

ÇOKLU DİRENÇLİ HASTANE İNFEKSİYONU ETKENLERİNİN KONTROLÜNDE HIZLI TANI TESTLERİ

Zeynep GÜLAY

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İZMİR
gulayz62@gmail.com

ÖZET

Çoklu dirençli bakteriler, özellikle metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, vanomisine dirençli *Enterococcus* ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten *Enterobacteriaceae* üyeleri, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de hastane kökenli infeksiyonların başlıca etkenleridir. Son yıllarda, bu mikroorganizmalarla kolonize hastaların hızla saptanması için çeşitli fenotipik ve genotipik yöntemler geliştirilmiştir. Bu yazıda, bu yöntemler ile güçlü ve zayıf yönleri özetlenmektedir.

Anahtar sözcükler: genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, hızlı saptama yöntemleri, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, vankomisine dirençli *Enterococcus*

SUMMARY

Rapid Diagnostic Methods for the Control of Multi-Drug Resistant Nosocomial Microorganisms

Multi-drug resistant bacteria especially methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci, and extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*, are the main causative microorganisms in hospital-acquired infections in our country as in the rest of the world. In the last decade, several phenotypic and genotypic methods were developed for the rapid detection of patients who are colonized with these microorganisms. In this review, powerful and weak aspects of some of these detection methods, will be summarized.

Keywords: extended-spectrum beta-lactamase, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, rapid detection methods, vancomycin-resistant enterococci

“Çoklu dirençli mikroorganizma” (ÇDM) tanımı, bir veya daha fazla antibiyotiğe dirençli mikroorganizmalar, özellikle bakteriler için kullanılmaktadır. Bazı bakteriler (örneğin, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) veya vankomisine dirençli enterokoklar (VRE), tek direnç özellikleri ile tanımlanmalarına rağmen aslında birçok antibiyotiğe doğal veya kazanılmış direnç gösterirler⁽¹⁸⁾.

Hastane infeksiyonlarından en sık soyutulan patojenler, *S.aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp., *Acinetobacter baumannii*, koagülaz negatif stafilokok (KNS) türleri ve diğer enterik çomaklardır. Bu etkenler arasında antibiyotiklere çoklu dirençli olanların oranı giderek artmaktadır. MRSA, VRE, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, karbapenemlere dirençli Gram negatif nonfer-

mentatif çomaklar (*Paeruginosa*, *A.baumannii*), doğal direnç özellikleri nedeniyle en geniş spektrumlu antibiyotiklere karşı bile direnç gösteren *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Burkholderia cepacia* tüm dünyada, bu arada ülkemizde de sorun oluşturmaktadır.

ÇDM prevalansı zaman, coğrafi bölge ve sağlık kuruluşunun özelliklerine göre değişmektedir. Yoğun bakım ünitelerindeki prevalans hastanenin diğer servislerine göre yüksektir. Ülkemizden 11 laboratuvarın kan kültür izolatları ile katıldığı ARMED-EARSS sürveys programı verilerine göre 2003-2004 yılında MRSA prevalansı % 43, VRE prevalansı % 4, GSBL üreten *E.coli* prevalansı % 27.8'dir (ARMED-EARSS report).

ÇDM infeksiyonları genellikle duyarlı olanlarla aynı bulguları vermesine karşın bu tip infeksiyonlarda tedavi seçeneklerinin kısıtlı

olması ve başlangıçta uygun antibiyotik verilememesinden dolayı morbidite ve mortalite artmaktadır. Yine tedavi seçeneklerinin kısıtlılığı nedeniyle geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı da normal flora bakterilerini baskılayarak çoklu dirençli bakterilerle karşılaşan hastalarda bu bakterilerin kolonizasyonunu kolaylaştırır. Klinik önem açısından MRSA izolatlarının diğer ÇDM'lerden farklı bir özelliği bulunmaktadır. MSSA ile kıyaslandığında MRSA ile kolonize hastalarda semptomatik infeksiyon gelişme hızının poststernotomi mediastinitisi, bakteriyemi gibi ağır infeksiyonlarda da fatalite hızının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum doğru bakterisidal tedavi uygulanmasındaki gecikmeye veya bazı MRSA izolatlarının özellikle persistan infeksiyonlar oluşturma eğilimine bağlı olabilir⁽¹⁸⁾.

ÇDM bulaşının sağlık personelinin elleri aracılığıyla olduğuna dair birçok epidemiyolojik kanıt bulunmaktadır. Eller medikal bakım sırasında hasta veya çevre ile temas sonucunda kontamine olmaktadır. El hijyeni ve eldiven kullanımı kurallarına uyumu arttıran stratejiler ÇDM kontrol programının en önemli basamaklarıdır.

2006 yılında ABD Hastalık Kontrol ve Önlem Merkezi (Centers for Disease Control, CDC) ÇDM kontrolü için yenilenmiş bir kılavuz yayınlamıştır⁽¹⁸⁾. Aynı kuruluşun izolasyon önlemlerinin⁽¹⁹⁾ bir parçası olan bu kılavuzda ÇDM kontrolü için çok yönlü bir yaklaşım önerilmektedir. Daha önceki CDC önerilerinin aksine bu rehberde "arttırılmış önlemler" başlığı altında, 2003 yılında yayınlanmış SHEA kılavuzuna benzer biçimde, başta MRSA ve VRE olmak üzere ÇDM'lerin izlem, saptanma ve ortadan kaldırılmasına yönelik daha güçlü öneriler yer almaktadır⁽¹⁸⁾. Arttırılmış önlemler esas olarak aktif sürveyans kültürlerini ve çevre kontrolünü kapsamaktadır. CDC kılavuzunda aktif sürveyans kültürü (ASK) uygulanması sağlık kuruluşunun inisiyatifine bırakılırken SHEA kılavuzunda tüm yüksek riskli hastalarda hastaneye yatış sırasında ASK uygulanması önerilmektedir⁽⁸⁾.

ÇDM sürveyansı için ASK kullanılması

Aktif sürveyans kültürlerinin amacı ÇDM

ile kolonize hastaların belirlenmesidir. Bu yaklaşım, sadece klinik kültürler ile izlendiğinde özellikle MRSA ve VRE ile kolonizasyonun saptanmasının geciktiği veya tamamen atlandığı gözlemine dayanmaktadır⁽⁸⁾. Yine birçok yazar, yeni ve dirençli bir patojen ilk kez izlendiğinde bu patojenin epidemiyolojik özelliklerini belirlemek için ASK uyguladığını bildirmektedir. ASK uygulanmasının temas önlemleri ile tamamlanması sonucunda birçok ünite hedef ÇDM'nin sıklığının azaltıldığı hatta eradike edildiği belirtilmektedir.

ASK genel olarak MRSA ve VRE için önerilmektedir^(8,18). Gram negatif çoklu dirençli bakteriler ile ilgili sonuçlar çelişkilidir. Başarı bildiren araştırmacılar olduğu gibi ASK'nin çoklu dirençli Gram negatif bakteri kontrolünde yararı bulunmadığını bildiren araştırmalar da vardır⁽¹⁸⁾.

ASK'nin MRSA ve VRE kontrolündeki etkisi matematiksel modeller yardımıyla araştırılmıştır. Böyle bir çalışmada hiç kültür alınmaması ile kıyaslandığında ASK'nin potansiyel bulaş % 39 oranında azalttığı; ASK ile birlikte izolasyon önlemleri de uygulandığında azalma oranının % 65 olduğu belirlenmiştir⁽¹³⁾.

ASK'nin infeksiyon izlem ve kontrol programına eklenmesi düşünülüyorsa öncelikle aşağıdaki faktörler göz önüne alınmalıdır:

1. ASK'nin nereden alınacağı: MRSA için burun delikleri, deri bütünlüğünün bozulduğu bölgeler (yara), perirektal sürüntü; VRE için dışkı, rektal, perirektal sürüntü; çoklu dirençli Gram negatif bakteriler için sadece rektal, perirektal sürüntü örnekleri veya bunlarla beraber orofaringeal, endotrakeal, inguinal sürüntüler veya yara sürüntüleri,
2. ASK'nin hangi hastalardan alınacağı: Yüksek riskli hastalar vs. hastaneye başvuran tüm hastalar,
3. ASK'nin zamanlaması: İlk başvuru sırasında ve hasta başka bir üniteye nakil olacağına; ilk başvuru sırasında ve sonra haftalık izlem şeklinde; risk faktörlerinin oluşması halinde (ör. uzun süreli yatış, geniş spektrumlu antibiyotik uygulanması) haftalık izlem şeklinde vb,
4. Kültür alacak personel,
5. Kültürleri işleyecek personel,

6. Alınan sonuçların hasta bakımı ile görevli kişilere bildirimini,
7. Kültür sonucu pozitif çıktığında alınacak önlemler ve bunların uygulanabilirliği örneğin, izolasyon veya çevre temizliği,
8. İzolasyonun ne zaman sona erdirileceği: örneğin, iki ASK'nin negatif çıkması,
9. Ek önlemlere uyumu izleyecek kontrol mekanizmaları.

Bunlar için yönetim desteğine ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarının sürece hazırlanmasına gerek bulunmaktadır.

Hızlı tanı

ÇDM bulaşında önemli bir faktör bu mikroorganizmaların en kısa sürede ve doğru olarak tanımlanmasıdır^(2,3). ASK alındığında sonuç çıkmasının uzaması, gereksiz olarak izolasyon önlemlerinin de uzamasına ve hasta üzerinde bununla ilgili olumsuz etkilerin artmasına veya herhangi bir izolasyon uygulanmıyorsa hastanın bu süre zarfında diğer hastalar açısından kaynak olmaya devam etmesine neden olmaktadır. Avustralya Royal Perth Hastanesinde ASK ve RT-PZR tekniklerini ve arttırılmış önlemleri uygulamaya koyarak VRE kontrolünü sağlayan ekibin başı Pearman⁽¹²⁾, bakteri tanımlanmasının 5 günü geçmesi halinde ASK'lerin yararının kalmadığını bildirmektedir.

Hızlı tanının potansiyel avantajları arasında:

- Kolonize ve kolonize olmayan hastaların ayrılması ve kolonize gruba temas önlemleri ve diğer önlemler (ör. dekolonizasyon) uygulanarak her iki grupta da infeksiyon insidansının azaltılması,
- Erken uyarı ile hasta güvenliğinin iyileştirilmesi,
- Uygun antibiyotik tedavisi ve çevresel temizlik önlemlerinin uygulanması ile bulaşın azaltılması,
- MRSA infeksiyon hızlarının düşürülmesi ile infeksiyon şiddetine göre değişmekle birlikte maliyetin hasta başına 9,275-35,367 USD arasında azalması,
- Kolonize olmayan hastalara gereksiz yere temas önlemleri uygulanmaması; buna bağlı maliyet ve yan etkilerden kaçınılması sayılabilir.

Bunlar yanı sıra, bakteri tür tanımının ve

antibiyotik duyarlılığının hızla yapılabilmesi de maliyeti azaltmaktadır. Dolayısıyla, ASK'de tanımlama yöntemlerinin hızlı olması (<24 saat içinde sonuç vermesi) gereklidir. Ancak standart kültür yöntemleri kullanılarak yapılan taramalar en az 48-72 saat almakta; özellikle VRE tanımlanması 5 güne kadar uzayabilmektedir. Bu nedenle son yıllarda özellikle MRSA ve VRE tanımlanmasına yönelik çeşitli yeni ve hızlı yöntemler bildirilmiştir.

Bu yöntemler genel olarak, fenotipik ve moleküler yöntemler olarak iki başlıkta toplanabilir. Fenotipik yöntemler, esas olarak, antibiyotiklere dirençli bakterilerin 24 saat içinde saptanmasını sağlayan kromojenik besiyerlerini içermektedir. Moleküler yöntemler içerisinde de bazıları ticari ve FDA onaylı olan gerçek zamanlı PZR testleri; "ev yapımı" ya da analite spesifik onay almış PZR testleri ve kolonilerden veya kan kültürlerindeki üremelerden hızlı tanıyı sağlayan diğer moleküler yöntemler [ör. PNA FISH, EVIGEN ürünleri (VRE, MRSA)] sayılabilir.

MRSA için kullanılan hızlı tanı yöntemleri

1- Kromojenik besiyerleri: MRSA saptanması için literatürde birçok ticari veya "ev yapımı" kromojenik besiyeri bulunmaktadır. Kromojenik besiyerleri hem aranan çoklu dirençli patojenin seçilmesini sağlayan hem de içerdikleri diğer ayraçlar sayesinde farklı koloni renkleri oluşturarak tür ayırımına olanak veren besiyerleridir. MRSA için kullanılan kromojenik besiyerlerinin bir kısmında seçici antibiyotik olarak sefoksitin bulunmaktadır. CHROMAgar MRSA (BBL), MRSASelect (BioRad), MRSA-ID (yeni adı CHROMIDMRSA) (bioMerieux), Chromogene MRSA agar (Oxoid) bu tip besiyerleridir^(3,21).

Bunlar yanı sıra seçici antibiyotik olarak oksasilin de kullanılabilir. Örneğin, oksasilin eklenmiş (6 mg/L) mannitol tuz besiyeri, ORSAB (Oxoid) besiyeri gibi. Ancak oksasilin daha kolay bozulabildiği ve sefamisinler PBP 2a için daha iyi indükleyiciler olduğu için sefoksitin içeren besiyerleri MRSA tanımlanmasında oksasilin içerenlere kıyasla daha fazla kullanılmaktadır. CHROMAgar MRSA, MRSASelect, MRSA ID gibi besiyerleri için çeşitli çalışmalarda bildirilen duyarlılık % 80'den fazla, özgüllük ise % 100'e yakındır. Nazal sürüntü örnekleri

doğrudan ya da çok sayıda besiyerine ekim yapılacaksa 400 µl steril serum fizyolojik içerisinde vortekslendikten sonra besiyerlerine ekim yapılmaktadır. Bu besiyerlerinde üreyen MRSA kolonileri pembe-mor, mavi veya yeşil görünümleri ile 24 saatte kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Özgüllük çok yüksek olduğu için 24 saatte doğrulama yapılmasına gerek bulunmamaktadır. İnkübasyonun 48 saate uzatılmasının MRSA saptanmasına katkısı çok az olmakta, buna karşın özgüllük düşmektedir.

2- Moleküler yöntemler: MRSA saptanması için birçok PZR tabanlı test tanımlanmıştır. Bunların çoğu PBP 2a'yı kodlayan *mecA* ile *S.aureus*'a özgü bir başka geni (*nuc*, *coa*, *sa442*, *femA*, *femB*) saptayan multipleks PZR testleridir. Bu testler günümüzde klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında metisilin direncinin doğrulanması, *S.aureus* küçük koloni varyantlarının tanımlanması veya kan kültürlerinden MRSA saptanması için rutin olarak kullanılabilir. Örneğin, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi merkez laboratuvarında 16SrRNA, *nuc* ve *mecA*'nın birlikte saptanabildiği bir multipleks PZR testi 2003 yılından beri doğrulama amacıyla uygulanmaktadır. Bu testler doğrudan klinik örnekler için de kullanılabilir. Ticari olanlara kıyasla ucuz ve esnek olan bu testlerin temel dezavantajı, aynı örnekte bir MSSA ile metisiline dirençli bir KNS'nin birlikte bulunması halinde, MRSA gibi yalancı pozitif sonuç verebilmeleridir^(3,7).

Günümüzde doğrudan sürüntü örneklerinden MRSA saptanmasını sağlayan iki FDA onaylı gerçek zamanlı PZR testi bulunmaktadır: GeneOhm MRSA (eski adı IDI MRSA) (Becton Dickinson) ve GeneXpert (Cepheid). Bu testlerde *mecA* geni değil, *mecA*'yı taşıyan SCCmec elemanının çevresindeki *S.aureus*'a özgü diziler hedeflenmektedir. Böylelikle ev yapımı moleküler testlerin yukarıda belirtilen dezavantajı çözümlenmiştir. Cepheid GeneXpert SCCmec insersiyon bölgesi olan AttBScC bölgesini; GeneOhm MRSA ise SCCmec'in 3' ucundaki orfX bölgesini saptamaktadır. Bu testlerden GeneXpert, özel eğitilmiş bir teknisyen olmaksızın herhangi bir laboratuvarında uygulanabilecek orta derecede karmaşık bir test olarak FDA onayı almıştır. GeneOhm MRSA'nın ise ancak

eğitilmiş teknisyenlerce uygulanabilecek yüksek derecede kompleks bir test olduğu bildirilmektedir. Cepheid GeneXpert sürüntü örneğinin test tüpüne konması ve üç ayrı deney sistemine eklenmesinden sonra tamamen otomatiktir. Buna karşın GeneOhm MRSA testinde kullanıcı tarafından uygulanması gereken çeşitli basamaklar bulunmaktadır. GeneOhm MRSA'da 14 test örneği için ön hazırlık 1-1.5 saat; RT-PZR aşaması 63 dakika sürmektedir. GeneXpert ile sonuç çıkma süresi RT-PZR için 75 dakikadır.

Her iki testin maliyeti de yüksektir. Senede birkaç bin test uygulanması koşulu ile GeneOhm için maliyet 30 USD (25 euro)/örnek iken, GeneXpert için örnek başına 42 USD'dir.

Ülkemizde de bulunan GeneOhm MRSA, nazal sürüntü, yara sürüntüsü ve kan kültüründen tanımlama için FDA onayı almıştır. Ürün kataloğunda test duyarlılığı % 92.5, özgüllük % 96.4 olarak bildirilmiştir. Nazal sürüntü dışındaki örneklerde duyarlılık düşmektedir. GeneXpert kataloğunda ise iki test 1,077 sürüntü örneği için kıyaslandığında, GeneXpert için duyarlılık % 86.3, özgüllük % 94.9, GeneOhm için duyarlılık % 83.3, özgüllük % 94.4 olarak bildirilmiştir. Diğer çalışmalarda genel olarak IDI MRSA veya yeni adıyla GeneOhmMRSA en duyarlı yöntem olarak bulunmuştur^(4,7,16). Bu yöntem ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Bazı suşlarda *mecA*'nın kaybedilmesine rağmen test tarafından hedeflenen SCCmec sağ bileşke dizisi yerinde kaldığı için yalancı pozitiflik oluşabilmektedir.

Üçüncü bir ticari moleküler yöntem ise GenoType MRSA Direct (Hain Life Science, Nehren, Almanya) PZR testidir. Bu test hedef olarak SCCmec I-IV'ün amplifiye edildiği bir revers hibridizasyon testidir. Test sırasında öncelikle kitteki protokoller ve araçlar kullanılarak PZR uygulanmakta, ardından DNA stripi ile hibridizasyon yapılarak görülen bantlara göre sonuç değerlendirilmektedir. Sonuçlar 6-7 saatte çıkmaktadır⁽¹⁶⁾.

Çeşitli örneklerde IDI MRSA ile GenoType MRSA'nın performanslarını kıyaslayan bir çalışmada; IDI MRSA'nın nazal sürüntülerde duyarlılığı % 90, diğer örnekler için % 80, GenoType MRSA'da ise bölgeden bağımsız olarak % 69 bulunmuştur⁽¹⁶⁾. Özgüllük IDI MRSA için % 94,

GenoType MRSA için % 96'dır. Saptama sınırı IDI MRSA için 25 koloni oluşturan ünit(koü)/ nazal sürüntü iken GenoType MRSA için 30 koü/5 µl'dir. Aynı çalışmada MRSA ID, MRSASelect ve CHROMAgar MRSA besiyerleri de kullanılmıştır. Olasılıkla aynı örnek 3 besiyerinde de kullanıldığı için bu besiyerleri için duyarlılık sırasıyla % 72, % 68, % 75; özgüllük ise % 95, % 98 ve % 99 olarak bulunmuştur.

Bunlar dışında kan kültüründe üreme saptandıktan ve Gram boyalı preparatlarda Gram pozitif kok görüldükten sonra, türe özgü ribozomal RNA dizilerine tutunan floresan işaretli peptid nükleik asit problemlerinin kullanıldığı PNA-FISH (floresan in situ hibridizasyon) (AdvanDx) yöntemiyle KNS/*S.aureus* ayırımı yapılabilmektedir. Ayrıca EvigeneMRSA (AdvanDx) ile kuyucuklara kaplanmış problemler ve sinyal amplifikasyon yöntemi ile kısa sürede ve ELISA formatında MRSA saptanması mümkün olmaktadır.

Moleküler yöntemler ile ilgili kısıtlılıklar

1. Maliyetin yüksek olması (örneğin, IDI MRSA için 30 -53.60 USD/test; 25-60 euro/test),
2. Bakterinin ölü olması ancak DNA pozitifliğinin sürmesi (dekolonizasyon tedavisi sonrasında ve izolasyonun sona erdirilmesinde sorun olabilir),
3. Üreme olmadan saptanma olması nedeniyle, diğer testler için (ör. moleküler tiplendirme) suş stoklarının bulunmaması,
4. DNA ekstraksiyonu ile ilgili problemler,
5. Prevalansın düşük olduğu durumlarda yalancı pozitiflik oranının artması ve pozitif prediktif değer (PPV) düşmesi,
6. Moleküler testlerin düşük riskli hastalar ve düşük riskli ünitelerde kullanılması halinde maliyetin yarara kıyasla çok yüksek olması,
7. Aşırı duyarlılık nedeniyle kontaminasyon riski bulunması,
8. Pasajlar sırasında *mecA*'nın kaybedilmesine rağmen ticari testlerin *mec* dışı bölgeleri saptaması nedeniyle yalancı pozitiflik olması,
9. IDI MRSA (GeneOhmMRSA) için *S.aureus* orf X ile bazı *Staphylococcus epidermidis* orf X bölgelerinin benzerliği nedeniyle yalancı pozitiflik oluşabilmesi,
10. Bazı SCCmec tiplerinin diğerleri ile aynı

etkinlikte saptanamaması (örneğin SCCmec tip V, bazı IV varyantları, yeni SCCmec tipleri)⁽⁴⁾.

Bu sorunlardan ilk yedisi ÇDM için uygulanan tüm moleküler testler için geçerlidir.

Sonuç olarak, doğrudan klinik örnekler veya ASK'de MRSA saptanması için kullanılan hızlı moleküler testlerin önündeki en önemli engel, gerçek MRSA varlığı ile, MSSA ve MRSE birlikte bulunmasının ayırt edilmesindeki güçlüktür. FDA onaylı testler bu engeli sadece MRSA izolatlarına özgü bir diziyi çoğaltarak aşmışlardır. Örneğin, IDI MRSA testinin performans özellikleri gayet iyidir. Ancak yukarıda da belirtildiği gibi, gerek bu test gerekse muadillerince saptanamayan yeni SCCmec tiplerinin çıkabilme olasılığı bulunması nedeniyle, test performansının sürekli olarak izlenmesi ve yeni klonlarla tekrar doğrulanması (validasyonu) gereklidir.

FDA onaylı testlerin maliyetinin yüksek olması nedeniyle, bu testlerin kısa sürede infeksiyonların önlenmesi ile maliyet etkinliğini kanıtlayabilmek hemen hemen imkansızdır. Buna karşın kromojenik besiyerleri maliyeti daha düşük yöntemlerdir (yaklaşık 5 USD/plak). Bölümümüzde yaptığımız bir çalışmada, 83 sürüntü örneği kullanılarak ChromAgar Staph aureus, GeneOhm Staph aureus S/R ve CNA besiyeri MRSA izolasyonu açısından kıyaslandığında; CHROMAgar ve GeneOhm yöntemlerinin % 100 uyumlu sonuç verdiği; CNA besiyerinin ise iki klinik örnekte MRSA saptanmasında yetersiz kaldığı belirlenmiştir. GeneOhm testinin kısa sürede sonuç vermesi büyük bir avantaj olmakla birlikte, yukarıda da belirtildiği gibi maliyeti düşündürücüdür. Dört cm çaplı petri kutularına döküldüğünde ChromAgarın maliyeti ise yaklaşık 2 TL'dir. Bu nedenle, özellikle ekonomik imkanları kısıtlı ülkelerde "ara ve yok et" stratejisinde ilk basamak olarak kromojenik besiyerlerinin kullanılmaları yeğlenebilir.

VRE için kullanılan hızlı tanı yöntemleri

1. Kültür yöntemleri: Vankomisine dirençli enterokokların hızlı ve doğru olarak tanımlan-

ması kolonize ve infekte hastaların tedavisi ve bu hastalara ilişkin uygun önlemlerin alınabilmesi açısından son derece önemlidir. En sık uygulanan kültür temelli tarama yöntemleri 1-5 gün süre almaktadır^(2,3,7). Bu yöntemler emek yoğun olduğu gibi, standart besiyerlerinde üreyen mikroorganizmanın tür tanımının da yapılması gereklidir. Besiyerleri arasında en sık kullanılanlar vankomisin içeren (6-8 mg/L) safra eskülinli sıvı ve katı besiyerleridir [örneğin Enterococcosel agar veya sıvı buyyon (BBL), vankomisin yanısıra *Enterococcus gallinarum* inhibisyonu için meropenem eklenen VRE agar (Oxoid) gibi]. Hatta sıvı besiyerleri dışındaki PZR üzerindeki inhibitör etkisi nedeniyle PZR öncesi zenginleştirme amacıyla da kullanılmaktadır.

MRSA'dakine benzer şekilde VRE için de kromojenik besiyerleri bulunmaktadır. Bunlar VRE'leri seçmeleri yanı sıra tür ayırımına da olanak sağlamaktadır. ChromID VRE (diğer adları VRE ID, VRE BMX) (bioMerieux), 8 mg/L vankomisin ve çeşitli ayraçlar içermektedir. Bu besiyerinde vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis* kolonileri mavi yeşil, *Enterococcus faecium* kolonileri mor olarak görülmektedir. ChromID VRE besiyerinin, vankomisin içeren safra eskülin azid (BEAV) ile kıyaslandığı bir çalışmada, 24 saatlik inkübasyon sonrasında duyarlılığı % 96.4, özgüllüğü % 96.6, pozitif prediktif değeri % 89.8 bulunmuştur⁽⁶⁾.

Benzer bir besiyeri CHROMAgar VRE'dir. Bu besiyerinde vankomisine dirençli *E.faecalis* / *E.faecium* kolonileri pembe-mor koloniler oluştururken; *E.gallinarum*/*Enterococcus casseliflavus* mavi renkte koloniler oluşturur veya inhibe olur.

Kültür tarama yöntemleri ile ilgili kısıtlılıklar arasında:

1. Klasik vankomisinli tarama testi plaklarında vanC genleri taşıyan doğal dirençli türlerin üremesi: *E.gallinarum*, *E.casseliflavus* ve *Enterococcus flavescens* gibi doğal dirençli türlerin klinik önemi belirsizdir, ancak vankomisin içeren besiyerlerinde ürediklerinden mutlaka tür düzeyinde tanımlama yapılması gerektiği için süre ve maliyet artmaktadır.
2. Diğer vankomisine dirençli türlerin üremesi: *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve bazı laktobasillerin üremesi yine ek işlemlere neden olmaktadır.

dır.

3. VRE konfirmasyonu için gerekli zaman genellikle 72 saat ve üstü olmaktadır.
4. Bazı *vanB* pozitif izolatların 6-8 mg/L vankomisin varlığında üreyememesi ve buna bağlı yalancı negatif sonuç alınabilmesi.
5. Yukarıdakine benzer şekilde bazı enterokokların canlı olmalarına rağmen kültür plağında üreyememesi sayılabilir.

Kromojenik besiyerleri bu sorunlardan ilk üçünü çözümlayebilmektedir.

2. Moleküler yöntemler: Enterokoklarda vankomisin direnci *vanA*, *vanB* (B1, B2, B3), *vanC* (C1, C2, C3), *vanD*, *vanE* olarak adlandırılan genlerin varlığına bağlıdır. Bunlar arasında *vanA* ve *vanB* klinik açıdan en önemli türler olan *E.faecium* ve *E.faecalis*'de bulunmaları ve hem bu türler arasında hem de diğer Gram pozitif bakterilere (ör. *S.aureus*) aktarılabilmesi nedeniyle en fazla önem taşıyan direnç elemanlarıdır. *VanA* ve *vanB* genleri operonlarında bulunan diğer ligazlarla birlikte glikopeptidlerin hedefi olan Dalanil-Dalanin dipeptidini Dalanin-Dlaktata çevirmektedir.

VRE için FDA onayı aşamasında bir gerçek zamanlı RT-PZR kiti bulunmaktadır. Günümüzde kullanılan moleküler testlerin büyük çoğunluğu "ev yapımı" ("in-house") multipleks PZR testleridir.

Birçok araştırmacı, kolonilerden veya direkt dışkı ve rektal sürüntü örneklerinden *vanA* ve *vanB* saptanmasını sağlayacak PZR tabanlı testler geliştirmişlerdir. Koloniden çalışmak, üreme için 24-48 saat gerektirdiği için hız açısından fazla bir avantaj sağlamamaktadır. Doğrudan örneklerden çalışmada ise inhibisyon önemli bir sorundur. Palladino ve ark.^(9,10), hasta örnekleri ve kolonilerden karşılaştırmalı olarak gerçek zamanlı PZR ile *vanA* ve *vanB* saptadıkları çalışmalarında, % 55 oranında inhibisyon oluştuğunu göstermişlerdir. Bu araştırmacılar, dışkının vankomisin içeren zenginleştirme besiyerinde 18-24 saat inkübasyonunun PZR duyarlılığını belirgin ölçüde arttırdığını ve % 88'e çıkardığını göstermişlerdir. Zenginleştirme basamağı tanımlanma süresini uzatmaktadır ancak yine de klasik kültür yöntemlerine göre 2-3 günlük bir avantaj sağlamaktadır. Satake ve ark.⁽¹⁷⁾ ise, dışkıdan

DNA eldesi için jel filtrasyon kolonları kullanarak duyarlılığı arttırmışlardır. Bu araştırmacılar multipleks PZR ile *vanA/B/C1/C2* genlerini saptadıkları çalışmalarında duyarlılığı % 88.5, özgülüğü % 99.6 olarak bulmuştur. Jel bazlı sistemlerin kullanıldığı çalışmalarda duyarlılık % 68-87, özgülük yaklaşık % 100'dür. Ancak bu sistemle, sonuçların 6-8 saatte alınabilmesine rağmen kontaminasyon riskinin arttığı bildirilmektedir. Dışkının inhibitör etkisi hem varlığı, kimyasalların varlığı, aşırı insan DNA'sına bağlanmaktadır.

Paule ve ark.⁽¹¹⁾ çalışmasında ise rektal ve perianal sürüntü örneklerinden Masterpure saflaştırma kiti (Epicentre Tech) kullanılarak elde edilen DNA klasik amplifikasyon sistemi ile çoğaltılmış ve SYBR green I ile boyanan % 1.5 agaroz jelde görüntülenmiştir. Bu yöntemle Enterococcosel agara kıyasla belirgin ölçüde fazla pozitiflik elde edilmiştir.

Gerçek zamanlı PZR ile klasik PZR yöntemlerine göre çok daha kısa sürede sonuç elde etmek mümkündür (1-2 st vs. 4-6 st). Sloan ve ark.⁽²⁰⁾, Light Cyler cihazı ve FRET problemleri aracılığıyla gerçek zamanlı *vanA* ve *vanB* tanımlaması yapan Roche Light Cyler *vanA/vanB* kitini kullandıkları çalışmalarında, LightCyler kitinin duyarlılığını % 100, özgülüğünü % 97, NPV % 100, PPV % 42 olarak bulmuşlardır. PPV düşüklüğü LightCyler ile Enterococcosel besiyerine göre daha fazla pozitif sonuç elde edilmesine bağlıdır. Bu durum özellikle *vanB* pozitif izolatlarda saptandığı için araştırmacılar bunu bazı *vanB* pozitif izolatların 6-8 mg/L vankomisin içeren besiyerlerinde üreyememesine bağlamışlardır. Ancak Ballard ve ark.⁽¹⁾ 2005 yılında yaptıkları çalışmalarında dışkı florasında bulunan bazı *Clostridium* türleri (*Clostridium hathewayii*, *Clostridium innocuum* benzeri, *Clostridium holtae*) ve *Ruminococcus lactaris*'in *vanB* elemanı taşıdığını ve anaerop olmaları nedeniyle kültürde üreyememelerine karşılık PZR testlerinde pozitif sonuç verdiklerini göstermişlerdir. Bunun dışında bazı *Paenibacillus* türlerinde *vanA* elemanı, bazı streptokoklarda da *vanB* elemanı gösterilmiştir. Bunlar da vankomisinli besiyerlerinde üreyememelerine karşılık pozitif sonuçlara yol açabilirler. Buna rağmen RT-PZR kullanımı ile hasta yatış süresi 2 gün kısaltmakta ve buna bağlı

maliyet yılda yaklaşık 205,000 USD azalmaktadır⁽²⁰⁾.

Moleküler yöntemlerin hız ve duyarlılık gibi özelliklerine karşılık bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Bunlardan genel olanlar MRSA için yazılan bölümde belirtilmiştir. VRE moleküler testlerinde bunlara ilaveten dışkının inhibitör etkisi ile dışkıda *vanA* ve *vanB* elemanı taşıyan diğer aerop ve anaerop türlerin bulunabilmesi sayılabilir.

Testlerde kalite kontrolüne çok dikkat edilmelidir. DNA ekstraksiyonu ve inhibitör etki ile ilgili sorun oluşabilmesi nedeniyle internal kontrol kullanılmalıdır.

Malhotra-Kumar ve ark.⁽⁷⁾'nin 2008 yılında yayınlanan derlemesinde MRSA ve VRE için kullanılan hızlı yöntemler ayrıntısı ile yer almaktadır.

Diğer çoklu dirençli mikroorganizmalar

Gram negatif bakteriler için ASK'nin etkinliği tartışmalıdır. Bu nedenle literatürde hızlı yöntemlere de daha az rastlanmaktadır. Bu alandaki gelişmeler, özellikle beta-laktamaz üretimini ve gruplarının saptanmasına yönelik hızlı testler ve kromojenik besiyerleri olarak özetlenebilir.

GSBL üreten bakteriler için HMRZ-86 kromojenik substratının kullanıldığı bazı yöntemler bildirilmiştir. Bu kromojenik substratın kan kültürlerine eklenmesi ile GSBL üreten bakterilerin 15 dakika - 2 saat (sıvı besiyerine pasaj yapıldığında) içinde saptanması mümkün olmaktadır⁽⁵⁾. Yine bu substratın kullanıldığı Cica Beta Test (Kanto Chem, Japonya; Mast İngiltere) ile 2-15 dakikada GSBL, AmpC ve metallobeta-laktamaz üretimi saptanabilmektedir.

Yine sefpodoksim içerdiği için GSBL üreten bakterileri seçmenin yanı sıra *E.coli*, *Klebsiella/Enterobacter/Serratia/Citrobacter* ve *Proteae* grubu bakterilerin ayırımını yapabilen ChromID ESBL (eski adı ESBLBx) (bioMerieux) hızlı tanı sağlayan ticari kromojenik bir besiyeridir⁽¹⁵⁾. Bir başka kromojenik besiyeri olan CHROMAgar CTX'in ise, AmpC üreten izolatlarda bile CTX-M pozitif *Enterobacteriaceae* üyelerini saptayabildiği gösterilmiştir⁽¹⁴⁾.

KAYNAKLAR

1. Ballard SA, Grabsch EA, Johnson PD, Grayson

- ML: Comparison of three (PCR) primer sets for identification of vanB gene carriage in feces and correlation with carriage of vancomycin-resistant enterococci: interference by vanB-containing anaerobic bacilli, *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(1):77-81.
2. Diekema DJ, Dodgson KJ, Sigurdardottir B, Pfaller MA: Rapid detection of antimicrobial-resistant organism carriage: an unmet clinical need, *J Clin Microbiol* 2004;42(7):2879-83.
 3. Diekema DJ, Edmond MB: Look before you leap: active surveillance for multidrug resistant organisms, *Clin Infect Dis* 2007;44(8):1101-7.
 4. Francois P, Bento M, Renzi G, Harbarth S, Pittet D, Schrenzel J: Evaluation of three molecular assays for rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *J Clin Microbiol* 2007;45(6):2011-3.
 5. Jain S, Andrews J, Fraise A, Brenwald N: Rapid detection of extended spectrum beta-lactamase producing Gram-negative bacilli in blood cultures, *J Antimicrob Chemother* 2007;60(3):652-4.
 6. Ledebner NA, Das K, Eveland M et al: Evaluation of a novel chromogenic agar medium for isolation and differentiation of vancomycin resistant *Enterococcus*, *J Clin Microbiol* 2007;45(5):1556-60.
 7. Malhotra-Kumar S, Haccuria K, Michiels M et al: Current trends in rapid diagnostics for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and glycopeptide-resistant *Enterococcus* species, *J Clin Microbiol* 2008;46(5):1577-87.
 8. Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE et al: SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*, *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;24(5):362-86.
 9. Palladino S, Kay ID, Costa AM, Lambert EJ, Flexman JP: Real time PCR for the rapid detection of vanA and vanB genes, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;45(1):81-4.
 10. Palladino S, Kay ID, Flexman JP et al: Rapid detection of vanA and vanB genes directly from clinical specimens and enrichment broths by real-time multiplex PCR assay, *J Clin Microbiol* 2003;41(6):2483-6.
 11. Paule SM, Trick WE, Tenover FC et al: Comparison of PCR assay to culture for surveillance detection of vancomycin-resistant enterococci, *J Clin Microbiol* 2003;41(10):4805-7.
 12. Pearman JW: 2004 Lowbury Lecture: the Western Australian experience with vancomycin-resistant enterococci - from disaster to ongoing control, *J Hosp Infect* 2006;63(1):14-26.
 13. Perencevich EN, Fisman DN, Lipstich M, Harris AD, Morris JG Jr, Smith L: Projected benefits of active surveillance for vancomycin-resistant enterococci in intensive care units, *Clin Infect Dis* 2004;38(8):1108-15.
 14. Randall LP, Kirchner M, Teale CJ, Coldham NG, Liebana E, Clifton-Hadley F: Evaluation of CHROMagar CTX, a novel medium for isolating CTX-M-ESBL positive Enterobacteriaceae while inhibiting AmpC- producing strains, *J Antimicrob Chemother* 2009;63(2):302-8.
 15. Régliez-Poupet H, Naas T, Carrer A et al: Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases, *J Med Microbiol* 2008;57(Pt 3):310-5.
 16. Rossney AS, Herra CM, Fitzgibbon MM, Morgan PM, Lawrence MJ, O'Connell B: Evaluation of the IDI-MRSA assay on the SmartCycler real-time PCR platform for rapid detection of MRSA from screening specimens, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26(7):459-66.
 17. Satake S, Clark N, Rimland D, Nolte FS, Tenover FC: Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR, *J Clin Microbiol* 1997;35(9):2324-30.
 18. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee: Management of Multidrug-Resistant Organisms In Healthcare Settings (2006).
 19. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee: Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings (2007).
 20. Sloan LM, Uhl JR, Vetter EA et al: Comparison of Roche LightCycler vanA/vanB detection assay and culture for detection of vancomycin-resistant enterococci from perianal swabs, *J Clin Microbiol* 2004;42(6):2636-43.
 21. Van Hal SJ, Stark D, Lockwood B, Marriott D, Harkness J: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) detection: comparison of two molecular methods (IDI-MRSA PCR assay and Genotype MRSA Direct PCR Assay) with three selective MRSA agars (MRSA ID, MRSASelect and CHROMagar MRSA) for use with infection-control swabs, *J Clin Microbiol* 2007;45(8):2486-90.

Panel 9 sunuları

SEYAHAT VE İNFEKSİYONLAR: ÖNLEMLER VE TEDAVİ

Yöneten: **Gaye USLUER**

- Seyahat sonrası ateşli hastaya yaklaşım
Volkan KORTEN
- Seyahatle ilgili cinsel yolla bulaşan hastalıklar
Reşat ÖZARAS
- Seyahat ilişkili infeksiyonlarda korunma
Gaye USLUER