

# Diyabetik ayak infeksiyonları ve dışı infeksiyonlardan izole edilmiş *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında virulans genlerinin karşılaştırılması - Çalışma ön verileri

M. Bülent ERTUĞRUL<sup>1</sup>, Erman Oryaşın<sup>2</sup>, Benjamin A. Lipsky<sup>3</sup>, Bülent Bozdağın<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın

<sup>2</sup>Adnan Menderes Üniversitesi REDPROM Araştırma Merkezi, Aydın

<sup>3</sup>University of Washington (Emeritus), Visiting Professor of Medicine, University of Geneva, University of Oxford, Oxford, UK

- ❖ Diyabetik ayak infeksiyonları (DAİ) diyabetin en yaygın komplikasyonlarından biri olup bu hastalarda önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir
- ❖ DAİ'da etkenlerin tedaviye yanıtları antibiyotik direnç durumlarından bağımsız olarak değişebilmektedir
- ❖ DAİ'da tedavi başarısını bir çok farklı faktör etkilemektedir
- ❖ Yakın zamanda yapılan çalışmada dirençli etkenler ile oluşan DAİ'da uygun antibiyotik verilse bile tedavi başarısızlığı ve majör amputasyon oranları duyarlı etkenlere göre daha fazadır
- ❖ Bu durum etkenlerin virülans faktörlerinin de tedaviye yanıtı etkileyebileceğini düşündürmektedir
- ❖ Bu çalışmanın amacı diyabetli ayaklardan izole edilmiş *P. aeruginosa* örneklerindeki virülans genlerinin PCR yoluyla araştırılmasıdır

# Gereç ve Yöntem

- ❖ Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesinde diyabetik ayak infeksiyonu ve dışı infeksiyon nedeniyle yatmakta olan hastaların klinik örneklerinden izole edilen *P. aeruginosa* izolatları çalışmaya alınmıştır.
- ❖ Bu izolatlarda toplam 23 adet *lasI, lasR, lasA, lasB, rhII, rhIR, rhIAB, aprA, fliC, toxA, plcH, plcN, ExoS, ExoT, ExoU, ExoY, phzI, phzII, phzM, phzS, pvdA, pilA, pilB* virülans geni araştırılmıştır
- ❖ Çalışma spesifik primerler kullanılarak konvensiyonel PCR yoluyla yapılmıştır
- ❖ İzolatlardan DNA ekstraksiyonu Instagene Matrix DNA izolasyon Kiti (Bio-Rad®) kullanılarak gerçekleştirilmiştir
- ❖ PCR amplifikasyonu sonrası %1.5 agaroz jelde spesifik bant büyüklüklerine göre izolatlardaki virülans gen varlığı değerlendirilmiştir
- ❖ Etkenlerin klonalite incelemesi amacıyla multilokus sekans tiplemesi yapıldı

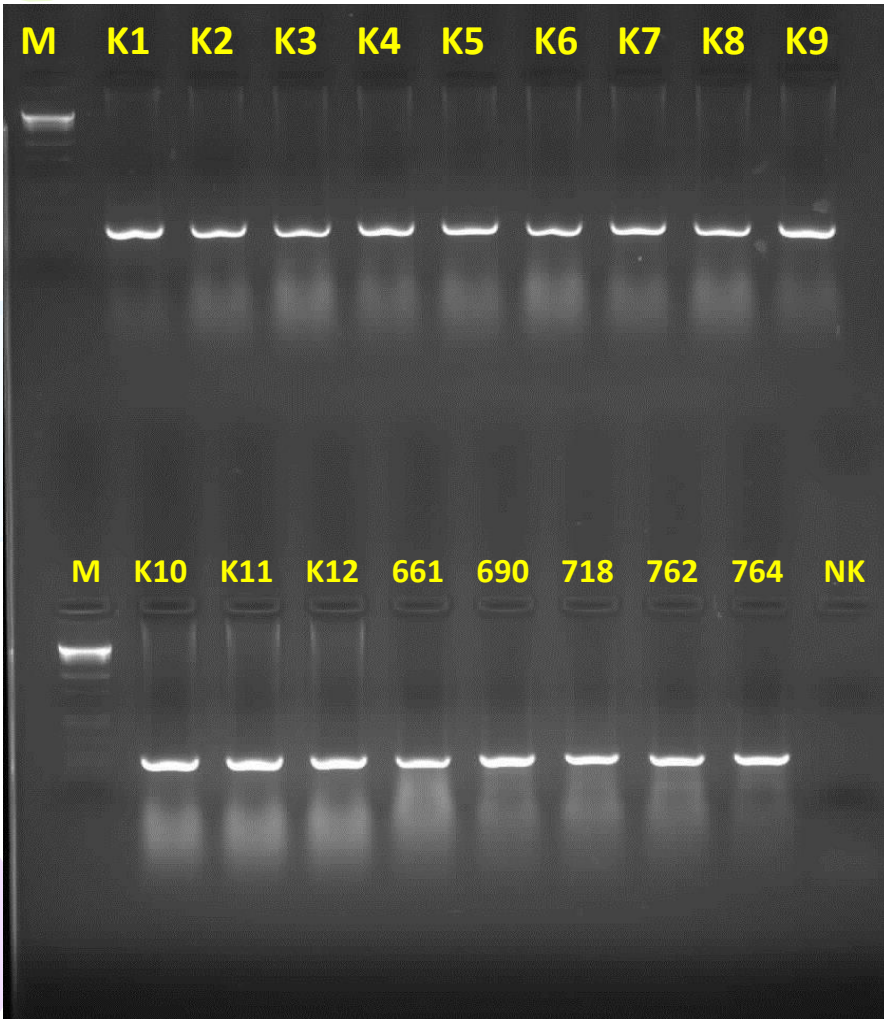
# Çalışmada Kullanılan Virülans genler

**lasA:** Protease  
**lasB:** Elastase  
**toxA:** Exotoxin  
**plcH:** hemolytic phospholipase  
**plcN:** non-hemolytic phospholipase C  
**ExoS:** exoenzyme S  
**ExoY:** exopolysaccharide production protein; adenylatecyclase  
**ExoU:** phospholipase  
**ExoT:** exoenzyme T; transport protein  
**lasI:** acyl-homoserine-lactone synthase

**lasR:** transcriptional regulator  
**rhII:** acyl-homoserine-lactone synthase  
**rhIR:** transcriptional regulator  
**rhIAB:** rhamnosyltransferase  
**aprA:** alkaline metalloproteinase  
**fliC:** flagellar filament structural protein (flagellin)  
**phzM:** phenazine-specific methyltransferase  
**pvdA:** L-ornithine N5-oxygenase  
**pilA:** fimbrial protein  
**pilB:** fimbrial biogenesis protein


# Bulgular

- ❖ Çalışmaya 16 diyabetik ayak infeksiyonu ve 5 diyabetik ayak infeksiyonu dışı infeksiyon nedeniyle yatmakta olan hastaların klinik örneklerinden izole edilen toplam 21 adet *P. aeruginosa* izolatu alınmıştır.
- ❖ Multilokus sekans tiplemesi analizinde suşların birbirleriyle benzer klonlardan olmadıkları saptandı.
- ❖ İzolatların tamamının *lasI*, *lasR*, *lasB*, *rhlI*, *rhlR*, *rhlAB* ve *ExoT* virülans genlerine ortak olarak sahip oldukları, *aprA* ve *pilB* virülans genlerini ise hiç içermedikleri tespit edilmiştir.
- ❖ *ToxA* geni diyabetik ayak infeksiyonundan izole edilen 16 suшта pozitif, diyabetik ayak infeksiyonu dışı 5 örnekte ise negatif bulunmuştur.



M-Marker

NK-Negatif Kontrol



Virülans faktörü	DAİ etkeni (n:16) Pozitif suş sayısı	DAİ dışı etken (n:5) Pozitif suş sayısı
las I	16	5
las R	16	5
las A	10	5
las B	16	5
rhl I	16	5
rhl R	16	5
rhl AB	16	5
apr A	0	0
fli C	10	0
tox A	16	0
plc H	5	5
plc N	14	5
exo S	9	5
exo T	16	5
exo U	7	0
exo Y	15	5
phz I	15	0
phzI I	8	0
phz M	15	0
phz S	7	0
pvd A	4	2
pil A	1	2
pil B	0	0

# Tartışma

- ❖ Ülkemizde ve ılıman iklim ülkelerinde DAI'larında *P.aeruginosa* en sık etken olarak karşımıza çıkar.
- ❖ Ancak son yıllarda Gram pozitif etkenlerin oranında artış dikkati çekmektedir.

Hatipoglu M, et al. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis* 2014 ;33:871 - 8  
Ertugrul BM, et al. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012, 31:2345-52



Mikroorganizma Adı	Yumuşak Doku	Kemik Doku
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23	14
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	13
Metisiline duyarlı	3	3
Metisiline dirençli	11	10
<i>Acinetobacter spp.</i>	8	5
Enterokok	4	2
Koagulaz-negatif stafilokok	5	5
Metisiline duyarlı	2	2
Metisiline dirençli	3	3
<i>Streptococcus spp.</i>	4	3
Nonhemolitik	1	2
Alfa Hemolitik	1	-
Beta Hemolitik	2	1
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1
<i>Puroteus vulgaris</i>	1	1
<i>Escherichia coli</i>	2	1
<i>Enterobacter spp.</i>	2	-
Peptostreptokok	3	1
<i>Serratia marsences</i>	1	1
<i>Candida spp.</i>	1	-
<b>Toplam</b>	<b>69</b>	<b>47</b>

Etken	N (%)	
<b>Gram pozitif</b>	<b>55 (47,8)</b>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	16 (13,9)	
Metisilin dirençli		8
Çoklu ilaç dirençli		2
Koagülaz-negatif <i>staphylococcus</i>	8 (6,9)	
Metisilin dirençli		3
<i>Streptococcus</i> spp.	17 (14,8)	
<i>Enterococcus</i> spp.	14 (12,2)	
Beta-laktam dirençli		1
<b>Gram negatif</b>	<b>55 (47,8)</b>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21(18,4)	
İBL pozitif		8
<i>Escherichia coli</i>	9 (7,8)	
GSBL pozitif		4
Çoklu ilaç dirençli		1
<i>Proteus</i> spp.	8 (6,9)	
GSBL pozitif		1
<i>Morganella</i> spp.	8 (6,9)	
Çoklu ilaç dirençli		3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3 (2,6)	
GSBL pozitif		2
<i>Acinetobacter</i> spp.	3 (2,6)	
Çoklu ilaç dirençli		3
<i>Enterobacter</i> spp.	3 (2,6)	
GSBL pozitif		2
<b>Diğer</b>	<b>5 (4,4)</b>	
<b>Toplam</b>	<b>115 (100)</b>	
<b>Toplam dirençli bakteri</b>		<b>38 (33)</b>


# Diyabetik Ayak İnfeksiyonu Etkenlerinin Yıllara Göre Dağılımları

Yıllar	2000-2004	2005-2009	2010-2014	P	2000-2014
Hasta Sayısı	(n=207)	(n=442)	(n=1023)		(n=1702)
<b>Toplam Gram pozitifler</b>	<b>139 (40,5 %)</b>	<b>227 (50,4 %)</b>	<b>460 (47,4 %)</b>	<b>0,102</b>	<b>826 (46,8 %)</b>
<i>S.aureus</i>	101 (%29,4)	130 (%28,9)	173 (17,8)	<0,001	404
Koagülaz negatif stafilokoklar	6 (%1,7)	36 (%8)	101 (%10,4)	<0,001	143
<i>Enterococcus</i> spp.	5 (%1,5)	25 (%5,6)	87 (%9)	<0,001	114
<i>Streptococcus</i> spp.	15 (%4,4)	30 (%6,7)	65 (%6,7)	0,175	103
Diğer Gram pozitifler	12 (%3,5)	6 (%1,3)	9 (%0,9)	0,002	27
<b>Toplam Gram negatifler</b>	<b>204 (59,5 %)</b>	<b>219 (48,7 %)</b>	<b>505 (52 %)</b>	<b>0,075</b>	<b>928 (52,6 %)</b>
<i>Pseudomonas</i> spp.	67 (%19,5)	75(%16,7)	150(%15,4)	0,088	292
<i>E.coli</i>	59(%17,2)	55(%12,2)	111(%11,4)	0,011	225
<i>Proteus</i> spp.	15(%4,4)	22(%4,9)	47(%4,8)	0,766	84
<i>Klebsiella</i> spp.	15(%4,4)	14(%3,1)	62(%6,4)	0,046	91
<i>Acinetobacter</i> spp.	10(%2,9)	23(%5,1)	20(%2,1)	0,116	53
<i>Enterobacter</i> spp.	14(%4,1)	13(%2,9)	45(%4,6)	0,412	72
<i>Citrobacter</i> spp	0	1(%0,2)	7(%0,7)	0,61	8
<i>Morganella</i> spp	0	5(%1,1)	23(%2,4)	0,002	28
<i>S. maltophilia</i>	0	2(%0,4)	1(%0,1)	0,96	3
Diğer Gram negatifler (anaeroblar dahil)	18(%5,2)	3(%0,7)	39(%4)	0,952	60
<i>Candida</i> spp.	0	4 (0,9 %)	6 (0,6 %)	0,325	10 (0,6 %)
<b>Toplam mikroorganizma</b>	<b>343</b>	<b>450</b>	<b>971</b>		<b>1764</b>

Ertugrul BM, ve ark. 17. Klimik Kongresi 2015, Poster bildiri

# Diyabetik Ayak İnfeksiyonu Etkenlerinin Yıllara Göre Dağılımları

Yıllar	2000-2004	2005-2009	2010-2014	P	2000-2014
Hasta Sayısı	(n=207)	(n=442)	(n=1023)		(n=1702)
<b>Toplam Gram pozitifler</b>	<b>139 (40,5 %)</b>	<b>227 (50,4 %)</b>	<b>460 (47,4 %)</b>	<b>0,102</b>	<b>826 (46,8 %)</b>
<i>S.aureus</i>	101 (%29,4)	130 (%28,9)	173 (17,8)	<0,001	404
Koagülaz negatif stafilokoklar	6 (%1,7)	36 (%8)	101 (%10,4)	<0,001	143
<i>Enterococcus</i> spp.	5 (%1,5)	25 (%5,6)	87 (%9)	<0,001	114
<i>Streptococcus</i> spp.	15 (%4,4)	30 (%6,7)	65 (%6,7)	0,175	103
Diğer Gram pozitifler	12 (%3,5)	6 (%1,3)	9 (%0,9)	0,002	27
<b>Toplam Gram negatifler</b>	<b>204 (52,50%)</b>	<b>219 (49,60%)</b>	<b>505 (52,0%)</b>	<b>0,075</b>	<b>928 (52,61%)</b>
<i>Pseudomonas</i> spp.	67 (%19,5)	75 (%16,7)	150 (%15,4)	0,088	292 (%16,5)
<i>E.coli</i>	59 (%17,2)	55 (%12,2)	111 (%11,4)	0,011	225
<b>Toplam mikroorganizma</b>	<b>343</b>	<b>450</b>	<b>971</b>		<b>1764</b>
<i>Proteus</i> spp.	15 (%4,4)	22 (%4,9)	47 (%4,8)	0,766	84
<i>Klebsiella</i> spp.	15 (%4,4)	14 (%3,1)	62 (%6,4)	0,046	91
<i>Acinetobacter</i> spp.	10 (%2,9)	23 (%5,1)	20 (%2,1)	0,116	53
<i>Enterobacter</i> spp.	14 (%4,1)	13 (%2,9)	45 (%4,6)	0,412	72
<i>Citrobacter</i> spp	0	1 (%0,2)	7 (%0,7)	0,61	8
<i>Morganella</i> spp	0	5 (%1,1)	23 (%2,4)	0,002	28
<i>S. maltophilia</i>	0	2 (%0,4)	1 (%0,1)	0,96	3
Diğer Gram negatifler (anaeroblar dahil)	18 (%5,2)	3 (%0,7)	39 (%4)	0,952	60
<i>Candida</i> spp.	0	4 (0,9 %)	6 (0,6 %)	0,325	10 (0,6 %)
<b>Toplam mikroorganizma</b>	<b>343</b>	<b>450</b>	<b>971</b>		<b>1764</b>

- 
- ❖ *P.aeruginosa*'ya bağlı infeksiyonların tedavisi çoğu kez etkenin farklı direnç profiline sahip olmasına bağlı olarak güç ve yüksek maliyetlidir.
  - ❖ Dirençli mikroorganizmalarla ortaya çıkan DAI'larında amputasyon oranları ve tedavi başarısızlığı duyarlı etkenlerle ortaya çıkanlara göre daha yüksektir.

Ertugrul BM, et al *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012, 31:2345-2352

- ❖ Virulans faktörleri *P. aeruginosa* infeksiyonlarında önemlidir.

❖ Diyabetik ayak infeksiyonu izolatlarının hepsinin *toxA* geni içerdiği ve sitotoksik bu toksini ürettiği gözlenmiştir.

❖ Nekroz oluşturan bu toksinin tedaviye yanıtızs diyabetik ayak infeksiyonları patogeneğinde önemli rolü olabilir.

# Teşekkür Ederim



INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE DIABETIC FOOT

<http://www.iwgdf.org>



KLİMİK DERNEĞİ DİYABETİK AYAK İNFEKSİYONLARI  
ÇALIŞMA GRUBU

<http://www.klimik.org.tr>



<http://www.aisdf.org>