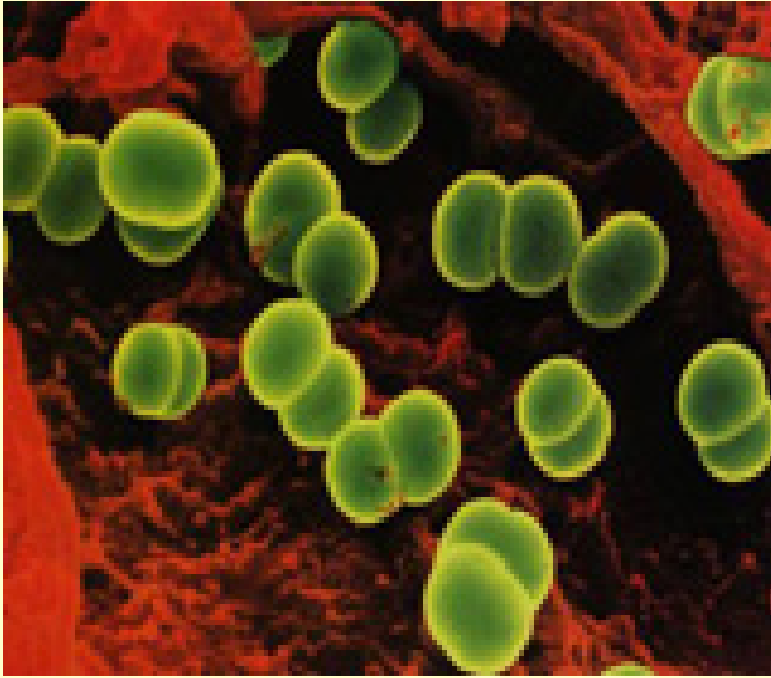
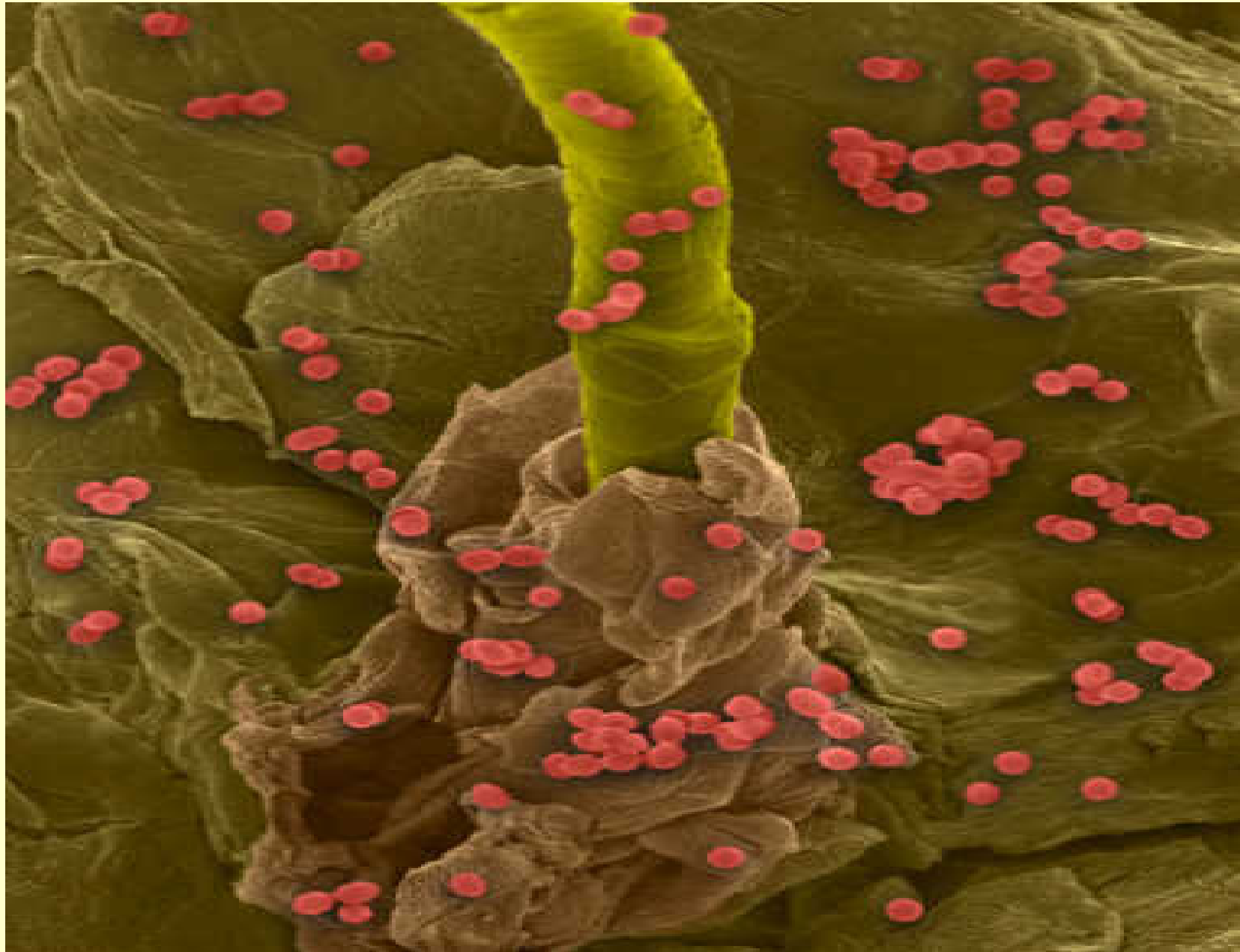




VRE'LERİN LABORATUVAR TANISI

Dr. Gül BAHAR ERDEM



GENEL ÖZELLİKLER

- *Genetik olarak*
Vagococcus, Tetragenococcus
Fenotipik olarak
Streptococcus , Lactococcus ile benzerlik gösterir.
- Katı by. de kokobasiller,
Tiyoglukolatlı by. de ovoid veya zincirler halinde görülebilir.

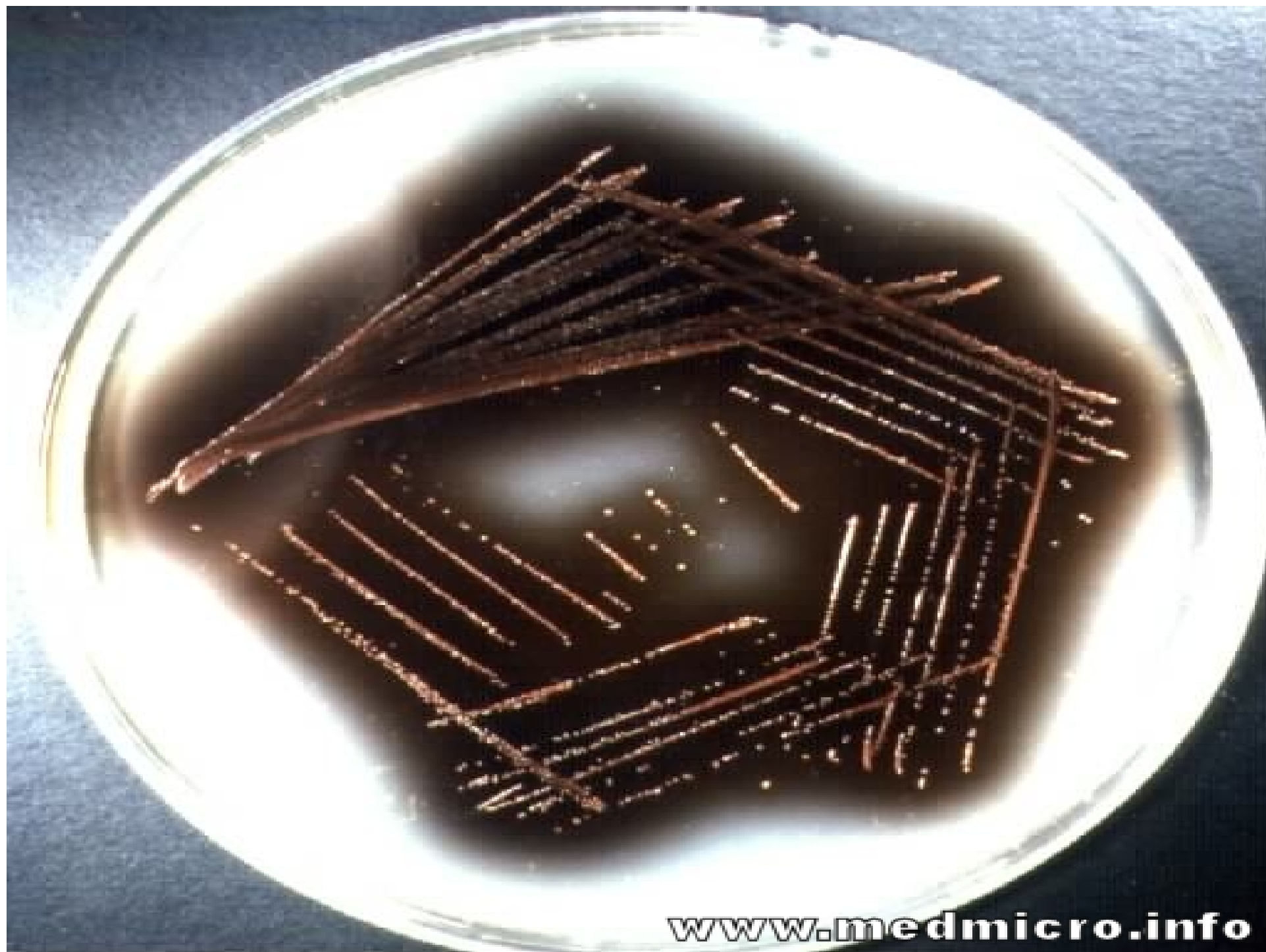
- Fakültatif anaerob,
- 10-45 °C'da ürer,
- %6.5 NaCl varlığında üreyebilir,
- bile esculin pozitif,
- bazıları motil,
- çoğu PYR pozitif,
- tümü LAP pozitif,
- bazı *E. faecalis* suşları psödokatalaz oluşturur.
- fermentatif, gaz oluşturmaz,
- çoğu Lancefield grup D antijeni ile aglütinasyon verir.



%6.5 NaCl besiyerinde üreme; sarı +, pembe –



Bile esculin besiyerinde üreme; siyah +



- triptikaz soya+%5 koyun kanlı agar, beyin kalp infüzyon+%5 koyun kanlı agar vb. by.de üreyebilir.
- selektif by. için safra-eskülin, nalidiksik asit, sefalotin, kolistin, Na-azid, kanamisin, aztreonam, amfoterisin ilave edilebilir.
- mannitol ve sorbozdan asit yapımı ve arjinin hidrolizi testlerine göre 5 fizyolojik tür grubuna ayrılır.

Tanıda ticari yöntemler

- Api 20S
- Api Rapid ID 32 strep (bio Merieux)
- Crystal gram pozitif (BD)
- Vitek sisteminin gram pozitif tanımlama kartı (bio Merieux)
- Microscan Walkaway System Gram pozitif tanımlama paneli (Dade Microscan)

Tanıda Moleküler Yöntemler

- DNA-DNA hibridizasyon,
- Sodyum-dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)
- Tüm hücre protein profili (WCP)
- Randomize amplifiye polimorfik DNA analizi
- 16 S rRNA geninin sekans analizi
- D-ala, D-ala ligazlarının ve vankomisin direnç genlerinin amplifikasyonu
- Enterococcus protein A genlerinin veya E. faecalis kollagen adezin geninin problemleri vb.

Salgın suşlarında

- Kromozomal DNA restriksiyon endonükleaz profillerinin pulsed field gel elektroforezi (PFGE) ile tayini
- MLST
- Ribotiplendirme
- RAPDNA PCR
- PCR ürünlerinin sekanslanması
- PCR ürünlerinin restriksiyon fragman uzunluk polimorfizm analizleri vb. kullanılır.

Antimikrobiyal duyarlılık

İntrinsik direnç: sefalosporinler
aminoglikozidler (düşük düzey)
linkozamidler

Kazanılmış direnç: ampisilin (>%80 *E. faecium*)
aminoglikozidler (yüksek düzey)
makrolidler
tetrasiklinler
kloramfenikol
tmp-sxt
glikopeptidler (van-genleri)
florokinolonlar (parC mutasyonu)

Antimikrobiyal duyarlılık

Disk difüzyon

- Besiyeri*: Mueller-Hinton agar
- İnokulum*: Üreme yöntemi veya doğrudan 0.5 McFarland standardına eşdeğer koloni süspansiyonu
- İnkübasyon*: 35°C'de normal atmosferde, 16-18 saat; vankomisin için 24 saat

- Vankomisin test edilirken;
 - 24 saat inkübasyon
 - ışık önünde inceleme
- inhibisyon zonu içindeki her çeşit üreme
ince yayılma
varlığı direnç göstergesidir.

Mikrodilüsyon:

-Besiyeri:

Sıvı dilüsyon: katyon ayarlı Mueller-Hinton
buyyon

Agar dilüsyon: Mueller-Hinton agar

-İnokulum: Üreme yöntemi veya doğrudan 0.5 McFarland standardına eşdeğer koloni süspansiyonu

-İnkübasyon: 35°C'de normal atmosferde, 16-18 saat; vankomisin için 24 saat

Vankomisin: S: ≤ 4 I: 8-16 R: ≥ 32

Vankomisin test edildiğinde,
plaklar 24 saatin sonunda
değerlendirilmelidir.

Vankomisin MİK'leri 8-16 µg/ml
olan izolatlarda Ek D'de
'vankomisin direnci' başlığı ile
verilen biyokimyasal testler ile
tanımlama tekrarlanmalıdır.

EkD

- Edinsel direnci (VanA ve VanB) olan türleri vankomisine orta düzeyde direnç gösteren, içsel olarak dirençli olan ve sıklıkla vankomisin tarama plağında üreyen *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* gibi türlerden ayırt etmek için vankomisin MİK bakın ve hareket ve pigment yapımı yönünden test edin. Diğer enterokokların aksine vankomisin MİK'leri 8-16 µg/ml *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* enfeksiyon kontrolü yönünden vankomisine dirençli enterokoklardan ayrılmaktadır.

VRE Epidemiyolojisi

- İlk 1988'de Avrupa'da saptandı
- Enterokoklar cansız yüzeylerde haftalarca yaşayabilir, her ortama iyi adapte olur.
- Avoparcin kullanımı Avrupa'da 1997'de yasaklanmıştır
- Asya ülkelerinde kullanılmaya devam etmektedir.

Risk faktörleri

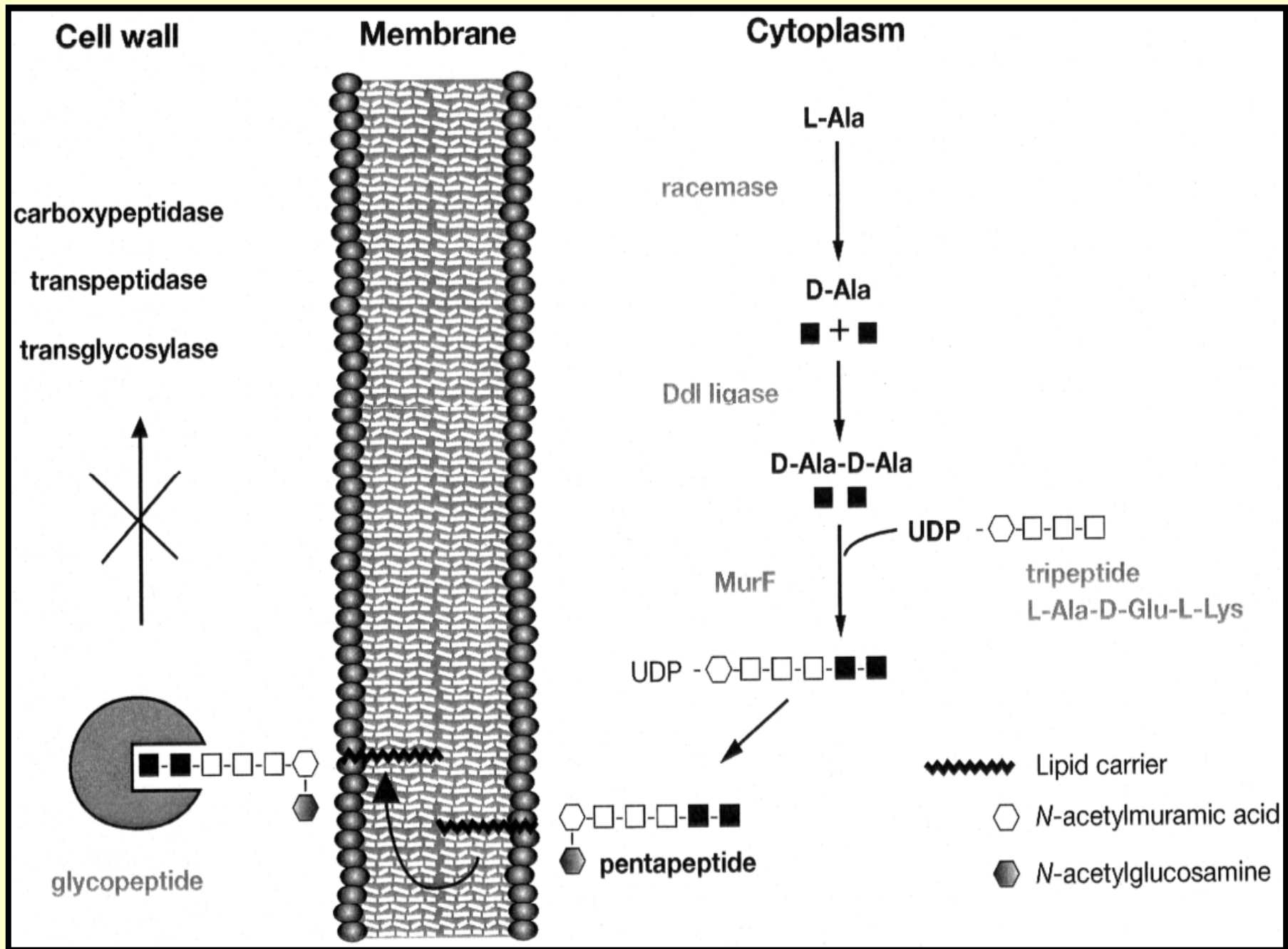
- Ampisilin dirençli hastane kaynaklı *E. faecium* suşları,
- Antibiyotik kullanımı,
- Uzun süreli hastanede yatış,
- Yetersiz personel,
- Yetersiz el hijyeni
- Enfeksiyon kontrol önlemlerine uyulmaması

- Penisilin/Ampisilin, aminoglikozid ve glikopeptidlere kazanılmış direnç giderek artmakta
- Quinopristin/dalfopristin, linezolid, tigesiklin, daptomisin gibi antibiyotikler seçenek

- İlk VRSA vakası 2003 yılında
- Yarada VRE ile VRSA kolonizasyonu
- ABD'den bildirilen 7 vakanın 5'i Michigan'da saptanmış

Glikopeptid direnci

- Vankomisin ve teikoplanin, UDP-N-asetilmuramil-pentapeptidin D-ala-D-ala terminaline yüksek afiniteyle bağlanarak peptidoglikan sentezinin transglikolizasyon aşamasını inhibe eder.



- D-Ala-D-Ala yerine D-Ala-D-Lac (VanA ve VanB) veya D-Ala-D-Ser (VanC) ile biten peptidoglikan prekürsörlerinin sentezlenmesi sonucu vankomisin ve teikoplanin bağlanması ve duvar sentezi inhibisyonu olmaz.

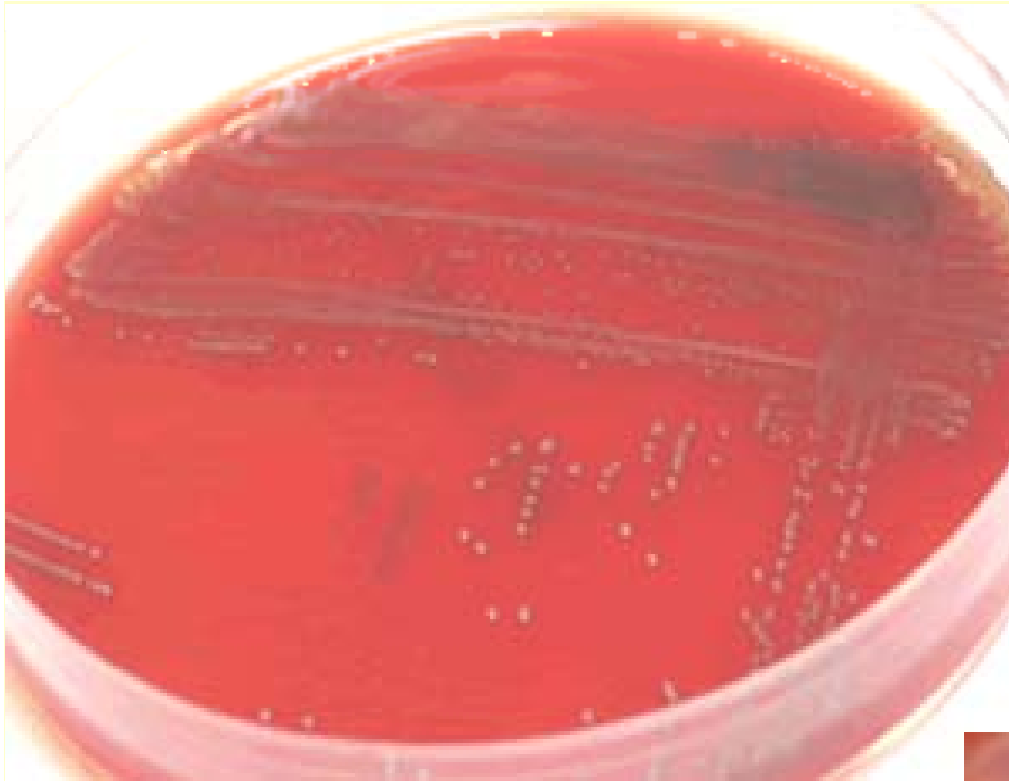
- Kazanılmış:

VanA, B (En sık, *E. faecium* ve *E. faecalis*)

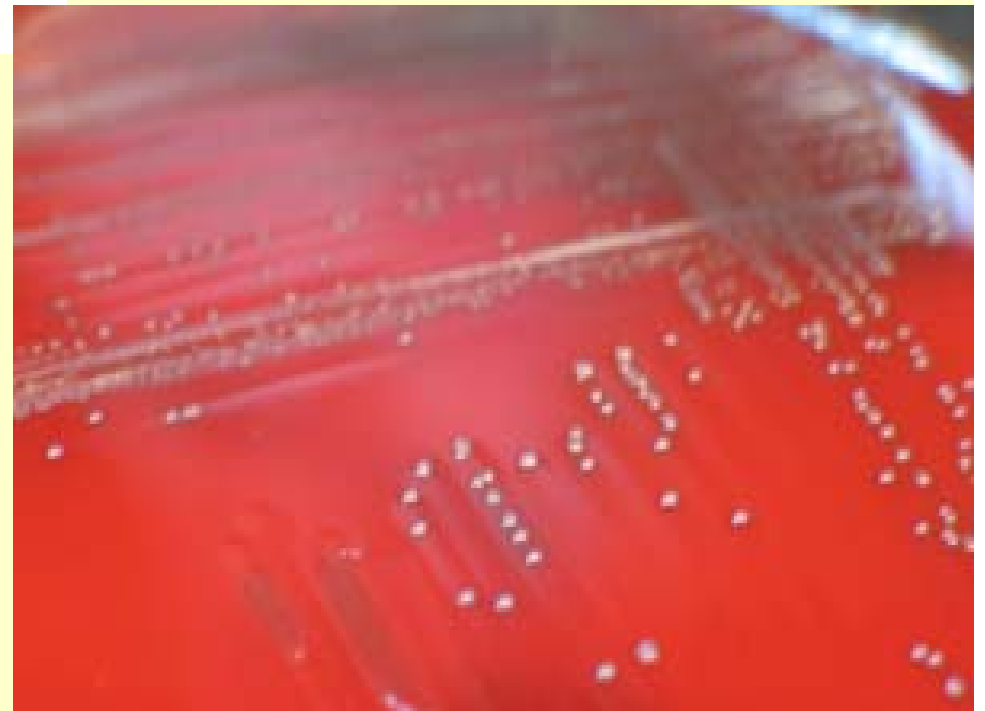
D, E, G, L

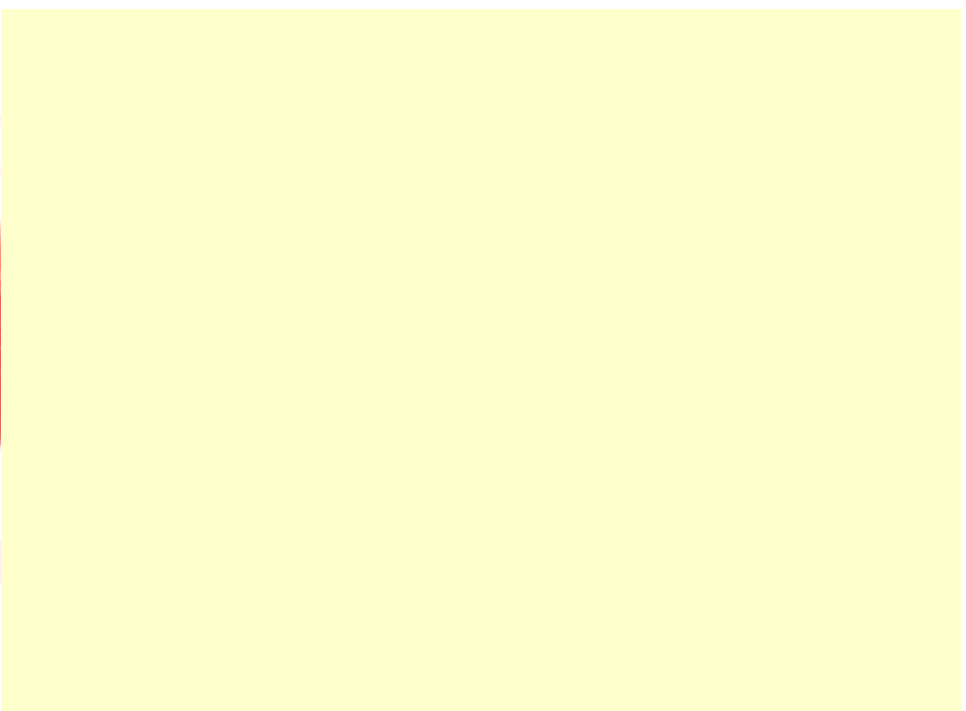
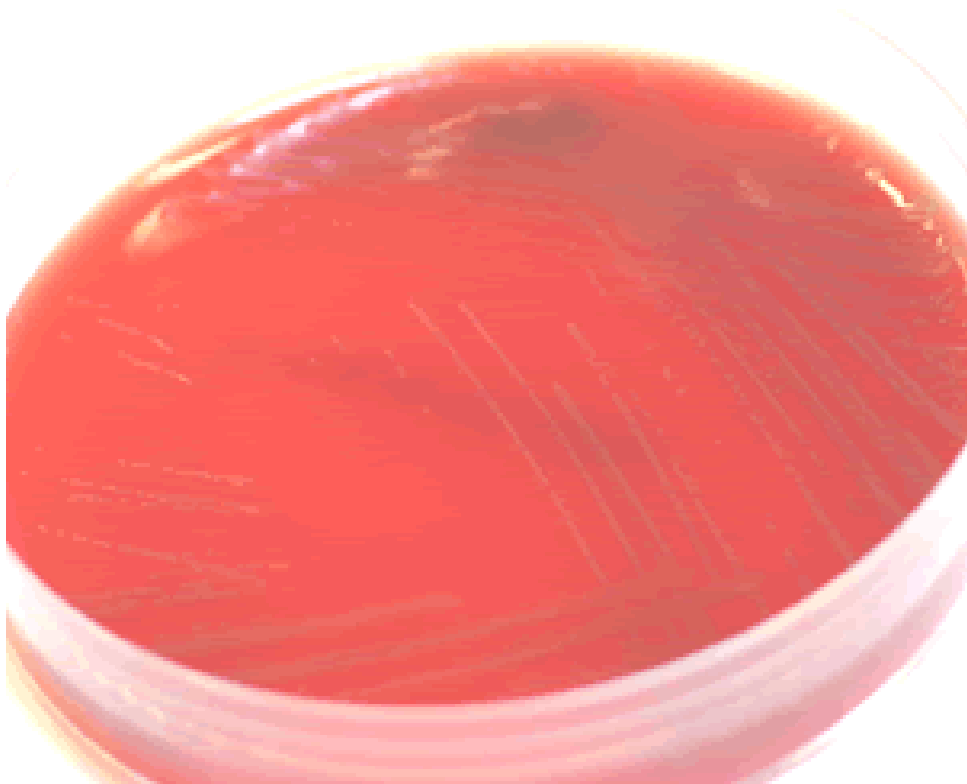
- İntrinsik:

VanC; *E. gallinarum* (*vanC1* genotipi) ve *E. casseliflavus* (*vanC2* ve *vanC3* genotipleri)



Normal koloni VRE





Pinpoint koloni VRE



VanA

- Hem vankomisine hem de teikoplanine yüksek düzeyde dirençli
- Tn1546 transpozonu ve bu transpozonla ilişkili elemanlar üzerinde taşınan *vanA* gen kümesi sorumludur.
- *vanA* gen kümesi hem transfer edilebilen hem de transfer edilemeyen plazmidler bakteriyel kromozomlar üzerinde bulunabilir
- Esas olarak *E. faecium*'da bulunur.

TABLE 1

Vancomycin resistance in enterococci. See cited reviews for details [96;97]

	Acquired resistance						Intrinsic resistance
phenotype	VanA	VanB	VanD	VanE	VanG	VanL	VanC
ligase gene	<i>vanA</i>	<i>vanB</i> ²	<i>vanD</i> ²	<i>vanE</i>	<i>vanG</i> ²	<i>vanL</i>	<i>vanC</i>
MIC _{vancomycin} in mg/L	16 - 1000	4 - 32 (-1000)	64 - 128	8 - 32	16	8	2 - 32
MIC _{teicoplanin} in mg/L	(4-) 16 - 512	0,5 - 1	4 - 64	0,5	0,5	S	0,5 - 1
expression	inducible	inducible	constitutive	inducible	inducible	inducible	constitutive/ inducible
localisation	plasmid/ chromosome	plasmid/ chromosome	chromosome	chromosome	chromosome	chromosome?	chromosome
transferable by conjugation	+/-	+/-	-	-	+	-	-
distribution among enterococcal species	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. durans</i> <i>E. hirae</i> <i>E. gallinarum</i> ¹ <i>E. casseliflavus</i> ¹ <i>E. raffinosus</i> <i>E. avium</i> <i>E. mundtii</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. durans</i> <i>E. gallinarum</i> ¹	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. raffinosus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i> : <i>vanC1</i> <i>E. casseliflavus</i> : <i>vanC2/3</i>

¹ acquisition of *vanA* or *vanB* cluster in addition to *vanC1* or *vanC2/3* genes - rare event² subtypes exist (*vanB1-3*, *vanD1-5*, *vanG1-2*); S, susceptible to teicoplanin (no value given in the corresponding paper)

VanB

- Vankomisine değişken düzeyde dirençli, teikoplanine duyarlıdır.
- Gen kümesi genellikle kromozomal bir lokalizasyona sahiptir.
- *vanB* gen kümesinin Tn1547 transpozonu ve plazmidler üzerinde taşınarak transfer edilebildiği de bildirilmiştir.
- Esas olarak *E. faecalis*, ve *E. faecium*'da tanımlanmıştır.
- VanA'dan farkı teikoplaninin değil vankomisinin *vanB* gen kümesinin indükleyicisi olmasıdır.

VanC

- Genellikle disk difüzyon yöntemi ile saptanamaz, sıklıkla vankomisin agar tarama plaklarında ürer.
- Enfeksiyon kontrol ve sürveyans için VanA veya VanB izolatlarını VanC den ayırt etmek gereklidir.
- *E. feacalis* ve *E. faecium* türlerinde VanC tanımlanmamıştır.
- *E. gallinarum*'da VanA tanımlanmıştır.
- Ampisilin ve aminoglikozid direnci daha az görülür.

- *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus*- *E. flavescens* türlerinde intrinsik olarak vankomisine düşük düzeyde direnç, teikoplanine duyarlılık vardır.
- *E. gallinarum*-*vanC*-1, *E. casseliflavus*- *vanC*-2 ve *E. flavescens*-*vanC*-3
- *vanC*-2 ile *vanC*-3'ün %98 oranında benzer olduğu gösterilmiştir.
- *vanC*-1, *vanC*-2/*vanC*-3 ile %73, *vanA* veya *vanB* ile %37-39 oranında benzerlik gösterir.
- Peptidoglikan prekürsörleri D-Ala-D-Ser ile sonlanır.
- *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* D-Ala-D-Ala sentezler.
- Fazla miktarda D-Ala-D-Ala: Vankomisine daha fazla duyarlılık var.

Van D

- Vankomisin ve teikoplanine dirençlidir.
- Peptidoglikan prekürsörü D-Lac ile biten bir pentadepsipeptiddir
- *vanD* kromozomlarda lokalize olup, *vanA* ve *vanB* ile benzerdir,
- Direnç yapısal olup, konjugasyon ile aktarılamaz.
- D-Ala ile biten normal pentapeptid sentezi minimum düzeydedir.
- Düşük düzeyde D,D-dipeptidaz aktivitesi, duyarlı fenotipe yol açabilir.

Van E

- *E. faecalis* suşlarında tanımlanmıştır.
- Vankomisine düşük düzeyde dirençli, teikoplanine ise duyarlıdır.
- vanE geni kromozom üzerinde lokalizedir ve transfer edilemez.
- Vankomisin direnci D-Ala-D-Ser ile sonlanan peptidoglikan prekürsörlerinin sentezi ile ilişkilidir.
- İntrinsik direnç değildir.

VanG

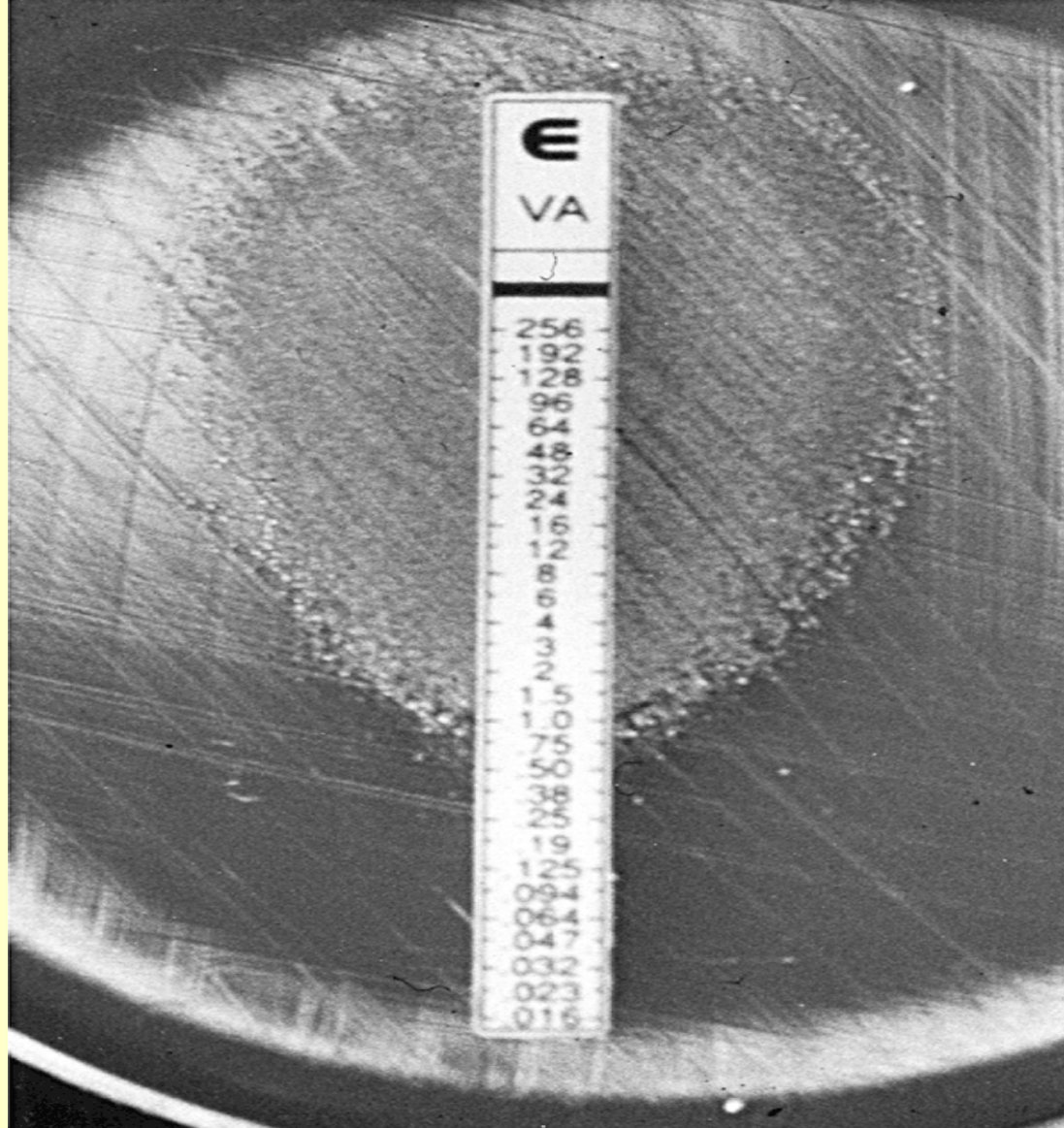
- Kazanılmış dirençtir
- Vankomisine düşük düzeyde direnç, teikoplanine duyarlılık vardır.
- İndüklenebilirdir.
- Peptidoglikan prekürsörleri D-Ala-D-ser ile sonlanır.
- Kromozomlarda lokalizedir.
- Konjugasyonla aktarılabilir

Van L

- Vankomisine düşük düzeyde dirençli (8 mcg/ml) Teikoplanine duyarlı,
- *E. faecalis* suşunda saptanmış
- Yeni bir D-ALa-D-Ser gen kümesi bulunuyor. Yapısal organizasyon olarak vanC'ye benziyor.
- Plazmidler gösterilememiş, alıcı suşa gen kümesi aktarılamamıştır.
- Kromozomlarda lokalize gibi görünmektedir.
- *vanL* fonksiyonu klonlama, transfer deneyleri ve hücre duvar öncüllerinin kimyasal analizi sonrasında tanımlanabilecektir.

Glikopeptid bağımlı suşlar

- Vankomisin veya hem vankomisin hem de teikoplanine dirençli olmasına karşın aynı zamanda üremeleri için onlara ihtiyaç duyarlar.
- Vankomisin varlığında *vanA* veya *vanB* ile kodlanan D-Ala-D-Lac ligaz indüklenir ve sonuç olarak D-Ala-D-Ala ile sonlanan peptidoglikan öncüllerinin sentezindeki hatanın üstesinden gelinir ve bakteri üremeye devam eder.
- Üremesi için özel koşullar gerektiğinden rutin laboratuvarlarda tespit edilmeyebilir.
- Vankomisin bağımlılığı sonradan vankomisin bağımsızlığına da dönüşebilir.



Vankomisin bağımlı enterokok

Vankomisin agar tarama testi

- 1993'te CLSI tarafından benimsenmiştir.
- %96-99 duyarlılık ve %100 özgüllük belirtilmiştir.
- 6µg/ml vankomisin katılmış BKİ agar plakları hazırlanır,
- 0.5 McFarland standardı bulanıklığında süspansiyondan 1-10 µl nokta ekim ya da 10-15 mm'lik bir alana spot inokulasyon yapılır.
- 35oC'da tam 24 saat inkübasyonu takiben koloni varlığı ya da ince puslu üreme direnci gösterir.

Vankomisin agar tarama testi

- VanC taşıyan enterokoklar olan *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus*'un duyarlılığını belirlemede sorun, vankomisin MİK 2-32 µg/ml arasında değişir.
- Genelde MİK >4 µg/ml olduğu için, üremeyi destekleyen zengin besiyerlerinde ve daha yoğun inokulumda vankomisin agar tarama plaklarında üremeleri olasıdır.
- Bazı *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus* kökenleri hareketsizdir.
- *E. faecalis* ve *E. faecium*'dan daha iyi ayıracak test %1 metil- α -D-glikopiranozid (MDG) fermentasyonu ile ayrılır.
- Bütün *vanC* içeren enterokoklar MDG'yi asidifiye eder, buna karşın *E. faecalis* ve *E. faecium* etmez.

- Vankomisin tarama plağında üreyen *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus* gibi türlerden ayırt etmek için;
 - vankomisin MİK
 - hareket
 - pigment yapımı

E. gallinarum hareketli-pigmentsiz,

E. casseliflavus hareketli-pigmentli (sarı),

E. faecium hareketsiz-pigmentsiz.

Kromojenik Besiyeri

- Direkt inokulasyonu takiben besiyerinde bulunan ve spesifik enzimler varlığında renk değiştiren iki kromojen *E. faecium* ve *E. faecalis* üremesi hakkında 24 saat içerisinde bilgi verir.
- Vankomisinin yanısıra başka antibiyotikler vankomisine intrinsik dirençli *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus* da dahil florayı baskılar.

VRE tespiti için kromojenik besiyerleri

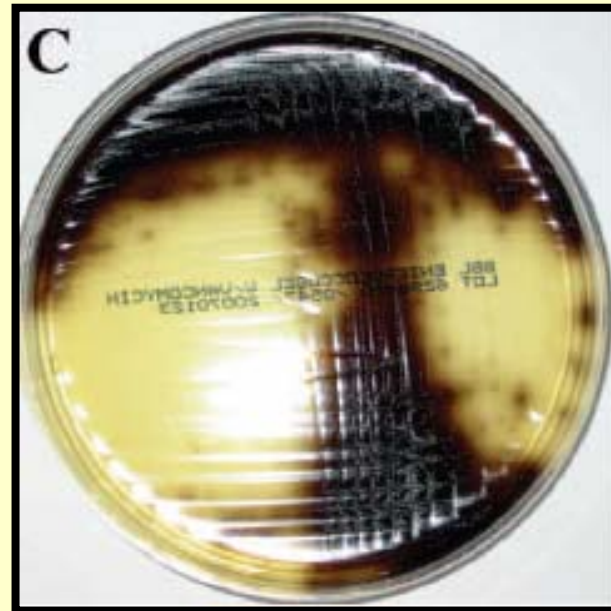
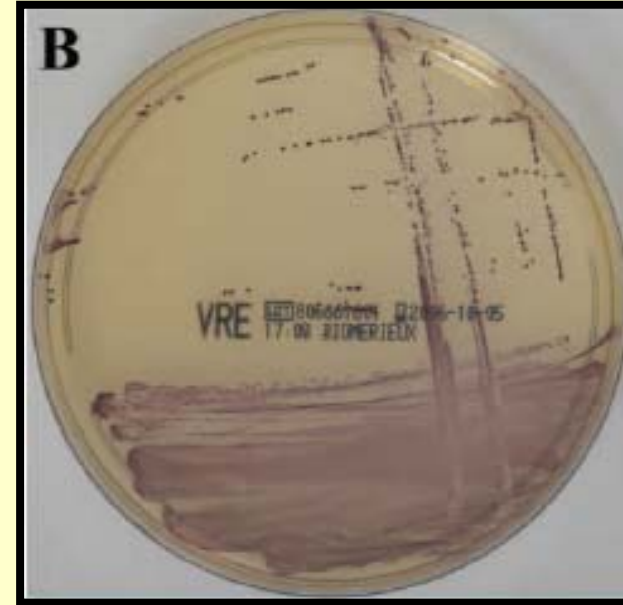
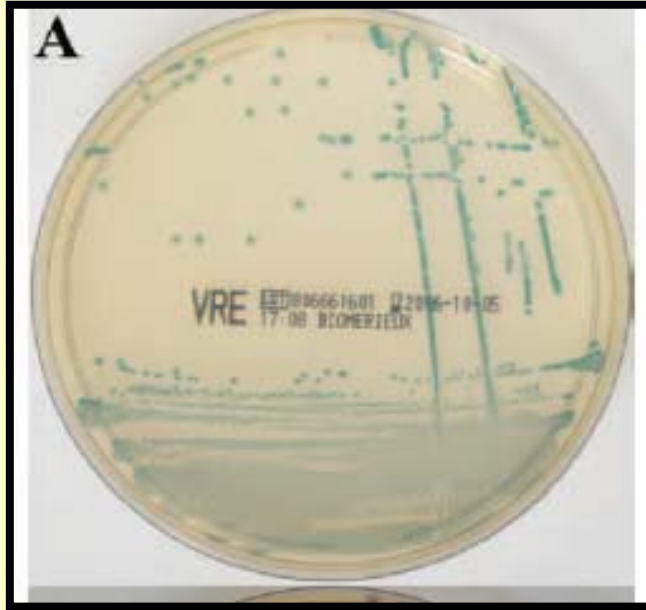
İnkübasyon	Besiyeri	Sensitivite	Spesifite	PPV	NPV
24 Saat	chromID	%86(44/51)	%100(69/69)	%100	%90.8
	BEAV	%90.2(46/51)	%73.9(51/69)	%71.9	%91.1
48 Saat	chromID	%88.2(45/51)	%98.6(68/69)	%97.8	%90.7
	BEAV	%92.2(47/51)	%72.4(50/69)	%71.2	%92.6

Diagn. Microbial and Infect Disease 2007

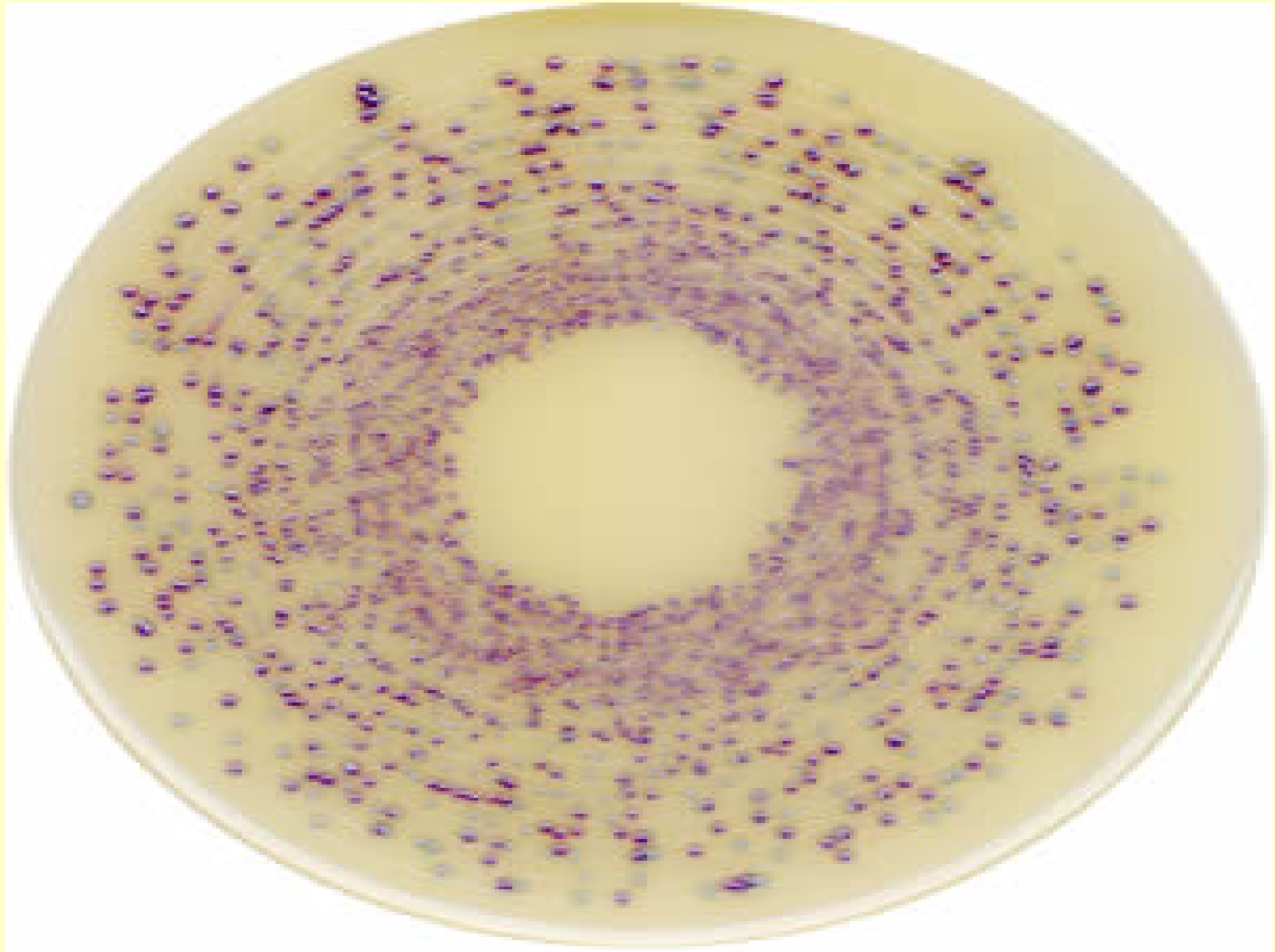
Kromojenik Besiyeri

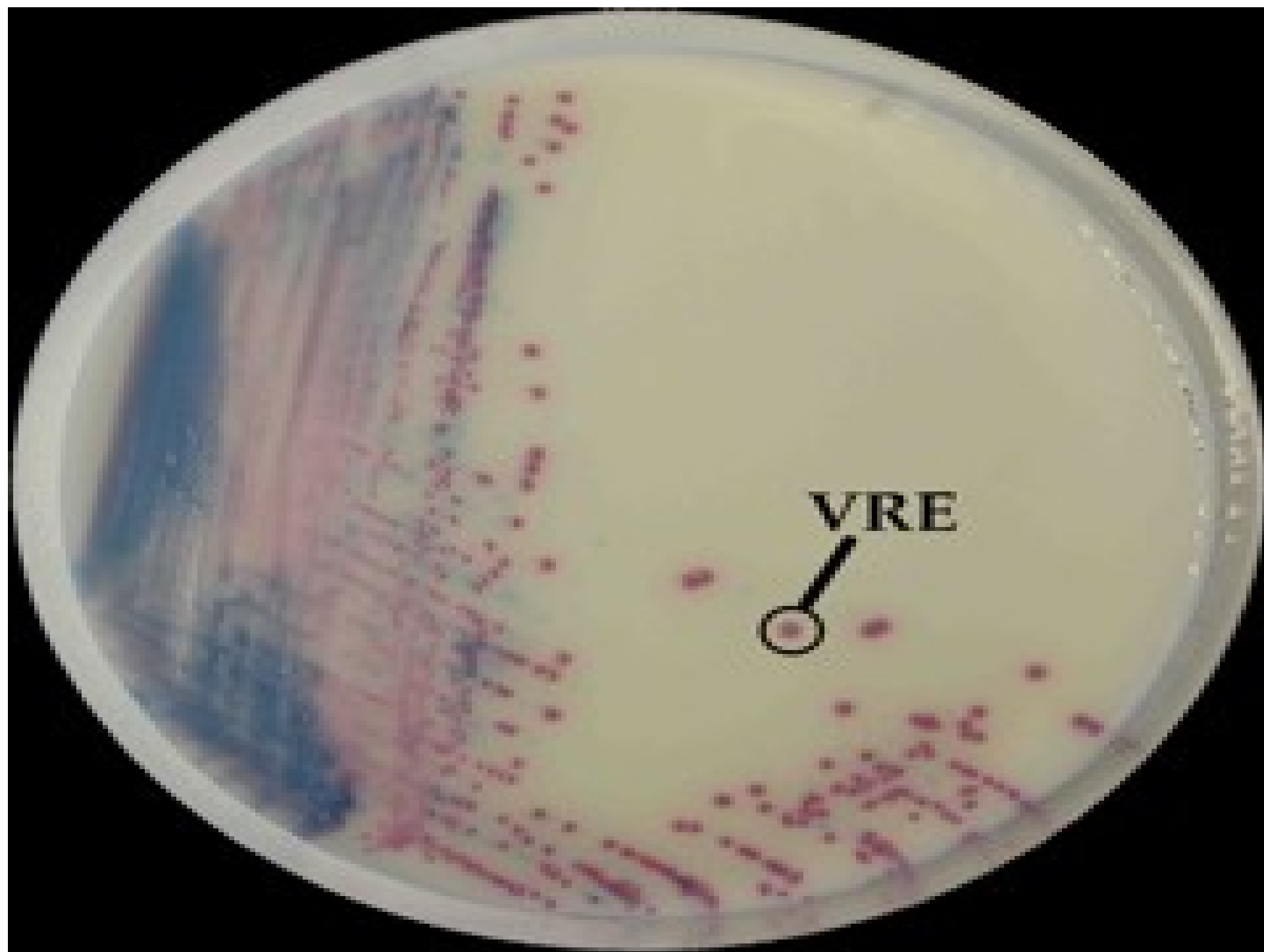
- 120 gaita örneği
- ChromID VRE spesifite ve PPV daha yüksek.
- Sensitivite benzer
- ChromID VRE ile tür düzeyinde tanı
- Zenginleştirme sonrası tespit oranı daha yüksek
- En iyi spesifite ve PPV 24 saatlik inkübasyon sonrasında

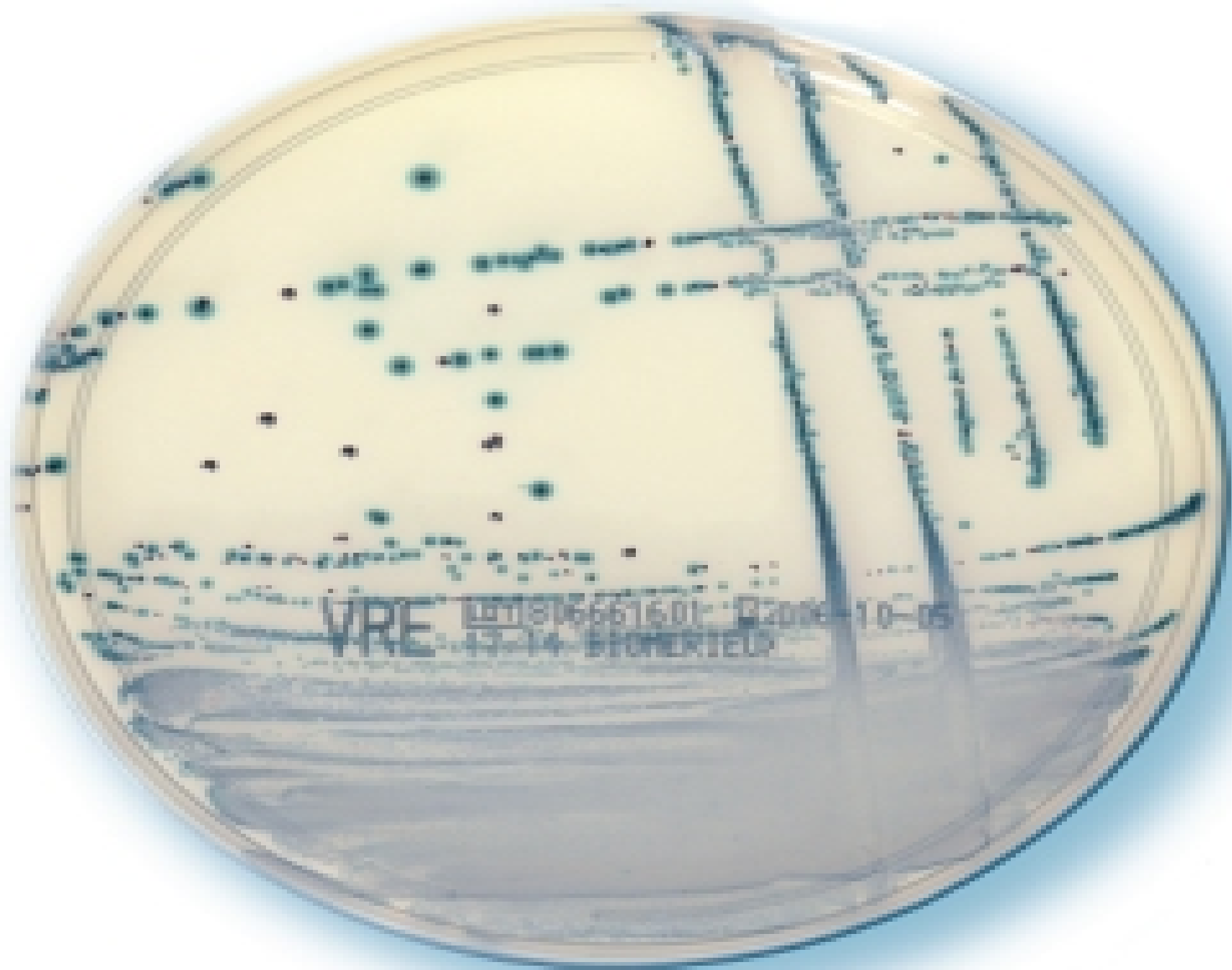
- Spesifite ChromID VRE %99.4
EVA %83.4
- Sensitivite ChromID VRE %96.9
EVA %93.9
- PPV ChromID VRE % 91.4
EVA %28.7



ChromID VRE besiyerinde *E. faecalis*, *E. faecium* ve EVA besiyerinde *E. faecium*







Otomatize tanı yöntemleri

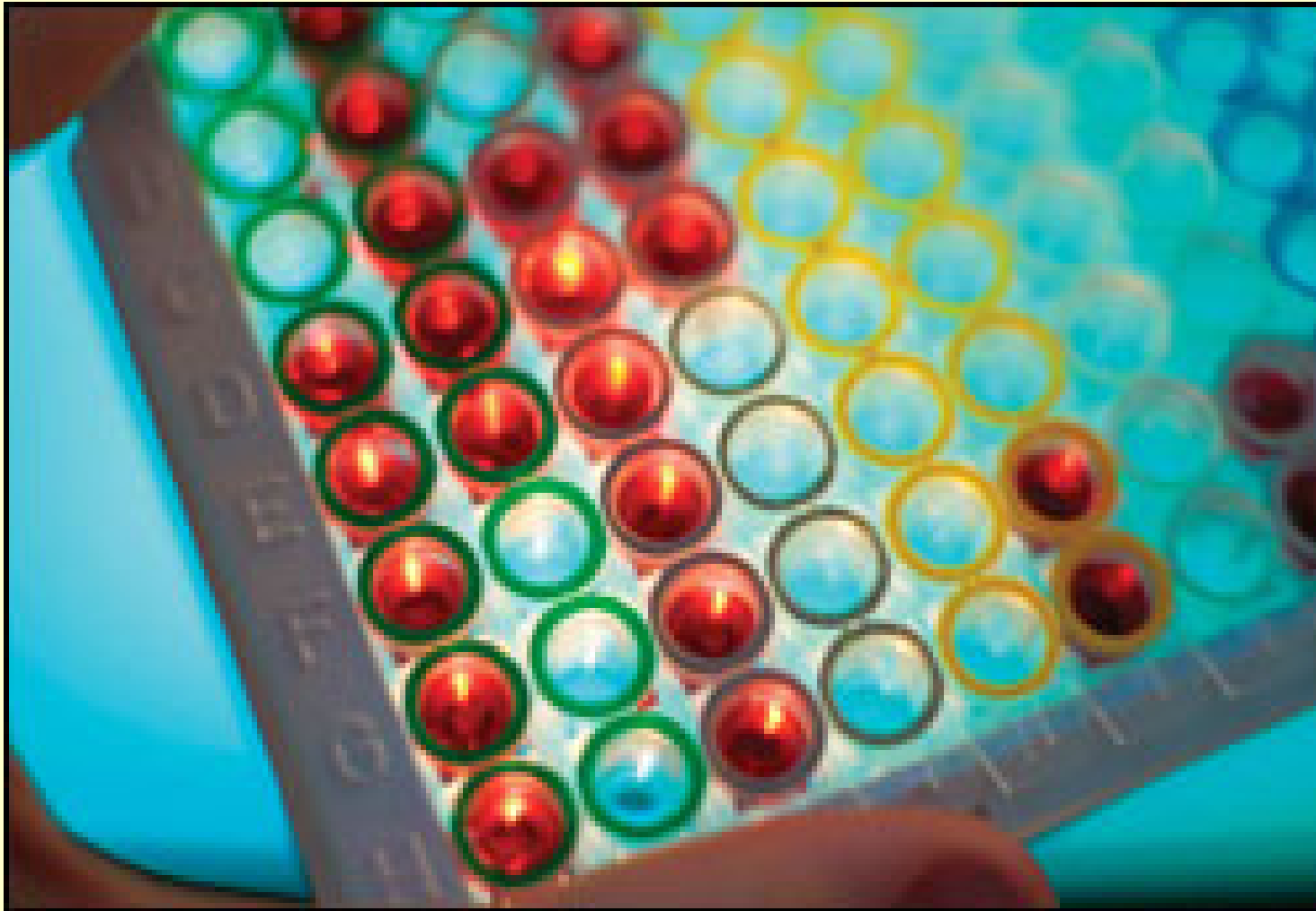
- Rapid fenotipik test, Raman spektroskopi, API Strep 20, BD Phoenix ve VITEK 2 karşılaştırılmış, doğru tanı % 92,96,39,86,88
- *E.faecium/faecalis* ve *E. casseliflavus/gallinarum* belirleme sensitivite ve spesifiteleri; %100-100, 99.5-36.1, 93.6-41.7, 98.4-100, 98.5-91.7

Top et al. ECCMID 2007

- Buyyon dilüsyon ile VITEK2 4.01 versiyonu karşılaştırılmış
- 121 suştan 114 (%94.2)'ü tür düzeyinde doğru olarak saptanmış
- 119'unda da glikopeptid direnci saptanmıştır.
- 1 VanA, VanB olarak tanımlanmış
- 1 *E. faecium* suşu da glikopeptid dirençli olarak saptanmış
- Antimikrobiyal duyarlılık uyumu vankomisin % 94.2, teikoplanin %95.9 bulunmuş

EVIGENE VRE TESPİT KİTİ

- Bakterinin hedef DNA sekansına spesifik DNA problemleri mikropiplara tespit edilmiştir.
- Sonuçlar 3-5 saat sonra gözle veya eliza okuyucusu ile değerlendirilir.
- %100 sensitivite ve spesifite tespit edilmiştir.



Evigene VRE kiti

Evaluation of the EVIGENE VRE Detection kit for detection of *vanA* and *vanB* genes in vancomycin-resistant enterococci

Abdullah Kilic,¹ Mehmet Baysallar,¹ Gul Bahar,² Ayten Kucukkaraaslan,¹ Feriha Cilli³ and Levent Doganci¹

¹Department of Microbiology and Clinical Microbiology, Gulhane Military Medical Academy and School of Medicine, 06018, Ankara, Turkey

²Department of Microbiology, Social Security Education Hospital, Ankara, Turkey

³Department of Microbiology and Clinical Microbiology, Ege University Medical Faculty, Izmir, Turkey

Table 2. Genotypes and *in vitro* activity of two antimicrobial agents against enterococci

Isolate	MIC breakpoint ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		Genotype determined by PCR	Genotype determined by kit
	Vancomycin	Teicoplanin		
<i>E. faecium</i> (n = 104)	≥ 256 (n = 104)	≥ 32 (n = 74), 12 to < 32 (n = 30)	<i>vanA</i> (n = 104)	<i>vanA</i> (n = 104)
<i>E. faecium</i> (n = 45)	≤ 4 (n = 45)	≤ 8 (n = 45)	(n = 0)	(n = 0)
<i>E. faecalis</i> (n = 6)	≥ 256 (n = 6)	≥ 32 (n = 1), 12 to < 32 (n = 5)	<i>vanA</i> (n = 6)	<i>vanA</i> (n = 6)

Velogene (VEL) yöntemi

- VanA ve VanB için geliştirilmiş kalitatif bir DNA probudur.
- Küçük miktarlarda DNA'yı bile tespit etmektedir.
- 150 örnekten 73'ünde VRE +
- Tüm VanA ve VanB VRE'ler doğru saptanmış
- Multipleks PCR ile doğrulama yapılmış
- %100 sensitivite ve %100 spesifite

Moleküler tanı yöntemleri

- VRE salgınlarında tarama testlerinde rektal sürüntü örnekleri
- Standart kültür yöntemi ile VRE izolasyonu ve tanımlanması zaman alıcı
- Hızlı, sensitif nükleik asit amplifikasyon temelli testlere ihtiyaç var

Moleküler tanı yöntemleri

- **Avantajları**

- Direnci hızlı tespit edebilir.,
- Farklı mekanizmaların yol açabileceği fenotiplerin genetik temelini doğru tanımlar
- Birden fazla mekanizmanın yol açabileceği farklı, kompleks antibiyogram sonuçlarının açıklanmasını sağlar.

- **Kısıtlamaları**

- Sadece bilinen mekanizmaları tespit eder, yeni mekanizmalar kaçırılabilir
- Yalancı sonuçlara yol açabilir.

VRE mo.ların az sayıda olması,canlı olmayan enterokokların bulunması

Barsakta vanB bulunan Clostridium ve Ruminococcus lactaris benzeri mikroorganizmaların varlığı vanB primerlerinin spesifitesini düşürür.

- Multipleks PCR yöntemi son birkaç yılda aynı anda *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2/C3*'ü tespit edebiliyor.
- Kültürden izole edilen VRE'lerin tespitinde çok yararlı.
- Direkt sürüntü örneklerinde farklı sonuçlar
- Kültürle kıyaslandığında iki çalışmada sensitivitesi düşük saptanmış,
 - gaitada polimeraz enzimini inhibe eden maddelerin varlığına bağlanmış.
 - vanA* genotipinde % 99.6 kadar spesifite saptanmış, *vanB* genotipinde konvansiyonel ve real time PCR ile yalancı pozitiflikler saptanmış

JCM 2003;41:2483-6

JCM 2003;41:4805-7

JCM 2004;42:2636-43

Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008;27:321-2

Öneriler

Tüm klinik izolatlarda

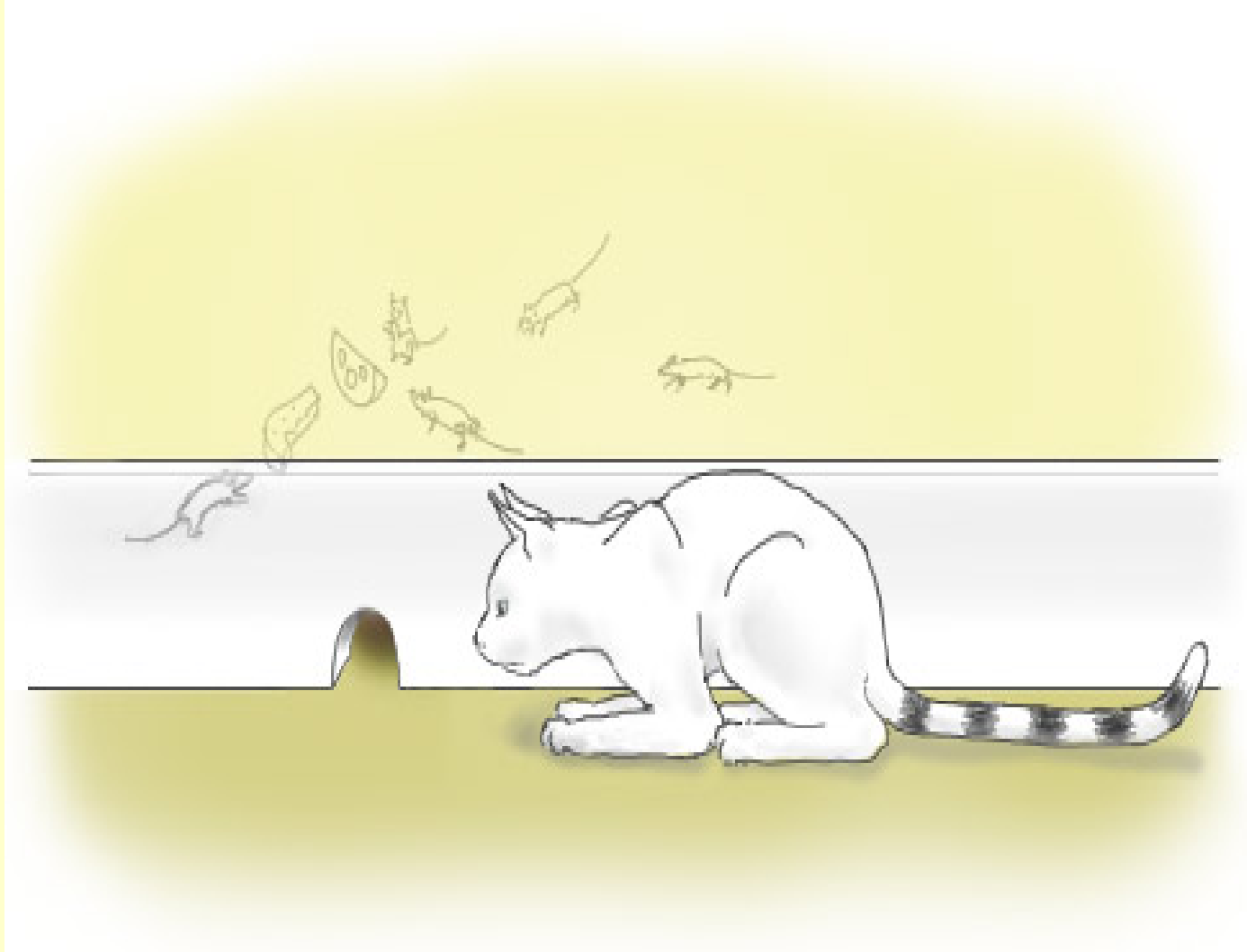
- İdentifikasyon ve duyarlılık yöntemi için doğru metodu kullanın
- VRE izole edilmişse
 - Başka bir yöntemle direnci doğrulayın
 - Genotipik tanımlama ve direncin tiplendirilmesi için referans laboratuvara gönderin.
- Tarama yöntemleri
 - Gaita ve rektal eküvyon örnekleri; rutin olarak önerilmemektedir.
 - Özellikle salgın sırasında klonal yayılım için önerilebilir.

Mikrobiyoloji lab. rolü

- Doğru yöntem
 - tanı
 - antibiyoqram
- VRE ise
 - referans yöntemle doğrulama
 - Personelin ve yoğun bakım çalışanlarının bilgilendirilmesi
 - Raporların hazırlanması
- Tarama
 - Gaita ve rektal örneklerin taraması
 - Antimikrobiyal duyarlılık taraması

Sonuç olarak

- **Gaita örneklerinden enterokok izolasyon hızı rektal sürüntülerden daha yüksektir.**
- **Zenginleştirme sonrası örneklerden VRE izole etme şansı artar.**
- **Moleküler tekniklerin spesifite ve pozitif prediktif değeri düşüktür.**
- **Antimikrobiyaller VRE'yi GIS'dan güvenli bir şekilde eradike edemeyebilir. Negatif gaita kültürü azalmış bakteri miktarını gösterip ve geniş spektrumlu atb kullanımı bu hastalarda VRE konsantrasyonunu artırabilir.**
- **HICPAC rehberlerine göre önceden kolonize olan bir hasta birer hafta aralıklarla test edilen 3 ardışık negatif kültür sonucu temizlenmiş kabul edilir.**
- **Kolonizasyon süresi 7 hafta ile 3 yıl arasında değişir.**



Umudunu kaybetme sabrın ödüllendirilecek!