



Sağlık Bakımı İlişkili Enfeksiyonların Önlenmesi ve Kontrolünde Moleküler Yöntemlerin Rolü

Dr. Yeşim Beşli

VKVSK Amerikan Hastanesi, İstanbul

Önce Zarar Verme !

Table 3.5 Adverse event source and preventability

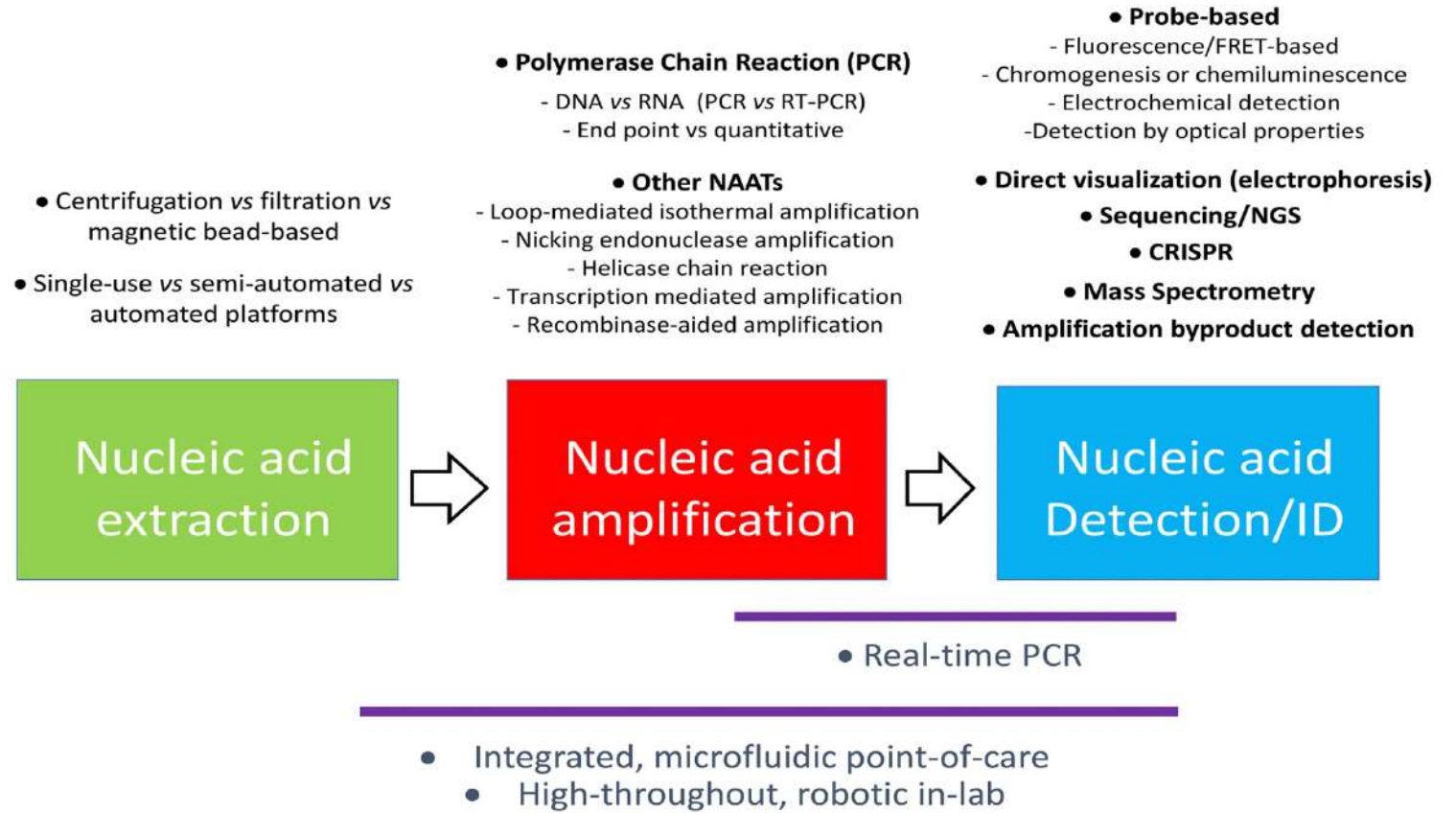
| Type | Med. | Surg. | Total | Preventable (as a share of the Total) |
|------------------------------|------------|------------|------------|---------------------------------------|
| Procedure-related | 11.2 | 37.6 | 25 | 31.7 |
| Nosocomial infection-related | 21.2 | 29.2 | 25.3 | 56.6 |
| Medication-related | 53.8 | 22.2 | 37.4 | 34.8 |
| Healthcare-related | 8.7 | 6.7 | 7.6 | 56 |
| Diagnosis-related | 2.9 | 2.9 | 2.7 | 84.2 |
| Other | 2.2 | 1.5 | 1.8 | 33.3 |
| TOTAL | 312 | 343 | 655 | 278 (42.6%) |

SOURCE: ENEAS (2006)



Enfeksiyon Etkenin Tanımlanması ve Salgının İzlemesi

- Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri
 - PCR, RT-PCR, LAMP
 - İzotermal amplifikasyon teknikleri
 - FilmArray
 - DNA Mikroarray
- Mikrofluidik Sistemler
- Biyosensör sistemler
- MALDI-TOF
- Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE)
- Multilocus Sequencing Typing (MLST)
- Pyrosequencing
- Tüm genom dizileme
- Yeni nesil dizileme



Impact of Molecular Syndromic Diagnosis of Severe Pneumonia in the Management of Critically Ill Patients

Dimitra Stafylaki^a, Sofia Maraki^a, Katerina Vaporidi^b, Dimitrios Georgopoulos^b, Dimitrios P. Kontoyiannis^d, Diamantis P. Kofteridis^c, Georgios Chamilos ^a

- Yunanistan'daki bir Üniversite Hastanesinin YBÜ
 - 2 yıllık bir süre içinde (2018–2020) pnömonili 79 hasta
 - Çalışmadan önceki yıl (2017–2018) pnömoni tanısı alan 40 kontrol
 - Her iki grupta da hastaların 2/’ü VIP
- Sendromik pnömoni panelinin uygulanması tanıya kadar geçen sürede iyileşme
- Vakaların %49'unda kültürlerinde saptanamayan patojenler, %11'de ise sadece kültürde saptanan etkenler
- Mortalite üzerinde olumsuz bir etki saptanmamış
- Önceki yıla kıyasla antibiyotik tüketiminde önemli bir azalma
- YBÜ'de MDR/XDR nozokomiyal patojenlerle ilişkili oranlarındaki pnömoni yönetiminde olumlu etki

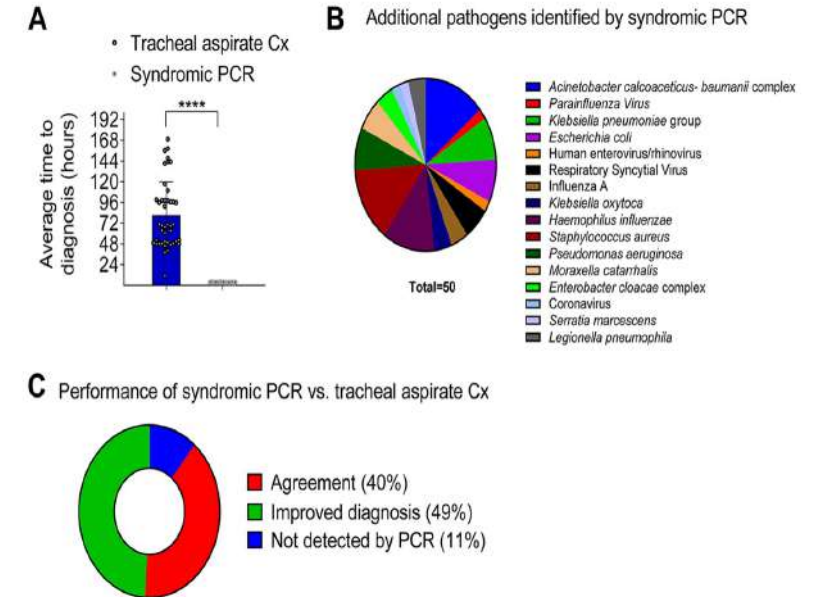


FIG 2 Comparative analysis of performance of syndromic PCR platform versus conventional culture of tracheal aspirates or BAL related to (A) time to diagnosis, (B) new pathogens identified (C) performance in diagnosis.

Özel Direnç Mekanizmalarının Belirlenmesinde Moleküler testler

| Agent | KPC-producer | NDM-producer | OXA-48-like-producer | Carbapenem-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Carbapenem-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> |
|---|--------------|--------------|----------------------|--|---|-------------------------------------|
| Aztreonam-avibactam | | | | | | |
| Cefiderocol | | | | | | |
| Ceftazidime-avibactam ¹ | | | | | | |
| Ceftolozane-tazobactam ¹ | | | | | | |
| Eravacycline ^{1,2} | | | | | | |
| Fosfomycin (intravenous) | | | | | | |
| Imipenem-relebactam ³ | | | | | | |
| Meropenem-vaborbactam ¹ | | | | | | |
| Plazomicin ^{1,4} | | | | | | |
| Polymyxin B ^{1,5} or Colistin ^{1,5} | | | | | | |
| Tigecycline ^{1,2} | | | | | | |

| Direnç geni | İlgili gen ile ilişkili enzim türü | Saptanan gen ile ilişkili enzim antibiyotik hidroliz profili | | | | Beta laktamaz inhibitörleri ile dirence neden olan enzim inibisyonu | | |
|-------------|------------------------------------|--|--|---|-----------|---|--|-----------|
| | | Penisilinler | 1. ve 2. Kuşak sefalosporinler (dar spektrulu sefalosporinler) | 3. ve 4. Kuşak sefalosporinler (geniş spektrumlu sefalosporinler) | Aztreonam | Karbapenemler | Klasik beta laktamaz inhibitörleri (klavulanik asit vb.) | Avibaktam |
| CTX-M* | ESBL | + | + | + | + | - | ± | + |
| OXA-48** | Karbapenemase | + | + | ± | - | + | - | + |
| KPC** | Karbapenemase | + | + | + | + | + | ± | + |
| NDM** | Karbapenemase | + | + | + | - | + | - | - |
| VIM** | Karbapenemase | + | + | + | - | + | - | - |
| IMP** | Karbapenemase | + | + | + | - | + | - | - |

*ESBL: Extended spectrum beta lactamase (GSBL, geniş spektrumlu beta laktamaz), 1, 2, 3., 4. kuşak sefalosporinler ve aztreonama dirençten sorumludur (sefotaksim, seftriksion, seftazidim veya sefepim bir veya bir kaçına direnç). GSBL üreten izolatlar bazen beta-laktam/ betalaktamaz-inhibitor kombinasyonlarına duyarlı çıkabilir. Bu kombinasyonların GSBL üreten bakterilere bağlı enfeksiyonlarda kullanımı yıllardır tartışma konusudur. Bazı çalışmalar uygun doz verildiğinde güvenilir olduklarını göstermektedir. Başka ESBL ilişkili direnç genleri de olduğundan, bu genin negatifliği ESBL varlığını ekarte ettirmez.

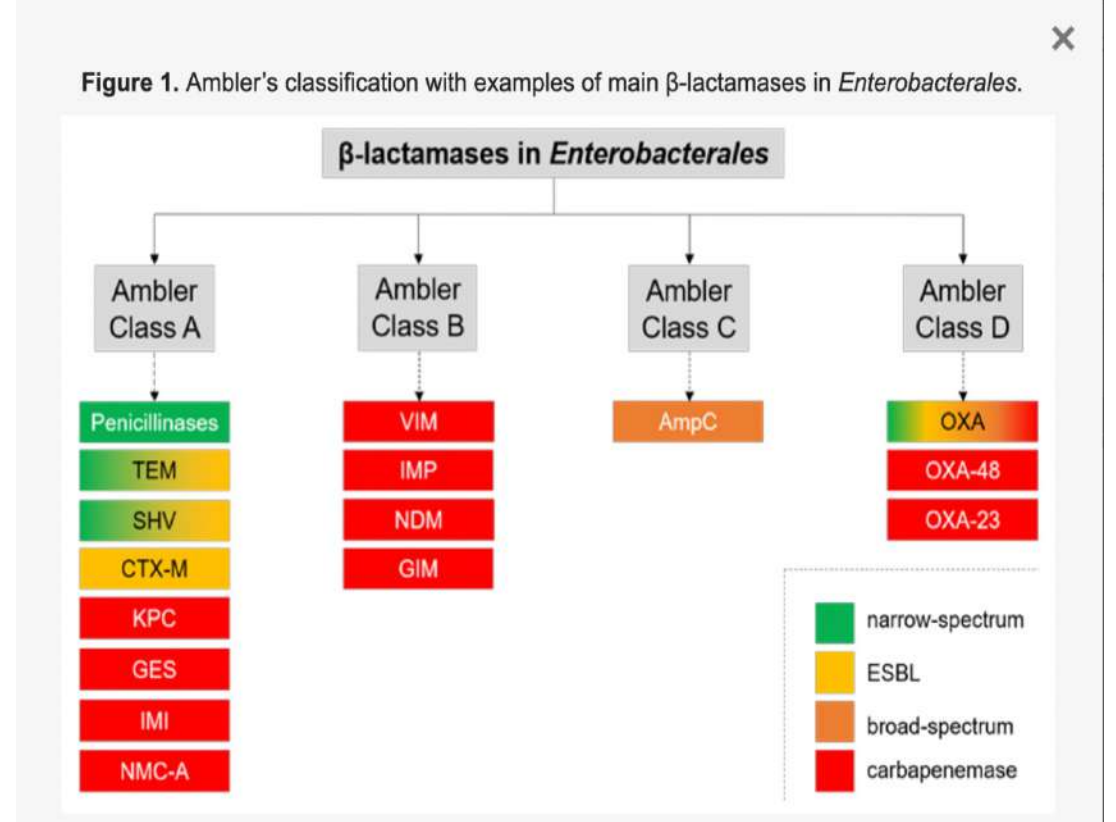
***Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* group, *Proteus spp.*, *Serratia marcescens* türlerinde saptanabilir. Bu genler dışında mekanizmalar ile de karbapenem ve geniş spektrumlu beta laktam direnci olabileceğinden bu genler için elde edilen negatif sonuç direnci ekarte ettirmez; pozitif sonuç durumunda da var olan genin ekspresyonu ve dolayısıyla fenotipe yansımaları değişikliği gösterebileceğinden her zaman esas olarak klasik antibiyogram sonucu (fenotipik duyarlılık sonucu) dikkate alınmalıdır.

| Direnç geni | İlgili gen ile ilişkili direnç özelliği | Antibiyotik direnç profili | | | | | |
|---------------------------------|---|----------------------------|--------------------------------|-----------------|---------------|-----------------------------------|--|
| | | Penisilinler | Anti-stafilokokal penisilinler | Sefalosporinler | Karbapenemler | Anti-stafilokokal sefalosporinler | Beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonları |
| mecA/mecC ve MRE ^{***} | Metsilin Direnci | + | + | + | + | - | Hayır |

***: mecA/mecC ve MRE: Stafilkoklarda metsilin direncinden sorumlu olup, *S.aureus*'da bu genin saptanması olası metsiline dirençli *S.aureus* (MRSA) izolatına işaret eder. Metsiline dirençli Stafilkok izolatları seftobiprol ve seftarolin dışında tüm beta laktam antibiyotiklere dirençlidir.

Karbapenem Dirençli Türler

- Yalnızca bilinen dizilerin tespit edilebilir
- *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* türlerinde enzimatik mekanizmalar dışındaki yollarla direnç (eflüks pompası, geçirgenlikte azalma vb)
- Plazmit türleri ve direnç prevalansının kurumsal açıdan bilmek ve yerel antibiyogramları periyodik olarak geçirilmesi yararlıdır



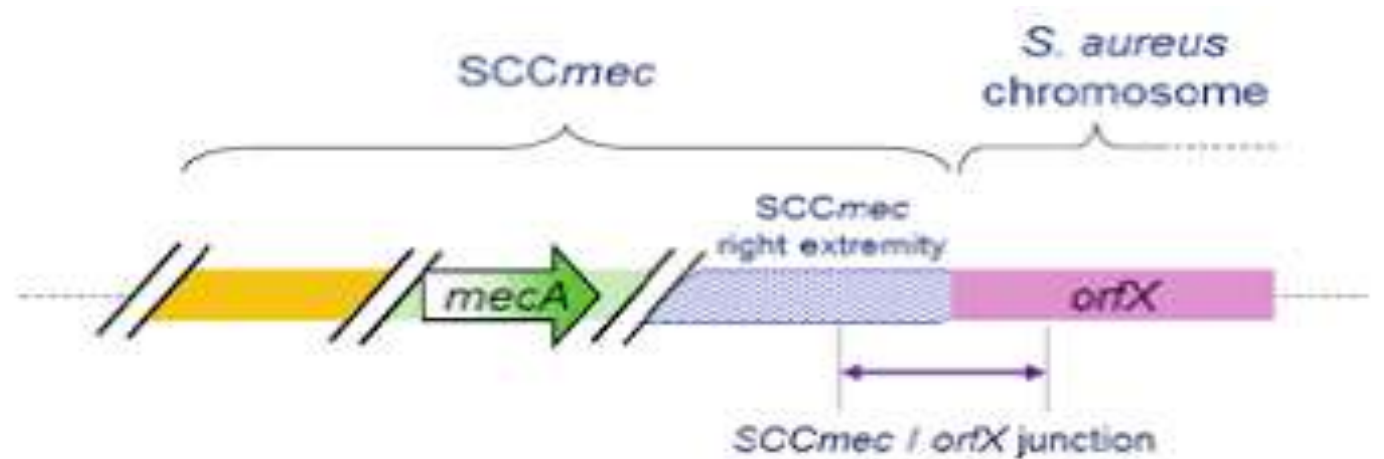
MALDI TOF - Karbapenem Direncinin Belirlenmesi

| Test | Süre | Zorluk | Hedef | Duyarlılık | Özgüllük | Numune |
|---|----------|--------|--|------------|----------|-----------------------------|
| MBT STAR-Carba IVD Kit (Bruker DALTONICS) | 30–60 dk | Orta | Karbapenemaz enzimi ile hidrolize edilen antibiyotik molekülün kütle değişiminin saptanması | 98–100 | 97–100 | Bakteri kolonisi |
| MBT STAR-Carba IVD Kit (Bruker DALTONICS) from PB | 1 sa | Orta | Karbapenemaz enzimi ile hidrolize edilen antibiyotik molekülün kütle değişiminin saptanması | 100 | 100 | Kan kültürü Vücut sıvısı |
| Direct-on-target microdroplet growth assay (DOT MGA), RUO | 4-6 sa | Orta | Çeşitli konsantrasyonlarda karbapenem varlığında bakteriyal büyümenin varlığının değerlendirilmesi | 100 | 100 | Bakteri kolonisi |
| Direct-on-target microdroplet growth assay (DOT MGA), RUO, from PBC | 4-6 sa | Orta | Çeşitli konsantrasyonlarda karbapenem varlığında bakteriyal büyümenin varlığının değerlendirilmesi | 97 | 100 | Kan kültürü Vücut sıvısı |

Metsilin Dirençli *S. aureus* (MRSA)

MRSA'nın rt-PCR ile saptanması durumunda burun sürüntüsü gibi steril olmayan bölgelerden doğrudan örneklerle uygulanması

- PCR primeri *mecA* genini tespit etmek üzere dizayn edilmiş ise
 - Kommensal KNS'lerin varlığında *mecA* genini saptanabilir ve yanlış pozitif sonuçlara neden olur
- *S. aureus* kromozomunun *mecA* geninin birleştiği bölgesi olan SCC *mec*-OrfX bağlantısına yönelik primerlerin kullanıldığında
 - KNS'lerde bulunan *mecA* geni ile ilişkili yanlış pozitiflik olmaz
 - bazı *S. aureus* izolatlarının işlevsel bir sonuçların ortaya çıkabilir



Vankomisin Dirençli *Enterococcus faecalis/faecium* (VRE)

Tablo 1. Glikopeptid dirençli enterokokların fenotipik özellikleri

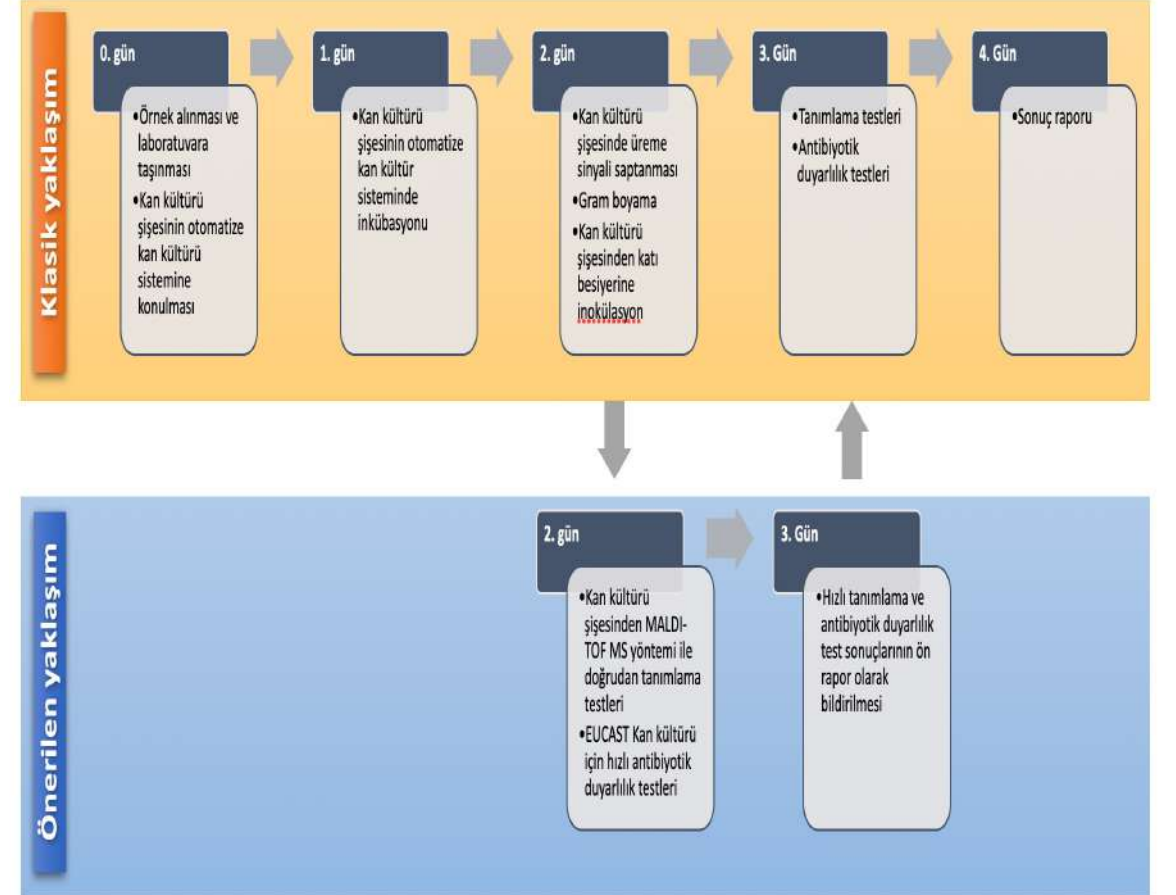
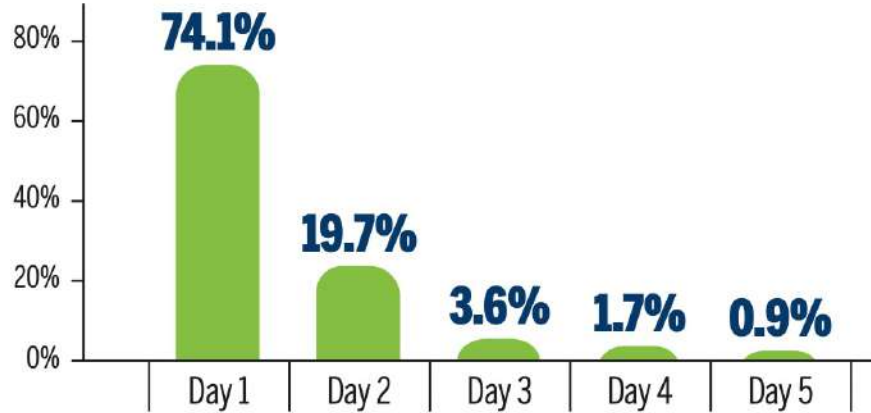
| Özellik | Fenotip | | | | |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------------|-------------------|--------------------|
| | VanA | VanB | VanC | VanD | VanE |
| Vankomisin MK (µg/mL) | 64-> 1000 | 4-1024 | 2-32 | 128 | 16 |
| Teikoplanin MK (µg/mL) | 16-512 | < 0.5 | < 0.5 | 4 | 0.5 |
| En sık görüldüğü enterokok suşları | <i>E. faecium</i> | <i>E. faecium</i> | <u><i>E. gallinarum</i></u> | <i>E. faecium</i> | <i>E. faecalis</i> |
| | <i>E. faecalis</i> | <i>E. faecalis</i> | <u><i>E. casseliflavus</i></u> | | |
| | | | <u><i>E. flavescens</i></u> | | |
| Genetik belirleyici | Kazanılmış | Kazanılmış | Intrinsik | Kazanılmış | Kazanılmış |
| Transfer edilebilir | Evet | Evet | Hayır | Hayır | Hayır |

MK: Minimum inhibitör konsantrasyon

Bakteriyal Enfeksiyon Etkenlerinin Hızlı Tanımlanması: MALDI TOF & Amplifikasyon Testleri

Figure 4: Clinically significant isolates per day³⁵

Adapted from Bourbeau PP, Foltzer M. Routine incubation of BACT/ALERT* FA and FN blood culture bottles for more than 3 days may not be necessary. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2506-2509.



Bakteriyal Enfeksiyon Etkenlerinin Hızlı Tanımlanması: MALDI TOF & Amplifikasyon Testleri

| | Pozitiflik saptanan kan kültür şişesinden hızlı tanımlama metotları | | Kültürden Bağımsız Testler (Tam kandan çalışılan moleküler testler) |
|---|---|--|--|
| | Doğrudan tanımlama, MALDI-TOF MS ile | Moleküler metotlar (PZR vb) ile tanımlama | |
| Süre | Hızlı | Hızlı | Çok hızlı |
| İş yükü | Kolay | Kolay | Özel ekipman ve eğitilmiş personel gerektirir, iş yükü fazla |
| Maliyet | Düşük | Yüksek | Çok yüksek |
| Tanımlayabildiği organizma türlerinin kapsamı | Bazı mikroorganizma türlerini tanımlamayaabilir | Kısıtlı sayıda organizma türünü tanımlayabilir | Kısıtlı sayıda organizma türünü tanımlayabilir |
| Birden çok organizma olan kültürlerin tanımlanması | Sonuç elde edilemez | - | - |
| Sonuç güvenilirliği | Doğrulama gerekebilir | Doğrulama gerekir | Doğrulama gerekmez ancak analitik duyarlılığı düşüktür. Kanda organizma DNA'sı saptanmasının klinik değeri tartışmalıdır. Sadece bazı üreticiler tarafından analitik eşik değeri belirlenmiştir. |

MALDI-TOF Hızlı Bakteriye Tanımlama

Original Article

Clinical impact of rapid bacterial identification by MALDI-TOF MS combined with the bêta-LACTA™ test on early antibiotic adaptation by an antimicrobial stewardship team in bloodstream infections

A. Mizrahi , J. Amzalag, C. Couzigou, G. Péan De Ponfilly, B. Pilmis & A. Le Monnier

Pages 668-677 | Received 09 Dec 2017, Accepted 23 Mar 2018, Published online: 02 Apr 2018

 Download citation

 <https://doi.org/10.1080/23744235.2018.1458147>

 Check for updates

- Toplam 335 kan kültürü
- MALDI-TOF MS ile hızlı tanımlama
 - 301 kan kültürü (%89,8) için doğru tanımlama
- Beta LACTA test ile antibiyotik direnci tarama
 - 141 kan kültüründe yapıldı
 - 28 (%19.9) izolat 3. KSS'lere dirençli
- 73 atak (%21,8) için erken antibiyotik tedavisi
- Yirmi bir hastaya (%75) birinci basamak tedavi
- Antimikrobiyal duyarlılık testi ile antibiyotik tedavisi adaptasyonu 28,1 saat daha erken
- Enfeksiyon kontrol önlemleri 35 saat daha erken

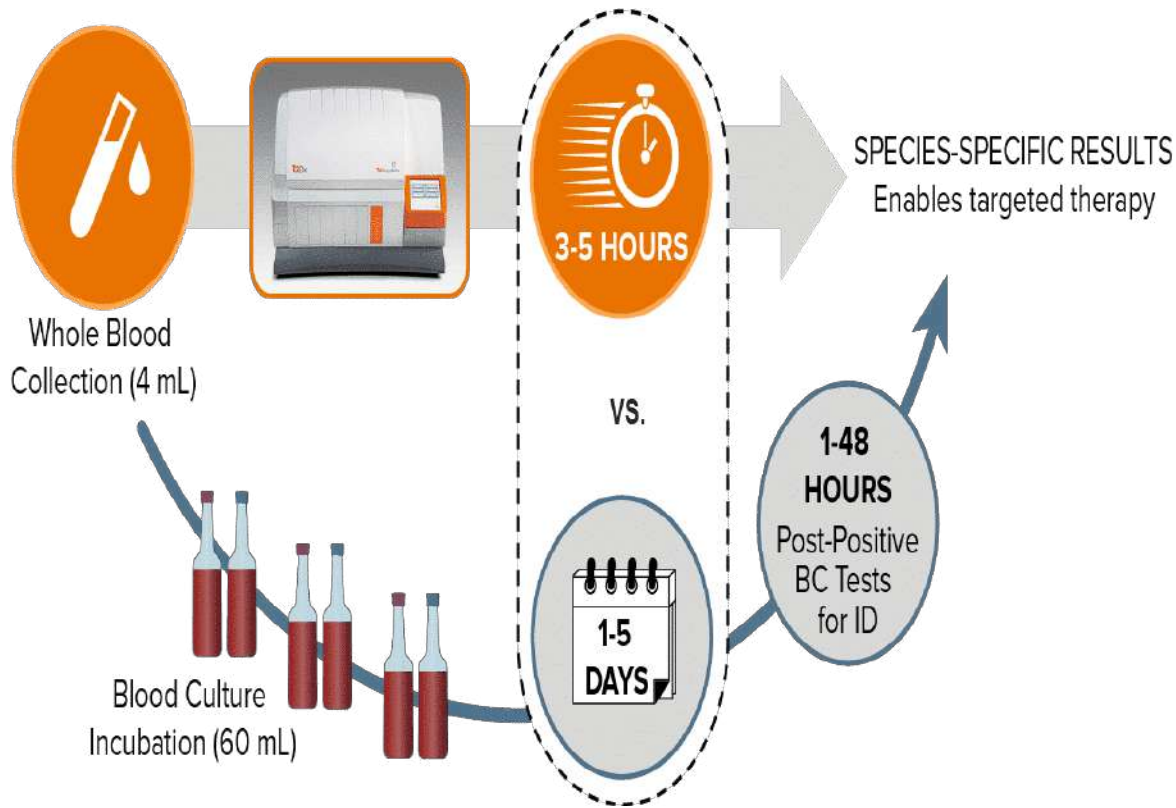
MALDI TOF - Karbapenem Direncinin Belirlenmesi

| Test | Süre | Zorluk | Hedef | Duyarlılık | Özgüllük | Numune |
|---|----------|--------|--|------------|----------|-----------------------------|
| MBT STAR-Carba IVD Kit (Bruker DALTONICS) | 30–60 dk | Orta | Karbapenemaz enzimi ile hidrolize edilen antibiyotik molekülün kütle değişiminin saptanması | 98–100 | 97–100 | Bakteri kolonisi |
| MBT STAR-Carba IVD Kit (Bruker DALTONICS) from PB | 1 sa | Orta | Karbapenemaz enzimi ile hidrolize edilen antibiyotik molekülün kütle değişiminin saptanması | 100 | 100 | Kan kültürü Vücut sıvısı |
| Direct-on-target microdroplet growth assay (DOT MGA), RUO | 4-6 sa | Orta | Çeşitli konsantrasyonlarda karbapenem varlığında bakteriyal büyümenin varlığının değerlendirilmesi | 100 | 100 | Bakteri kolonisi |
| Direct-on-target microdroplet growth assay (DOT MGA), RUO, from PBC | 4-6 sa | Orta | Çeşitli konsantrasyonlarda karbapenem varlığında bakteriyal büyümenin varlığının değerlendirilmesi | 97 | 100 | Kan kültürü Vücut sıvısı |

Sepsis Tanısında Kültürden Bağımsız Moleküler Testler

Maliyet-etkinlik ????
100-200 Euro/test

21 günlük mortalite oranlarında
%22-24 oranında düşüş



| T2Candida® | T2Bacteria® | T2Resistance® |
|--|---|--|
| Sensitivity: 91.1% ¹ Specificity: 99.4% ¹ | Sensitivity: 95.4% ² Specificity: 98.0% ² | FDA Breakthrough Device CE Mark/RUO 2019 |
| <i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. krusei</i> <i>C. glabrata</i> | <i>E. faecium</i> <i>S. aureus</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> | <i>mecA/C</i> <i>vanA/B</i> CTXM-14/15 KPC OXA-48 Group NDM, VIM, IMP AmpC (CMY/DHA) |
| FDA-Cleared CE-marked 1-3 CFU/mL LoD | FDA-Cleared CE-marked 2-11 CFU/mL LoD | Available as RUO (US) FDA in process CE-marked 3-11 CFU/mL LoD |

Sepsis Tanısında Kültürden Bağımsız Moleküler Testler

Maliyet-etkinlik ????
Karius NGS test için 1000 Euro/test

Table 2
Metagenomics based assays for the diagnosis of bloodstream infections from whole blood

| Technology | Assay (manufacturer) | TAT (h) | Organisms detected | Resistance genes detected | Complexity–Personnel experience level | Sensitivity/specificity | FDA clearance/ CE marked | Commercially available | Ref. |
|--|---|-------------------|---|---|---|---|---------------------------|------------------------|---------|
| PCR of 16S/18S regions, followed by sequencing | SepsiTest™ (Molzym) | 8–12 | Over 345 Bacteria and 8 fungi | — | Partially automated Specially trained personnel | 48%/86% | CE marked | Yes | [37] |
| PCR of 16S/18S regions, followed by sequencing | Micro-Dx™ (Molzym) | 7 | Over 200 bacterial and 65 fungal genera | — | Partially automated Specially trained personnel | Performance on whole blood not provided | CE marked | Yes | [41–43] |
| PCR of 16S/28S regions, followed by sequencing | Hybcell Pathogens DNA (CubeDx) ^a | 3 | Bacteria: 56 species and 11 genera Fungi: 19 species + 5 genera | <i>vanA B, mecA C, CTX-M, KPC, OXA-48, NDM, IMP</i> | Partially automated Specially trained personnel | 63%/83% | CE marked | Yes | [44] |
| Untargeted NGS | iDTECT® Dx Blood (PathoQuest) [NGS platform: MiSeq (Illumina)] | NA | Over 1200 pathogens (bacteria and viruses) | — | Not provided Specially trained personnel | (Negative predictive value: 98.4%) | CE marked | Yes | [48,49] |
| Untargeted NGS | Karius NGS plasma Test™ (Karius) [NGS platform: NextSeq (Illumina)] | 53 ^{b,c} | Over 1200 pathogens (bacteria, fungi, DNA viruses ^b and parasites) | — | High complexity test Specially trained personnel | 93%/63% | FDA approval not required | Yes (USA only) | [50,51] |

Abbreviations: CE, European Conformity; FDA, US Food and Drug Administration; ID, identification; NA, not available; TAT, turnaround time.

^a Specific cartridges for bacteria and fungi are also available (Hybcell Bacteria, Hybcell Fungi).

^b Including sample shipment.

^c The test does not detect RNA viruses.


Clostridium difficile Tanısı

- 2008-2013 yılları arasında İspanya'da 111 laboratuvardan gaita örnekleri
 - Epizotların yarısına (%50,5) katılan laboratuvarlarda tanı konulamadığı anlaşılmış
- 482 Avrupa hastanesinde her yıl tahminen 40.000 yatan hastada *C. difficile* enfeksiyonunda teşhis konulmadığı düşünülmektedir
 - Klinik şüphenin olmaması
 - Yetersiz laboratuvar tanı yöntemleri
- Türkiye ??????????



Concise Communication

Effect of testing methods on incidence of *Clostridioides difficile* infection rates in Veterans' Affairs medical centers

Brian P. McCauley DPM, MHSA^{1,2} , Martin E. Evans MD^{2,3,4}, Loretta A. Simbartl MS¹, Shantini D. Gamage PhD, MPH^{1,5}, Stephen M. Kralovic MD, MPH^{1,5,6} and Gary A. Roselle MD^{1,5,6}

¹National Infectious Diseases Service, Specialty Care Services, Veterans' Affairs Central Office, Washington, DC, ²MRSA/MDRO Prevention Office, National Infectious Diseases Service, Specialty Care Services, Veterans' Affairs Central Office, Washington, DC, ³Lexington Veterans' Affairs Medical Center, Lexington, Kentucky, ⁴Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, University of Kentucky School of Medicine, Lexington, Kentucky, ⁵Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, Ohio and ⁶Cincinnati Veterans' Affairs Medical Center, Cincinnati, Ohio

- *Clostridioides difficile* enfeksiyon oranları,
 - 24 ay boyunca için tek başına NAAT (mavi)
 - İlk 12 ay tek başına nükleik asit amplifikasyon testi (NAAT) kullanıp, sonraki 12 ay NAAT ve toksin enzim immunoassay'e (EIA) geçiş yapan 7 kurum (turuncu)
- İlk 12 ayda grupları arasında oranlarda anlamlı bir fark yoktu (p= 0.21)
- İkinci 12 ayda NAAT+EIA'ya değişen tesisler için oranlarda düşüş (p < 0.0001)

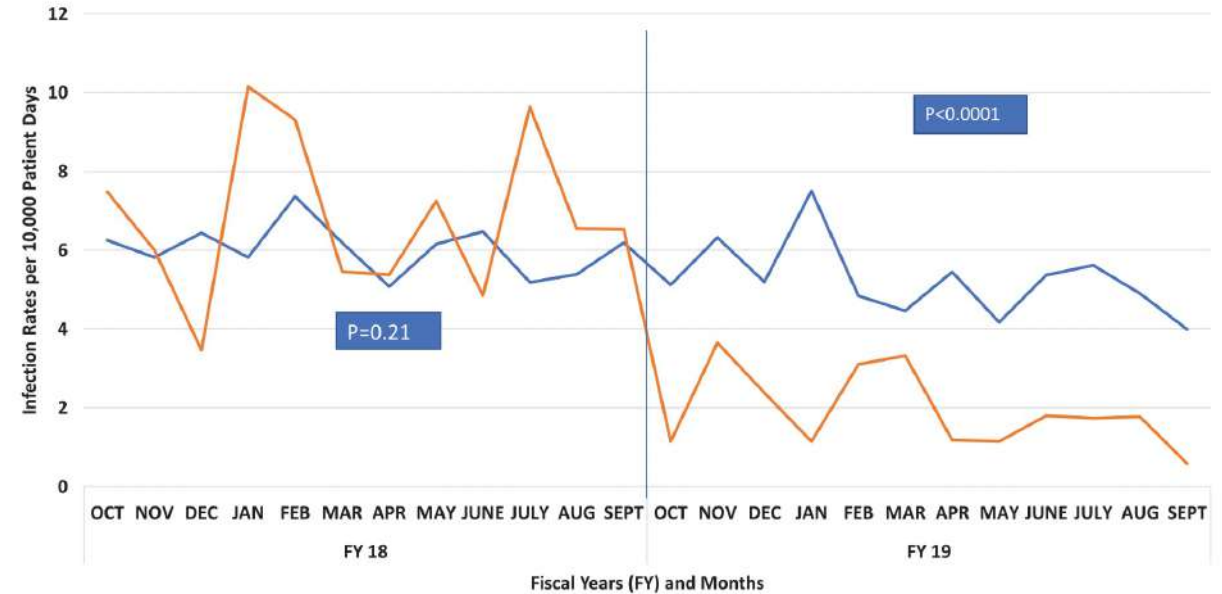


Fig. 1. *Clostridioides difficile* infection rates in VA acute-care facilities. Blue line: facilities that used nucleic acid amplification test (NAAT) only in both FY 18 and FY 19. Orange line: facilities that used NAAT only in FY 18 and NAAT + toxin EIA in FY 19. Comparisons of CDI rates in each fiscal year (FY) were performed using linear regression.

Clostridium difficile Tanısı

- 24 saat içinde üç ve üzerinde sulu dışkılaması olan ve başka şekilde açıklanamayan hastalar *C. difficile* enfeksiyonu açısından araştırılmalıdır
- <2 yaş kolonizasyon olabilir
- Asemptomatik hastada ya da <1 yaş altında test istenmemeli

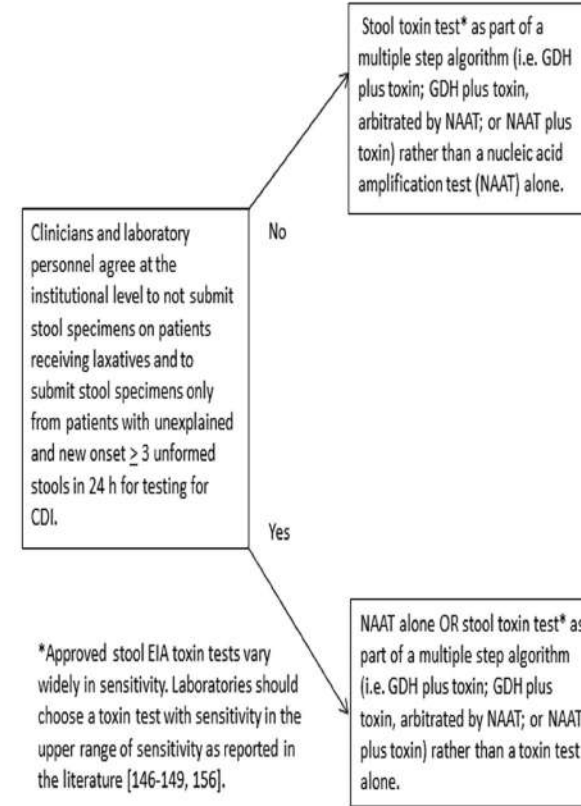


Figure 2. *Clostridium difficile* infection laboratory test recommendations based on preagreed institutional criteria for patient stool submission. Abbreviations: CDI, *Clostridium difficile* infection; EIA, enzyme immunoassay; GDH, glutamate dehydrogenase; NAAT, nucleic acid amplification test.

C. difficile (ribotype 027)

- İsviçre’de, 2015 yılında yapılan nokta prevalans çalışmasında *C. difficile* 027 saptanmamış olmasına karşın
- Aralık 2016'da bir hafta içinde üç vaka tespit edilmesinin ardından Aralık 2017'ye kadar devam eden salgın
- 28 olgunun 20'sinde aynı klon saptanmış

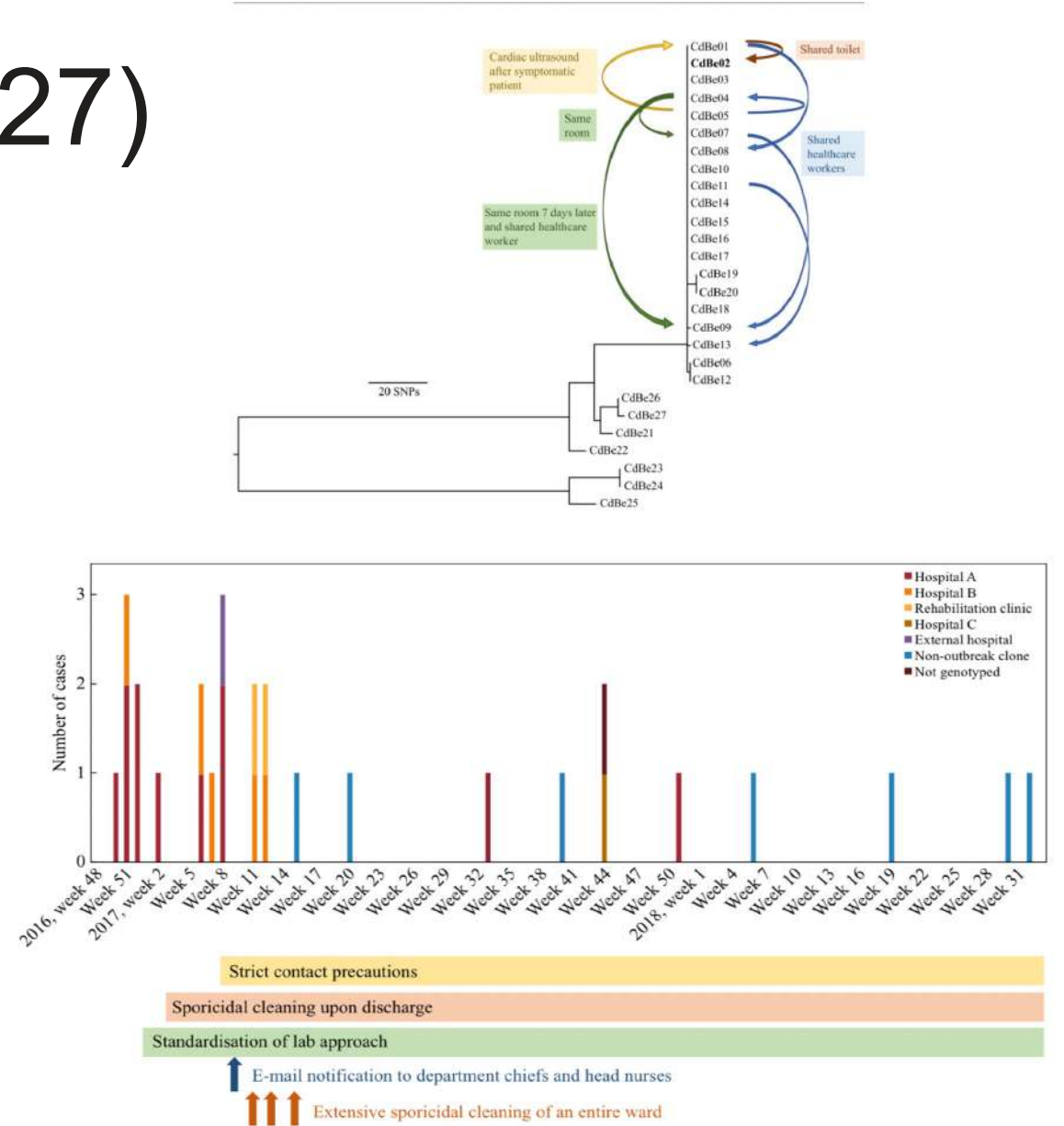


Figure 1. Epidemiological curve of *C. difficile* 027 isolates and timeline of interventions.

Tanı Yönetimi, Enfeksiyon Kontrolü ve Antimikrobiyal Yönetimde Entegre Yaklaşım

