

Metisiline dirençli stafilokok ve vankomisine dirençli enterokok infeksiyonları: epidemiyoloji, patogenezi ve tanısı



Dr. Bilgehan Aygen



Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı
KAYSERİ

***Staphylococcus aureus* infeksiyonları**

Toksin aracılı

- Besin zehirlenmesi
- Haşlanmış deri sendromu
- Toksik şok sendromu

İnvazyon ve sistemik yayılım

- Deri ve yumuşak doku inf.
- Bakteriyemi
- Endokardit, perikardit
- Santral sinir sistemi inf.
- Akciğer ve plevra inf.
- Kas iskelet sistemi inf.
- Üriner sistem inf.
- Yabancı cisim inf.

Koagülaz negatif stafilokokların (KNS) neden olduğu infeksiyonlar

- Bakteriyemi
- Endokardit
- Osteomyelit
- Üriner sistem infeksiyonları
- Yabancı cisim infeksiyonları
- Endoftalmit

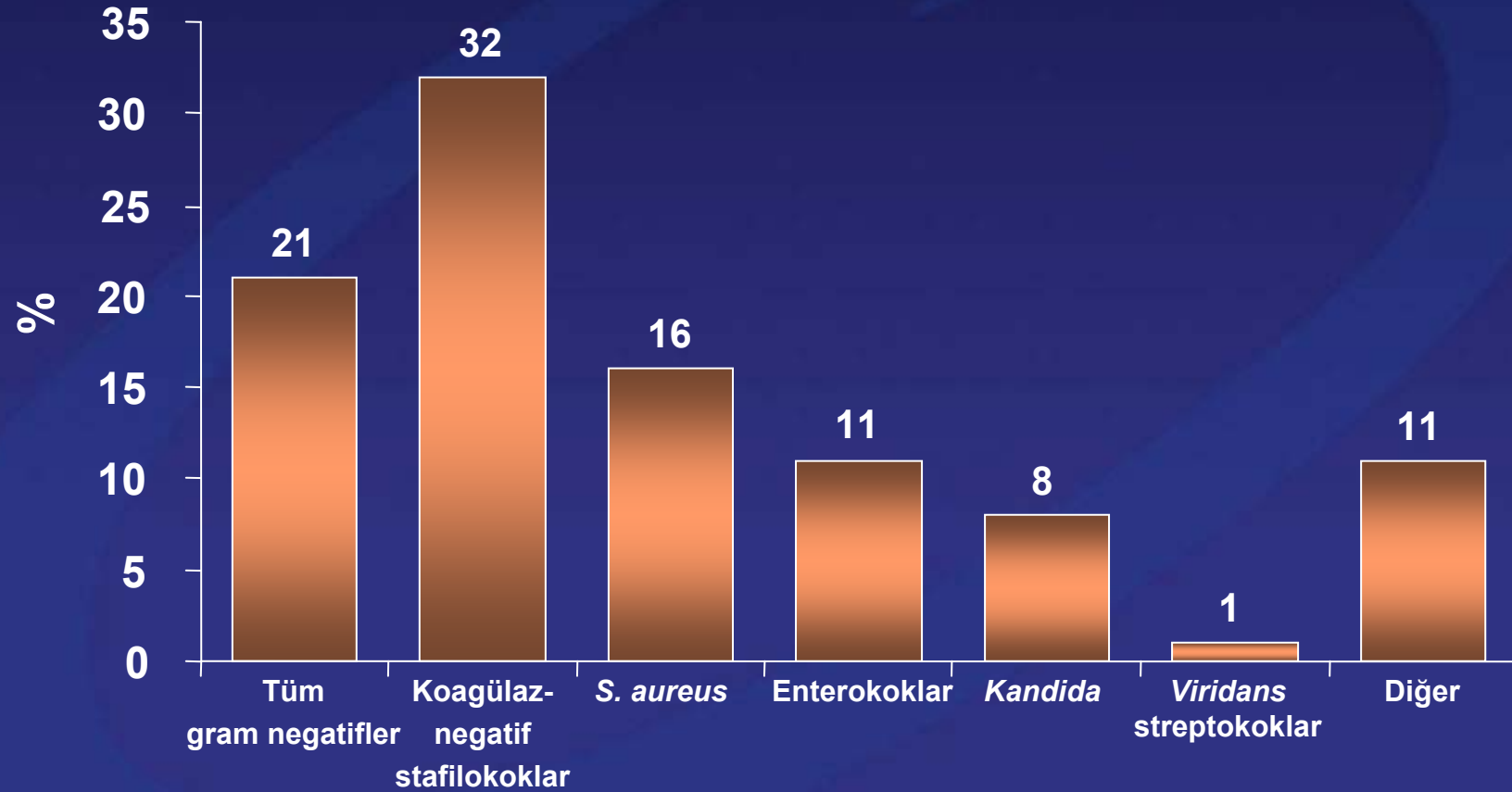
Enterokoklar

- Üriner sistem infeksiyonları
- Endokardit
- Bakteriyemi
- İntraabdominal ve intrapelvik infeksiyonlar
- Yara infeksiyonları
- Diğer

Hastanede sorun olan gram pozitif koklar

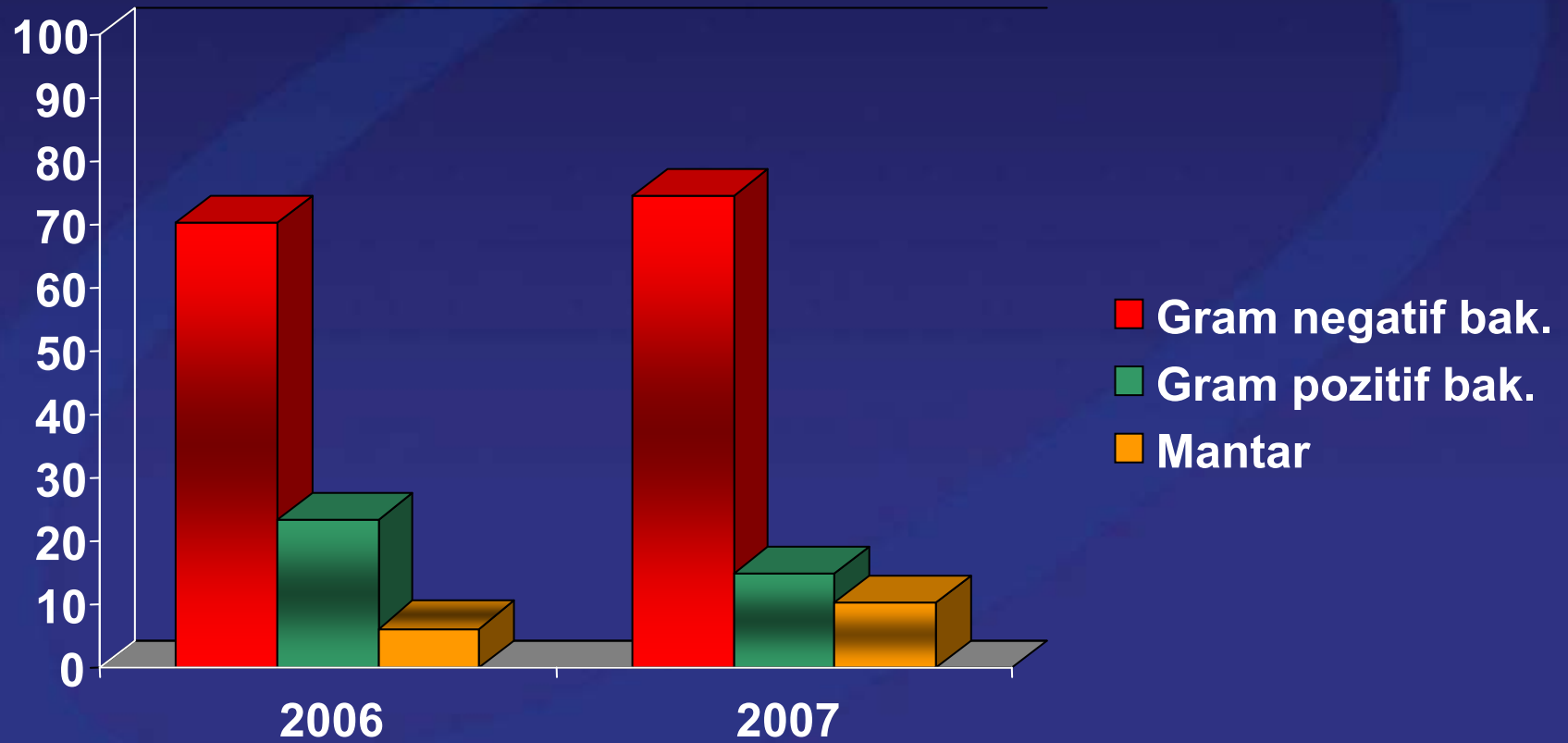
- Stafilokoklar
 - *Stapylococcus aureus*
 - KNS'ler (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*)
- Enterokoklar

Nozokomiyal kan dolaşımı izolatları



Edmond MB, et al. Clin Infect Dis 1999; 29: 239-44.

Yanık ve yoğun bakım ünitelerinden izole edilen etkenler



EÜTF, İKK Sürveyans verileri.

Yoğun bakım ünitelerinde kan-dolaşımı infeksiyonlarında mortalite

- YBÜ, 10.515 izolat

	<u>Sıklık (%)</u>	<u>Kaba mortalite (%)</u>
KNS	35.9	25.7
<i>S. aureus</i>	16.8	34.4
Kandida spp.	10.1	47.1
Enterococcus spp.	9.8	43.0
<i>P. aeruginosa</i>	4.7	47.9
<i>E. coli</i>	3.7	33.9
<i>A. baumannii</i>	1.6	43.4

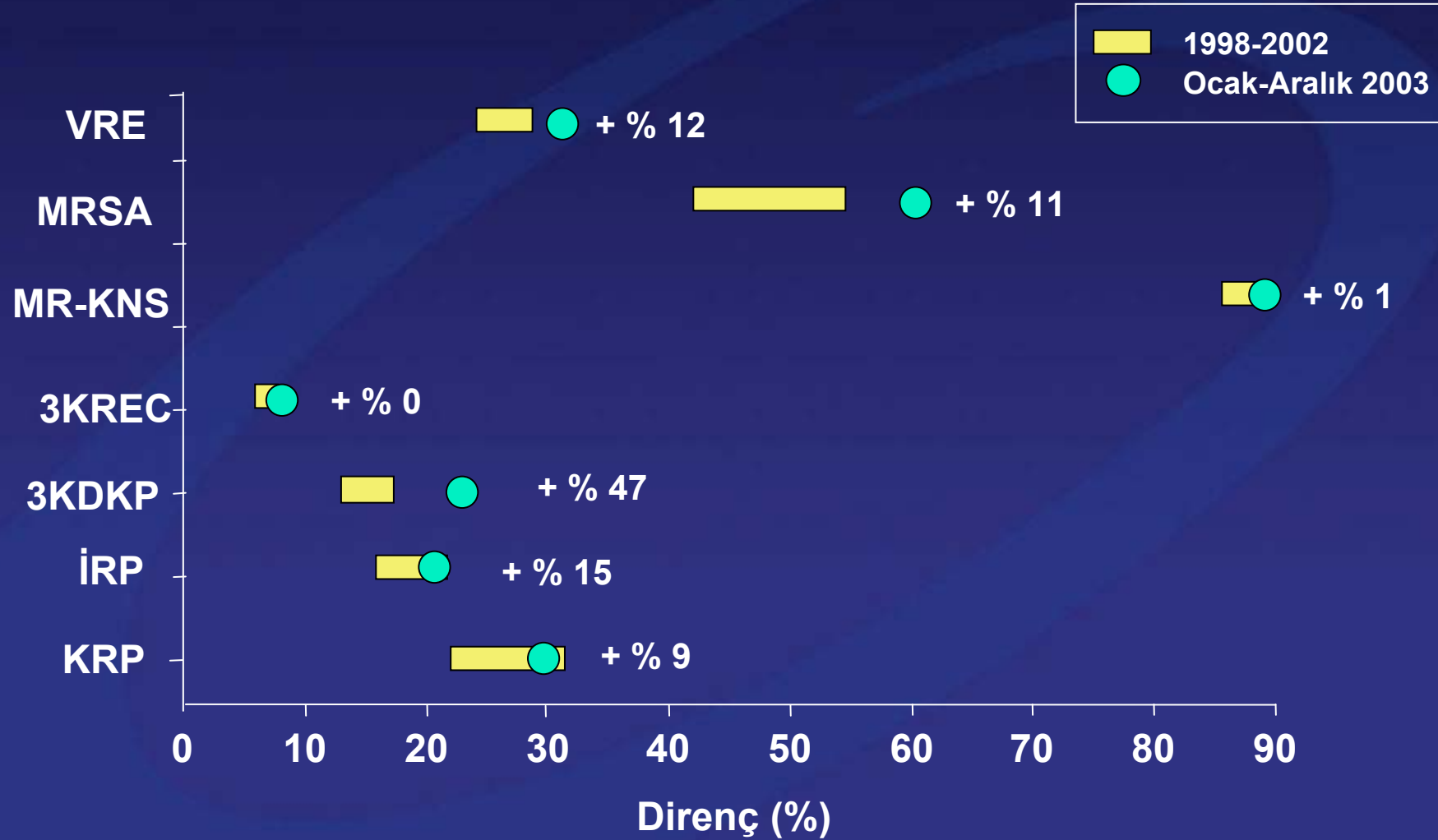
“...resistant pathogens are emerging and spreading more rapidly than in previous decades and resistance is a world problem, affecting developed and developing countries...” (WHO)

“ The continuing emergence of difficult to treat or untreatable nosocomial pathogens.....threaten the lives of hospitalised individuals and those with chronic conditions” (CDC, FDA and NIH)

Bakteriyel direncin önemi

- Morbidite ve mortalite oranlarında artış
- Etki spektrumu yetersizliği
 - Komplikasyon sıklığında artış
 - Hastanede kalış süresinin uzaması
- Çoğul antibiyotik tedavisine gereksinim
- Rezerv olarak düşünülen antibiyotiklerin erken kullanımı
 - Direnç artışı
- Tedavi başarısızlığı
 - Daha çok hekim ziyareti
 - Daha çok antibiyotik kullanımı

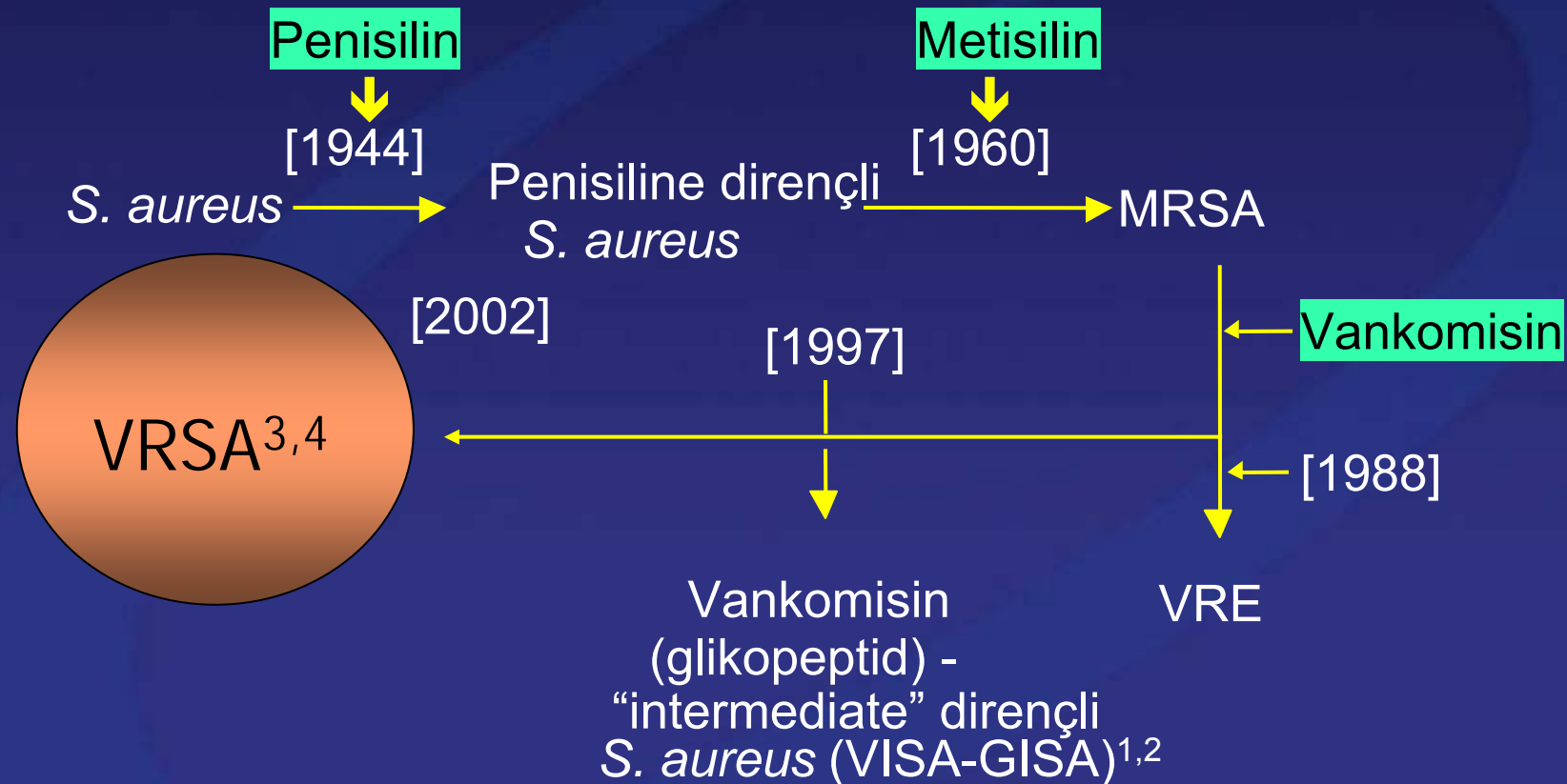
Antimikrobiyal direnç sorunu



NNIS. Am J Infect Control 2004; 32: 470-85.



Gram pozitif koklarda direnç gelişmesi



¹Hiramatsu K. *MMWR* 1997; 46: 624-6.

²CDC.Update. *MMWR* 1997; 46: 813-5.

³CDC. *MMWR* 2002; 11: 902.

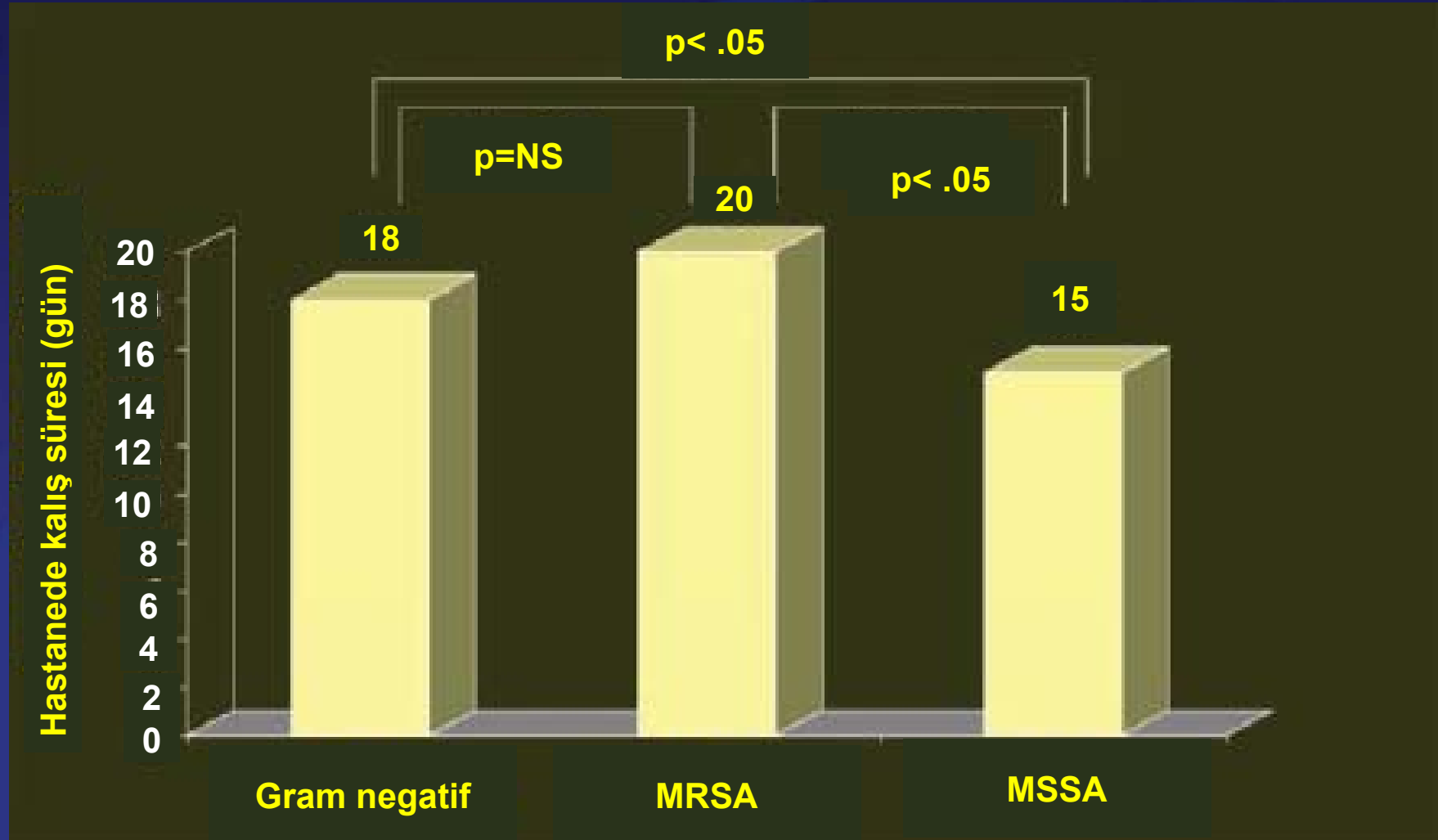
⁴Tenover FC, et al. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(1): 275-8.

MRSA

- Dünyada birçok bölgede (Avrupa, Amerika, Kuzey Afrika, Orta ve Uzak-Doğu) hastane infeksiyonlarından en sık izole edilen patojen
- Yoğun bakım ünitelerinden diğer hastane birimlerine göre daha sık izole edilir
- MRSA infeksiyonları
 - Hastanede kalış süresinin uzaması
 - Yüksek mortalite oranı

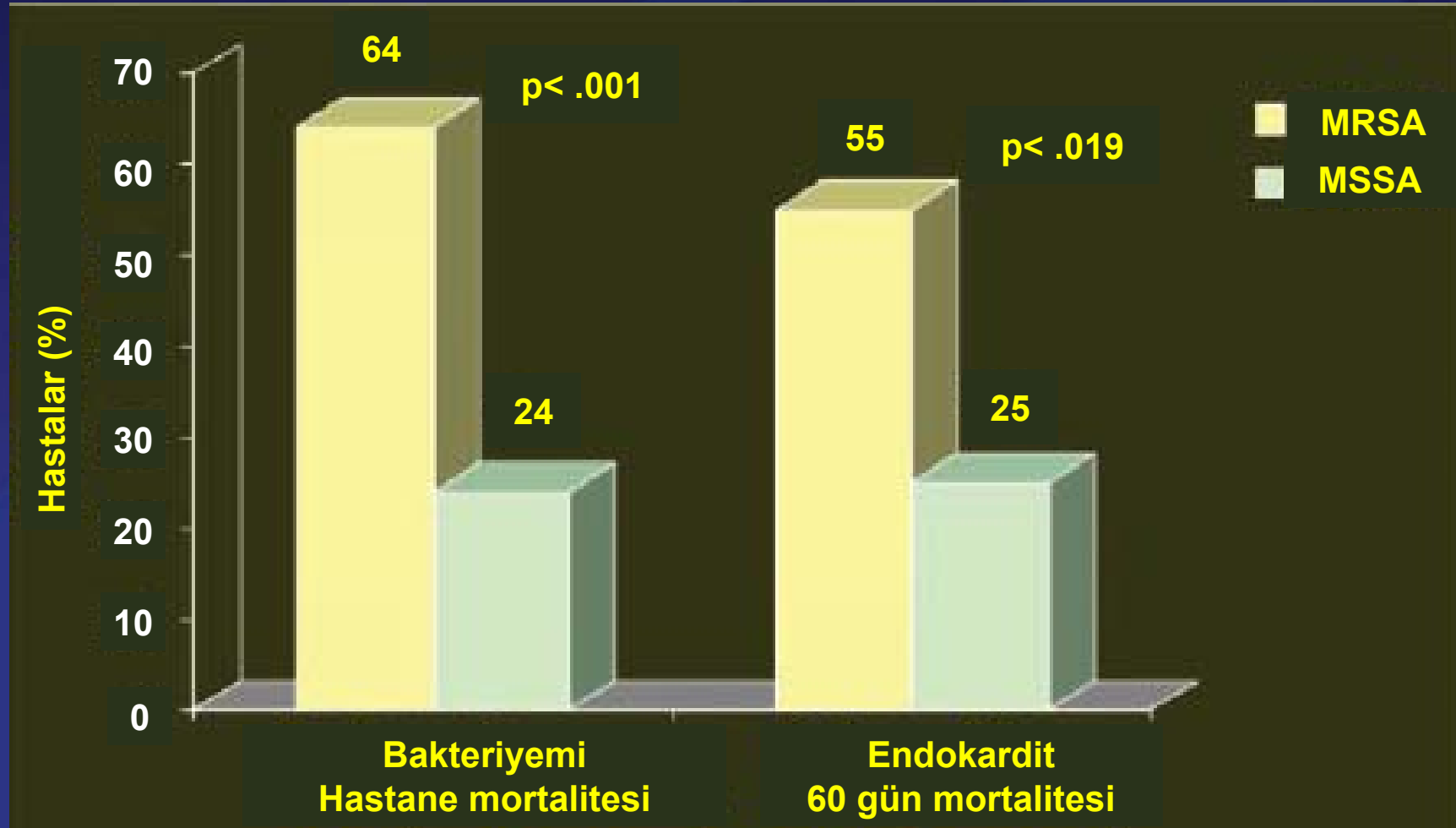
*Karchmer AW. Clin Infect Dis 2000; 31 Suppl 4:S139-43.
Cosgrove SE, et al. Clin Infect Dis 2003 ;36 (1):53-9.*

MRSA'nın klinik önemi (1)



Shorr AF. Clin Infect Dis 2007; 45: S171-6.

MRSA'nın klinik önemi (2)



MRSA: Risk faktörleri

- Önceden hastanede yatış
- Kronik akciğer hastalıkları
- Cerrahi girişimler
- Santral venöz kateterizasyon
- Enteral beslenme
- Antibiyotik kullanımı
 - Üçüncü kuşak sefalosporinler
 - Florokinolonlar (siprofloksasin, levofloksasin v.b.)
 - Vankomisin
 - Aminoglikozidler, makrolidler

Weber SG. Emerg Infect Dis 2003;9: 1415-22.

Tacconelli E, et al. J Antimicrob Chemother 2008; 61 (1): 26-38.

İnvazif *S. aureus* infeksiyonları için hazırlayıcı faktörler

- Lökosit kemotaksis bozuklukları
- Oponizasyon bozuklukları
- Bakterilerin hücre içi öldürülmesinde yetersizlik
- Deri bütünlüğünde bozulma
- Yabancı cisimler
- Diğer mikroorganizma infeksiyonları
- Altta yatan kronik hastalıklar
- Antimikrobiyal kullanımı

Metisiline dirençli KNS infeksiyonları için risk faktörleri

- Daha önce antibiyotik kullanım öyküsü
- Santral venöz kateter kullanımı
- Bakım evindenden nakil
- Metisiline dirençli stafilokoklar ile kolonizasyon veya infeksiyon öyküsü

Tacconelli E. Clin Microbiol Infect 2006; 12 (2): 102-9.

Metisiline direncinin mekanizması (1)

- Temel mekanizma *mecA* geninin varlığına bağlı olarak β -laktam antibiyotiklere karşı düşük afinitesi olan PBP2a'nın sentezlenememesi
- *mecA* gen kompleksi mobil genetik yapı (stafilokoksik kaset kromozomu-SCC) üzerinde taşınır
- *SCCmec*
 - *mec* metisilin direncinden sorumlu
 - *ccr* kompleksi bakteri genomunda kasetin integrasyon ve eksizyonundan sorumlu
- Beş farklı *SCCmec* tipi

Metisiline direncinin mekanizması (2)

- SCC*mec* tip I (IA), II (IIA) ve III (IIIA, IIIB)
 - Genellikle hastane kökenli MRSA suşlarında bulunur
 - Tip I plazmid ve transpozon taşımaz
 - Tip II *mecA* ve *mecRI* genlerinin yanı sıra Tn554 transpozonunu (eritromisin ve streptomisin direnci) taşır
 - Tip III Tn554 , Ψ Tn554 transpozonlarını ve pT 181 plazmidini taşır
 - Tip III'te farklı *ccr* gen tipleri de (Ψ *ccr*) tanımlanmıştır

Metisiline direncinin mekanizması (3)

- *SCCmec* tip IV
 - Toplum kökenli MRSA suşlarında saptanmıştır
 - *mecA* dışında direnç geni taşımaz
 - Daha küçük yapıdadır
 - IVA, IVB, IVC ve IVD subtipleri var
- *SCCmec* tip V
 - *mecA* dışında direnç geni taşımaz
 - Tarklı tipte *ccr* genleri (tip c) taşır
 - *V22* ve *V23* genleri tarafından kodlanan restriksiyon ve modifikasyon sistemi taşır

Metisiline direncinin mekanizması (4)

- Homojen direnç: Populasyonu oluşturan bakterilerin tümünde yüksek düzeyde direnç
- Heterojen direnç:
 - $1/10^4$ - 10^8 bakteride direnç var
 - *mec* elementi dışındaki bir bölgede gelişen ek kromozomal mutasyonlar (*chr*)
- İntrensek dirençli suşlarda metisiline direncin fenotipik ekspresyonuna göre dört sınıf tanımlanmıştır
 - Sınıf 1 heterojen, sınıf 4 homojen direnç

Metisiline direncinin mekanizması (5)

- Direncin düzeyi çeşitli genetik faktörlerden etkilenen PBP2'lerin miktarına bağlıdır
- *mecA* pozitif suşlarda direnç düzeyi fenotipik olarak duyarlılıktan yüksek düzey dirence kadar değişebilir
- Heterojen direncin olduğu suşlar yüksek düzeyde dirençli varyantlara dönüşebilir

Metisiline direncinin mekanizması (6)

- “Borderline” direnç
 - Suşlar *mecA* geni taşımaz
 - Beta-laktamazların aşırı üretimine bağlı oksasilin inaktivasyonu veya oksasiline afinitesi düşük olan modifiye intrensek PBP’lerin yapımı (MOD-SA)

MRSA

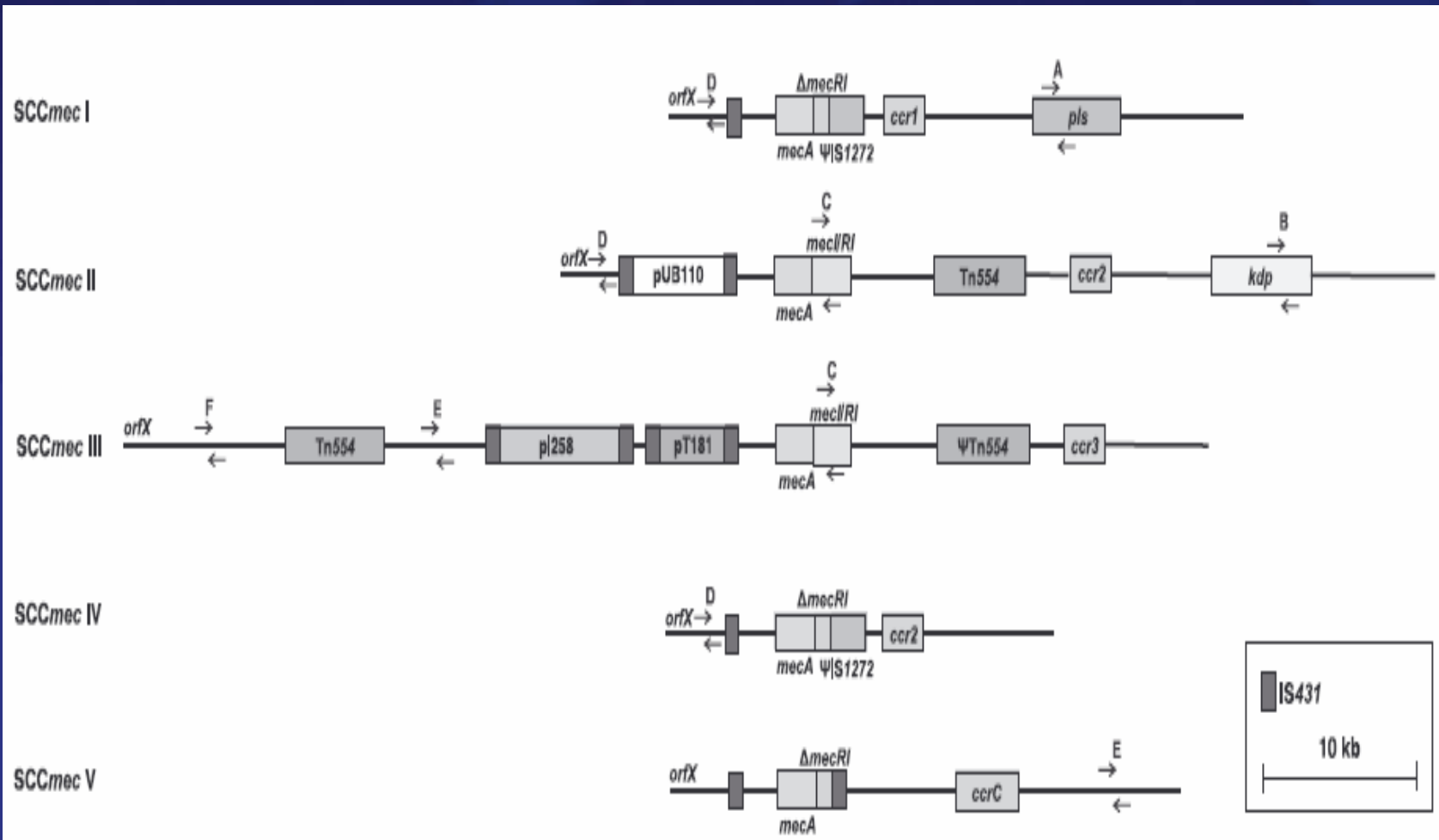
- Tüm beta-laktam antibiyotiklere
- Makrolidlere
- Aminoglikozidler
- Kloramfenikol
- Kinolonlar
- Tetrasiklin
- Rifampisin
- TMP-SMZ

direnç!

KNS'lerde metisiline direncinin mekanizması

- *S. aureus*'taki direnç mekanizması ile aynıdır
- *mecA* geninin aracılık ettiği direnç MRSA'ya göre daha düşük düzeyde eksprese edilir
- *S. epidermidis* suşlarında heterojen direnç *S. aureus* suşlarına göre daha fazladır

Stafilokoksik kaset kromozomunun tipleri



Pandemik MRSA klonları

Klonlar	SCCmec	PFGE paterni	MLST*
“Brazilian”	Tip IIIA	B	2-3-1-1-4-4-3
“Iberian”	Tip IA	A	3-3-1-1/12-4-4-16
“New York/Japon”	Tip II	C	1-4-1-4-12-1-10
“Hungarian”	Tip III	A	2-3-1-1-4-4-3
“Pediatric”	Tip IV	A	1-4-1-4-12-1-10

*MLST: “Multilocus sequence typing”

Martins A, Cunha MLRS. Microbiol Immunol 2007; 51 (9): 787-95.

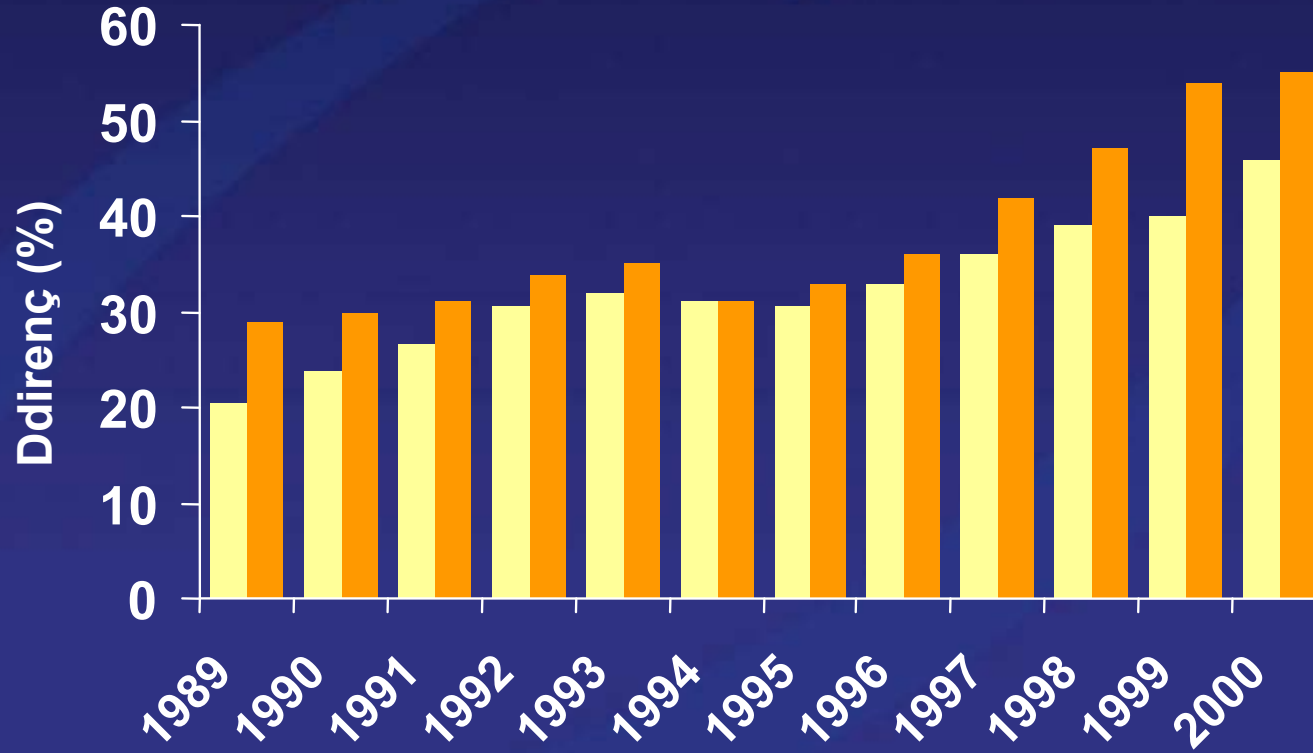
Değişik çalışmalarda MRSA sıklığı

	<u>Hastane</u> <u>(sayı)</u>	<u>Yıl</u>	<u>%</u>
SCOPE	49	1995-1998	29
ICARE	41	1996-1997	33
SENTRY	30	1997-1999	34
NNIS	315	2003	59.5

Karchmer AW. Clin Microbiol Infect 2006; 12 (Suppl 8): 15-21.

ABD'de MRSA oranları

■ NNIS, 1992-2004



■ YBÜ dışı

■ YBÜ

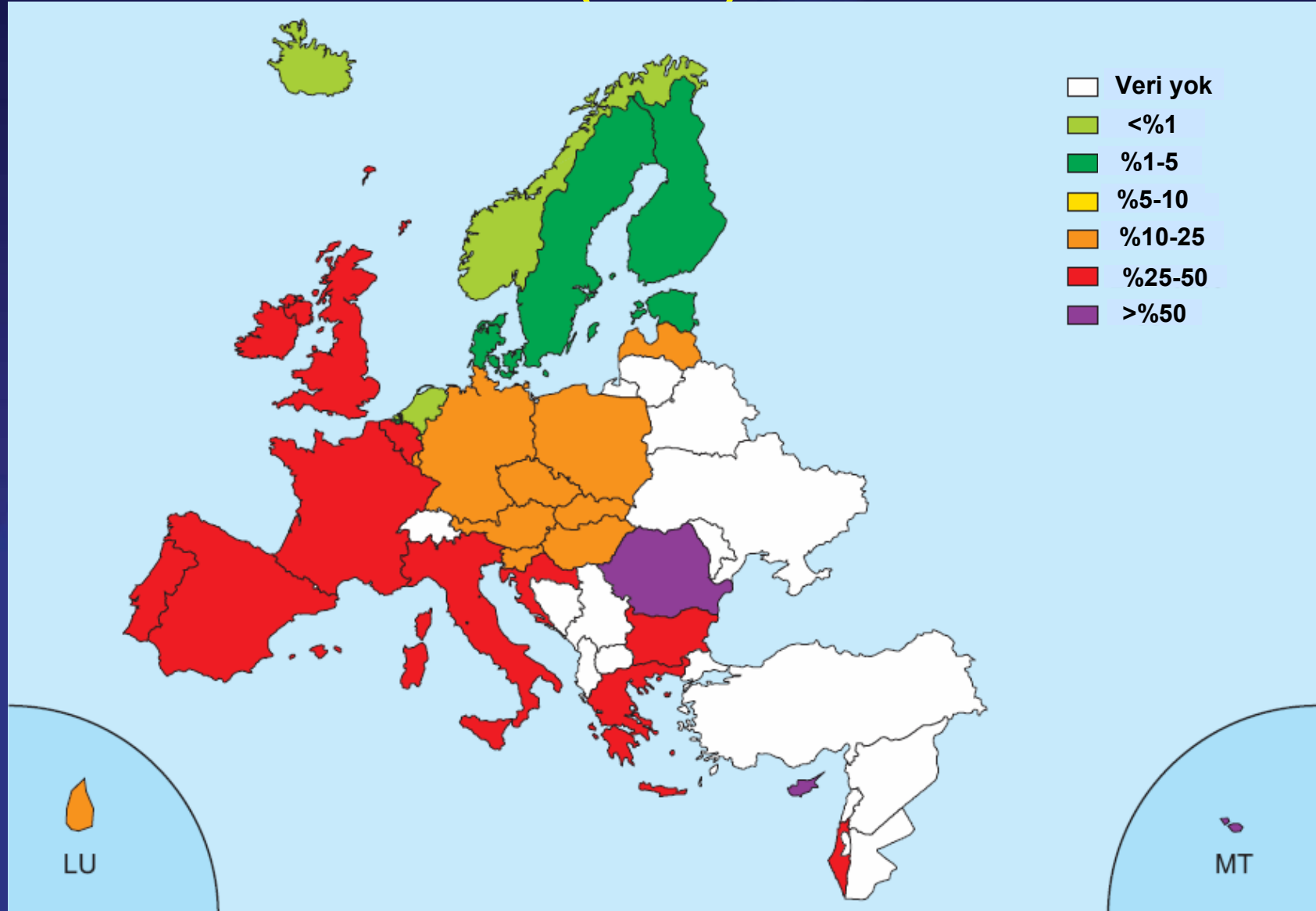
NNIS. Am J Infect Control 2004;32 (8): 470-85.

Zaman içinde MRSA artışı

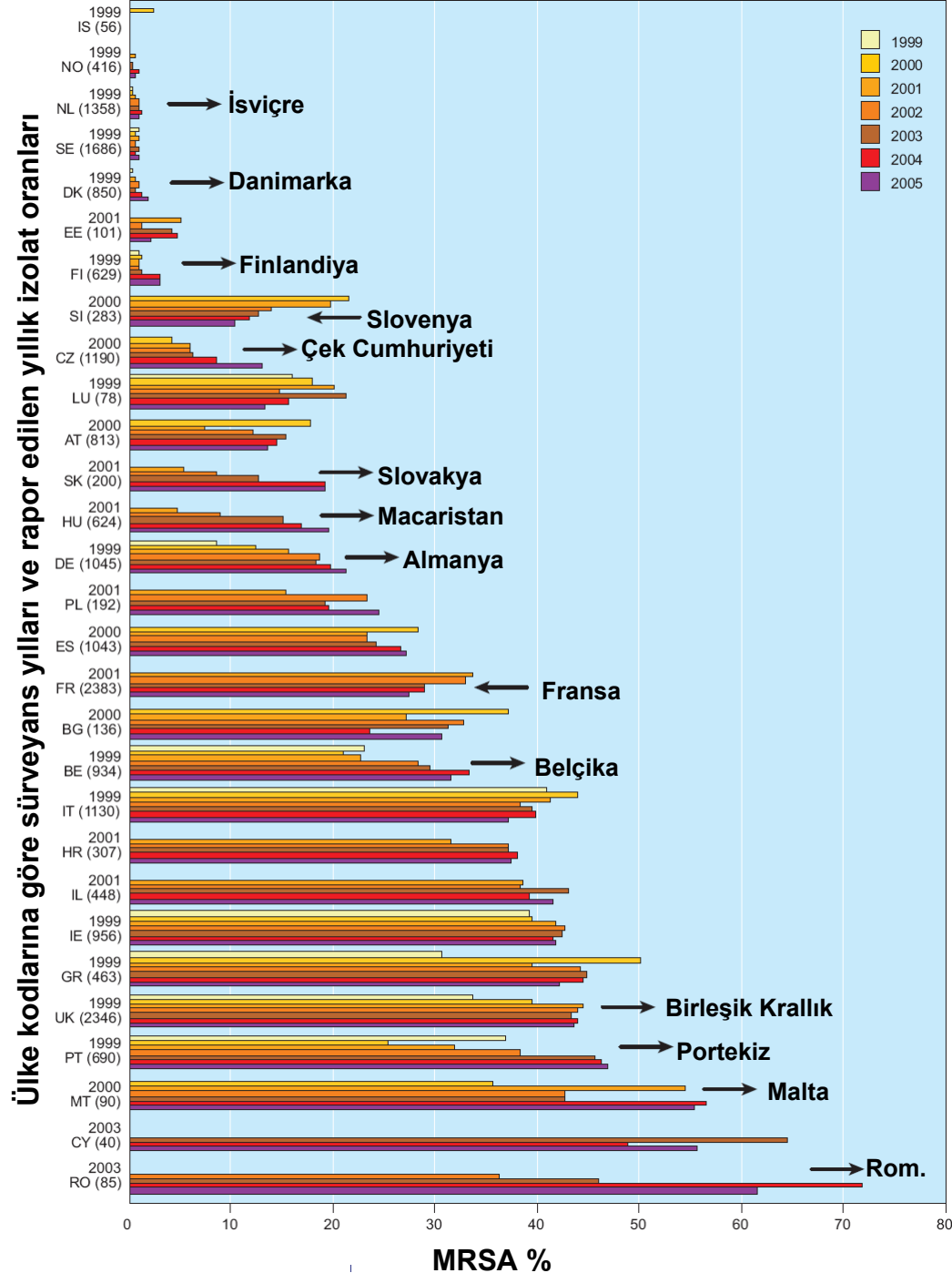


*Salgado CD, et al. Infect Med 2003; 20: 194-200.
NNIS. Am J Infect Control 1999; 27: 520-32.
NNIS. Am J Infect Control 2004; 32: 470-85.*

Avrupa'da invazif MRSA izolatlarının oranı (2005)



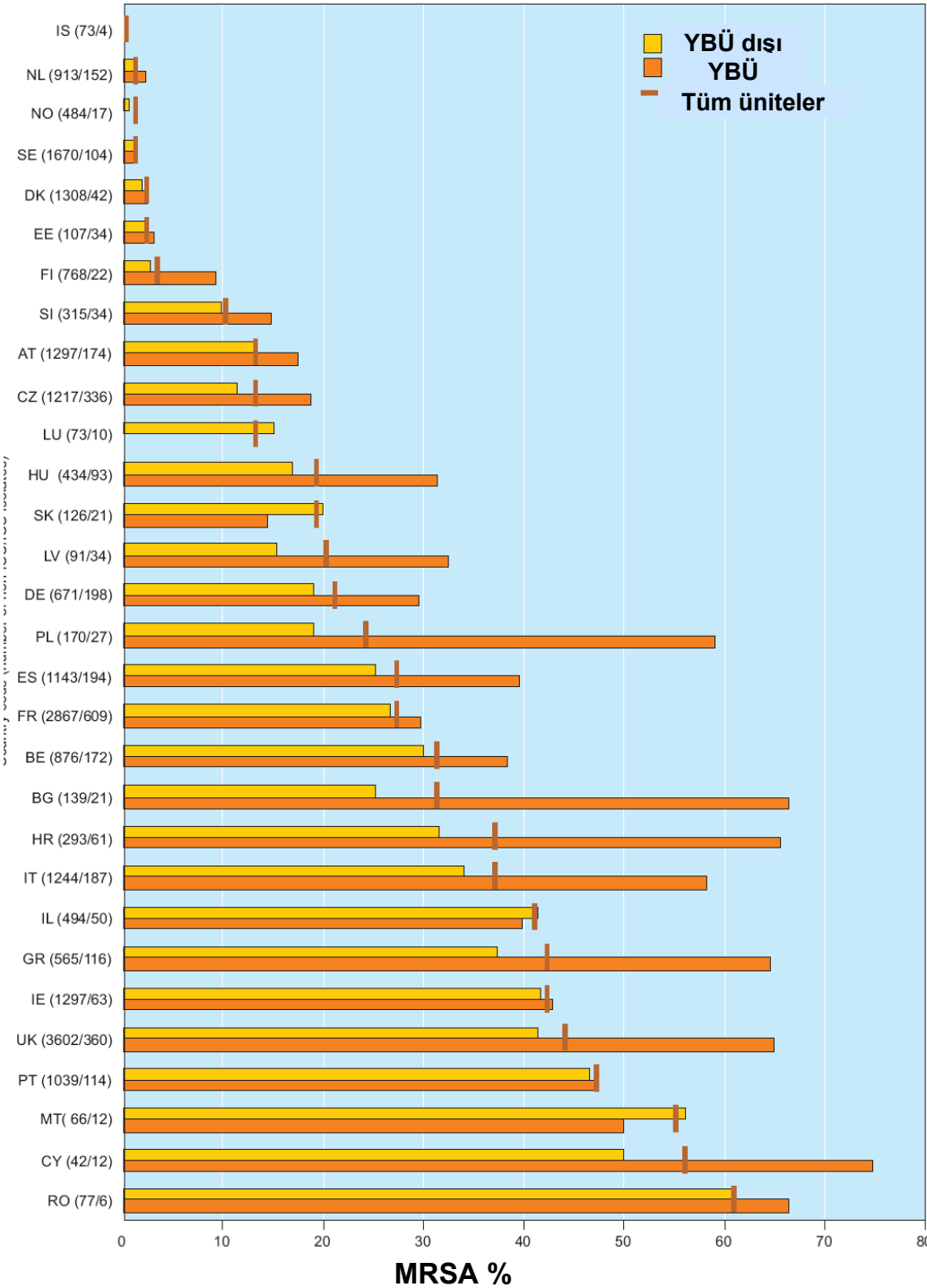
EARSS, October 2006.



**Avrupa ülkelerinde
1999-2005 yılları
arasında MRSA
oranları (n: 27.095)**

EARSS, October 2006.

Ülke kodlarına (yoğun bakım ünitesi dışı/yoğun bakım ünitesi izolatları)



Avrupa'da yoğun bakım üniteleri ve diğer hastane birimlerinde MRSA oranları (2005)

EARSS, October 2006.

KNS'lerde direnç (1)

- *S. epidermidis* ve *S. haemolyticus* suşları genellikle çoklu dirençli
- Metisiline direnç >%80
- Eritromisin, klindamisin, timetoprim-sulfametoksazol, gentamisin ve siprofloksasin direnci >%50

KNS'lerde direnç (2)

- İtalya: YBÜ'lerden izole edilen suşların %41'i KNS ve %64'ü metisiline dirençli

Nicoletti G, et al. Int J Antimicrob Agents 2000; 15: 265-9.

- İspanya: 143 hastaneden izole edilen suşların %45.7'si KNS ve metisiline direnç %67

Cuevas O, et al. Antimicrob Agents Chemother 1999; 48: 4240-5.

KNS'lerde direnç (3)

- Finlandiya: Metisiline dirençli *S. epidermidis* 1983 yılında %28, 1994 yılında %77

Witte W. J Antimicrob Chemother 1999; 44: S1-9.

- ABD: Bakteriyemi etkeni suşlarda metisiline direnç %65

Baquero F. J Antimicrob Chemother 1997; 39: S1-6.

Türkiye'de MRSA (1)

Yıl	Merkez	Klinik özellik	MRSA (%)
1995	Akdeniz Üniversitesi	Nozokomiyal infek.	63
1999	GATA, Ankara	Nozokomiyal infek.	70
1999	ÇAPA Tıp Fak, İst.	VİP, YBÜ	78
1999	İbn-i Sina Hastanesi	Noz. ve toplum kökenli infek.	14
2000	Atatürk Üniv.	Nozokomiyal infek.	37
2001	Numune Hast, Ankara	Nozo pnömoni, YBÜ	78
2002	Osman Gazi Üniv.	Nozokomiyal infek.	83
2002	Cumhuriyet Üniv.	Beyin cerrahisi kliniği	53
2002	Erciyes Üniv. Kayseri	Nozokomiyal infek.	65
2002	GATA, İstanbul	Nozokomiyal infek.	68
2003	Siyami Ersek, İst.	Nozokomiyal infek.	60
2003	Çukurova Üniv.	YBÜ	95

Türkiye'de MRSA (2)

- Doğu Anadolu Bölgesi %58
- Karadeniz Bölgesi %37
- Türkiye %52

Derbentli Ş. ANKEM Dergisi 2005; 19 (Ek 2).

Türkiye'de MRSA (3)

ARMed projesi

- Sadece kan izolatları ve 11 merkez katılımlı
 - 2003: Kayseri %30, İzmir %73 (n=749)
 - 2004: İstanbul %22, İzmir %68 (n=687)

Gür D, et al. 6th IFIC, 2005.

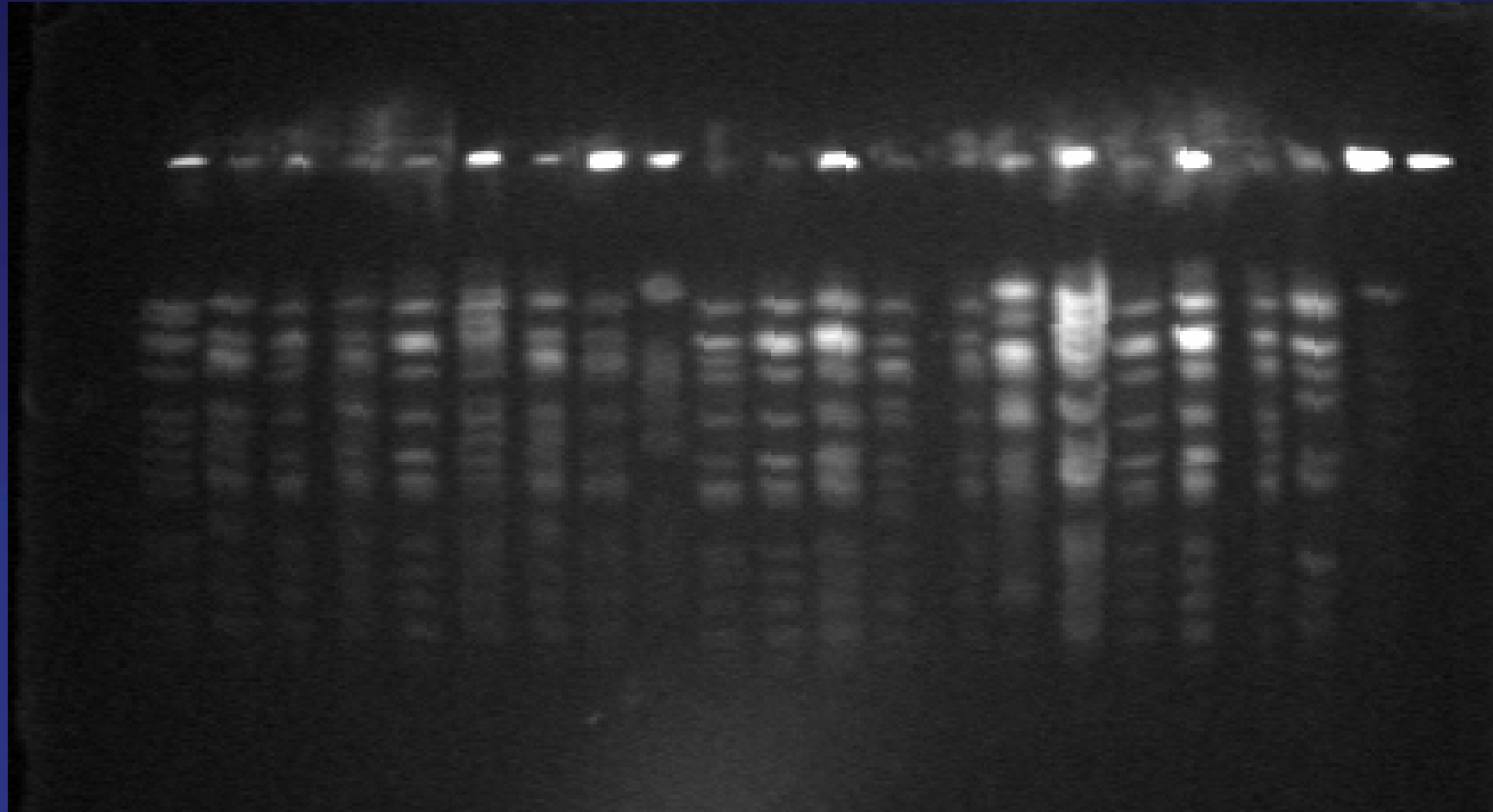
***S. aureus*'a bağlı kan dolaşım infeksiyonları epidemioloğisi (Erciyes Üniversitesi verileri)**

- 142 nozokomiyal kan dolařım infeksiyonu
- Metisiline direnç oranı %65.5
- 80 MRSA izolatının klonal yakınlığı PFGE ile araştırıldı
- PFGE ile 10 farklı klon
- Suşların %76.3'ü aynı klondan

Aygen B, et al. Clin Microbiol Infect 2004; 10:309-14.

“Sma” 1 enzimi ile kesilerek elde edilmiş bazı PFGE bant paternleri

14 42 22 41 55 75 23 12 78 20 68 49 3 62 35 54 69 27 * ** 56



A₅ A A A₂ A₁ D A A B A₁ A₁ A A A İ F A₂ A * ** *

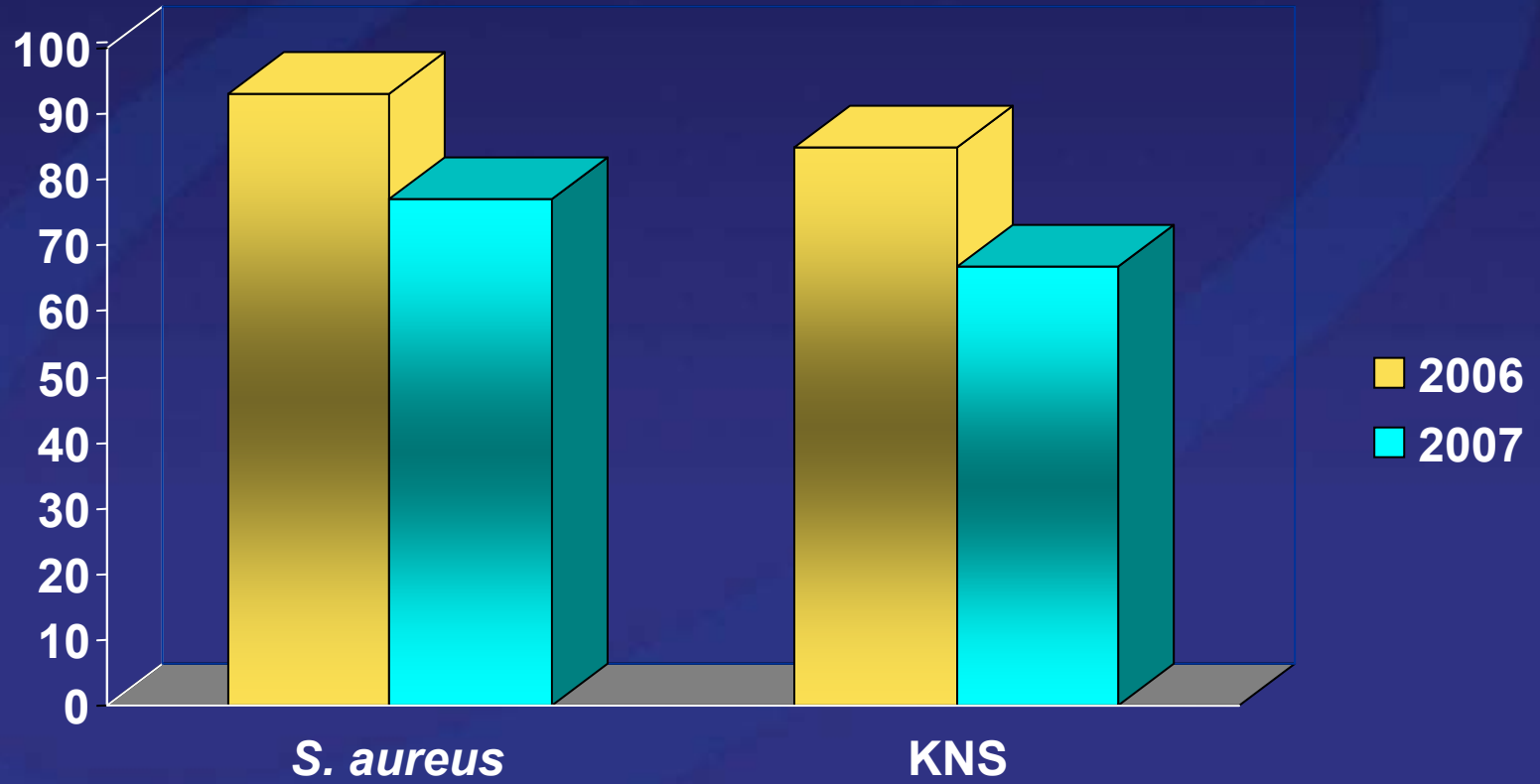
Hacettepe klonu, ** "Iberian" klonu

Yanık ve yoğun bakım ünitelerinden izole edilen stafilokok suşlarının yıllara göre metisiline direnç oranları

	<i>S. aureus</i> Dir. suş / top. suş (%)	KNS Dir. suş / top. suş (%)
2002	58/64 (91)	40/41 (98)
2003	80/84 (95)	76/81 (94)
2004	83/87 (95)	69/70 (99)
2005	74/84 (88)	13/15 (87)
2006	80/86 (93)	23/27 (85)
2007	40/52 (77)	6/9 (67)

EÜTF, İKK Sürveyans verileri.

Stafilokok suşlarında metisiline direnç



EÜTF, İKK Sürveyans verileri.

***S. aureus* infeksiyonlarının patogenezi (1)**

- Mikrobiyal virülans
 - Hücre duvarı yapıları: Peptidoglikan tabaka, teikoik asit, protein A
 - Hücre yüzey yapıları: Kapsül, matriks proteinlerini bağlayan yapılar, “slime” faktör, adezinler, hemaglütininler
 - Hücre dışı ürünler: Toksinler ve enzimler
- Konak faktörleri

S. aureus infeksiyonlarının patogenezi (2)

- Hücre duvarı yapıları
 - Peptidoglikan tabaka
 - Osmotik stabilite
 - Endotoksin benzeri aktivite (sitokin salınımı, kompleman aktivasyonu, trombosit agregasyonu)
 - İnsan monositlerinden İL-1 salgılanması, lökosit kemotaksisi
 - Teikoik asit
 - Hücre duvarı ve membran teikoik asiti
 - Konağa aderans (fibronektin, fibrinojen, laminin, trombospondin, vibronektin, elastin, sialoprotein, kollajen gibi mukozal özgül reseptörlere bağlanarak)
 - Peptidoglikan ile birlikte özgül antikor yanıtı uyarımı

***S. aureus* infeksiyonlarının patogenezi (3)**

- Kapsül
 - Fagositozdan korunma ve konak hücrelerine, yabancı cisimlere aderans
- Yüzey proteinleri (protein A, elastin, kollajen, fibrinojen bağlayan proteinler, “clumping” faktör



MSCRAMM (“microbial surface proteins recognizing adhesive matrix molecules)



Konak dokularda kolonizasyon

- Protein A: Antikomplemanter ve antifagositik etkinlik

S. aureus infeksiyonlarının patogenezi (4)

- Toksinler
 - Alfa-toksin
 - İnflamatuvar yanıt indüksiyonu
 - Subkutan nekroz ve potansiyel nörotoksik etki
 - Beta toksin (sfingomiyelinaz C)
 - İnvazif infeksiyonlarda doku hasarı
 - CAMP faktörle etkileşim
 - Gamma toksin
 - Eritrositlere toksik etki
 - Delta toksin
 - Biyolojik membranlarda hasar
 - Adenilat siklaz aktivasyonu

S. aureus infeksiyonlarının patogenezi (5)

- Toksinler
 - Lökosidin
 - Granülosit stoplazmalarında degranülasyon ve hücre kaybı
 - Pirojenik ekzotoksinler (Epidermolitik toksin, enterotoksinler, TŞST-1)
 - Süperantijen yapı

S. aureus infeksiyonlarının patogenezi (6)

- Toksinler
 - Epidermolitik toksin (eksfoliyatin)
 - Stafilokoksik haşlanmış deri sendromu
 - ET-A: Kromozomal kökenli, ısıya duyarlı, aside dayanıksız
 - ET-B: Plazmid kökenli, ısıya dayanıksız, aside dirençli
 - Proteolitik (serin proteaz) aktivite
 - İmmünolojik özellik
 - Enterotoksinler
 - En az 15 farklı tip
 - En sık besin zehirlenmesi enterotoksin A
 - Sempatik aktivasyon
 - SSS etkisi

S. aureus infeksiyonlarının patogenezi (7)

- Toksinler

- Toksik şok sendromu toksini-1

- Menstrüasyon ile ilişkisiz TSS'lerin %50'sinden sorumlu. Diğer olgularda enterotoksin B ve C salgılayan suşlar
 - Endotoksinlere karşı ortaya çıkan yanıtın güçlenmesi

- Enzimler

- Katalaz

- Fagosit içinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye direnç

- Koagülaz

- Bağlı koagülaz: Fibrinojenin fibrine dönüşümü, bakterilerin birbirine yapışması
 - Serbest koagülaz: Stafilotrombin yapımı

S. aureus infeksiyonlarının patogenezi (8)

- Enzimler
 - Lipaz
 - Yağ hidrolizi ve doku invazyonu
 - Hiyalüronidaz
 - Deoksiribonükleaz
 - Beta-laktamazlar

Virülans faktörlerini kontrol eden genler (1)

Gen	Ürün
Yüzey proteinleri	
<i>spa</i>	Protein A
<i>cna</i>	Kollajen bağlayan protein
<i>fnbA</i>	Fibronektin bağlayan protein A
<i>fnbB</i>	Fibronektin bağlayan protein B
<i>clfA</i>	“Clumping” faktör A
<i>clfB</i>	“Clumping” faktör A
	Laktoferrin bağlayan protein
Kapsüler polisakkaritler	
<i>cap5</i>	Polisakkarit kapsül tip 5
<i>cap8</i>	Polisakkarit kapsül tip 8

Virülans faktörlerini kontrol eden genler (2)

Gen	Ürün
Sitotoksinler	
<i>hla</i>	Alfa hemolizin
<i>hlb</i>	Beta hemolizin
<i>hld</i>	Gamma hemolizin
<i>hlg</i>	Delta hemolizin
<i>lukS/F</i>	“Panton-Valentine” lökositidin
Süperantijenler	
<i>sea</i>	Enterotoksin A
<i>seb</i>	Enterotoksin B
<i>sec</i>	Enterotoksin C
<i>sed</i>	Enterotoksin V
<i>eta</i>	Eksfoliyatin A
<i>etb</i>	Eksfoliyatin B
<i>tst</i>	TŞST-1

Virülans faktörlerini kontrol eden genler (3)

Gen

Ürün

Enzimler

spIA-F

Serin proteaz

ssp

V8 proteaz

aur

Metalloproteaz

sspB

Sistein proteaz

scp

“Staphopain” (proteaz II)

geh

Gliserol ester hidrolaz

lip

Lipaz (bütiril esteraz)

fme

FAME

plc

PI-fosfolipaz C

nuc

Nükleaz

hys

Hyaluronidaz

coa

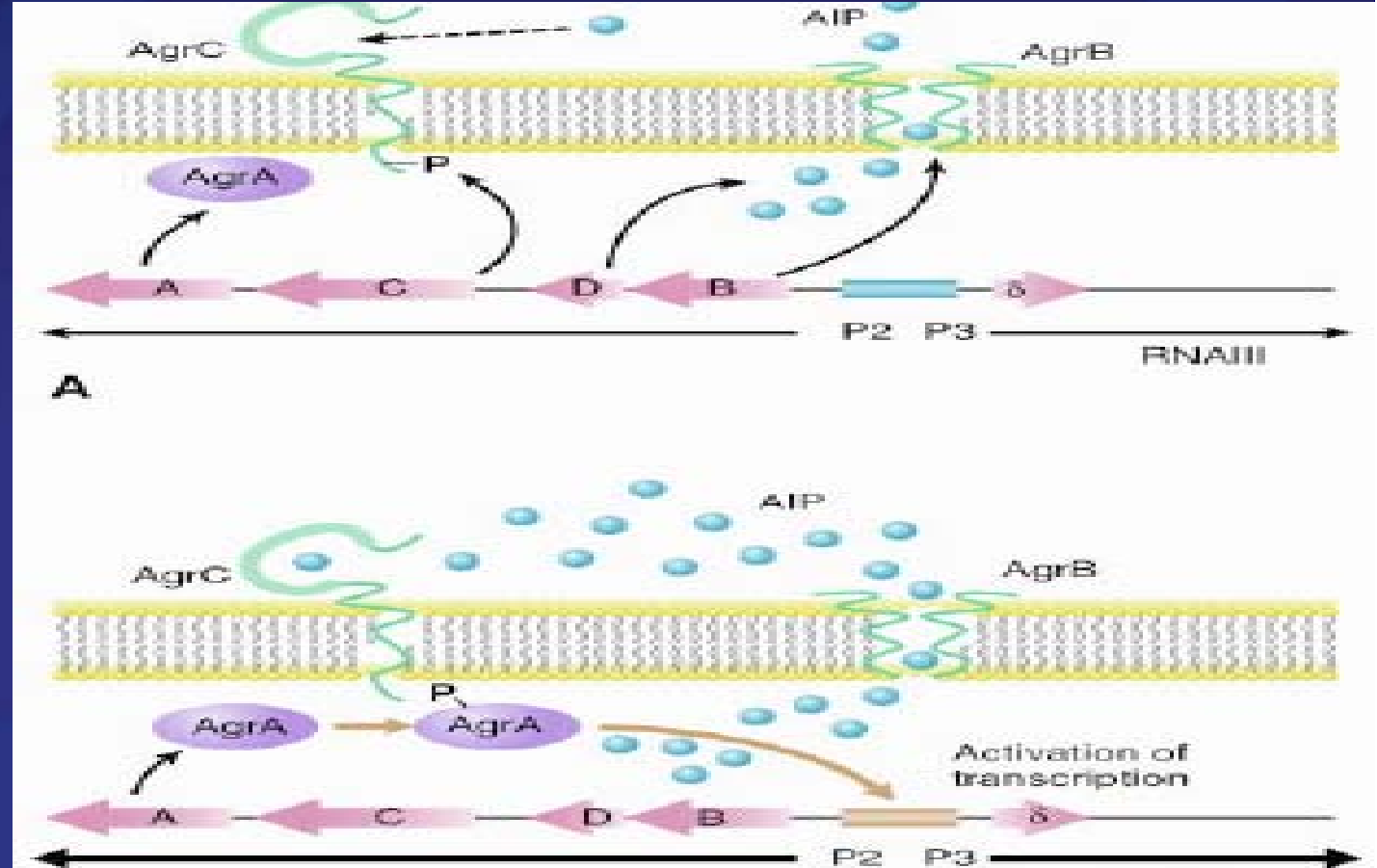
Koagülaz

sak

Stafilokinaz

Virülans faktörlerinin düzenlenmesi (1)

- *agr* ana regülasyon sistemi
- Promoter P2 *agrB*, *agrC* ve *agrD* ile transkripsiyonun aktivasyonu ve ekzoproteinlerin salınımı



Virülans faktörlerinin düzenlenmesi (2)

- *sae*: *S. aureus* ekzoproteinleri
- *ar/S*: Otoliz ilişkili lokus sensörünün kontrolü
- *srrAB*: Stafilokokal solunum yanıtı
- RNAIII-aktive eden protein (RAP) ve TRAP: Protein *agr* sisteminin kontrolü üzerine etkili

Virülans faktörlerinin düzenlenmesi (3)

- Patogenezi düzenleyenler:
 - Hareketli inzersiyon sekansları
 - Transpozonlar
 - Taşınabilir patojenite adacıkları
- Patojenite adalarından SaPI1 ve SaPI2 TSST-1 geninden sorumlu
- SCC*mec* adası
 - *ccrA* and *ccrB* mobilizasyon
 - *mecA* geni, β -laktam direnci

KNS'lerde virülans faktörleri ve infeksiyon patogenezi (1)

- Biyofilm oluşumu
 - Aderans (polimer yüzeye tutunma) fazı:
 - Özgül olmayan fizikokimyasal çekim güçleri
 - Stafilokok yüzey proteini 1 (SSP-1) ve SSP-2
 - Yüzey ile ilişkili otolizin (AtIE), “biofilm associated protein (Bap)”
 - Polisakkarit adezinler: Kapsüler polisakkarit adezin (PSA) ve polisakkarit interselüler adezin (PIA) → *ica* operonu tarafından kodlanırlar
 - “Fibrinogen binding protein (Fbe)”, “serine-aspartate repeat (Sdr)” proteinler [SdrG, SdrF, SdrH]
 - Teikoik asit

KNS'lerde virülans faktörleri ve infeksiyon patogenezi (2)

- Biyofilm oluşumu
 - Birikim fazı:
 - PIA aracılığı ile interselüler adezyon
 - “Slime associated antigen (SAA)” PIA ile aynı
 - “Accumulation associated protein (AAP)” PIA'nın hücre yüzeyine tutunmasında rol alır
 - PIA üretiminde açık ve kapalı faz değişimleri

KNS'lerde virülans faktörleri ve infeksiyon patogenezi (3)

- Enzim ve toksin salınımı
 - Metalloproteaz: Elastaz aktivitesi
 - Lipazlar: Deri kolonizasyonu
 - Sistin proteaz: Albümin, fibrinojen, fibronektin, IgM ve IgA'nın parçalanması
 - Serin proteaz
 - δ hemolizin: *agr* gen lokusunda hld geni tarafından kodlanır
 - Nadir suşlarda EIA ile enterotoksin C (SEC) ve TŞST-1
- Bakteriyosin üretimi
- Konakta demir alımını sağlayan sistemler

Virülans faktörlerinin düzenlenmesi

- *Fur* ve *DtxR* benzeri proteinler
 - Fur DNA'ya bağlanan baskılayıcı bir protein ve biyosentezde yer alan genler ile siderofor transport proteinlerinin genlerini kontrol eder
 - *S. epidermidis*'te SirR olarak adlandırılan, geni *sitABC* operonu üstünde bulunan *DtxR* benzeri protein
- *agr* ve *sar* bölgesi
 - *S. aureus*'takine çok benzeyen *agrABCD* genleri
 - *agrD* hücre dışına salınan bir sinyal peptidi kodlar
 - *agrA* yanıt düzenleyici molekül
 - *sar* gen ürünü *agr* promotor bölgesine bağlanarak RNA II ve RNA III transkripsiyonunu sağlar

Stafilokoklarda metisiline direnci saptamak için kullanılan yöntemler

- Fenotipik yöntemler
 - Oksasilin ve tuz içeren agar tarama testi (“oxacillin salt screening agar”- agar dilüsyon yöntemi)
 - Disk difüzyon veya sıvı mikrodilüsyon yöntemleri ile sefoksitin kullanılarak *mecA*'ya bağlı oksasilin direncinin saptanması
- Hızlı direnç testleri
 - Lateks aglütinasyon testleri
 - Moleküler yöntemler: Direnç genlerinin gen probları veya PZR yöntemiyle saptayan testler

Oksasilin direncini saptamak için kullanılan tarama testleri (*S. aureus* ve *S. lugdunensis*)

Testler	Oksasilin direnci	<i>mecA</i> 'ya bağlı oksa. direnci (sefoksitin)	
Metod	Agar dilüsyon	Disk dif.	Sıvı mikrodil.
Besiyeri	MH agar+%4 NaCl	MH agar	KEMHB
Antimik. kons	6 µg/mL	30 µg	4 µg/mL
İnokulum	0.5 McFarland koloni süs.	Standart disk dif.	Standart sıvı mikrodil.
İnkübasyon	33-35°C, 24 saat	33-35°C, 16-18 saat	33-35°C, 16-20 saat
Sonuçlar	> 1 koloni=direnç	≤ 21 mm= <i>mecA</i> poz. ≥ 22 mm= <i>mecA</i> neg.	> 4 µg/mL= <i>mecA</i> poz. ≤ 4 µg/mL= <i>mecA</i> neg.

MH: Mueller-Hinton, KEMHB: Katyon eklenmiş Mueller-Hinton broth

KNS'lerde sefoksitin kullanarak *mecA*'ya bağlı oksasilin direncinin saptanması

mecA'ya bağlı oksasilin direnci (sefoksitin)

Metod	Disk difüzyon
Besiyeri	Mueller-Hinton agar
Antimikrobik	30 µg sefoksitin diski
İnokulum	Standart disk difüzyon yöntemi
İnkübasyon	33-35°C, 24 saat
Sonuçlar	≤ 24 mm= <i>mecA</i> pozitif ≥ 25 mm= <i>mecA</i> negatif
Raporlama	<i>mecA</i> pozitif ise oksasiline dirençli <i>mecA</i> negatif, ancak oksasilin MİK'i dirençli (≤ 0.5 µg/mL) ise oksasiline dirençli

Hızlı testlerin üstünlükleri

- Uygun antimikrobiyal tedaviye erken dönemde başlayabilme olanağı
- Sınır noktaya yakın MİK değerlerinin daha sağlıklı yorumlanabilmesi
- Direnç genlerinin doğrudan klinik materyalde saptanabilmesi
- Olası salgınların erken dönemde saptanması

Duyarlılık testlerinin karşılaştırılması

Test	Duyarlılık %	Özgüllük %
Agar difüzyon	97	100
Agar dilüsyon	97	95
Oksasilin agar tarama testi	100	100
MRSA lateks aglütinasyon testi	100	100

Soloaga et al. Rev Argent Microbiol 2004; 36 (1): 36-40.

MRSA lateks aglütinasyon testi

	<u>Duyarlılık %</u>	<u>Özgüllük %</u>
Van Griethuysen A, et al. J Clin Microbiol 1999; 37(9): 2789-92.	98.5	100
Cavassini M, et al. J Clin Microbiol 1999; 37(5):1591-4.	100	99.2
Louie L, et al. J Clin Microbiol 2000; 38 (6): 2170-3.	98.5	100

Direncin saptanmasında PZR testleri (1)

- “Multiplex” PZR: *mecA*, *gyrA*, *nuc*, 16S rRNAs, *fem* genlerinin saptanması
- “Quadriplex” PZR yöntemiyle 16S rRNA, *nuc*, *mecA*, *mupA* genlerini saptayarak metisiline ve mupirosine direncin belirlenmesi, *S. aureus* ve KNS ayrımı



Duyarlılık ve özgüllük %100

Direncin saptanmasında PZR testleri (2)

- 439 rektal sürüntü örneğinde *mecA* ve *femB* genlerinin PZR yöntemiyle araştırılması ve konvansiyonel yöntemle karşılaştırılması



Her iki yöntemle de 36 MRSA pozitif örnek

Kitagawa Y, et al. Ann Surg 1996; 224 (5): 665-71.

- Gerçek zamanlı PZR yöntemi klasik PZR yöntemine göre daha hızlı sonuç verir ve kontaminasyon riski daha azdır

Shrestha NK, et al. J Clin Microbiol 2002; 40: 2659-61.

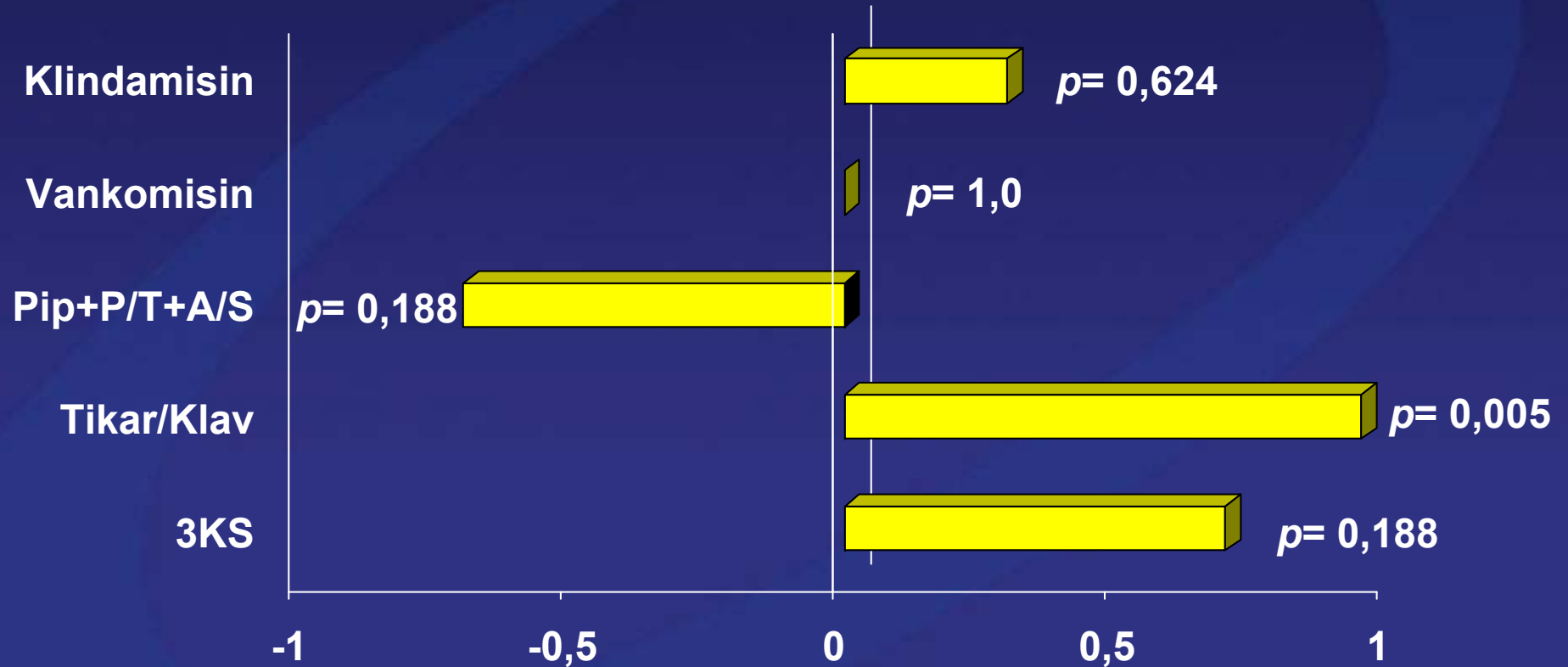
ENTEROKOKLAR





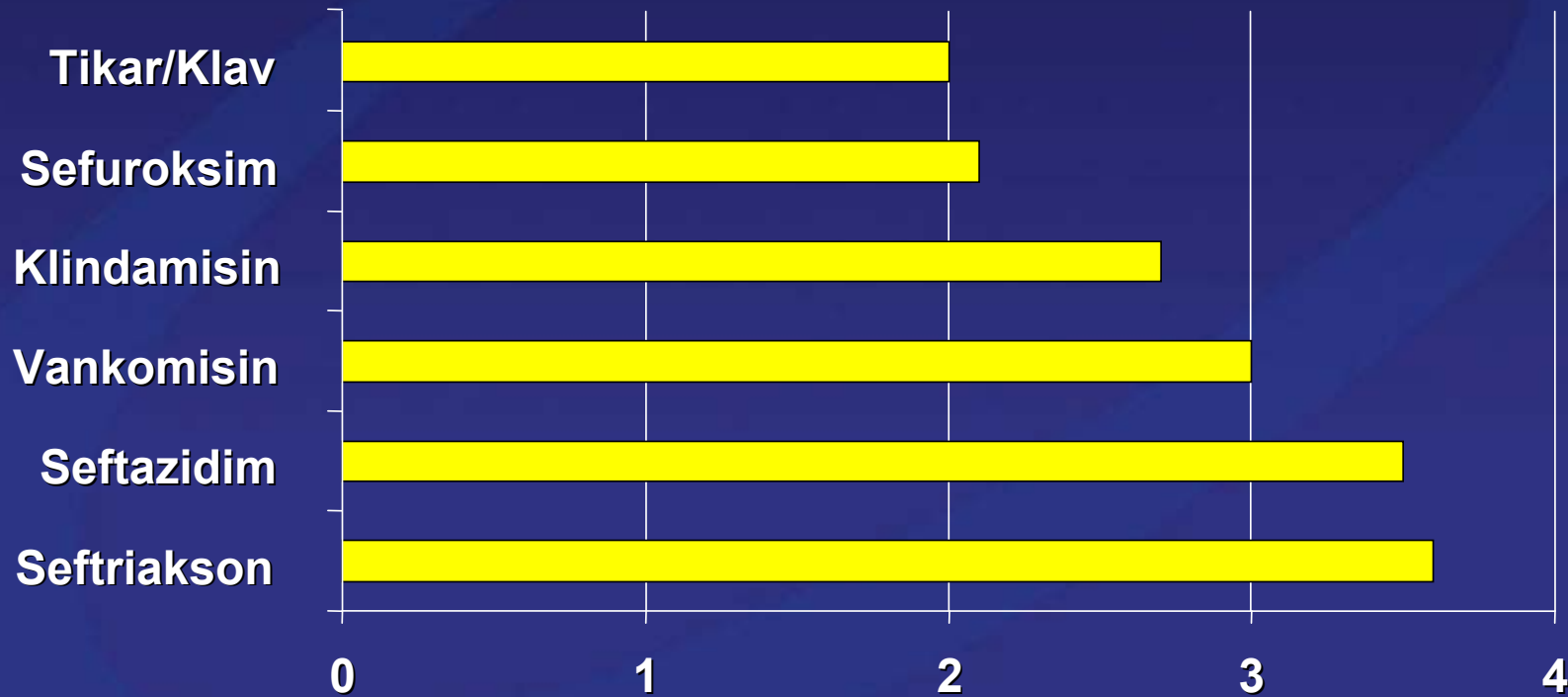
Antibiyotik kullanımı ve VRE kolonizasyonu arasındaki ilişki

Korelasyon katsayısı



Antibiyotik kullanımı ve VRE kolonizasyonu arasındaki ilişki

VRE kolonizasyonu için rölatif risk



Tokars JI , et al. Infect Control Hosp Epidemiol 1999; 20: 171-5.

Enterokoklarda direnç sorunu (1)

Doğal direnç

- Beta-laktamlar (düşük düzey)
- Aminoglikozidler(düşük düzey)
- Linkozamidler (düşük düzey)
- TMP-SMX (in vivo)
- Kinupristin/dalfopristin (*E. faecalis*)
- Kinolonlar
- Klindamisin

Enterokoklarda direnç sorunu (2)

Kazanılmış direnç

- Beta-laktamlar (yüksek düzey)
- Aminoglikozidler (yüksek düzey)
- Linkozamidler (yüksek düzey)
- Makrolidler
- Tetrasiklinler
- Rifampisin
- Kinolonlar
- Vankomisin
- Linezolid
- Kinupristin/dalfopristin



Enterokoklarda glikopeptid antibiyotiklere direnç (1)

Özellik	VanA	VanB	VanC
Vankomisin	64-≥1024	4->1024	2-32
Teikoplanin	16-512	0.25-2	0.12-2
Genin kaynağı	Edinsel	Edinsel	İntrensek
Genin yeri	<i>Tn1546</i> <i>Tn5482</i>	<i>Tn1547</i> <i>Tn5382</i>	Kromozom
Peptidoglikan prek.	Laktat	Laktat	Serin
Transfer edebilme	Evet	Evet	Hayır
İndüklenebilme			İndüklenebilir
Vankomisin	+	+	ve konstitütif
Teikoplanin	+	-	
Mikroorganizma	<i>E.faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. durans</i> <i>E. raffinosus</i>	<i>E.faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i>

Enterokoklarda glikopeptid antibiyotiklere direnç (2)

Özellik	VanD	VanE	VanG
Vankomisin	16-256	16	16
Teikoplanin	2-64	0.5	0.5
Genin kaynağı	Edinsel	Edinsel	?
Genin yeri	Kromozom	Kromozom	?
Peptidoglikan prek.	Laktat	Serin	Serin
Transfer edebilme	Hayır	Hayır	?
İndüklenebilme	Konstitütif	İndüklenebilir	?
Mikroorganizma	<i>E.faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>

Dünyada VRE

- İlk VRE 1988 yılında İngiltere ve Fransa'da*
- Dünyada yaygın
- ABD'de
 - Bir merkezde 1990'da ilk VRE izolasyonundan iki yıl sonra *E. faecium* suşlarının %53' ü VR**
 - Nozokomiyal infeksiyonlardan soyutlanma
1989 (%0.3) —————> 1993 (%11.4)***
1999' da suşların %17' si VRE****

* Uttley AHC, et al. *Lancet* 1988; 1:5 7-8.

* Leclerg R, et al. *N Eng J Med* 1988; 319: 157-61.

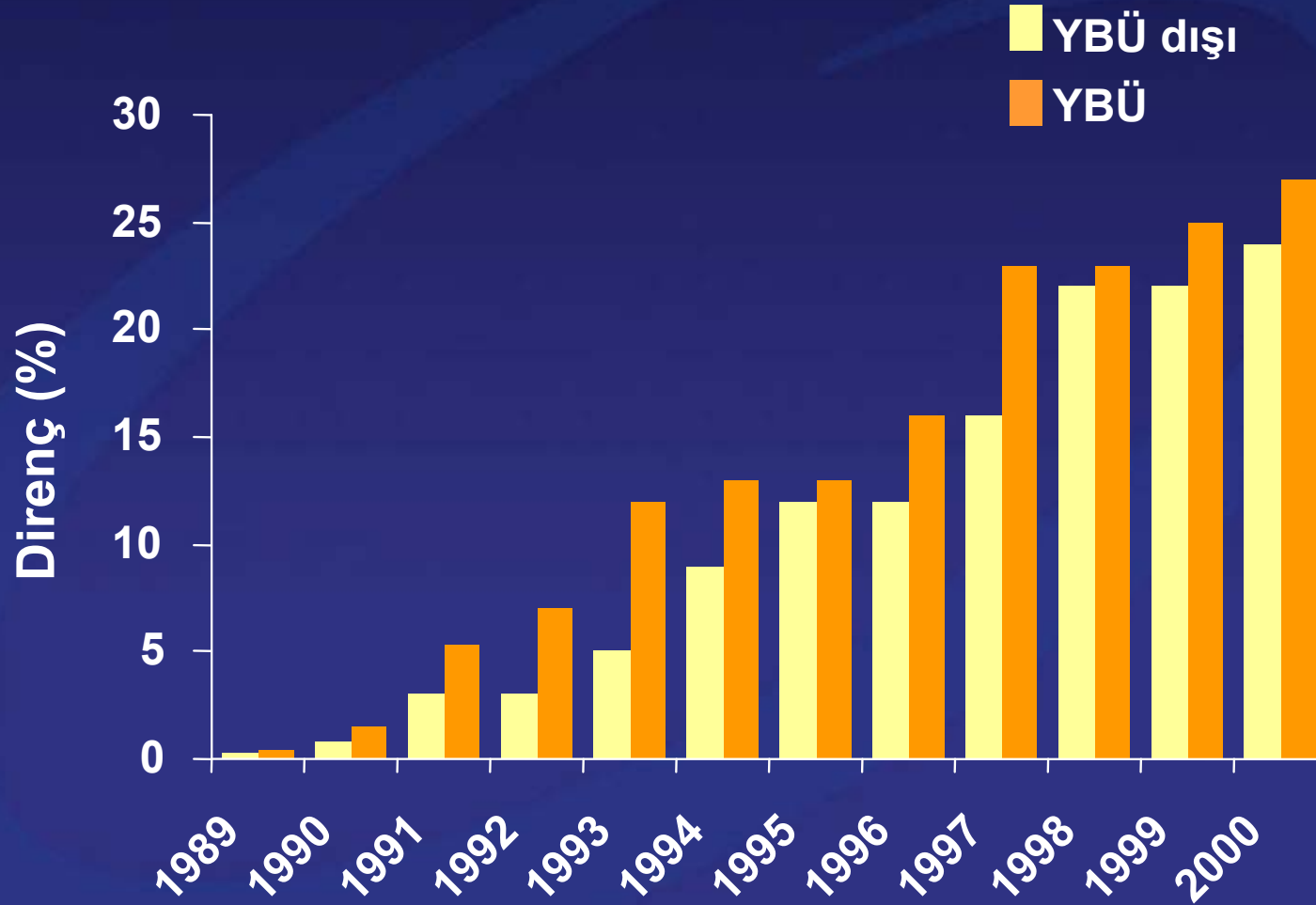
** Mato R, et al. *Microbiol Drug Res* 1996; 2: 309-17.

*** CDC. *MMWR* 1993; 42:5 97-9.

**** Low DE, et al. *CID* 2001 32 (suppl 2): S133-45.

VRE

- NNIS, 1992-2004



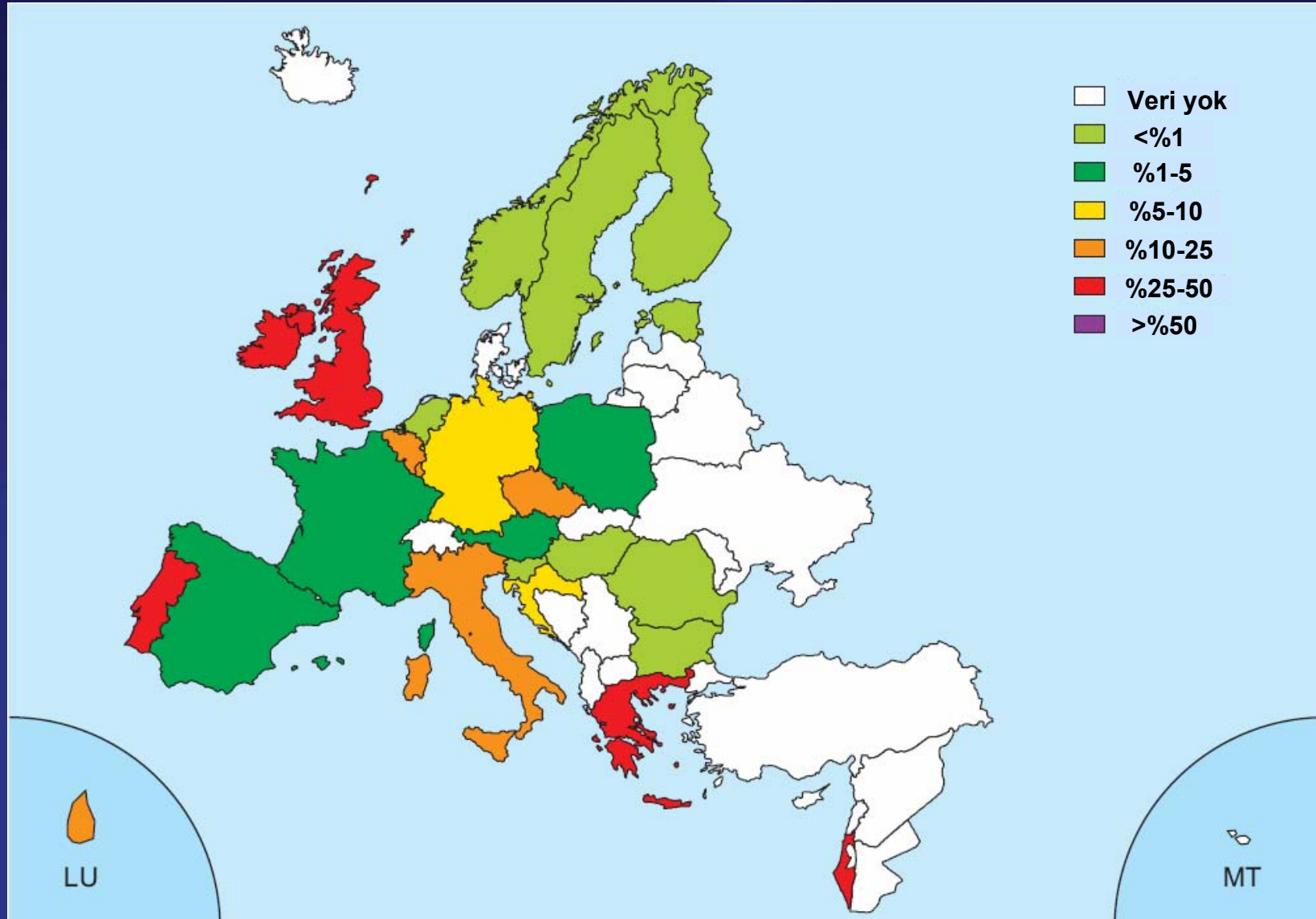
NNIS. Am J Infect Control 2004; 32 (8): 470-85.

Zaman içinde VRE artışı

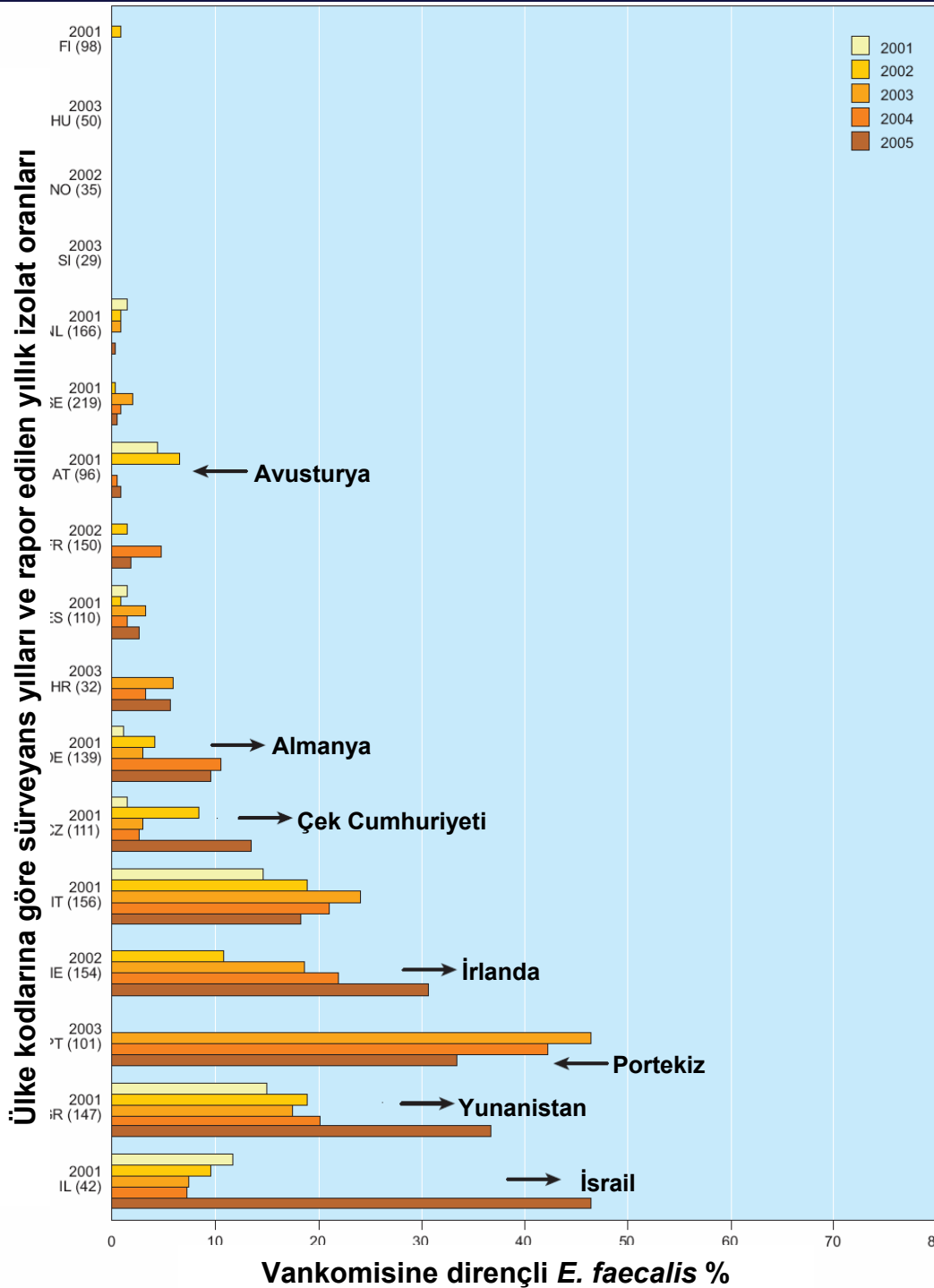


*Salgado CD, et al. Infect Med. 2003; 20: 194-200.
NNIS. Am J Infect Control 1999;27: 520-32.
NNIS. Am J Infect Control 2004; 32: 470-85.*

Avrupa'da vankomisine dirençli invazif *E. faecium* izolatlarının oranı (2005)



EARSS, October 2006.



Avrupa ülkelerinde 2001-2005 yılları arasında vankomisine dirençli *E. faecium* suşları

EARSS, October 2006.

Türkiye'de VRE epidemiyolojisi

- İlk VRE olgusu 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi Hastanesi'nden bildirildi*

Yıl	Tür	Fenotip	Klinik özellik	Araştırmacılar
1999	E. faecium		Klinik örnek (n:111)	Torun MM ve ark.
1999	Enterococcus spp (n:8)		Yenidoğanlarda	Yüce A ve ark.
2000	E. faecium	VanA	Kan kültürü	Başustaoğlu ve ark
2000	E. faecium	VanA	Pü	Başustaoğlu ve ark
2000	Enterococcus spp (n:5)		Sürveyans (n:244)	Ceryan N ve ark.
2001	E. faecium (n:3)	VanA (n:1)	Kan kültürü	Arda B ve ark.
2002	E. faecium (n:5)	VanA	Sürveyans (n:1020)	Çetinkaya ve ark.

* Vural T ve ark. ANKEM Derg 1999; 13:1-4.

Enterokoklarda direnç: Kocaeli

- 107 Nozokomiyal izolat
 - %73 *E. faecalis*
 - %25 *E. faecium*

	%				
	Amp	Pen	GenYD	StreYD	Vanko
<i>E. faecalis</i>	4	10	13	22	0
<i>E. faecium</i>	78	74	41	67	0

Meriç M ve ark. ANKEM Dergisi 2004; 18.

Enterokoklarda direnç: Manisa

- 123 klinik izolat (nozokomiyal)

	% -----		
	Gentamisin (YD)	Teikoplanin	Vankomisin
<i>E. faecalis</i>	21	0	0
<i>E. faecium</i>	23	0	0

Gazi H ve ark. ANKEM Dergisi 2004; 18.

VRE kolonizasyon araştırması

	Perirektal örnek sayısı	İzole edilen suş (%)
2004	431	6 (1.4)
2007		
Eriřkin YBÜ	385	0
Pediatri YBÜ	221	1 (0.5)

EÜTF, İKK Sürveys verileri.

Enterokoklarda virülans faktörleri ve infeksiyon patogenezi

- Sitolizin
- Agregasyon faktörü
- Jelatinaz
- Ekstraselüler süperoksit
- Ekstraselüler yüzey proteini (Esp)
- Kapsüler polisakkarit antijen

Virülans faktörlerinin düzenlenmesi

- *esp* genleri: Esp proteini
- *fsr* lokusu: Serin proteaz, jelatinaz ve biyofilm yapımı
- Biyofilm oluşumundan sorumlu diğer fokuslar: *bob*, *bee* (transfer edilebilir), *sagA*-like genler (*saA*, *saB*)
- Regülatör genler: *ace*, *fsr*, *croRS*, *prf*-like regülatör

Yalnızca direnç genleri değil virülans genleri de horizontal gen transferi yoluyla yayılabilir!

Enterokoklarda tarama testi ile vankomisin direncinin saptanması

Vankomisin direnci

Metod

Agar dilüsyon

Besiyeri

“Brain Heart” infüzyon

Antimik. kons

Vankomisin 6 µg/mL

İnokulum

Agar yüzeyine 0.5 McFarland süspansiyonundan 1-10 µL damlatma

İnkübasyon

35±2 °C, 24 saat

Sonuçlar

> 1 koloni= direnç

Direncin saptanmasında PZR testleri

- Rektal sürüntü örneklerinde özgüllük yüksek, duyarlılık düşük
- “Multiplex” PZR ile 657 numunede vanA ve vanB genlerinin araştırılması ve konvansiyonel yöntemle karşılaştırılması sonucu özgüllük %99.8, duyarlılık %95.4



- VRE saptama süresi PZR yöntemi 48 saat, konvansiyonel yöntemde 96 saat

Jayarathne P, Rutherford CJ. Clin Microbiol 1999; 37(6): 2090-2.

- Direkt kültürde “real time” PZR ile sonuç elde edilmesi 1.5 saat, konvansiyonel PZR ile 5.5 saat

Palladino S, et al. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 45(1): 81-4.

SONUÇ ve ÇÖZÜM

- Gram pozitif koklarda antimikrobiyal direnç önemli bir sorun
- Ülkemizde direnç oranları bölgeden bölgeye değişmekte
 - Ulusal sürveyans
 - Yerel seviyede sürveyans
- İzolasyon, doğru tanımlama, standart yöntemlerle duyarlılık testi
- Kolonizasyon, bulaş yolları, risk faktörleri bilinmeli
- Kontrol ve korunma için EVRENSEL önlemler uygulanmalı

