



MAKALE SUNUMLARI

Dr. Ferda Tunkanat

Hacettepe niversitesi Tıp Fakltesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

High-Level Azithromycin Resistance Occurs in *Neisseria gonorrhoeae* as a Result of a Single Point Mutation in the 23S rRNA Genes[▽]

Stephanie A. Chisholm,^{1*} Jayshree Dave,² and Catherine A. Ison¹

Sexually Transmitted Bacteria Reference Laboratory, Centre for Infections, Health Protection Agency, 61 Colindale Avenue, Colindale, London NW9 5HT,¹ and Scottish Bacterial Sexually Transmitted Infections Reference Laboratory, Royal Infirmary of Edinburgh, Edinburgh,² United Kingdom



Neisseria gonorrhoeae' de yüksek düzey azitromisin direncinin 23SrRNA nın peptidil transferaz bölgesinde oluşan tek bir nokta mutasyon ile ortaya çıktığını gösteren ilk alışma



- *Neisseria gonorrhoeae* suşlarında yüksek düzey azitromisin direnci (AZM-YD)

- 2001 → Arjantin
- 2004 → İskoçya
- 2007 → İngiltere, Galler, İtalya

Mekanizma ?

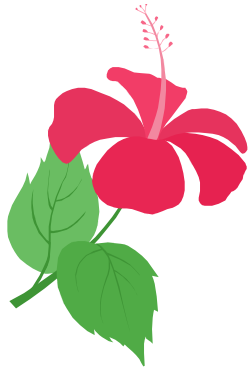
- Düşük düzey azitromisin direnci (MIC= 1-4 mg/L)

Mekanizmalar:

- 23SrRNA daki değişiklik
 - Enzimatik (*ermB*, *ermF*)
 - Mutasyonel (C2611T)
- Geri atım pompaları
 - MtrCDE pompası (*mtrR*)
 - MacA-MacB sistem (*mef*)

Çalışmanın Amacı:

Yüksey düzey azitromisin direnci gösteren *Neisseria gonorrhoeae* suşlarında direnç mekanizmasının araştırılması



Gereç ve Yöntemler:

■ Bakteriyel isolatlar

Toplam 57 izolat

Tiplendirme: NG-MAST

Duyarlılık testleri: E-test

- 19 izolat → yüksek düzey AZM direnci
(10'u İskoçya, 7'si İngiltere, 1 izolat Galler, 1 izolat İrlanda)
- 26 izolat → orta direnç (MİK= 2-8 mg/L) (İngiltere)
- 12 izolat → duyarlı (MİK=0.06-0.25 mg/ml)
(8'i İngiltere, 4'ü İskoçya)

Gereç ve Yöntemler:

■ PCR amplifikasyonu ve dizi analizi ile AZM direnç mekanizmasının araştırılması

- 57 izolatta → 23SrRNA'nın peptidil transferaz bölgesini kodlayan 4 farklı alel (PCR ve dizi analizi)
- 45 AZM-YD ve 4 duyarlı izolatta → *mtrR* promotor bölgesi-MtrCDE pompası- (dizi analizi)
mutasyon varlığı açısından araştırılmış
- Bu 49 izolatta → *ermA*, *ermB*, *ermC* genleri (PCR) araştırılmış

Gereç ve Yöntemler:

- AZM yüksek direncinin in vitro seçilme deneyleri
 - 4 duyarlı izolat eritromisinin seri dilüsyonları (8-0.5 mg/L) ile hazırlanan besiyerlerine ekilmiş. Üreme gösteren bakterilerin eritromisin ve AZM için MİK değerleri E-test ile belirlenmiş.
 - Eritromisin MİK değerinde artış saptanan suşlarda test her defasında daha yüksek eritromisin konsantrasyonları kullanılarak tekrarlanmış (Başlangıç konsantrasyon MİK değerinin iki katı olacak şekilde).

Gereç ve Yöntemler:

■ Transformasyon deneyleri

- AZM duyarlı laboratuvar suşları ile AZM-YD izolatların genomik DNA ları ya da 23SrRNA amplikonları birlikte inkübe edilerek gerçekleştirilmiş.



Sonuçlar

AZM_YD direnç mekanizmasına ilişkin sonuçlar

- 19 yüksek dirençli izolatın
 - 16'sında (%84) her dört alelde de A2059G mutasyonu
 - 3'ünde üç alelde mutasyon
- 12 duyarlı izolatın
 - 9'unda (%75) A2059G mutasyonu yok
 - 3'ünde bir alelde A2059G mutasyonu
- 26 orta dirençli izolatın
 - Hiçbirisinde A2059G mutasyonu yok

Sonuçlar

TABLE 1. Sequence of the peptidyltransferase region of domain V of each 23S rRNA allele in 57 gonococcal isolates representing different AZM resistotypes and NG-MAST sequence types

Susceptibility to AZM (MIC range)	23S rRNA domain V allele sequence				NG MAST sequence type(s) ^a	No. of isolates
	Allele 1	Allele 2	Allele 3	Allele 4		
Sensitive (0.06–0.125 mg/liter)	WT ^b	WT	WT	WT	51, 87, 384, 649 , 1182, 2208, 3373, 3375	8
	WT	WT	WT	A2059G	1443, 1704	2
	WT	A2059G	WT	WT	470	1
	WT	WT	C2611T ^c	WT	25	1
Moderately resistant (2–8 mg/liter)	WT	WT	WT	WT	2, 359	4
	C2611T	C2611T	C2611T	C2611T	359, 1195, 2322, 3150, 2597, 4236	19
	C2611T	C2611T	WT	C2611T	1195, 3150	3
Highly resistant (≥256 mg/liter)	A2059G	A2059G	A2059G	A2059G	470, 649, 1443, 1704, 2152, 2193	16
	A2059G	WT	A2059G	A2059G	1443	1
	A2059G	A2059G	WT	A2059G	225, 3311	2

^a High-level AZM resistance has been documented for sequence types in boldface.

^b WT, wild-type sequence.

^c Only a single strand of sequence was of sufficient quality to determine mutations at position 2611.

Sonuçlar:

mtrR promotor bölge mutasyon sonuçları:

- 4 duyarlı suşun hiçbirisinde mutasyon yok
- 26 orta dirençli izolatın
 - 21'inde mutasyon yok
 - 5'inde tek baz delesyonu (n=4) veya insersiyonu (n=1)
- 19 yüksek dirençli izolatın
 - 16 sında mutasyon yok
 - 3 izolatta tek baz delesyonu

Çalışılan hiçbir izolatta *erm* genleri saptanmamış

Sonuçlar:

AZM-YD direncinin in-vitro seçilimi ve transformasyon

- 3/4 izolatta bir veya iki pasaj sonrası AZM-YD'in hızla seçildiği gözlemlendi
- Yapılan çalışmalarda transformasyon gerçekleştirilemedi

TABLE 2. Changes in the AZM MIC and domain V of each 23S rRNA allele following selection by erythromycin

Isolate no. (ST ^a) and stage of selection by erythromycin	AZM MIC (mg/liter)	23S rRNA domain V allele sequence			
		Allele 1	Allele 2	Allele 3	Allele 4
136 (ST 1704) Preselection Postselection	0.25 >256	WT ^b A2059G	WT A2059G	WT A2059G	A2059G A2059G
352521 (ST 1443) Preselection Postselection	0.25 >256	WT A2059G	WT A2059G	WT A2059G	A2059G A2059G
252611 (ST 470) Preselection Postselection	0.38 >256	WT A2059G	A2059G A2059G	WT A2059G	WT A2059G
254921 (ST 649) Preselection Postselection	0.25 1.5	WT WT	WT WT	WT WT	WT WT

^a ST, NG-MAST sequence type.

^b WT, wild type.

Tartışma

Bu çalışmada

- AZM-YD gösteren tüm suşlarda **A2059G** mutasyonu 4 alelden en az üçünde gösterilmiş
- Bu açıdan benzer mekanizma ile yüksek makrolid direncinin görüldüğü diğer bazı bakterilerden farklı bir durum söz konusu
- Yüksek direnç *mtrR* promotor bölgede mutasyona ve *erm* metilazlara bağlı değil

Tartışma:

- Orta dirençli izolatlarda daha önce gösterilen **C2611T** mutasyonu YD lerin hiçbirisinde gösterilememiş, OD lerin %88 inde gösterilmiş
- Tek alelde mutasyon gösteren izolatlarda, makrolid varlığında yüksek direncin hızla seçilmesi önemli. Çünkü bu tür suşlar fenotipik olarak duyarlı.
- AZM primer olarak gonokokal enfeksiyonlarda kullanılmasa da koenfeksiyon düşünülen olgularda ya da diğer cinsel yolla geçen enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılıyor. Bu da direncin artmasına neden olacaktır



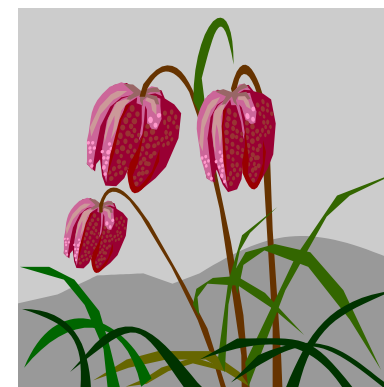
ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Sept. 2010, p. 3564–3568
0066-4804/10/\$12.00 doi:10.1128/AAC.00220-10
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 54, No. 9

Foreign Travel Is a Major Risk Factor for Colonization with *Escherichia coli* Producing CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases: a Prospective Study with Swedish Volunteers[∇]

Thomas Tängdén,^{1*} Otto Cars,¹ Åsa Melhus,^{2†} and Elisabeth Löwdin^{1†}

Sections of Infectious Diseases¹ and Clinical Bacteriology,² Department of Medical Sciences, Uppsala University, Uppsala, Sweden



Yabancı ülkelere seyahatin GSBL (+)
Enterobacteriaceae üyeleri ile kolonizasyon
için bir risk faktörü oluşturduğunu gösteren
ilk **prospektif** çalışma.



- GSBL oluşturan *Enterobacteriaceae* prevalansı küresel olarak artış göstermekte
- GSBL (+) *Escherichia coli* izolatları ile gelişen toplumdan kazanılmış enfeksiyonlar birçok ülke için önemli bir sorun
- Risk faktörleri
 - Hastaneye yatış
 - Antibiyotik kullanımı
 - Üriner kateter
 - İleri yaş
 - Diyabet



- *Klebsiella pneumoniae* ve *E.coli* izolatlarında GSBL pozitifliği:
 - Güney Amerika, Asya ve **Hindistan**'da yüksek
 - Kuzey Amerika ve Avrupa'da düşük; **İsveç**'te < %3
- İsveç dahil birçok ülkede fekal taşıyıcılık oranı ?
- Retrospektif çalışmalar→Yabancı ülkelere seyahat GSBL (+) bakteriler ile enfeksiyon ve fekal taşıyıcılık için risk faktörü



Çalışmanın Amacı:

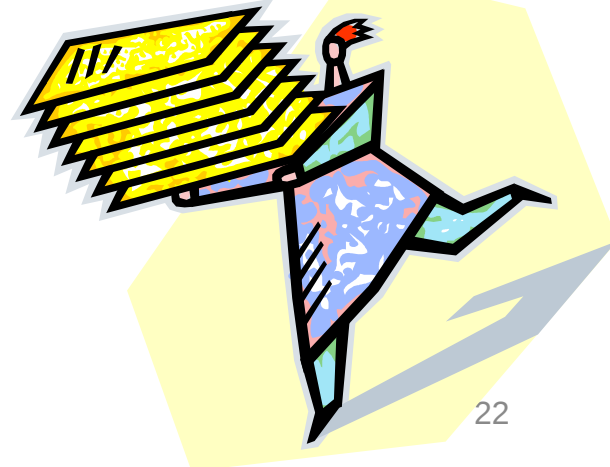
- Yabancı ülkelere seyahatin GSBL (+) *Enterobacteriaceae* ile fekal kolonizasyona etkisinin ve taşıyıcılarda 6 ay sonraki durumun **prospektif** olarak araştırılması
- GSBL (+) *Enterobacteriaceae* ile fekal kolonizasyonda seyahat ile ilgili risk faktörlerinin belirlenmesi (gidilen yer, gastroenterit, antibiyotik kullanımı)

Gereç ve Yöntemler:

■ Çalışma planı:

Kasım 2007 tarihinden itibaren 15 aylık süre içinde seyahate çıkan gönüllüler

- Seyahat öncesi ve sonrası
 - Fekal örnekler
 - Anket formu
- GSBL (+) bulunan kişilerde 6 ay sonra tekrarlanmıs



Gereç ve Yöntemler:

- GSBL (+) bakterilerin saptanması: Sinerji testi
- GSBL tiplendirmesi: PCR, dizi analizi
- Antibiyotik duyarlılık: E test, sonuçlar EUCAST standartlarına göre değerlendirilmiş
- Diyarejenik *E.coli* tanımlanması: EPEC, ETEC, EHEC, EIEC, EAgEC ile ilişkili 6 spesifik virülans genine bakılmış (PCR)
- İstatiksel analiz: McNemar, Pearson, Wilcoxon testleri

Sonuçlar:

Çalışma popülasyonu:

- 100 gönüllü
 - 55 kadın+45 erkek
 - Ortalama 43 (2- 84) yaş
- Ortalama seyahat süresi 2 hafta (1-26 hafta)
- Toplam 35 ülke; 15 kişi bir ülkeden fazla yere, 3 kişi birden fazla kıtaya seyahat etmiş



Sonuçlar:

GSBL (+) *Enterobacteriaceae*:

- 24 GSBL (+) *E.coli* ($P < 0.001$)
- Tümü CTX-M (+); 11'inde TEM (+), 3'ünde SHV (+)

TABLE 2. Distribution of CTX-M genes detected in 24 strains of *Escherichia coli* isolated from rectal swabs after foreign travel^a

Continent or region	No. of isolates				
	Group I		Group IV		
	CTX-M- 1	CTX-M- 15	CTX-M- 9	CTX-M- 14	CTX-M- 27
Africa		1			
Asia (India excluded)		2	1	5	2
India		7			
Southern Europe	1	1			
Middle East		2	2		
Total	1	13	3	5	2

^a PCR amplification with subtype-specific primers was used.

Sonuçlar:

Antibiyotik duyarlılık

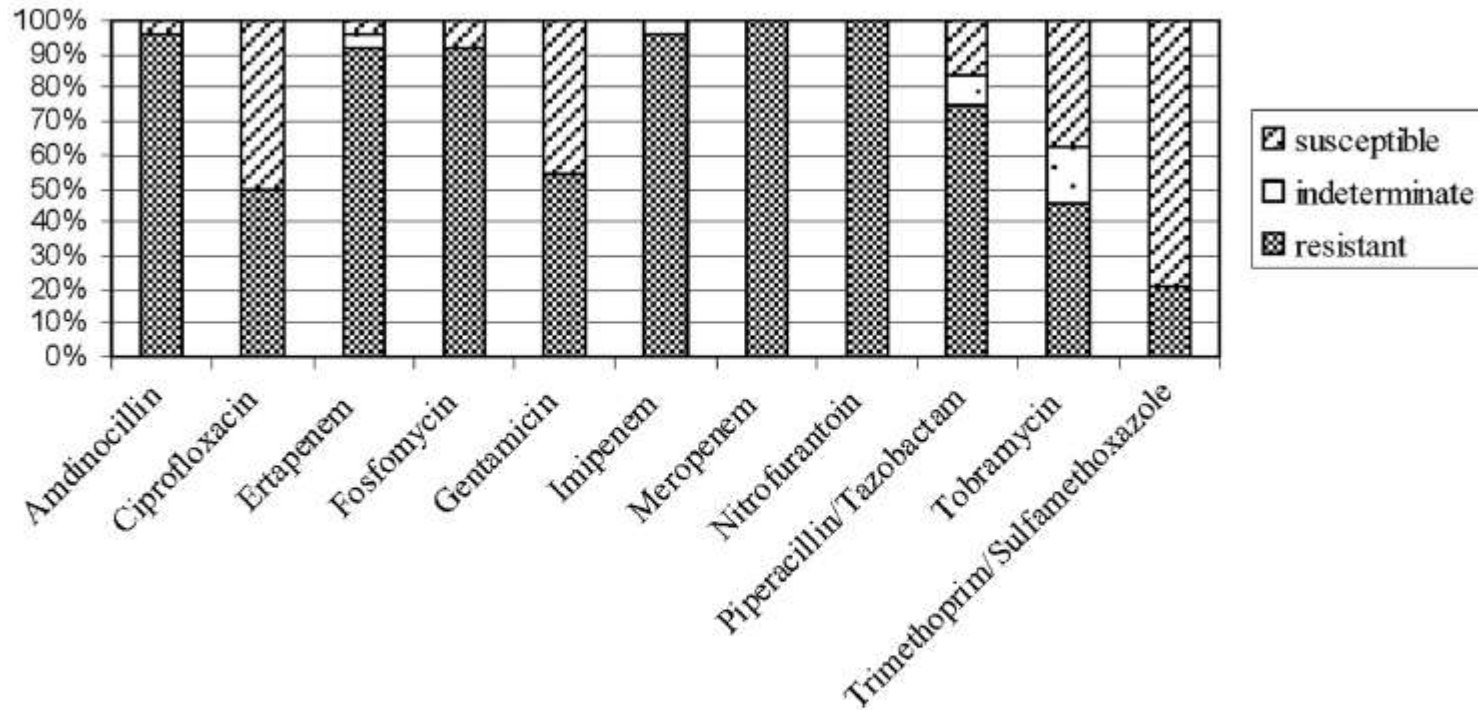


FIG. 1. *In vitro* antibiotic susceptibilities of 24 ESBL-producing *Escherichia coli* strains acquired after foreign travel. Susceptibilities

9 izolatta 2 den fazla antibiyotik grubuna direnç saptanmış

Sonuçlar:

Seyahat ile ilişkili risk faktörleri

TABLE 3. Travel destinations of travelers who were negative for ESBL-producing strains before the trip and rate of fecal colonization with ESBL-producing *E. coli* strains upon return^a

Continent or region	No. of travelers	No. (%) of travelers positive for ESBL-producing isolates
Africa	25	1 (4)
Asia (India excluded)	31	10 (32)
Central America	6	0 (0)
India	8	7 (88)
Middle East	14	4 (29)
North America	2	0 (0)
South America	1	0 (0)
Southern Europe	16	2 (13)

^a The rate of acquisition of ESBL-producing strains was highest for travelers visiting India ($P < 0.001$). Three participants visited more than one continent, and therefore, the sum of travelers in this table exceeds the actual number of 100.

Sonuçlar:

Seyahat ile ilişkili risk faktörleri

- Gastroenterit (+) ($P=0.03$) → Tek bir izolat EPEC olarak saptanmış (gastroenterit Ø).
- Antibiyotik (10 kişi)

Sefalosporin, tetrasiklin, penisilin ve eritromisin kullanan 7 kişide kolonizasyon yok

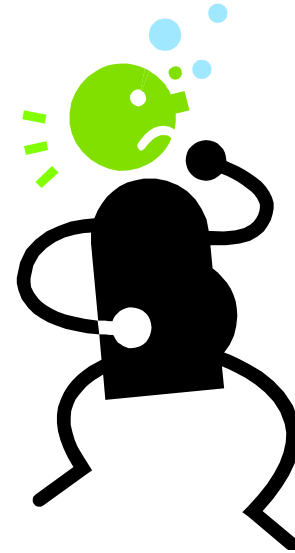
Gastroenterit nedeniyle siprofloksasin kullanan 3 kişide GSBL (-) *E.coli*



Sonuçlar:

Altı ay sonunda GSBL (+) bakteri persistansı:

- 21 kişi çalışmayı tamamlayabilmiş→
5'inde (% 23.8) GSBL (+) bakteri persistansı
saptanmış



Tartışma:



- Çalışma sonuçları GSBL (+) suşların yüksek oranda bulunduğu bölgelere seyahatin bu suşlarla kolonizasyon riskini artırdığını ortaya koymakta
- GSBL (+) suşların hepsinde CTX-M genleri mevcut→GSBL pandemisinde bu enzim tipinin artan oranlarda saptandığına ilişkin bilgileri doğrulamakta
- En sık CTX-M-15 enziminin saptanması, bu enzimin yeryüzünde artan sıklıkta görüldüğü bilgileri ile uyumlu

Tartışma:

- CTX-M tipleri ile gidilen yer arasında korelasyon var (sayı ↓)

Saptanan GSBL (+) izolatların seyahat sırasında kazanıldığını doğrulamakta

- Diğer antibiyotiklere korezistans olması GSBL (+) *E.coli* izolatları için beklenen bir durum. Dokuz izolatta 2 den fazla antibiyotik grubuna direnç saptanması **tedavide sorun !**

Nitrofurantoin ve amdinosisilin empirik olarak tedavide kullanılabilir

Tartışma:



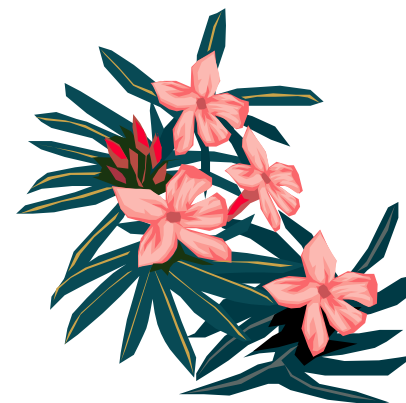
- Seyahat ile ilgili risk faktörleri
 - Hindistan*, diğer Asya ve Orta Doğu ülkelerine seyahat
 - Seyahat sırasında gastroenterit geçirme (kolonizasyona neden olan GSBL + suşlar gastroenterite yol açmıyor, bu kişiler benzer kaynaklardan GSBL – diyarejenik *E.coli* suşlarını da alıyorlar)
 - Seyahat sırasında antibiyotik kullanımı risk faktörü oluşturmuyor
- Kolonizasyon persistans oranı %23.8. Bu oran hastanede yatan hastalarda saptanan oranlarla benzer.



Invasive Serotype 1 *Streptococcus pneumoniae* Outbreaks in the South Pacific from 2000 to 2007[∇]

S. Le Hello,^{1*} M. Watson,² M. Levy,³ S. Marcon,¹ M. Brown,⁴
J. F. Yvon,⁵ I. Missotte,⁶ and B. Garin¹

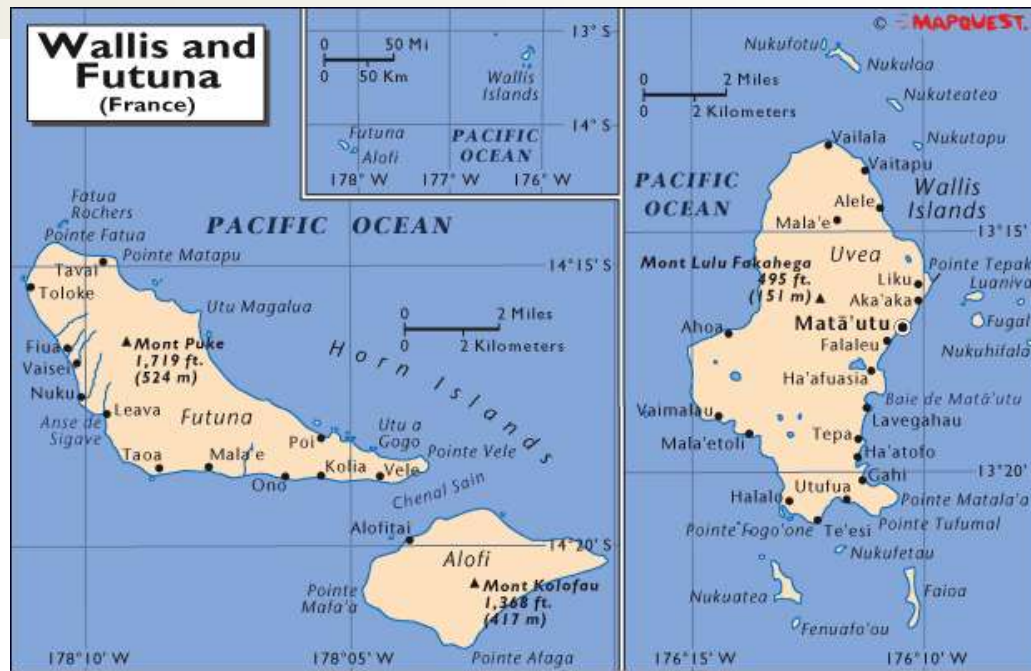
*Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Nouméa, New Caledonia*¹; *Clinipath Pathology, West Perth, Western Australia*²; *Centre Hospitalier Territorial Mamao, Tahiti, French Polynesia*³; *Pneumococcal Reference Laboratory, Westmead Hospital, Westmead NSW, Australia*⁴; *Hôpital de Sia, Wallis and Futuna*⁵; and *Centre Hospitalier de Magenta, Noumea, New Caledonia*⁶



Yeni Kaledonya ve Fransız Polinezyası'nda 2000-2007 yılları arasında yapılmış bir s rveyans  alışması







- İnvaziv pnömokok enfeksiyonları morbidite ve mortalitenin önemli nedeni
- *Streptococcus pneumoniae* serotip 1 en önemli serotiplerden. Küçük ve kapalı toplumlarda salgınlara yol açan birkaç serotipten birisi
- 2 yaş altı bebeklerde önerilen heptavalan konjuge pnömokok aşısı: Serotip 4, 6B, 9V,14,18C,19, 23F



Gereç ve Yöntemler:

İzolatlar :

- İnvaziv izolatlar → Steril vücut sıvılarından (kan, BOS, plevral sıvı)
- Serotiplendirme: Quellung reaksiyonu
- Antibiyotik duyarlılık: Penisilin, amoksisilin, sefotaksim

Serotip 1 izolatlar

- Yeni Kaledonya → 96 izolat (80 invaziv , 15 non invaziv , 1 taşıyıcı) (Ocak 2000-Aralık 2007)
 - Fransız Polinezya'sı → 40 invaziv izolat (2002-2005)
 - Wallis ve Futuna → 3 invaziv, 3 non invaziv
 - Yeni Güney Galler → 3 invaziv, 3 non invaziv
- } 2003-2005

Gereç ve Yöntemler:

Moleküler yöntemler:

- “Pulse field gel electrophoresis” (PFGE) → Toplam 141 (96 Yeni Kaledonya, 33 Fransız Polinezyası, 6 Wallis ve Futuna, 6 Avusturalya) izolat moleküler analiz için çalışmaya alınmış
- Multilokus sekans tiplendirme (MLST) → PFGE ile seçilen 32 serotip 1 izolat

İstatiksel analiz

- Student t test, X^2 testi



Sonuçlar:

Yeni Kaledonya'da

- Toplam 1436 izolatın 437'si (%30,4) invaziv pnömokok.
- İnsidans hızı 24 /100.000 kişi / yıl

TABLE 1. Cases and annual estimated rates of IPD in New Caledonia

Yr	No. of cases of:				Total no. of cases	Case rate per 100,000 inhabitants/yr ^a (95% CI)
	Serotype 1	Serotype 4	Serotype 7F	Other serotype		
2000	50	5	1	31	87	41.0
2001	12	6	4	29	51	23.6
2002	2	3	9	28	42	19.1
2003	0	6	9	32	47	20.9
2004	1	11	9	31	52	22.5
2005	1	5	6	21	33	14.0
2006	2	10	6	31	49	20.4
2007	12	12	11	41	76	31.1
Total	80	58	55	244	437	24.0

^a According to the INSEE census, the population size in 1996 was 196,836, and that in 2004 was 230,789, with an increase of 1.9 % per annum.

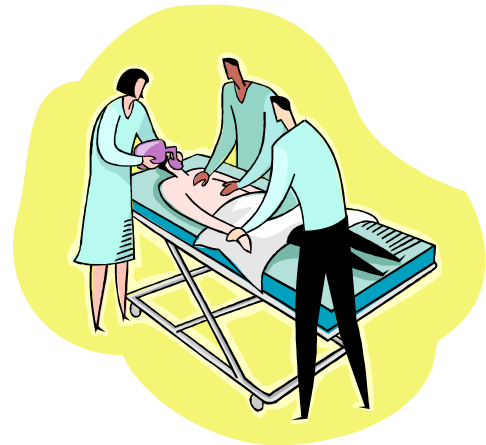
Sonuçlar:

- Yeni Kaledonya'da invaziv izolatların (n=437) örneklerle göre dağılımı

Kan izolatları → %85.1

BOS → %11.5

Plevral sıvı → %3.4



Sonuçlar:

TABLE 1. Cases and annual estimated rates of IPD in New Caledonia

Yr	No. of cases of:				Total no. of cases	Case rate per 100,000 inhabitants/yr ^a (95% CI)
	Serotype 1	Serotype 4	Serotype 7F	Other serotype		
2000	50	5	1	31	87	41.0
2001	12	6	4	29	51	23.6
2002	2	3	9	28	42	19.1
2003	0	6	9	32	47	20.9
2004	1	11	9	31	52	22.5
2005	1	5	6	21	33	14.0
2006	2	10	6	31	49	20.4
2007	12	12	11	41	76	31.1
Total	80	58	55	244	437	24.0

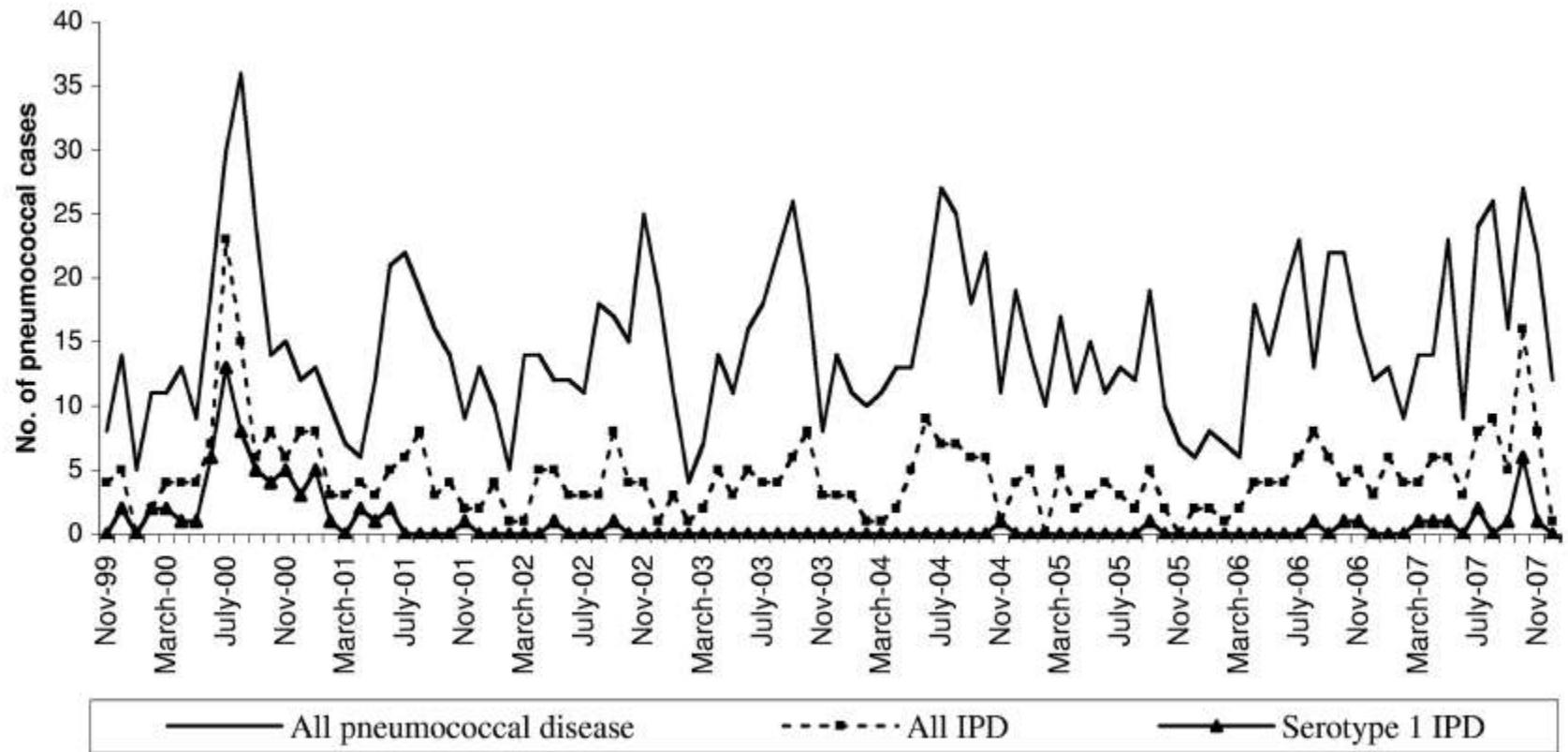
^a According to the INSEE census, the population size in 1996 was 196,836, and that in 2004 was 230,789, with an increase of 1.9 % per annum.

Serotip 1 → %18.3

Serotip 4 → %13.3

Serotip 7F → % 12.6

Sonuçlar:



Sonuçlar:

TABLE 1. Cases and annual estimated rates of IPD in New Caledonia

Yr	No. of cases of:				Total no. of cases	Case rate per 100,000 inhabitants/yr ^a (95% CI)
	Serotype 1	Serotype 4	Serotype 7F	Other serotype		
2000	50	5	1	31	87	41.0
2001	12	6	4	29	51	23.6
2002	2	3	9	28	42	19.1
2003	0	6	9	32	47	20.9
2004	1	11	9	31	52	22.5
2005	1	5	6	21	33	14.0
2006	2	10	6	31	49	20.4
2007	12	12	11	41	76	31.1
Total	80	58	55	244	437	24.0

^a According to the INSEE census, the population size in 1996 was 196,836, and that in 2004 was 230,789, with an increase of 1.9 % per annum.

56

28'i genç erişkinler (15-39 yaş)

P<0.01

Sonuçlar:

- 2000 salgınında
 - Tüm hastalar hastanede izlenmiş
 - 44/56 (%78) hastada risk faktörü saptanmamış ($P<0.01$)
 - Vakaların dağılımı 42 pnömoni (+ kan kültürü), 14 bakteriyemi
 - Ölüm yok

- 2007 salgınında (Temmuz-Kasım)
 - İnsidans düşük
 - Vakaların ~ %50 si < 8 yaş ($P=0.02$)
 - İlk menenjit olgusu +

Sonuçlar:

- Fransız Polinezyası'nda serotip 1 prevalansı:

2002→%52.1

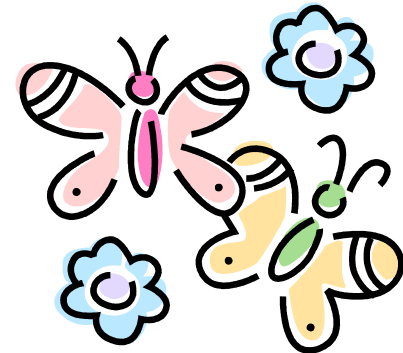
Salgın

2003→%25.8

2004→%10.3

2005→%13.3

- Tüm izolatlar test edilen antibiyotiklere duyarlı bulunmuş



Sonuçlar:

► PFGE de test edilen 141 serotip 1 izolatında

■ Üç farklı pulsotip saptanmış

Tip A (130 izolat-her 4 ülkeden)

Tip B (1 izolat-Avusturalya)

Tip C (10 izolat-Avusturalya ve Fransız Polinezya'sı)

► MLST sonuçları

Tip A→ST306 (2000-2007 salgınlarında)

2 izolatta (Yeni Kaledonya 2007) yeni ST

Tip B →ST227 (Avusturalya)

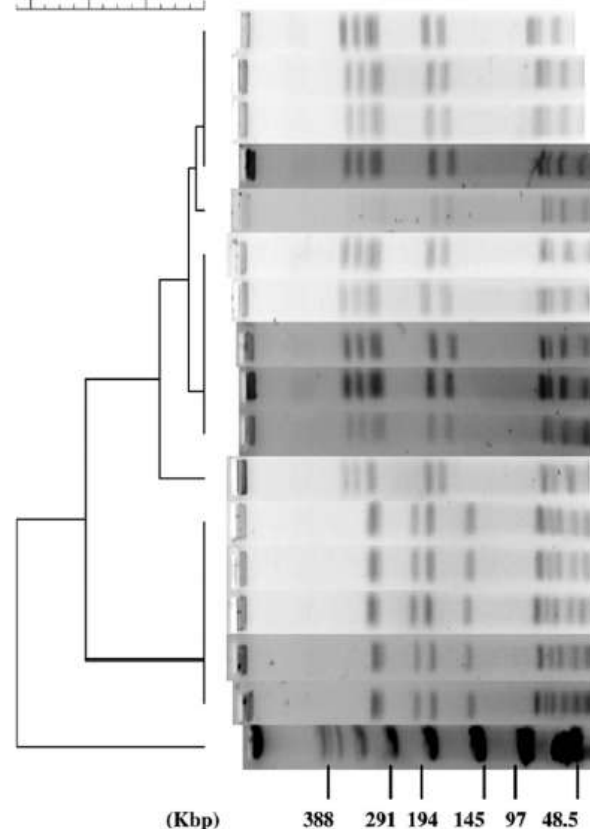
Tip C →ST304 (Avusturalya ve Fransız Polinezya'sı)

Dice (Opt:1.50%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.%]

pneumo

pneumo

40 60 80 100



Serotype	Strain	Specimens	Country of isolation	Date of isolation	PFGE subtype	MLST
1	Aus6968	blood culture	Australia	2005	A1	306
1	H769	blood culture	New Caledonia	2001	A1	306
1	H755	blood culture	New Caledonia	2000	A1	306
1	T2003 n° 5	blood culture	French Polynesia	2003	A1	306
1	H1988	spinal fluid	New Caledonia	2007	A2	3717 (SLV-306)
1	H639	sputum	Wallis&Futuna	2000	A3	306
1	P1444	nasal swab	New Caledonia	2003	A3	306
1	T2003 n° 3	blood culture	French Polynesia	2003	A3	
1	T2003 n° 6	peritoneal fluid	French Polynesia	2003	A3	
1	T2003 n° 7	blood culture	French Polynesia	2003	A3	306
1	Aus 3713	blood culture	Australia	2003	B1	227
1	Aus 6960	blood culture	Australia	2005	C1	304
1	Aus 6927	blood culture	Australia	2005	C1	
1	Aus 6862	blood culture	Australia	2005	C1	
1	T2002 n° 23	blood culture	French Polynesia	2002	C1	304
1	T2003 n° 1	blood culture	French Polynesia	2003	C1	304
	ladder					

FIG. 2. Phylogenetic analysis of 5 representative PFGE profiles (A1, A2, A3, B1, and C1) obtained among 141 *S. pneumoniae* isolates. Serotypes, strain designations, types of specimen, countries and dates of isolation, PFGE types and subtypes, and STs are listed to the right of the patterns. SLV, single-locus variant.



Tartışma:

- Yeni Kaledonya'nın epidemiyolojik özellikleri farklı
 - En sık rastlanan serotipler (Mayıs 1999-Mayıs 2000)→ 1 (%20)*, 23F (%10), 12F (%8), 19F (%8) ve 6B (%5)
- ST306 'nın 2000'den 2007'ye değişiklik göstermemesi bu klonun çok stabil olduğunu ortaya koymakta.
 - ST306 serotip 1'in en önemli sekans tipi. Avrupa; Amerika ve Kanada'da fazla.

Bu çalışma Güney Pasifik'te de bu tipin önemli olduğunu ortaya koymuş. Bu klon sağlıklı kişilerde pnömoni ve bakteriyemi oluşturma eğiliminde

Tartışma:

- Yeni Kaledonya'da 2003'te nazofarenks taşıyıcılarında (2-24 aylık bebekler) 544 izolattan yalnızca biri serotip 1, aynı yıl serotip1 ile çok az sayıda invaziv enfeksiyon görülmüş

Güney Pasifik'te bu serotip endemik olarak bulunmuyor. Salgınlara neden oluyor.

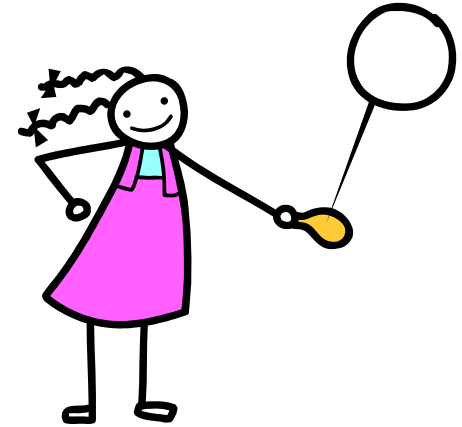


Tartışma:

- Yeni Kaledonya'da 2005 yılında 2 yaş altı bebekler PCV7 ile immünizasyon programına alındıktan sonra bu grupta invaziv pnömokok enfeksiyonlarında yarıdan fazla azalma görülmüş. **Serotip 1 haricinde** aşının kapsamadığı invaziv tiplerle ortaya çıkan enfeksiyonlarda istatistiksel açıdan önemli bir artış saptanmamış.

Bu bölgede serotip 1 ST306 ile ortaya çıkan salgınların önlenmesinde konjuge aşı yeterli değil.

Bu alışma yeni kuşak konjuge pnömokok aşılarının, yeryüzünde farklı dağılım gösteren ve aşıya dahil olmayan invaziv suşları da kapsayacak şekilde hazırlanmasının gerekliliğini vurgulamaktadır



Teşekkür ederim



JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Oct. 2010, p. 4904–4911

Vol. 192, No. 19

0021-9193/10/\$12.00 doi:10.1128/JB.00445-10

Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Human Hypervirulent *Clostridium difficile* Strains Exhibit Increased Sporulation as Well as Robust Toxin Production[∇]

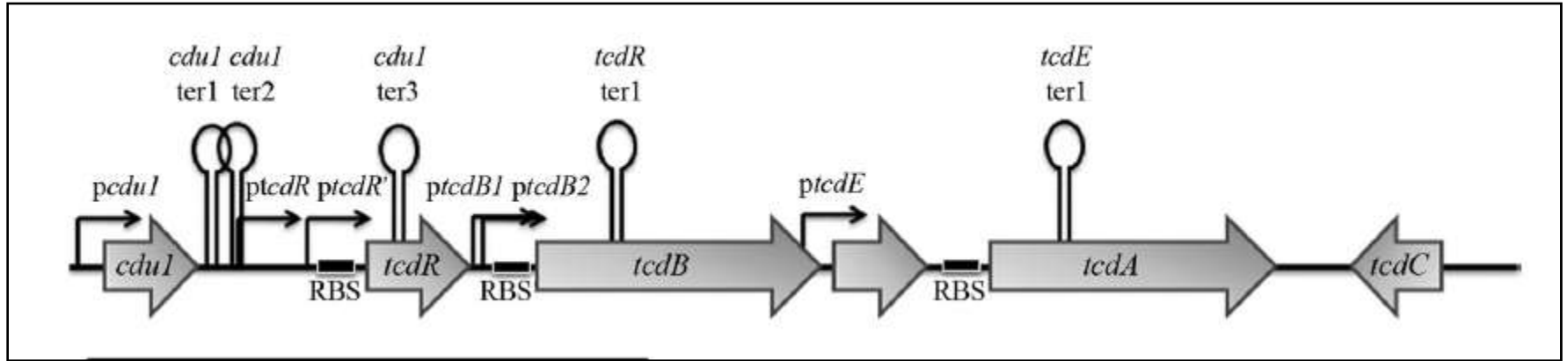
Michelle Merrigan,¹ Anilrudh Venugopal,¹ Michael Mallozzi,⁴ Bryan Roxas,⁴ V. K. Viswanathan,⁴
Stuart Johnson,^{1,2} Dale N. Gerding,^{1,2} and Gayatri Vedantam^{3,4*}

Loyola University Medical Center, Maywood, Illinois¹; Hines VA Hospital, Hines, Illinois²; Southern Arizona VA Healthcare System, Tucson, Arizona³; and University of Arizona, Tucson, Arizona⁴

- Hipervirülan (HV) *Clostridium difficile* suşları
 - 2000 yılından bu yana ağır seyirli ve yüksek mortaliteye yol açan epidemilere neden olmakta
 - Farklı moleküler metodlarla ayrı bir filogenetik grupta yer aldığı belirlenmiş
 - Tiplendirme
 - “Restriction endonuclease” analiz (REA) → grup BI
 - “Pulsed field gel electrophoresis” → tip NAP1
 - PCR ile ribotiplendirme → ribotip 027
 - Toksin gen polimorfizm tiplendirme → toksinotip III

 **BI/NAP/027 suşları**

Patojenite loküs'ü



PaLoc

Toksin genleri: *tcdA*, *tcdB*

Regülatör genler: *tcdC* (negatif regülatör)

tcdR (aktivatör/sigma faktör)

- 
- *C.difficile* toksinleri TcdA ve TcdB üremenin duraklama döneminde besin maddelerinin azalmasına reaksiyon olarak salgılanmakta
 - Hipervirülansta bu iki toksinin miktarı ve bunun enfeksiyonun ciddiyetine etkileri araştırma konusu

- 
- Akerlund ve ark. (2006) bir HV suşun **3-13 kez daha fazla miktarda** toksin yaptığını göstermiş
 - Freeman ve ark. (2007) yapılan ortalama toksin titrelerinin değişmediğini yalnız HV suşlarda **daha uzun süreler toksin yapımı** olduğunu göstermiş
 - Warny ve ark. (2005) HV suşlarda toksin A (X16) ve B nin (x23) **daha fazla yapıldığını**, ayrıca bu suşların **logaritmik fazda da toksin ürettiğini** göstermiş

- 
- HV suşlarda toksin disregülasyonuna **TcdC de bir eksiğin** yol açabileceği öne sürülmüş
 - *tcdA* ve *tcdB* genlerinin tersine ***tcdC* geninin üremenin logaritmik** fazında eksprese edildiği bir çalışmada gösterilmiş
 - ▶ HV suşlarda ***tcdC* varyasyonu olduğu gösterilmiş olmasına rağmen bunun hipervirülans ile doğrudan ilişkisi ?**
 - HV suşlarda spor yapımı ↑ **sporulasyonun etkisi?**

Çalışmanın Amacı:

- HV *C.difficile* suşlarında TcdA/B gerçekten daha fazla mı yapılmakta
- Sporulasyon gibi üreme ile ilgili diğer parametrelerin rolü var mı

Gereç ve Yöntemler:

■ Sekiz suş ile çalışılmış

TABLE 1. Strain designations, origins, and characterizations

Strain designation ^a	Isolate no.	Yr	Source	Toxigenic ^b	Hypervirulent ^c
R23 (630)	6396	1982	Switzerland	Yes	No
Z3 (VPI 10463)	5707	1980	Eastern United States	Yes	No
J9	4478	1987	IL	Yes	No
K14	5780	1994	IL	Yes	No
BI-6	6336	2003	OR	Yes	Yes
BI-8	6477	2004	ME	Yes	Yes
BI-17	6443	2004	Montreal, Canada	Yes	Yes
BI-23	6654	2007	Eastern United States	Yes	Yes

^a Strain designation by REA type. The more common strain designations for strains R23 and Z3, as reported in the literature, appear in parentheses.

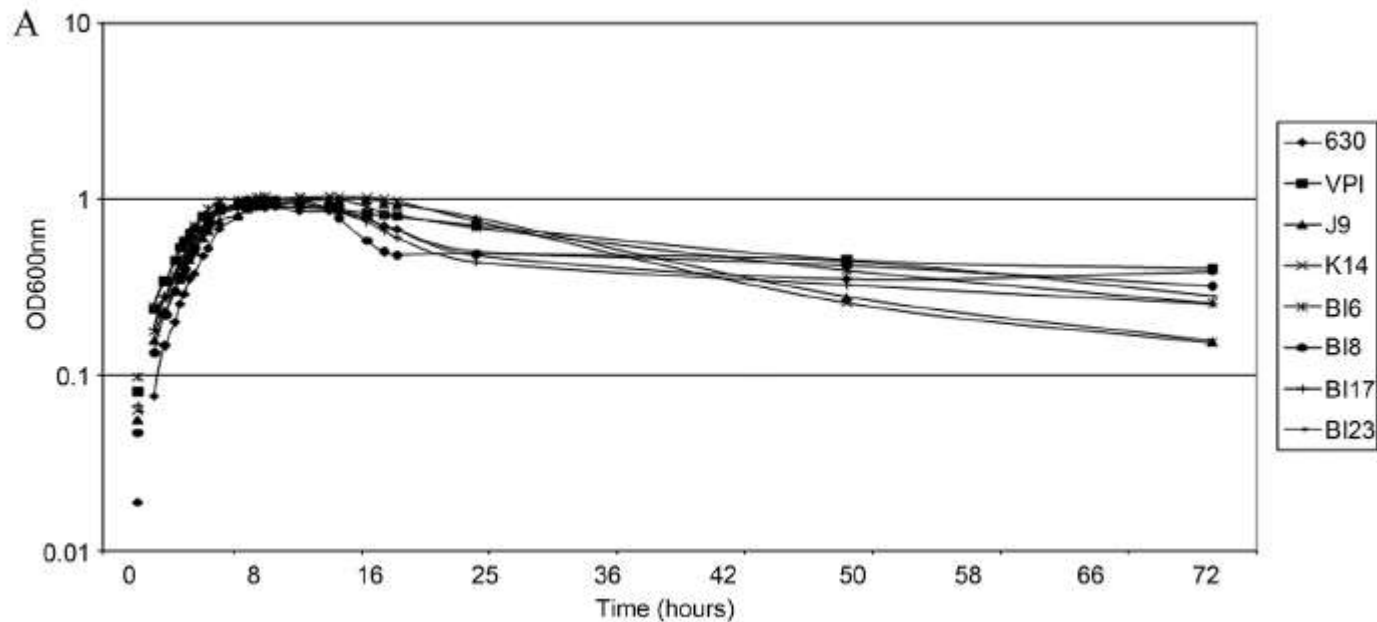
^b Toxigenic status as determined by *in vitro* cytotoxicity, as well as toxin A immunoassays of culture supernatants.

^c Hypervirulence as defined by association with recent hospital outbreaks of severe clinical disease.

Gereç ve Yöntemler:

- Toksin miktarı ELISA yöntemi ile Wampole Tox A/B kiti ile ölçülmüş
- Üremenin hem logaritmik hem de duraklama dönemlerinde toksin gen ekspresyonuna kantitatif “real-time PCR” ile bakılmış (PaLoc genlerinin tümü)
- Üreme dönemleri süresince spor yoğunlunun ölçümü için mikroskopi ve %1 safra tuzu içeren früktoz agar besiyerine ekim yöntemleri kullanılmış.

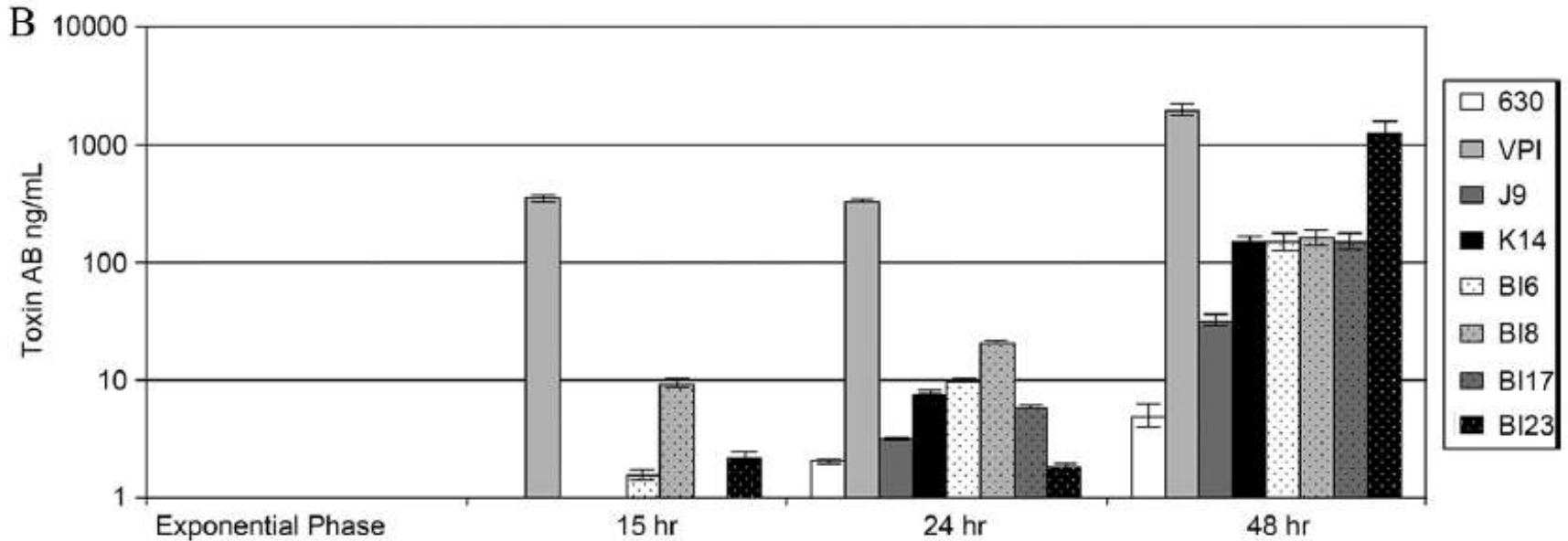
- HV suşlar non-HV olanlara göre üreme açısından bir defekt ya da avantaj göstermemiş



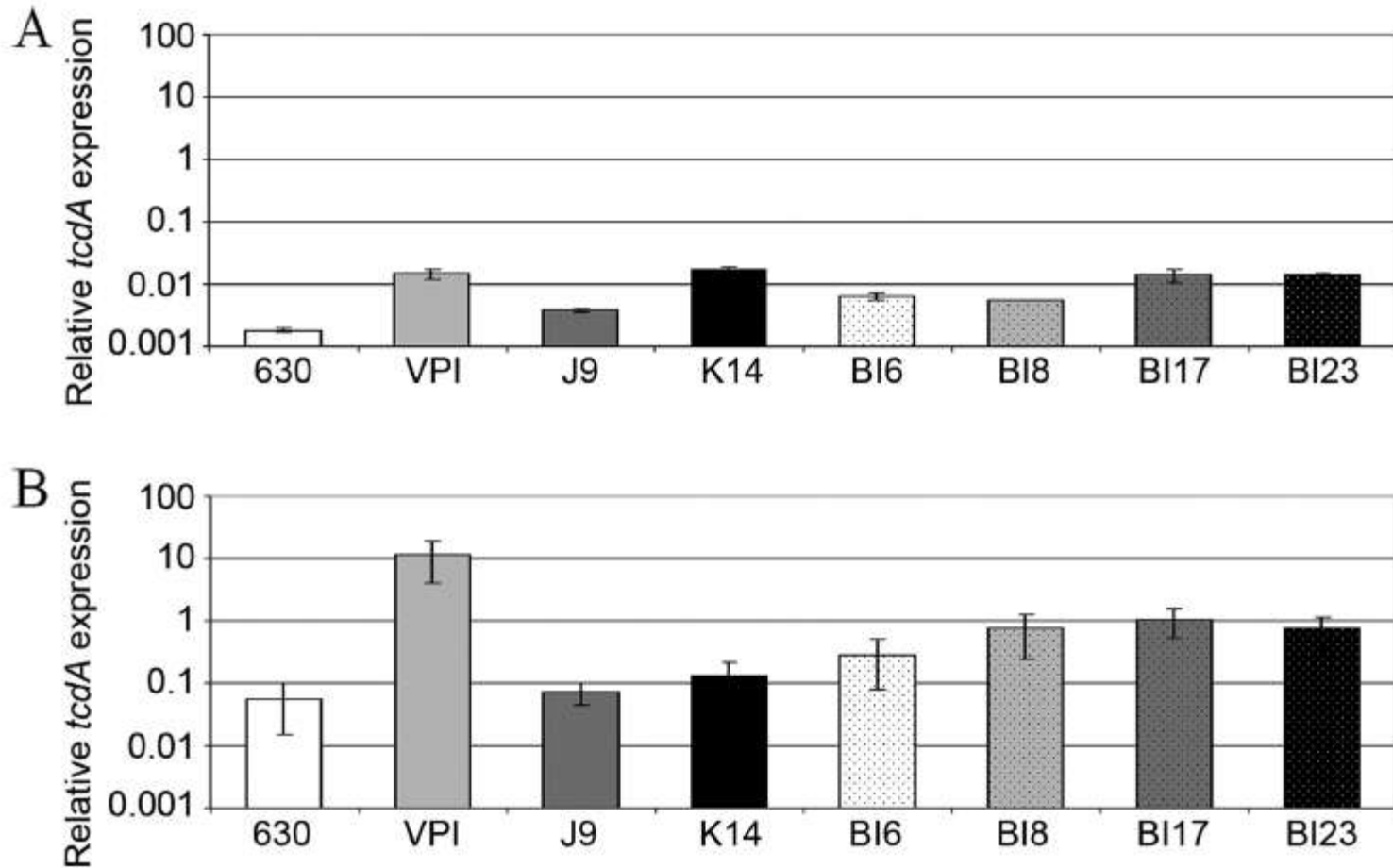


Sonuçlar:

- Suşların tümünde logaritmik üreme fazında toksin ölçülebilir düzeylerin altındaymış.
- En fazla toksini non-HV VPI suşu 48 saatte üretmiş
- HV ve non-HV gruplarının ortalama değerleri arasında olarak önemli fark bulunmamış ($P \geq 0.72$)

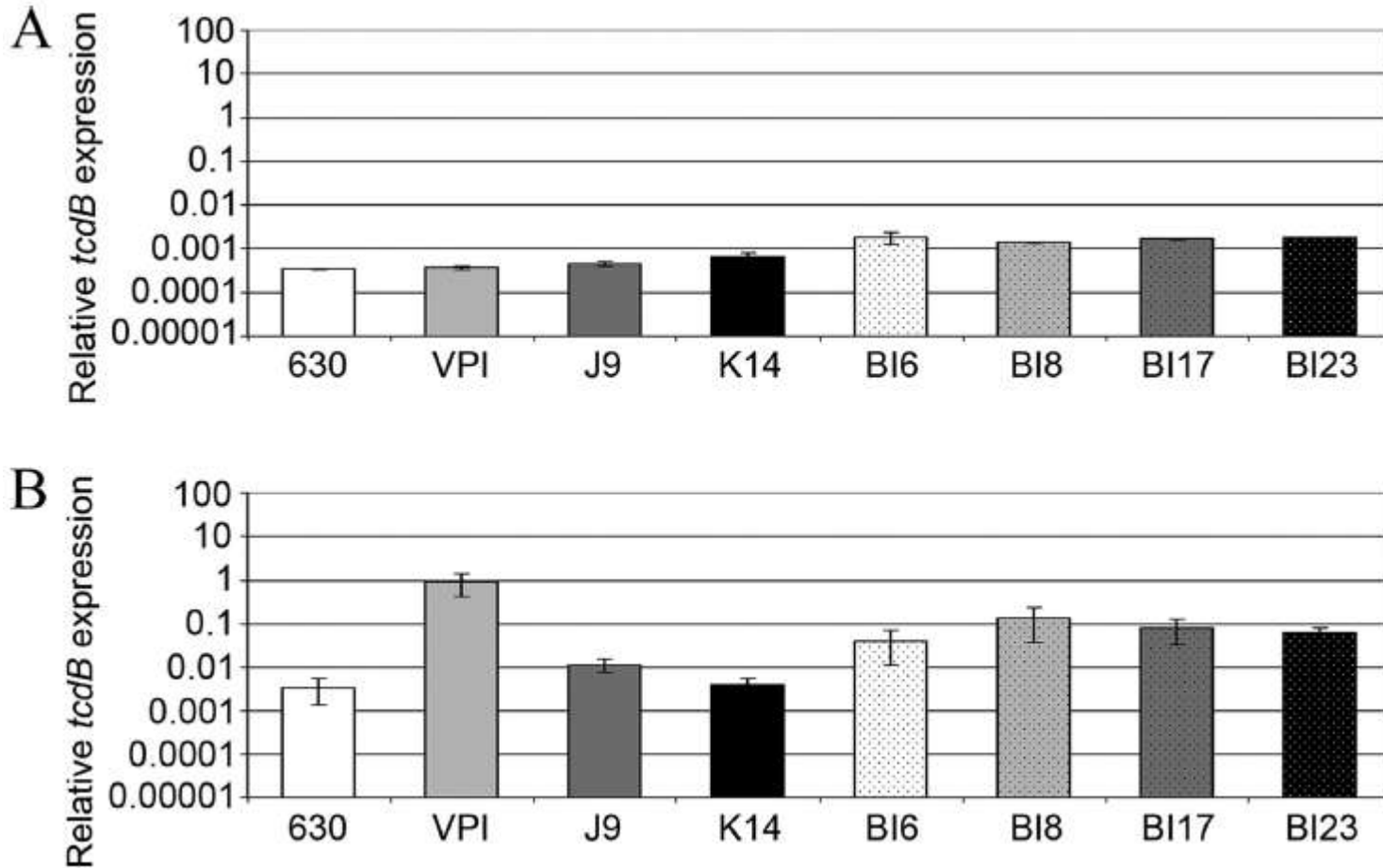


Sonuçlar:



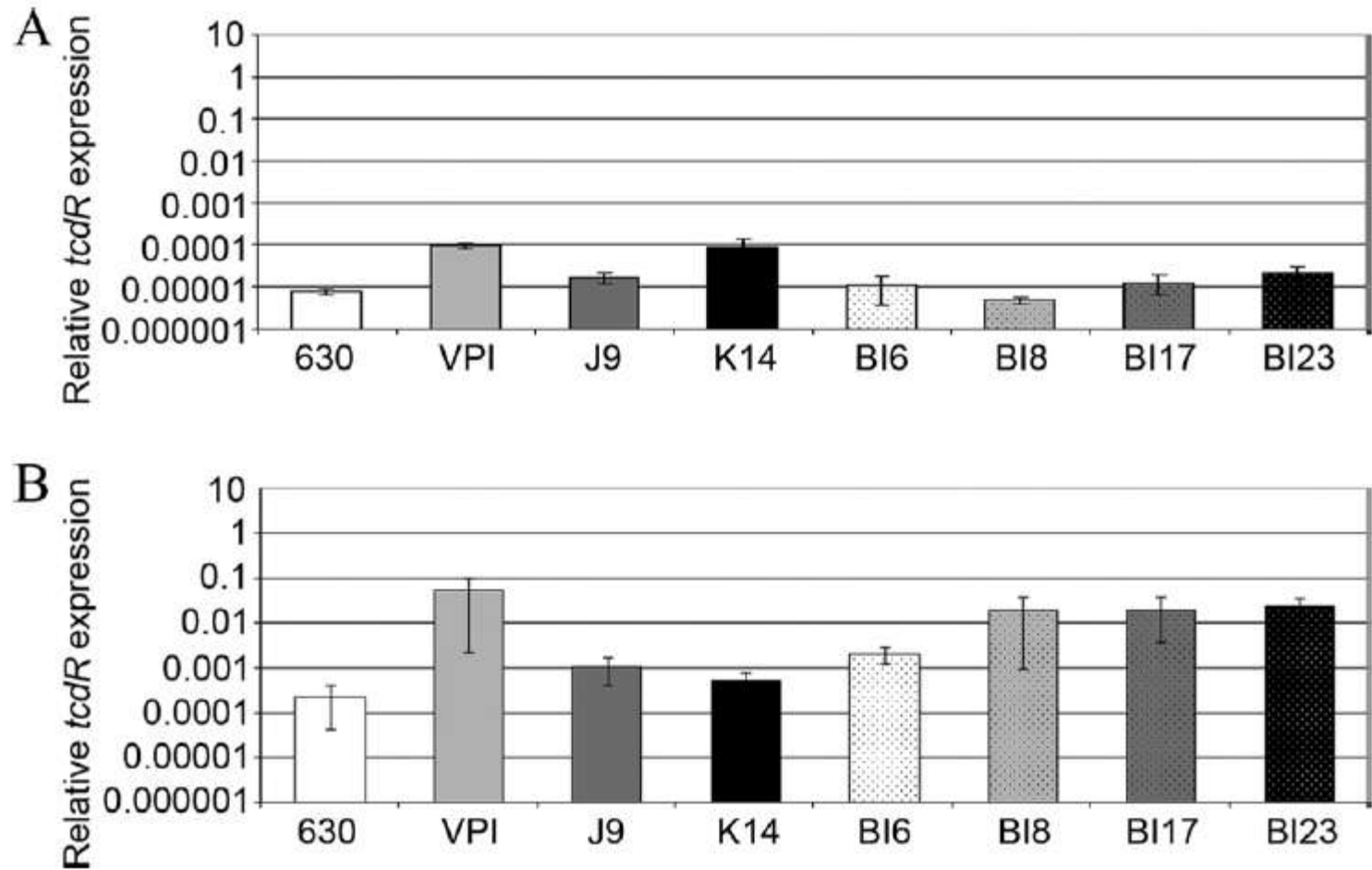
Üremenin Logaritmik ve Duraklama Dönemlerinde *tcdA* gen ekspresyonu

Sonuçlar:



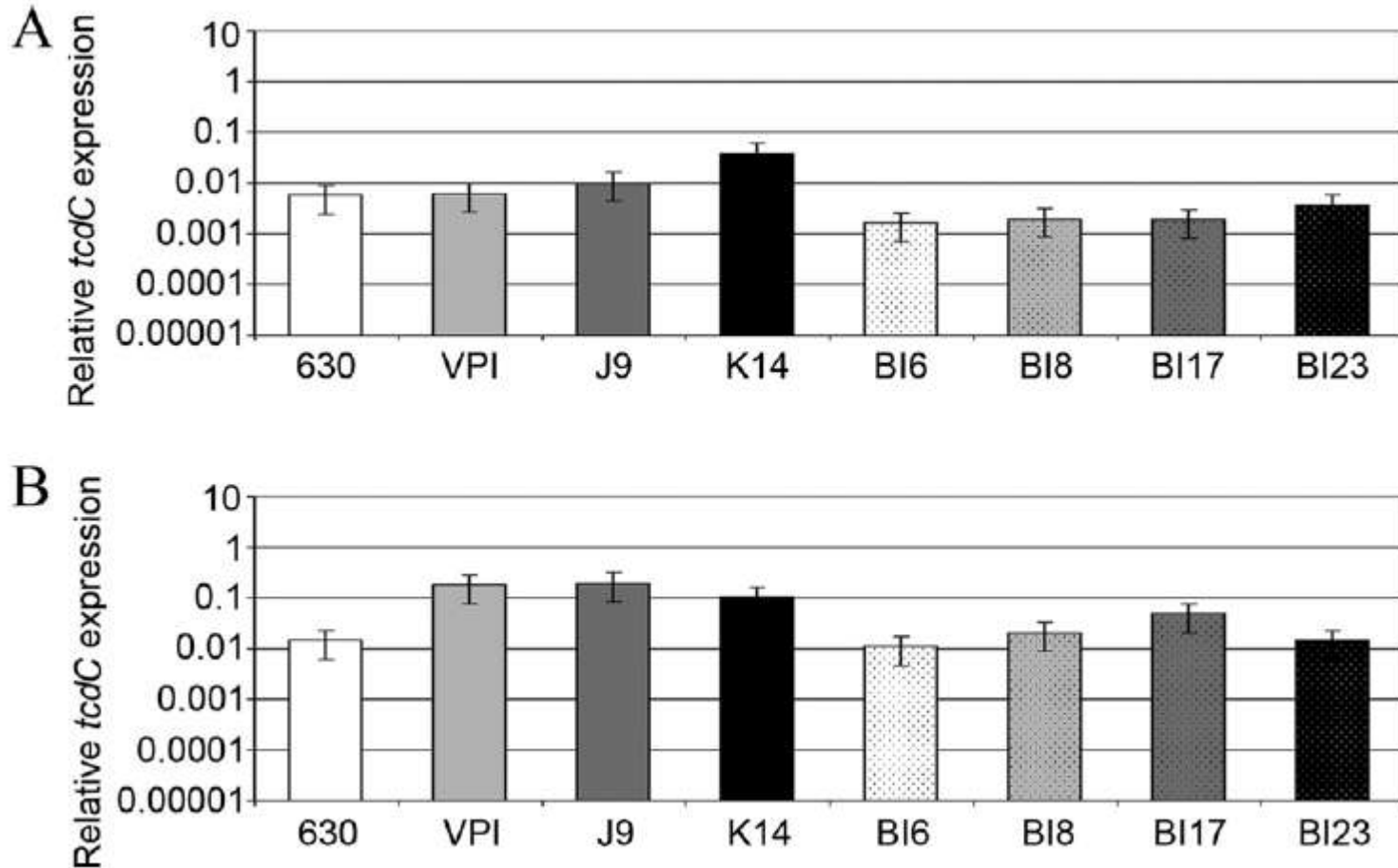
Üremenin Logaritmik ve Duraklama Dönemlerinde *tcd B* gen ekspresyonu

Sonuçlar:



Üremenin Logaritmik ve Duraklama Dönemlerinde *tcdR* aktivator gen ekspresyonu

Sonuçlar:



Üremenin Logaritmik ve Duraklama Dönemlerinde *tcdC* negatif regülatör gen ekspresyonu



Sonuçlar:

- Spor oluşumu: HV suşlarda üreme siklusu sırasında spor oluşumu hem daha erken başlamakta hem de kültürün total hacminde daha çok sayıda spor birikmekte

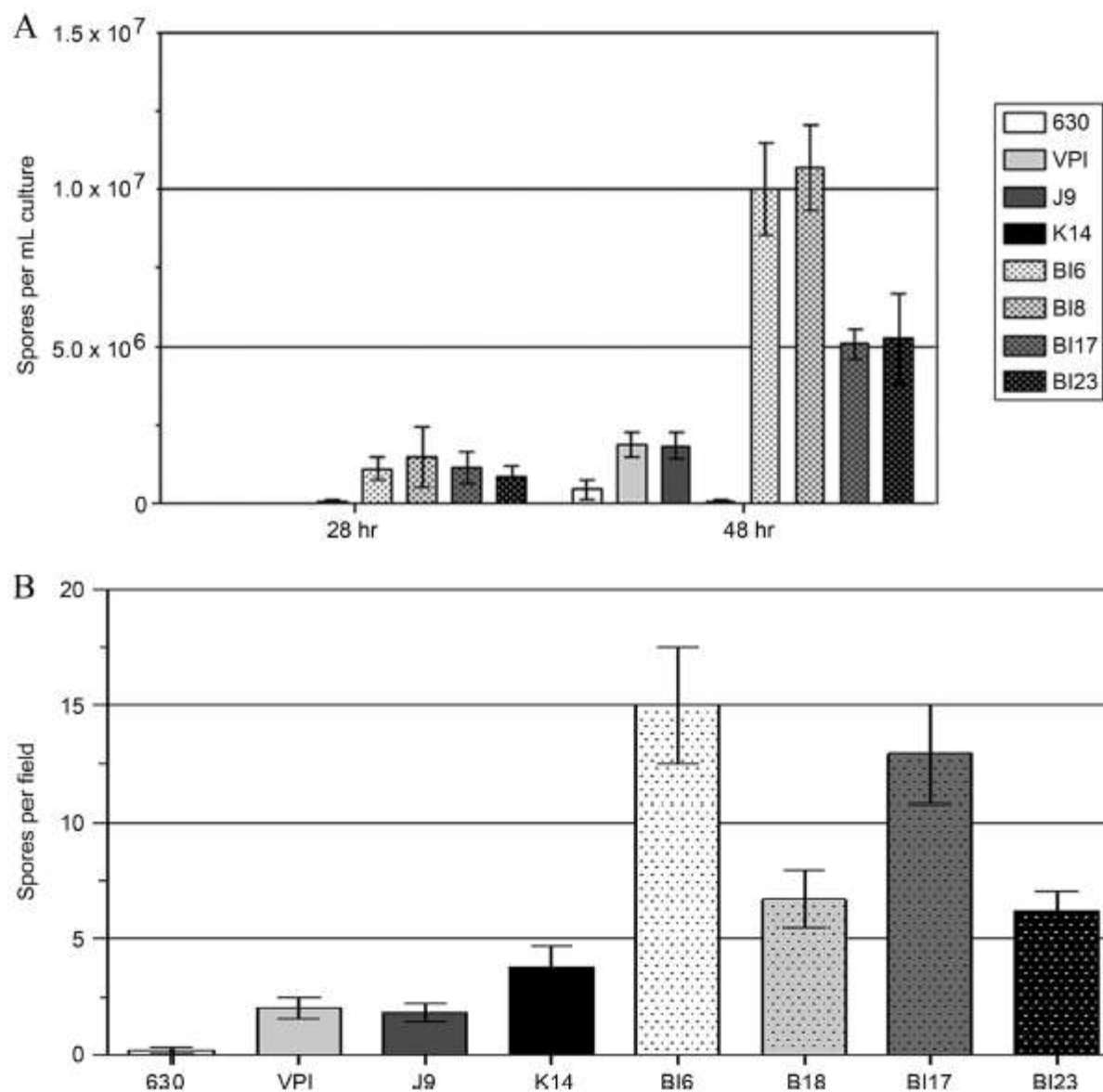


FIG. 7. (A) Spores as heat-resistant CFU over 48 h of growth. Means and standard errors of three biological replicates are shown. (B) Mean spores counted by microscopy per field.

Tartışma:

- Bu çalışmada HV suşların diğerlerine göre daha erken ve daha fazla toksin yapmadığı ancak sporulasyonun hem daha çabuk başladığı hem de daha fazla spor oluştuğu gösterilmiş.

Tartışma:

- Logaritmik fazda TcdA/B saptanmamış
 - Kullanılan (BHI) besiyeri içindeki glukozun etkisi tartışılmış. Karşılaştırmalı çalışmalarda seçilen **non-HV suşlar önemli**
 - Sonuçlar önceki çalışmalarda saptanan “HV suşlarda logaritmik fazda tcdC geninde ortaya çıkan çerçeve mutasyonun non fonksiyonel TcdC yapımına, dolayısı ile daha fazla miktarda toksin yapımına neden olduğu” bulguları ile uyumlu değil. Bu çalışmada logaritmik fazda toksin yapımı gösterilmemiş.

Logaritmik fazda toksin yapımında TcdC nin negatif regülasyonu muhtemelen tek başına yeterli olmuyor. TcdR de önemli. Logaritmik fazda güçlü bir *tcdR* gen represyonu saptanmış.

Tartışma:

- Duraklama fazında toksin artan miktarlarda salgılanmakta
 - Hakim olan görüşe göre bu dönemde TcdC bilinmeyen bir mekanizma ile azalmakta ve toksin miktarı artmakta. Bu çalışma ise duraklama fazında *tcdC* gen transkripsiyonunda nispeten bir artış olduğunu göstermiş

TcdC logaritmik dönemde *tcdA* ve *tcdB* represyonu için gerekli değilken toksin yapımı üzerinde modüle edici bir etki yapmakta. HV suşlarda bu modülatördeki eksiklik nedeniyle duraklama döneminde daha güçlü bir toksin yapımı söz konusu.

Tartışma:

- Toksin yapımı ve sporulasyon ortamdaki besin maddelerinin azalmasına yanıt olarak ortaya çıktığından ikisi arasındaki ilişki tartışma konusu olmaktadır.
 - Arada ters bir ilişki olduğunu gösteren bir çalışmaya göre bakteri erken dönemde sporlanıyorsa toksin oluşturma süresi kısalır. Öte yandan besin maddelerinin azalması sonucunda daha uzun süre toksin yapılması bakterilerin sporlanmayı tamamlayamadan ölmesine neden olur
 - Diğer çalışmalar ise duraklama devri regülatör mutantlarında hem sporulasyonun hemde toksin yapımının azaldığını göstermektedir

Tartışma:

- Bu çalışma HV suşlarda non-HV suşlara göre spor yapımının hem daha erken başladığını, hem de daha efektif olduğunu, öte yandan bu suşlarda toksin yapımının da daha güçlü olduğunu göstermektedir. Artmış sporulasyon bakterinin daha kolay ve etkili dağılımına dolayısı ile daha sık ve kolay enfeksiyon oluşturmalarına neden olmaktadır

