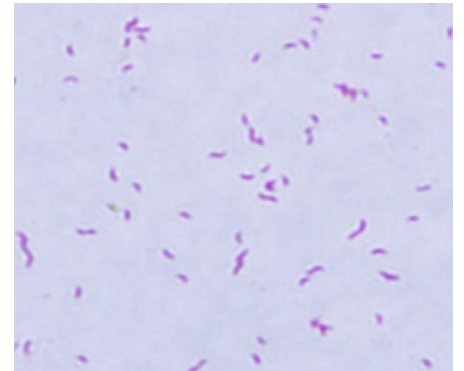






# Enterik Bakteriyel Patojenlerin Moleküler Tanısı

**Prof. Dr Dilara Öğünç**  
**Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi**  
**Tıbbi Mikrobiyoloji AD**



# Sunum Planı

- **Olgu sunumları**
- **Dışkı kültürünün enterik bakteriyel patojenlerin tanısında yeri**
- **Multipleks PCR testlerinin enterik bakteriyel patojenlerin tanısında yeri**

# **Olgu-1**

- **34 yaşında kadın hasta**
- **Antalya'da yaşıyor**
- **Muhasebeci**
- **Seyahat öyküsü bulunmuyor.**

# Olgu-1

- **Köfte yeme öyküsü olan hasta;**
- **Kusma**
- **Ateş 39°C**
- **Karın ağrısı**
- **İshal (10 kez/gün)**
- **Kan ve mukus yok**
- **Dış merkezin acil servisinde değerlendirilmiş ve evine gönderilmiş.**



# Olgu-1

- Evde bilinç kaybı gelişen hasta hastanemiz acil servisine başvurdu.
- Septik şok ön tanısıyla yoğun bakım ünitesine yatırıldı.



# **Olgu-1**

- **Sıvı replasmanı yapıldı.**
- **Seftriakson**
- **Vankomisin**
- **Metronidazol tedavisi başlandı.**
- **Ani solunum sıkıntısı gelişmesi**
- **Satürasyonların düşmesi**
- **Hipotansiyon**
- **Genel durumunun bozulması ile entübe edildi.**

# Olgu-1

- Akciğer ödemi geliştiği düşünülerek diüretik,
- Hipotansiyonu nedeniyle 3'lü inotrop tedavi başlandı.
- İleus nedeniyle Genel Cerrahi konsültasyonu istendi.
- Batın USG normal olarak değerlendirildi.



# Olgu-1

- **Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı ile görüşüldü.**
- **Hastadan dışkı örneği alınamaması nedeniyle üç adet rektal sürüntü örneği alınmasını önerdik.**
- **Dışkı kültürü**
- **PCR testleri çalışıldı.**

# Olgu-1

- **Dışkı kültürü: Salmonella, Shigella, Campylobacter, O157 E. coli üremedi.**
- **GN broth: Zenginleştirme sonrası ekimde üreme olmadı.**

# Olgu-1

- **Salmonella +**
- **Shigella**
- **Campylobacter**
- **Shiga-like toksin  
üreten E. coli  
(STEC) stx1/stx2**



**BD MAX™**  
*The Power of Choice*

# **Olgu-1**

- **Tedavinin ikinci gününde ateş yanıtı alındı.**
- **Spontan solunumda takip edildi.**
- **Vital bulguları normale döndüğünde Enfeksiyon Hastalıkları Servisine devri yapılan hasta şifa ile taburcu edildi.**

# **Dışkı kültüründe ürememe nedeni:**

- **Hastanın antibiyotik tedavisi alması;**
- **Antibiyotik tedavisi alan hastalarda dışkı kültürü çok az değer taşımaktadır.**

# Dışkı kültüründe ürememe nedeni:

- Dışkı örneği yerine rektal sürüntü örneği alınması;
- Erişkin hastalarda rektal sürüntü örneklerinin duyarlılığı düşük olduğundan önerilmemektedir.
- Semptomatik çocuk hastalarda ise, dışkı kültürü ile rektal sürüntü örneklerinin kültürü eşit duyarlılığa sahiptir.



# Olgu-2

- 5 yaşında kız çocuğu
- Ateş: 39.5°C
- İshal:
  - Başlangıçta 2 saatte bir, sonra daha sık aralıklarla sulu dışkılama
  - Dışkı kan, mukus içermiyor.
- Bulantı, kusma
- Karın ağrısı

# Olgu-2

- **Bir gün önce köfte yeme öyküsü bulunuyor.**
- **Diğer aile bireylerinde benzer yakınma yok.**
- **Dışkı kültürü**
- **PCR testleri çalışıldı.**



# Olgu-2

- **PCR sonucu:**
  - **Salmonella +**
  - **Shigella**
  - **Campylobacter**
  - **Shiga-like toksin üreten E. coli (STEC) stx1/stx2**

# Olgu-2

- **Dışkı kültürü sonucu:**
  - **24 saatlik inkübasyon sonrasında, ekim yapılan dışkı kültürü plaklarında üreme saptanmadı.**
  - **Hastanın PCR sonucunun pozitif olması nedeniyle, aynı dışkı örneğinden ikinci kez dışkı kültürü için ekim yapıldı.**
    - **Salmonella spp. üredi.**

# Olgu-2

- **Dışkı patojenlerinin saptanması için birden fazla dışkı örneğinin incelenmesi nadiren gereklidir.**
- **Erişkin hastalarda;**
- **İlk örnekte enterik patojenlerin saptanma oranı: %87-94**
- **2. örnek ile oran %98'e ulaşır.**

# Olgu-2

- **Çocuk hastalarda ilk örnekte enterik patojenlerin saptanma oranı: %98**
- **Çocuklarda tek örnek yeterlidir. Erişkinlerde ise seçilmiş hastalarda 2. örnek gerekebilir.**

# Olgu-3

- 35 yaşında kadın,
- Karın ağrısı,
- İshal yakınmaları olan hasta
- Dış merkezde değerlendirilmiş.
- Flagyl ve nifuroksazid başlanmış.

# **Olgu-3**

- **Bir gün sonra yakınmaları artmış.**
- **Bulantı**
- **Oral alamama**
- **Karın ağrısı**
- **Kanlı ishal**
- **Hasta hastanemiz acil servisine başvurdu.**
- **Enfeksiyon Hastalıkları konsültasyonu ile Enfeksiyon Hastalıkları servisine yatırıldı.**
- **Hastaya**
- **Siprofloksasin:2x400mg**
- **Metronidazol: 4x500mg başlandı.**

# Olgu-3

- **Entamoeba histolytica**  
**Ag EIA**
- **Dışkı kültürü**
- **PCR testleri çalışıldı.**
- **Negatif**
- **Salmonella, Shigella,  
Campylobacter,  
O157 STEC üremedi.**
- **Shiga-like toksin üreten  
E. coli (STEC) stx1/stx2  
pozitif**

# STEC

- **EHEC: Klinik tanım**
- **STEC: Mikrobiyolojik tanım**
- **O157 STEC**
- **O157 dışı STEC**



# STEC

- Tüm dünyada yaygın
- Sıklıkla diyare
- Karın ağrısı
- Ateş
- Seyahat öyküsü bulunmuyor.
- Önce sulu başlayabilir. Daha sonra kanlı olabilir.
- Ateş yok veya hafif yüksektir.

# STEC

- **%8 vakada enfeksiyon yaşamı tehdit eden hemolitik üremik sendroma ilerleyebilmektedir.**
- **HUS:**
  - Hemolitik anemi
  - Trombositopeni
  - Böbrek yetmezliği

# STEC: Klinik seyirin şiddeti

- **O157 STEC > O157 dışı STEC**
- **Stx2 üreten suşlar > Stx1 üreten suşlar**

- **Ancak;**
- **O157 dışı STEC**
- **Sadece Stx1 üreten suşlar da**

**Salgınlar**  
**Ciddi enfeksiyonlar**  
**HUS'a yol açabilmekte**

# STEC: Tedavi

- **Primer olarak destekleyici tedavi uygulanır.**
- **Parenteral volüm ekspansiyonu:**
  - Muhtemelen dolaşımdaki Shiga toksini dilüe etmesi nedeniyle yararlıdır.
  - Renal hasarı azaltır.
- **O157 STEC ile ilgili çalışmalar, antibiyotiklerin stres sinyali oluşturarak Shiga toksin oluşumu ve salınımını artırabileceği ve kliniği şiddetlendirebileceğini öne sürmektedir.**

# STEC Tanı

- **Uygun tedavinin zamanında uygulanması için hızlı ve güvenilir sonuç elde edebileceğimiz bir tanı yönteminin uygulanması gereklidir.**

# STEC Tanı: Kültür

- **Kültür: Sorbitollü Mac Conkey Agar**
- **Avantajları**
- **Dezavantajları**
- **Üreme =1 gün + tanımlama**
- **Ucuz, özgül**
- **O157 dışı STEC'ler saptanamaz.**
- **Deneyim gerektirir.**
- **Göreceli olarak uzun sürer.**
- **Sorbitolü fermente eden O157 STEC'ler saptanamaz.**

# STEC Tanı: Antijen Saptama

- **Lateks aglütinasyon ve immünokromatografik testler**
  - Duyarlılık ve özgüllük düşük
  - Değerlendirme subjektif
- **EIA:**
  - Dışkıda serbest toksin miktarı düşük olabilir.
  - Bir gece sıvı besiyerinde zenginleştirme gerekir veya
  - Koloniden çalışılması önerilir.
- **Avantajları**
  - Hem O157 STEC hem de O157 dışı STEC'leri saptar
- **Dezavantajları**
  - Zenginleştirme işlemi nedeniyle sonucu elde etme zamanı >1 gün
  - Suş elde edilmez.

# STEC Tanı: PCR

- **Geleneksel PCR**
    - Kontaminasyon
    - Zaman alıcı
    - Deneyim gerekir
  - **Real time PCR**
    - Kontaminasyon oranı düşük
    - Deneyim gerekir
  - **Multipleks PCR**
- **Suş elde edilmez**
  - **Maliyet**





# CDC'nin Önerisi

- **Toplumdan kazanılmış akut diyarelerde**  
  
**ve**
- **Olası hemolitik üremik sendromlu hastalarda**
- **E. coli O157 kültürü**  
**+**
- **Stx1 ve stx2 saptanması**

# Olgu-3

- **Entamoeba histolytica Ag EIA: Negatif**
  - Metronidazol tedavisi kesildi.
- **PCR : stx1/2 pozitif**
  - Siprofloksasin tedavisi kesildi
- **IV hidrasyon ile durumu düzelen hasta taburcu edildi.**

# Dışkı Kültürü

- IDSA'nın 2001 yılında yayınladığı kılavuzda;
- Semptomlar hızla düzelmeyorsa,
- Ateş veya kanlı ishal varsa,
- Hastanın altta yatan hastalığı var böylece komplikasyonlara yatkın ise,
- İmmün yetmezlikli bir hasta ise;



**Dışkı kültürü yapılması uygundur**



# Dışkı Kültürü

- En sık uygulanan test
- Duyarlılık: Oldukça değişken
- Özgüllük: Mükemmel
- Sonuç zamanı: 24-96 saat
- Sadece vakaların %1-5'inde pozitif
- Çoğu laboratuvar farklı besiyeri kombinasyonlarını kullanmakta

# Multipleks moleküler tanı

- **Neden gerekli?**
- **Klinik tablolar birbirine çok benziyor**
  - **Ayırt etmek güç**
- **Bakım kararlarını (tedaviye yön verebilecek) etkileyebilecek düzeyde hızlı**
- **Duyarlılık**
  - **Elimizdeki seçeneklerden daha iyi**

# FDA Onaylı Testler

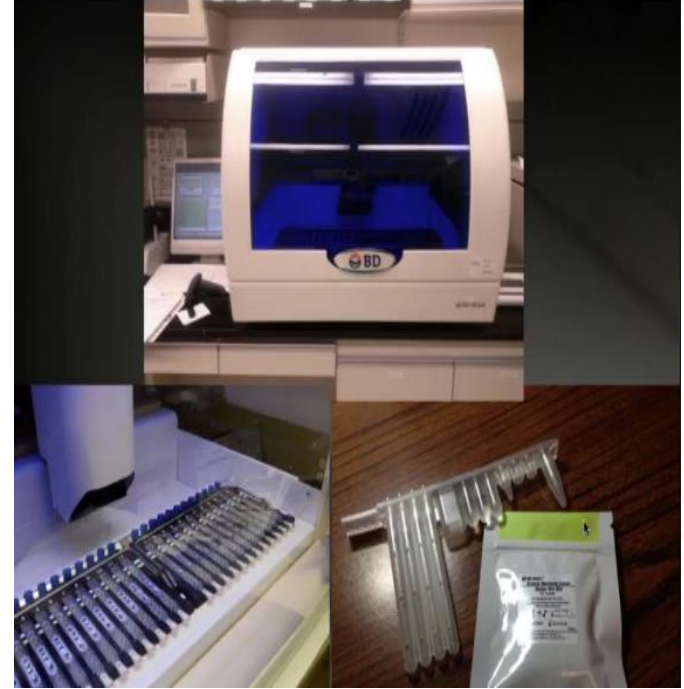
- **BD Max™ Enteric Bacterial Panel**
  - **Prodesse® Progastro™ SSCS**
  - **Nanosphere Inc. Verigene® Enteric Pathogen test**
  - **Luminex™ xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel (GPP)**
  - **Biofire Diagnostics Inc. FilmArray® GI panel**
- **Ortak özellikleri:**
    - **Salmonella**
    - **Shigella**
    - **Campylobacter**
    - **Shiga-like toksin üreten E. coli (STEC) stx1/stx2**
- saptamaları**

# BD Max

- Tam otomatize
  - Ekstraksiyon

↓

  - Sonuç deęerlendirilmesi
- Moleküler deneyim gerektirmeyen
- Real time PCR sistemi



# Çok Merkezli Çalışma

- **4242 dışkı örneği**
  - 3457 prospektif
  - 785 retrospektif
- **Örnekler: Amerika, Kanada ve Meksika'dan toplanmış**
- **BD Max EBP sonuçları kültür ve EIA sonuçları ile karşılaştırılmış**
- **Uyumsuz sonuçlarda alternatif PCR yöntemi kullanılmış.**



# Sonuçlar

	PPA	NPA
<i>Salmonella spp</i>	97.3	99.8
<i>Shigella spp</i>	99.2	100
<i>Campylobacter spp</i>	97.5	99.0
<i>Shigatoksin</i>	100	99.7

PPA: positive percent agreement

NPA: negative percent agreement

# Sonuçlar

- **Kültür:**
  - Tüm patojenlerin prevalansı: %3.9
- **BD Max EBP**
  - Prevalans:% 6.2

# Sonuç elde etme zamanı

- 86 dışkı örneği kültür ve BD Max EBP ile değerlendirilmiş.
- Kùltürlerin yaklaşık %20'sinde patojenleri ekarte etmek için ek işlem basamağına gerek duyulmuş.
- Konvansiyonel kültür ile negatif sonuç raporlama süresi:
  - Yaklaşık: 41-54 saat
- BD Max EBP ile:
  - Yaklaşık: 2-3 saat

# Akdeniz Üniversitesi Sonuçları

- 2014 yılında 1175 dışkı örneği incelendi.

	<b>BD Max</b>	<b>Kültür</b>	<b>EIA/ ICT</b>
<b>Salmonella spp</b>	<b>30</b>	<b>25</b>	<b>-</b>
<b>Shigella spp/EIE.coli</b>	<b>11</b>	<b>2</b>	<b>-</b>
<b>STEC (stx1/2)</b>	<b>38</b>	<b>10</b>	<b>16</b>
<b>Campylobacter spp</b>	<b>35</b>	<b>14</b>	<b>11</b>

# Akdeniz Üniversitesi Sonuçları

- Uyumsuz 31 örneği Biofire Film Array ile çalıştık.

	<b>BD Max</b>	<b>Film Array</b>
<b>Salmonella spp</b>	<b>5</b>	<b>4</b>
<b>Shigella spp/EIE.coli</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
<b>STEC (stx1/2)</b>	<b>12</b>	<b>10</b>
<b>Campylobacter spp</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

# Laboratuvar Uygulamalarında Değişim

- Foodnet sürveyans sisteminde;
- Kültür dışı Shigatoksin saptama yöntemi kullanım oranı:
  - 2003 → 2007: %6 → %11
- Kültür dışı Campylobacter saptama yöntemi kullanım oranı:
  - 2009 → 2010: %2 → %7

# 2014 yılında;

- **STEC;**
  - Laboratuvarların %47'si kültür + kültür dışı test
  - %34'ü sadece kültür
  - %19'u sadece kültür dışı test
- **Campylobacter spp;**
  - Laboratuvarların %5'i kültür + kültür dışı test
  - %85'i sadece kültür
  - %10'u sadece kültür dışı test

# Sonuç

- **Moleküler testler mikrobiyoloji laboratuvarında tanı testleri arasında yerini alıyor.**



# Sonuç

- **Asemptomatik taşıyıcıların yüksek olduğu toplumlarda saptanan mikroorganizmanın klinik öneminin belirlenmesi güç olabilir.**
- **Sonuçlar mutlaka klinik uyumla birlikte değerlendirilmelidir.**

# Sonuç

- **Bakteriyel enterik enfeksiyonların büyük bölümü kendini sınırlayan enfeksiyonlardır.**
- **Ancak moleküler testlerin gerekli olduğu ciddi klinik durumlar da bulunmaktadır.**

# Sonuç

- **Hızlı sonucun halk sağlığı açısından önemli olduğu: Salgın araştırması, kontrol önlemlerinin alınması için,**
- **Antimikrobiyal tedavinin gerekli olduğu durumlarda,**
- **Prognozu olumsuz etkileyecek patojenlerin varlığını belirlemede,**
- **Moleküler Testler değerlidir.**

# Sonuç

- **Moleküler testler mikrobiyoloji laboratuvarında tanı testleri arasında yerini almakla birlikte,**
- **İhtiyacımız;**
- **Enterik enfeksiyonların tanısında Moleküler yöntemleri içeren tanı kılavuzlarıdır.**