

Διαπανεπιστημιακό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
"Κλινική Φαρμακολογία-Θεραπευτική"

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ
ΣΤΟΥΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

Αικατερίνη Στάμου
Ειδικευόμενη
Ιατρικής Βιοπαθολογίας

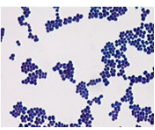
Αλεξανδρούπολη
Ιούνιος 2014

Ταξινόμηση

Kingdom	Bacteria
Phylum	Firmicutes
Class	Bacilli
Order	Bacillales
Family	Micrococcaceae
Genus	Staphylococcus Micrococcus Planococcus Stomatococcus

Περιγραφή- Καλλιεργητικοί χαρακτήρες

- Gram θετικοί κόκκοι (0,5-1,5μm), ακίνητοι, μη σπορογόνοι, αερόβιοι ή δυνητικά αναερόβιοι
- Βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης: 35-37 °C
- Θρεπτικά υλικά με NaCl 7,5-10%
- μεγάλες, λείες, κυκλικές αποικίες, διαμέτρου 1-3mm / 24h επώαση




Βιοχημικές ιδιότητες

- Δοκιμασία καταλάσης: (+)
(διάκριση από στρεπτοκόκκους)
- Παραγωγή κοαγκουλάσης
(από *S. aureus*)
- Διάσπαση σακχάρων
(μαννιτόλη, γλυκόζη, λακτόζη κ.α.)
με παραγωγή γαλακτικού οξέος




Παράγοντες λοιμοτοξικότητας

■ τοξίνες

- ✓ κυτταρολυτικές τοξίνες
(α, β, γ, δ-τοξίνη, λευκοκτονίνη Pantan-Valentine)
- ✓ απολεπιστικές τοξίνες (Α και Β)
- ✓ εντεροτοξίνες (Α ως Ε, Γ ως Ι)
- ✓ TSST-1 (τοξίνη-1 συνδρόμου τοξικής καταπληξίας)

■ ένζυμα

- ✓ καταλάση, κοαγκουλάση, υαλουρονιδάση, ινωδολυσίνη, πενικιλινάση, λιπάσες, νουκλεάσες

■ σχηματισμός βιομεμβράνης

ΕΙΔΗ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

➤ coagulase-positive Staphylococci

S. aureus

➤ coagulase-negative Staphylococci

S. lugdunensis

S. schleiferi

S. epidermidis

S. capitis

S. epidermidis

S. auricularis

S. saprophyticus

S. pasteurii

S. haemolyticus

S. caprae

S. warneri

S. cohnii

S. hominis

S. xylosus

S. simulans

S. saccharolyticus

Koneman, 2006

Παθογόνος δράση *Staphylococcus aureus*

- Δερματικές λοιμώξεις
- Σταφυλοκοκκικό σύνδρομο αποκόλλησης της επιδερμίδας
- Τροφική δηλητηρίαση
- Σύνδρομο τοξικού σοκ
- Βακτηριαμία και ενδοκαρδίτιδα
- Πνευμονία και εμπύημα
- Οστεομυελίτιδα και σηπτική αρθρίτιδα

Παθογόνος δράση coagulase-negative Staphylococci

- Ενδοκαρδίτιδα
- Λοιμώξεις καθετήρων και παροχετεύσεων
- Λοιμώξεις προσθετικών αρθρώσεων
- Λοιμώξεις ουροποιητικής οδού (*S. saprophyticus*)

Αντιμικροβιακή αγωγή

- Β-λακταμικά
 - Γλυκοπεπτίδια
 - Οξαζολιδινόνες
 - Δαπτομυκίνη
 - Τιγκεκυκλίνη
- Μακρολίδες-Λινκοσαμίδες-Στρεπτογραμμίνες
- Αμινογλυκοσίδες
- Κινολόνες-Φθοριοκινολόνες
- Τριμεθοπρίμη-Σουλφαμεθοξαζόλη

Β-λακταμικά αντιβιοτικά

- **Μηχανισμός δράσης**
Χημικά ανάλογα των διπεπτιδίων D-ala-D-ala ομοιοπολική σύνδεση με PBPs → αναστολή σύνθεσης πεπτιδογλυκάνης → autólυση μικροβίου
- **Μηχανισμοί ανθεκτικότητας**
 - ✓ τροποποίηση στόχου αντιβιοτικού (PBPs)
 - ✓ ενζυμική αδρανοποίηση του αντιβιοτικού
 - ✓ ελαττωμένη διαπερατότητα ή ενεργητική απομάκρυνση

Γλυκοπεπτίδια

- **Μηχανισμός δράσης**
Σύνδεση με τελικό άκρο πεπτιδογλυκάνης (D-ala-D-ala) → αναστολή πολυμερισμού-σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος
 - **Μηχανισμός ανθεκτικότητας**
Στελέχη με μειωμένη ευαισθησία στα γλυκοπεπτίδια
- Παχύτερο τοίχωμα

Αυξημένα ποσά διπεπτιδίων D-ala-D-ala
- Η περίσσεια των ελεύθερων διπεπτιδίων συνδέεται στην επιφάνεια του τοιχώματος με τα γλυκοπεπτίδια και τα εμποδίζει να φτάσουν στο στόχο τους (περιοχή πολυμερισμού της πεπτιδογλυκάνης)

Οξαζολιδινόνες (Linezolid)

- **Μηχανισμός δράσης**
Αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση των μικροοργανισμών (θέση 23S της 50S υποομάδας του ριβοσώματος)
- **Μηχανισμός ανθεκτικότητας**
 - ✓ τροποποίηση του στόχου δράσης (μεθυλίωση) λόγω γονιδιακών μεταλλάξεων

Δαπτομυκίνη

- **Μηχανισμός δράσης**
Αποσταθεροποιεί το ηλεκτρικό δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης
- **Μηχανισμός ανθεκτικότητας**
 - ✓ μεταλλάξεις γονιδίων που ρυθμίζουν το ηλεκτρικό δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης
 - ✓ πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος

Τιγκεκυκλίνη

- **Μηχανισμός δράσης**
Αναστέλλει την πρωτεϊνική μετάφραση μέσω σύνδεσης στη ριβοσωμική υποομάδα 30S

Σε αντίθεση με τις παλαιότερες τετρακυκλίνες **ΔΕΝ** είναι ευάλωτη στους κλασικούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας

Σκοπός της μελέτης

Ο έλεγχος της ευαισθησίας στελεχών σταφυλοκόκκων στους αντιμικροβιακούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία **σοβαρών σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων**

Υλικό

χρονικό διάστημα: Ιούνιος 2012 - Ιούνιος 2013
κλινικά δείγματα ασθενών Π.Γ.Ν. Έβρου

Υλικό	Κλινική	ΠΑΘ	ΜΕΘ	ΧΕΙΡ	ΠΑΙΔ ΜΕΝΝ	ΕΙ ΤΕΠ	ΣΥΝΟΛΟ
ΑΙΜΑ		39	27	3	4	-	73
ΠΥΟΝ		4	-	7	1	2	14
ΤΡΑΥΜΑ		1	-	1	-	2	4
ΚΑΘΕΤΗΡΕΣ		1	1	1	-	-	3
ΑΣΚΙΤΙΚΟ ΥΓΡΟ		2	-	-	-	-	2
ΠΕΡΙΤΟΝΑΙΚΟ ΥΓΡΟ		2	-	-	-	-	2
ΔΕΡΜΑΤΙΚΕΣ ΒΛΑΒΕΣ		2	-	-	-	-	2

Μέθοδοι

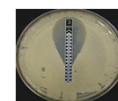
- καλλιέργεια των κλινικών δειγμάτων
- ταυτοποίηση των στελεχών με βάση
 - Gram χρώση
 - Δοκιμασία καταλάσης-κοαγκουλάσης
 - Βιοχημική ταυτοποίηση Vitek 2

Gram χρώση

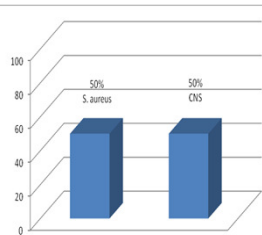
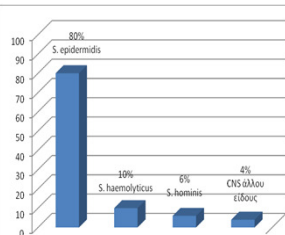
Δοκιμασία
καταλάσης-
κοαγκουλάσηςΒιοχημική ταυτοποίηση
Vitek 2

Μέθοδοι

- έλεγχος της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά
 - ✓ μέθοδος διάχυσης των δίσκων (Kirby-Bauer)
 - ✓ προσδιορισμός MIC με E-test και αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek 2
- έλεγχος παραγωγής PBP2a (Slidex MRSA detection, Biomerieux- France)
- έλεγχος της ικανότητας σχηματισμού βιομεμβράνης (Tube method)



Αποτελέσματα

Ταξινόμηση σταφυλοκόκκων με
βάση τη δοκιμασία κοαγκουλάσηςΤαξινόμηση CNS σταφυλοκόκκων
σε επίπεδο είδους

Αποτελέσματα - αντοχή στη μεθικιλίνη

- από τα 50 στελέχη S. aureus

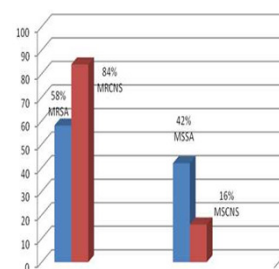
29 MRSA

21 MSSA

- από τα 50 στελέχη CNS

42 MRCNS

8 MSCNS



Αποτελέσματα - ανίχνευση PBP2a

Latex test Είδος	ΘΕΤΙΚΟ PBP2a (+)	ΑΡΝΗΤΙΚΟ PBP2a (-)
S. aureus	27 (54%)	23 (46%)
CNS	41 (82%)	9 (18%)
Σύνολο	65	35

Αποτελέσματα

Κατανομή σταφυλοκόκκων ανά κλινική με βάση την ευαισθησία τους στη μεθικιλίνη

Κλινική Είδος	MRSA	MSSA	MRCNS	MSCNS
ΠΑΘ	59%	67%	36%	62,5%
ΜΕΘ	24%	-	48%	12,5%
ΧΕΙΡ	7%	29%	7%	12,5%
ΠΑΙΔ - ΜΕΝΝ	3%	-	7%	12,5%
ΤΕΠ-ΕΙ	7%	4%	2%	-

Αποτελέσματα

Κατανομή σταφυλοκόκκων ανά παθολογικό υλικό με βάση την ευαισθησία τους στη μεθικιλίνη

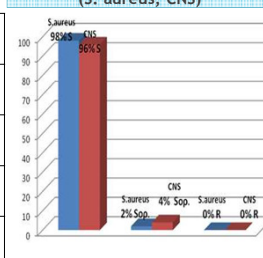
Υλικό Είδος	MRSA	MSSA	MRCNS	MSCNS
ΑΙΜΑ	69%	53%	83,2%	87,5%
ΠΥΟΝ	20,5%	29%	4,8%	-
ΤΡΑΥΜΑ	3,5%	9%	2,4%	-
ΚΑΘΕΤΗΡΕΣ	-	-	4,8%	12,5%
ΑΣΚΙΤ. ΥΓΡΟ	3,5%	-	2,4%	-
ΠΕΡΙΤ. ΥΓΡΟ	3,5%	4,5%	-	-
ΔΕΡΜ. ΒΛΑΒΕΣ	-	4,5%	2,4%	-

Αποτελέσματα - Βανκομυκίνη

Έλεγχος ευαισθησίας στη βανκομυκίνη, CLSI 2012

Ευαισθησία στη βανκομυκίνη ανά είδος σταφυλοκόκκων (S. aureus, CNS)

MIC μg/ml	≤1	1-2	2-4	>4
MRSA	23 (79%)	5 (17%)	1 (4%)	-
MSSA	19 (90%)	2 (10%)	-	-
MRCNS	17 (40%)	20 (48%)	3 (7%)	2 (5%)
MSCNS	6 (75%)	2 (25%)	-	-

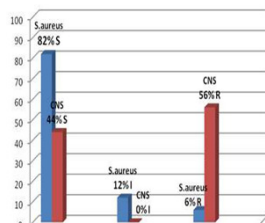


Αποτελέσματα- Λινεζολίδη

Έλεγχος ευαισθησίας στη
λινεζολίδη, CLSI 2012

MIC μg/ml	<4	4-8	≥8
MRSA	23 (79%)	3 (10,5%)	3 (10,5%)
MSSA	18 (86%)	3 (14%)	-
MRCNS	16 (38%)	-	26 (62%)
MSCNS	6 (75%)	-	2 (25%)

Ευαισθησία στη λινεζολίδη ανά
είδος σταφυλοκόκκων
(S.aureus, CNS)

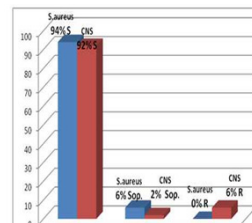


Αποτελέσματα- Δαπτομυκίνη

Έλεγχος ευαισθησίας στη
δαπτομυκίνη, CLSI 2012

MIC μg/ml	<1	1	>1
MRSA	27 (93%)	2 (7%)	-
MSSA	20 (95%)	1 (5%)	-
MRCNS	39 (92,5%)	1 (2,5%)	2 (5%)
MSCNS	7 (87,5%)	-	1 (12,5%)

Ευαισθησία στη δαπτομυκίνη
ανά είδος σταφυλοκόκκων
(S.aureus, CNS)

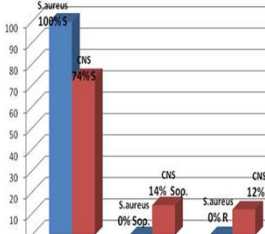


Αποτελέσματα- Τιγκεκυκλίνη

Έλεγχος ευαισθησίας στη
τιγκεκυκλίνη, EUCAST 2012

MIC μg/ml	<0,5	0,5	>0,5
MRSA	29 (100%)	-	-
MSSA	21 (100%)	-	-
MRCNS	31 (74%)	5 (12%)	6 (14%)
MSCNS	6 (75%)	2 (25%)	-

Ευαισθησία στη τιγκεκυκλίνη
ανά είδος σταφυλοκόκκων
(S.aureus, CNS)



Αποτελέσματα-Δοκιμασία παραγωγής βιομεμβράνης

Αντοχή στη μεθικυκλίνη	Ισχυρώς Θετικά	Ασθενώς Θετικά	Αρνητικά
MRSA	34,5%	31%	34,5%
MSSA	38%	33,5%	28,5%
MRCNS	40%	38%	22%
MSCNS	25%	50%	25%
Σύνολο στελεχών	37%	36%	27%



Ταυτόχρονη Αντοχή- Παραγωγή Βιομεμβράνης

- ❑ Από τα 42 στελέχη **MRCNS**:
 - 17 είχαν ταυτόχρονη αντοχή σε **VA, LZD**
 - 3 είχαν ταυτόχρονη αντοχή σε **VA, LZD, TGC**
 - 2 είχαν ταυτόχρονη αντοχή σε **VA, LZD, DAP**
- ❑ 1 στέλεχος **MRSA** εμφάνισε αντοχή σε **VA, LZD**
- ❑ Όλα τα στελέχη με την ταυτόχρονη αντοχή είχαν την ικανότητα **παραγωγής βιομεμβράνης** (ισχυρώς ή ασθενώς)

Συζήτηση

- Στη μελέτη μας η ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη κυμάνθηκε σε ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά (**58%** για *S.aureus* και **84%** για CNS)
- Η ανίχνευση της **PBP2a** που ερμηνεύεται ως φορέας του γονιδίου **mecA επιβεβαίωσε** τα υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας
- Παράλληλα παρατηρήθηκε αυξημένο ποσοστό ανθεκτικότητας και **σε άλλες κατηγορίες αντιμικροβιακών ουσιών**

Συζήτηση

- Στη βανκομυκίνη τα ποσοστά των MRSA και MSSA με MIC > 1μg/ml βρέθηκαν **21%** και **10%** αντίστοιχα
- ενώ η πλειοψηφία των MRCNS (**60%**) βρέθηκε με MIC > 1μg/ml

η έρπουσα αύξηση της MIC στη VA
&
η ετερογενής αντοχή (hVISA)



θεραπευτική αποτυχία

Συζήτηση

- Στη **λινεζολιδη** το ποσοστό των MRCNS που εμφάνισε αντοχή (MIC>256μg/ml) ήταν ιδιαίτερα υψηλό
- Οι MRSA ήταν στο σύνολό τους ευαίσθητοι στην **τιγκεκυκλίνη** ενώ χαμηλό ποσοστό MRCNS παρουσίασε ανθεκτικότητα
- Κανένα στέλεχος MRSA/MSSA δεν παρουσίασε αντοχή στη **δαπτομυκίνη**, ενώ στους CNS μόλις το 6% ήταν μη ευαίσθητοι

Συμπεράσματα

- ✓ Τα ανθεκτικά στη μεθικιλίνη στελέχη *S. aureus* και CNS αποτελούν **συχνά αίτια** ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων
- ✓ Η **πολυανθεκτικότητα** των σταφυλοκόκκων στα χορηγούμενα αντιμικροβιακά φάρμακα περιορίζει κατά πολύ τις θεραπευτικές επιλογές
- ✓ Η παραγωγή βιομεμβρανών από την πλειοψηφία των σταφυλοκόκκων και ιδιαίτερα από τα πολυανθεκτικά στελέχη **δυσχεραίνει την αποτελεσματική θεραπευτική αντιμετώπιση των λοιμώξεων**

Συμπεράσματα

- ✓ Η παρατηρούμενη έρπουσα αύξηση της MIC στη βανκομυκίνη και ο συσχετισμός της με **θεραπευτική αποτυχία** επιβάλλουν:
 - ➡ εφαρμογή αξιόπιστων εργαστηριακών μεθόδων προσδιορισμού της MIC (E-test)
 - &
 - ➡ νέα κλινική ερμηνεία των ορίων ευαισθησίας με βάση την MIC

Συμπεράσματα

- ✓ Η λινεζολίδα είναι δραστική in vitro έναντι των *S. aureus* (MRSA και MSSA), όχι όμως κι έναντι των MRCNS
- ➡
- να χορηγείται μόνο μετά από ακριβή προσδιορισμό της MIC δεδομένου ότι ο μηχανισμός αντοχής φαίνεται να εξαπλώνεται ταχέως μεταξύ των στελεχών

Συμπεράσματα

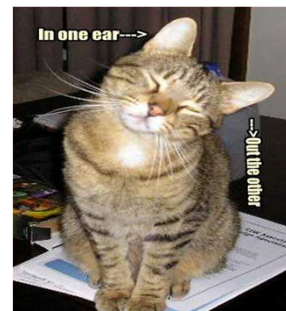
- ✓ Η δαπτομυκίνη είναι ιδιαίτερα δραστική έναντι των *S. aureus* και CNS οπότε αποτελεί καλή θεραπευτική επιλογή για σοβαρές σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις
- ✓ Η τιγκεκυκλίνη εμφανίζει χαμηλά ποσοστά αντοχής, οπότε αποτελεί χρήσιμη θεραπευτική επιλογή για σοβαρές λοιμώξεις κυρίως από στελέχη *S. aureus*

Συμπεράσματα

Μέτρα ελέγχου και πρόληψης
των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων

- ✓ γνώση της επιδημιολογίας των λοιμώξεων
- ✓ εφαρμογή συνεχούς επιτήρησης
- ✓ ορθολογική χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων
- ✓ αυστηρή εφαρμογή των κανόνων υγιεινής

Σας ευχαριστώ
για την προσοχή σας



Ευχαριστίες

- ✓ Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας
Μαρία Πανοπούλου, Επιβλέπουσα
- ✓ Προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του
Δ.Π.Θ