κοινότητας**
- Υδρολύουν πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, μονοβακτάμες
- Δεν υδρολύουν τις καρβαπενέμες (IMP, MEM, ERT)
- Αναστέλλονται από τους αναστολείς (CLAV, TAZ)
- Κωδικοποιούνται από γονίδια που φέρονται σε πλασμίδια, μαζί με άλλα γονίδια αντοχής, με συνέπεια την πολυαντοχή!
- **Θεραπεία Εκλογής: Καρβαπενέμες**

Νεότερες ESBLs –τύπου CTX-M

(CTX-M-1 έως CTX-M-69)

- Προέρχονται από τις χρωμοσωματικές β-λακταμάσες τάξης A του γένους *Kluyvera*
- Μετά το 1995 διαδόθηκαν δραματικά, και στην Ελλάδα
- Συχνότερες σε στελέχη *E. coli* της κοινότητας
- Ταξινομούνται σε 5 υποομάδες (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25)
- Υδρολύουν καλύτερα την Cefotaxime (CTX) και την Cefepime (FEP), σε σχέση με την Ceftazidime (CAZ) (εξαιρούνται οι CTX-M-15,-16,-27)
- Αναστέλλονται πολύ καλά από την Tazobactam (TAZ) και μέτρια από το Clavulanic acid (CLAV)

Άλλες ESBLs (σπάνιες)

- GES-1, (-3, -7, -8, -9)
 - Πλασμιδιακές
 - Τα αντίστοιχα γονίδια φέρονται σε ιντεγκρόνια τάξης 1
 - Υδρολύουν καλύτερα την CAZ, σε σχέση με την CTX και την AZT
 - Δεν αναστέλλονται ικανοποιητικά από το CLAV
- PER-1, -2, -3
 - Χρωμοσωματικές ή πλασμιδιακές
- VEB-1 έως -6
 - Χρωμοσωματικές ή πλασμιδιακές
 - Τα αντίστοιχα γονίδια φέρονται σε ιντεγκρόνια τάξης 1
- TLA-1 και -2
- BES-1
- BEL-1
- SFO-1

Μέθοδοι Ανίχνευσης των ESBLs

- Αρχικός διαχωρισμός (screening test)
 - *Μέτρηση των ζωνών αναστολής
 - CAZ ($\leq 22\text{mm}$), CTX ($\leq 27\text{mm}$), AZT ($\leq 27\text{mm}$)
 - Φαινοτυπική επιβεβαίωση (confirmatory test)
 - *Δοκιμή δίσκων (combined discs)
 - CAZ/CAZ+CLAV, CTX/CTX+CLAV: $\geq 5\text{mm}$
 - *Etest (CAZ/CAZ+CLAV=8) ή (>3 log αραιώσεις)
- *Είναι προτυποποιημένες για *K. pneumoniae* – *K. oxytoca* – *E. coli* - *P. mirabilis* (CLSI)

Άλλες μέθοδοι

- Δοκιμή συνέργειας των δύο δίσκων (DDST)
 - CAZ, CTX, AZT και AMC*

Ανίχνευση ESBLs

Δοκιμή συνέργειας των δύο δίσκων (DDST)



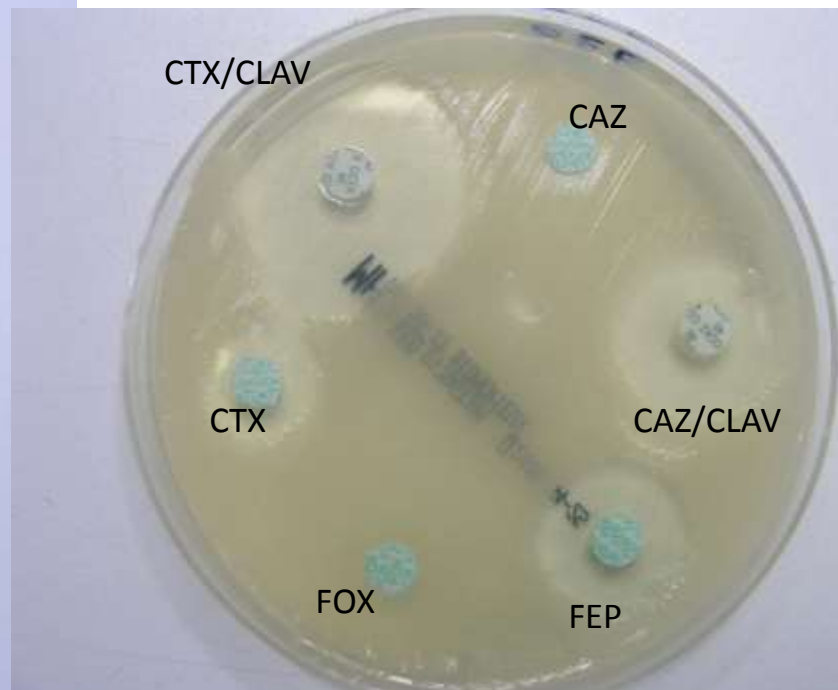
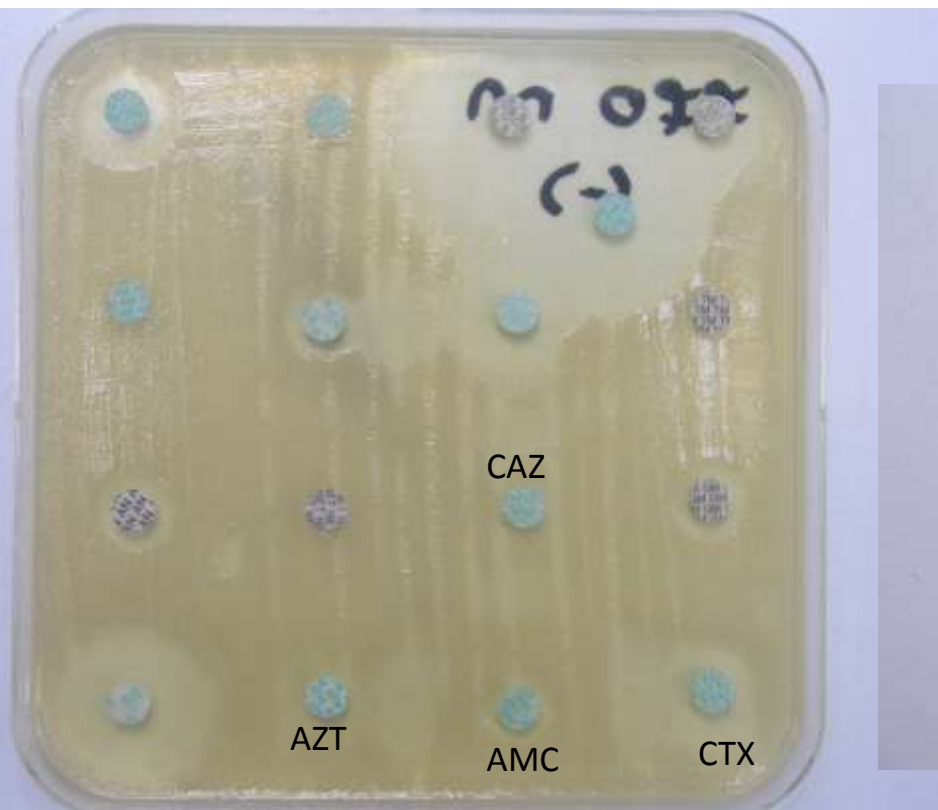
Επιβεβαιωτική δοκιμή με δίσκους (combined discs) ctx/ctx+clav και caz/caz+clav (CLSI)



Ανίχνευση ESBLs σε *E. cloacae*

Δοκιμή συνέργειας των δίσκων (DDST)

Επιβεβαιωτική δοκιμή με δίσκους
ctx/ctx+clav και caz/caz+clav (CLSI)





K. pneumoniae 276E

ESBL positive by TZ/TZL and negative by CT/CTL