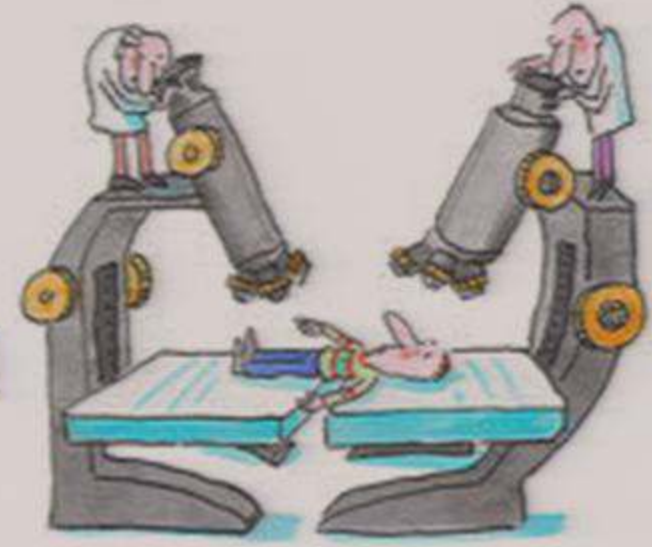


Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında Bakteri Tanımlamasında Konvansiyonel Yöntemler



Doç. Dr. Gürdal YILMAZ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD

TRABZON

Bakterileri tanımlanması

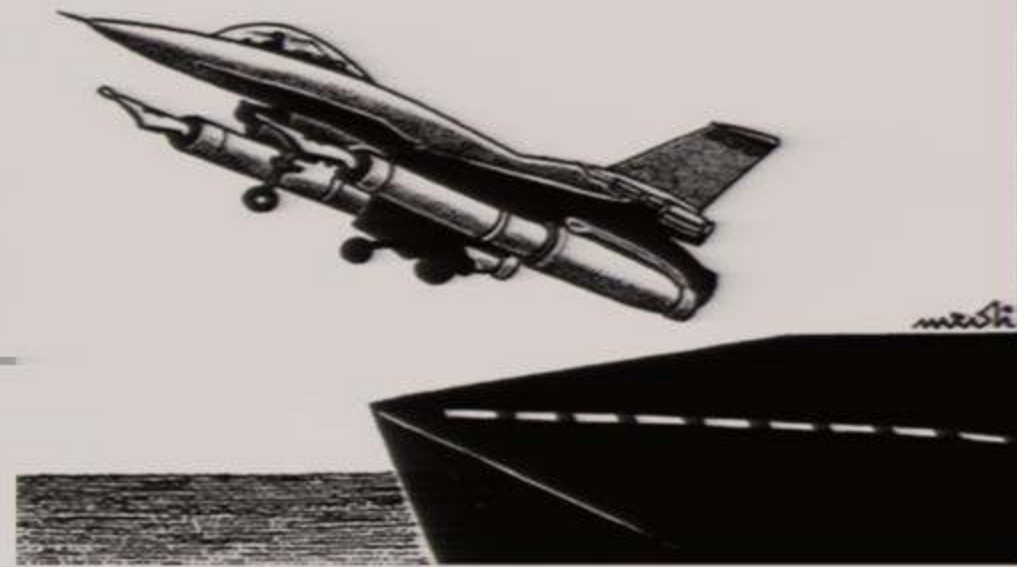
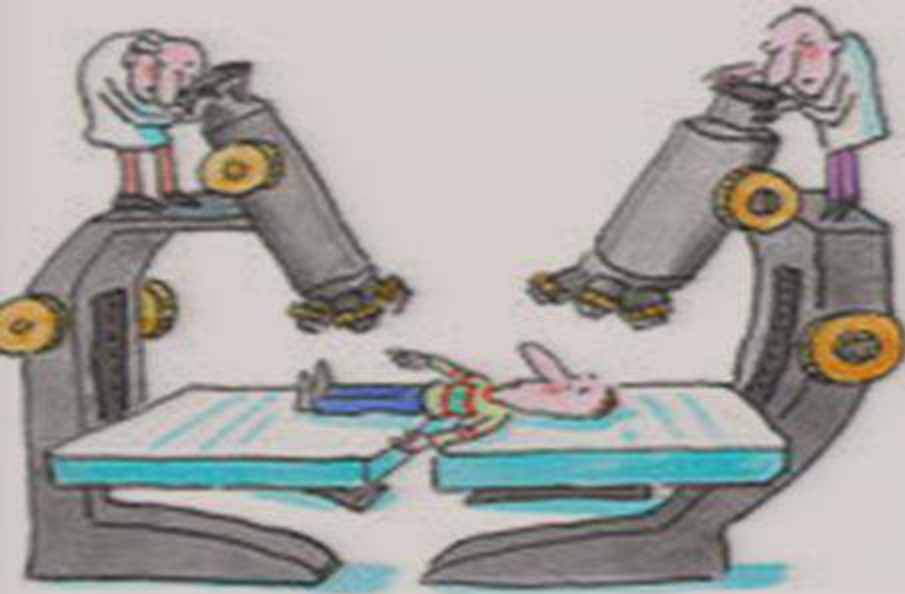
Neden gerekli

- Enfeksiyon etkeninin belirlenmesi
- Uygun antimikrobiyal tedavinin seçimi
- Antimikrobiyal direncin saptanması için uygun laboratuvar testinin seçimi
- Olağandışı duyarlılık profillerinin belirlenmesi
- Mikroorganizmanın diğer hastalar veya çalışanlar için riskinin belirlenmesi
- Epidemiyoloji



Klinisyen ne istemekte?

- Etiyolojik ajanın doğru ve hızlı belirlenmesi
- Anti enfeksiyöz ilaçlara duyarlılığın ölçülmesi
- Sonuçların klinisyene hızlı iletimi



Konvansiyonel yöntemler

19 yy.

- Fenotipik sınıflandırma

20 yy.

- Kimyasal testler

1970

- Yarı otomatik tanımlama sistemleri
 - API, Mikroscan

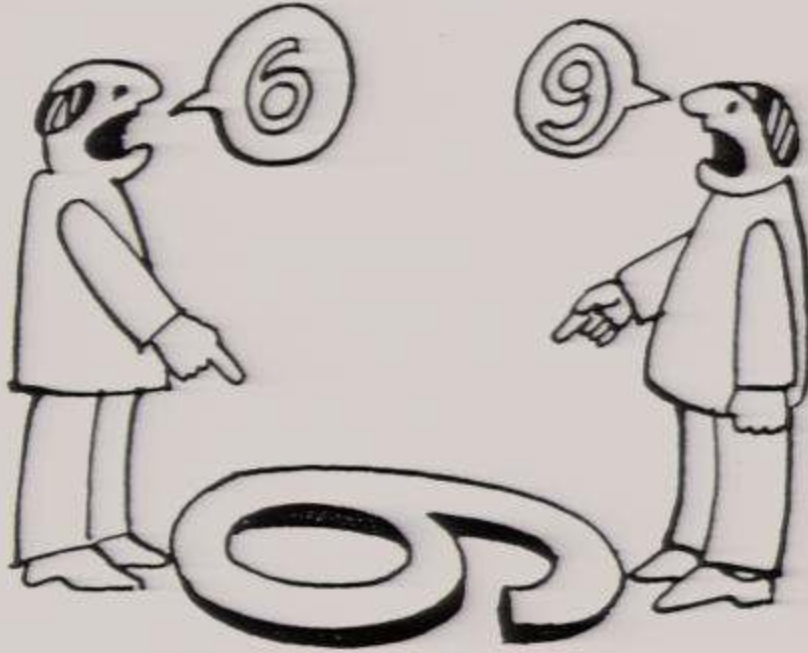
2000

- Otomatize sistemler
 - VITEC
 - Phonix

Yeni yöntemler

- Kütle spektrometrisi
 - MALDI-TOF MS
 - Electrospray ionization kutle spektrometrisi
- Moleküler metodlar
 - PCR
 - Genotipik metot
 - Gene Xpert
 - Real-Time PCR
 - Multiplex

ENFEKSIYON HASTALIKLARININ TANISI



ENFEKSİYON HASTALIKLARININ TANISI

Mikrobiyolojinin tarihçesi

- Hipokrat (M.Ö. 460-370): sıtma, lekeli humma, çiçek, veba, sara, verem hakkında bilgiler vermiş ve hastalıkların topraktan çıkan fena hava, su, yıldız, rüzgar ve mevsimlerden ileri geldiğini
- Aristoteles (384-322): veba, lepra, verem, trahom, uyuz hastalığının insandan insana solunum yoluyla bulaştığını

ENFEKSİYON HASTALIKLARININ TANISI

Mikrobiyolojinin tarihçesi

- **İbni Sina (980-1037):** Bulaşıcı hastalıkların gözle görülmeyen kurtçuklardan ileri geldiğini ve korunmak için temizliğin önemli olduğunu vurgulamıştır
- **Akşemseddin (1389-1459):** Pasteur'dan yaklaşık 400 yıl önce ilk mikrop teorisini ortaya attı
"Hastalıkların insanlarda teker teker ortaya çıktığını sanmak hatadır. Hastalık, insandan insana bulaşmak suretiyle geçer. Bu bulaşma, gözle görülmeyecek kadar küçük, fakat canlı tohumlar vasıtasıyla olur" (Kaynak Maddetül Hayat)

ENFEKSİYON HASTALIKLARININ TANISI

Mikrobiyolojinin tarihçesi

- İlk mikroskop Leeuwenhoek tarafından (1676) bulundu ve bakterileri tarif etti.



www.penguen.com



ENFEKSİYON HASTALIKLARININ TANISI

Mikrobiyolojinin tarihçesi

Louis Pasteur (1822-1895)

- Bulaşıcı hastalıklarda mikroorganizmaların sorumlu olduğunu kanıtladı.
- Kendiliğinden türeme teorisini çürüttü. Bu sayede şarap, bira, süt, meyve suyu gibi mayalanabilir sıvıların uzun süre bozulmadan saklanabilmelerini sağlayan "pastörizasyon" adlı konserve yönteminin gelişmesini sağladı.
- 1885'te ilk kuduz aşısını yaptı

ENFEKSİYON HASTALIKLARININ TANISI

Mikrobiyolojinin tarihçesi

Robert Koch (1843-1910):

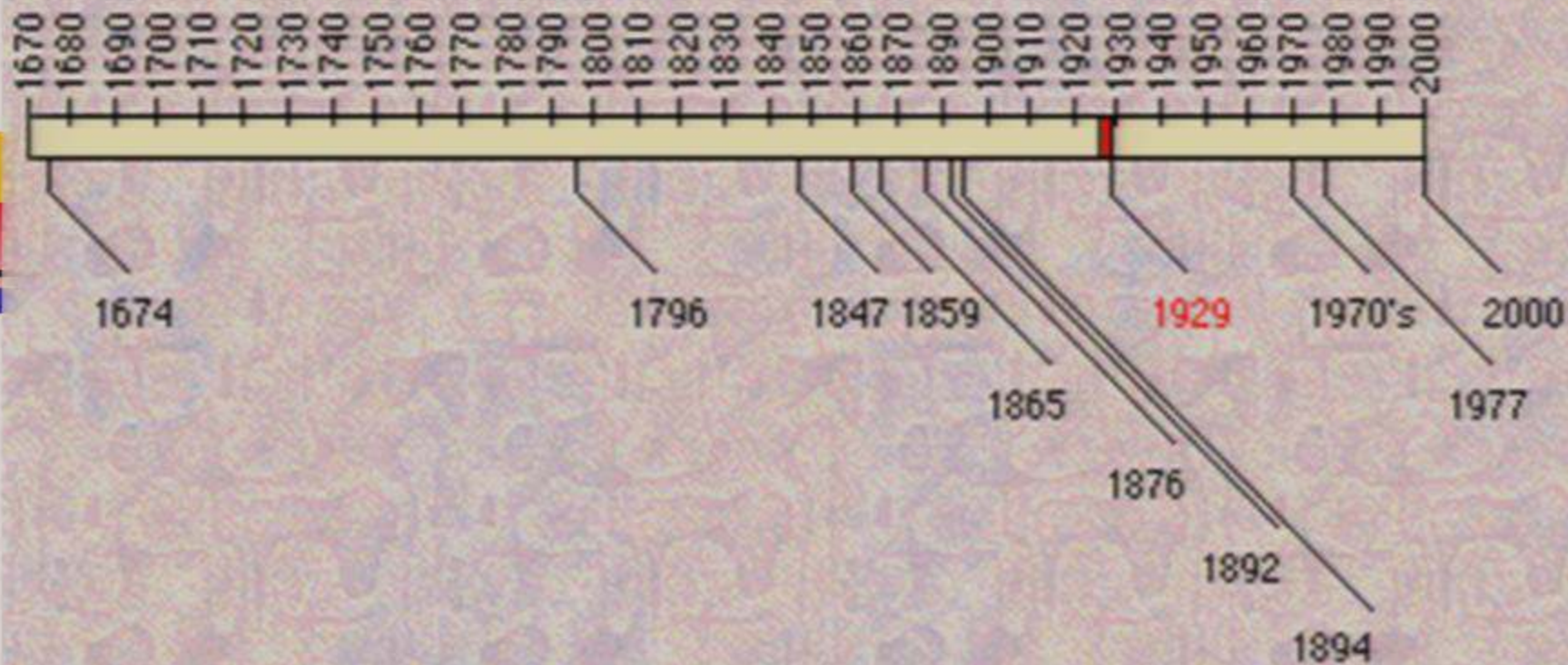
- Katı besiyerini geliştirmiştir
- Saf kültür olarak mikroorganizmaları izole etmiştir
- Şarbon hastalığına neden olan mikroorganizmayı saf kültür olarak izole etmiştir
- Bakterileri anilin boyalarla boyamıştır
- İlk kez yayma preperat hazırlamıştır
- Hastalıkların etiyolojilerinde bazı kriterler ortaya koymuştur (Koch Postulatları)

ENFEKSİYON HASTALIKLARININ TANISI

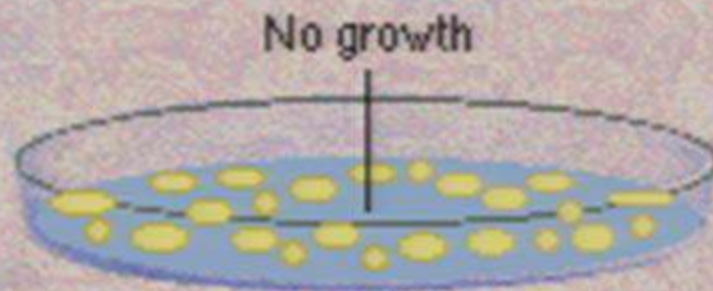
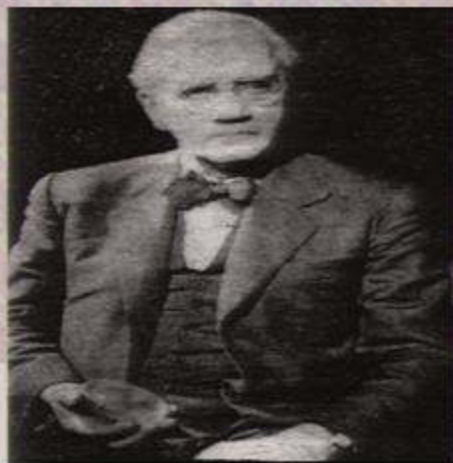
Mikrobiyolojinin tarihçesi

Koch Postulatları

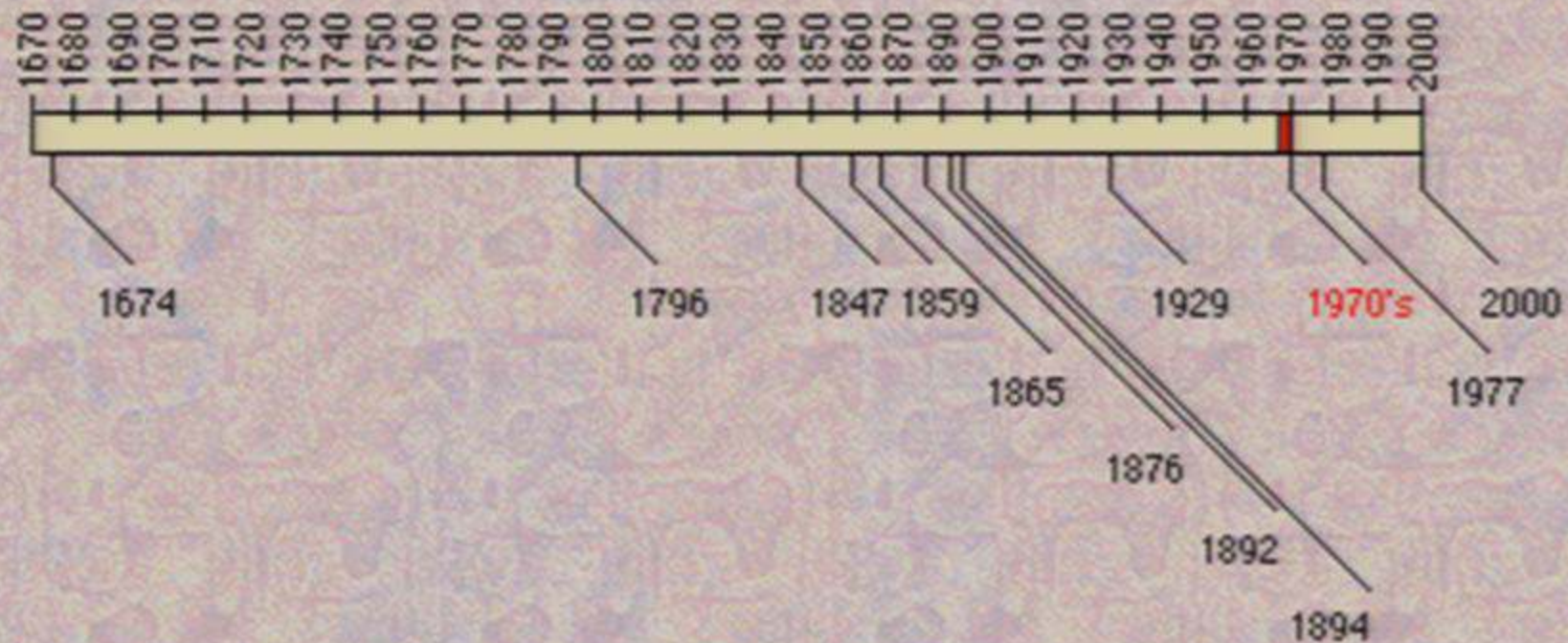
- Hastalıklar spesifik mikroorganizmalar tarafından oluştururlar
- Etkenler izole edilmeli ve saf kültürler halinde üretilmelidir
- Duyarlı sağlam deneme hayvanlarına verildiklerinde hastalık oluşturabilmeli
- Tekrar saf kültürler halinde üretilebilmelidirler



1929 Alexander Fleming discovers penicillin.



Time Line of Microbiology



1970s Bacteria-based recombinant DNA technology is developed.



ENFEKSİYON HASTALIKLARININ TANISI

■ Klinik tanı

- Öykü
- Fizik muayene

■ Etyolojik tanı

✓ Spesifik testler

A. Etkeni tanımlamaya dönük testler

- Mikroskopi
- Kültür
- Seroloji
- Moleküler mikrobiyolojik testler

B. Etkene karşı konak cevabını ölçen testler

- Seroloji

✓ Nonspesifik testler

- TIT
- CBC
- Kan biyokimyası
- Akut faz cevabı testleri

ENFEKSİYON HASTALIKLARININ TANISI



© SHUTTERSTOCK.COM



Klinik

Öykü



Öykü

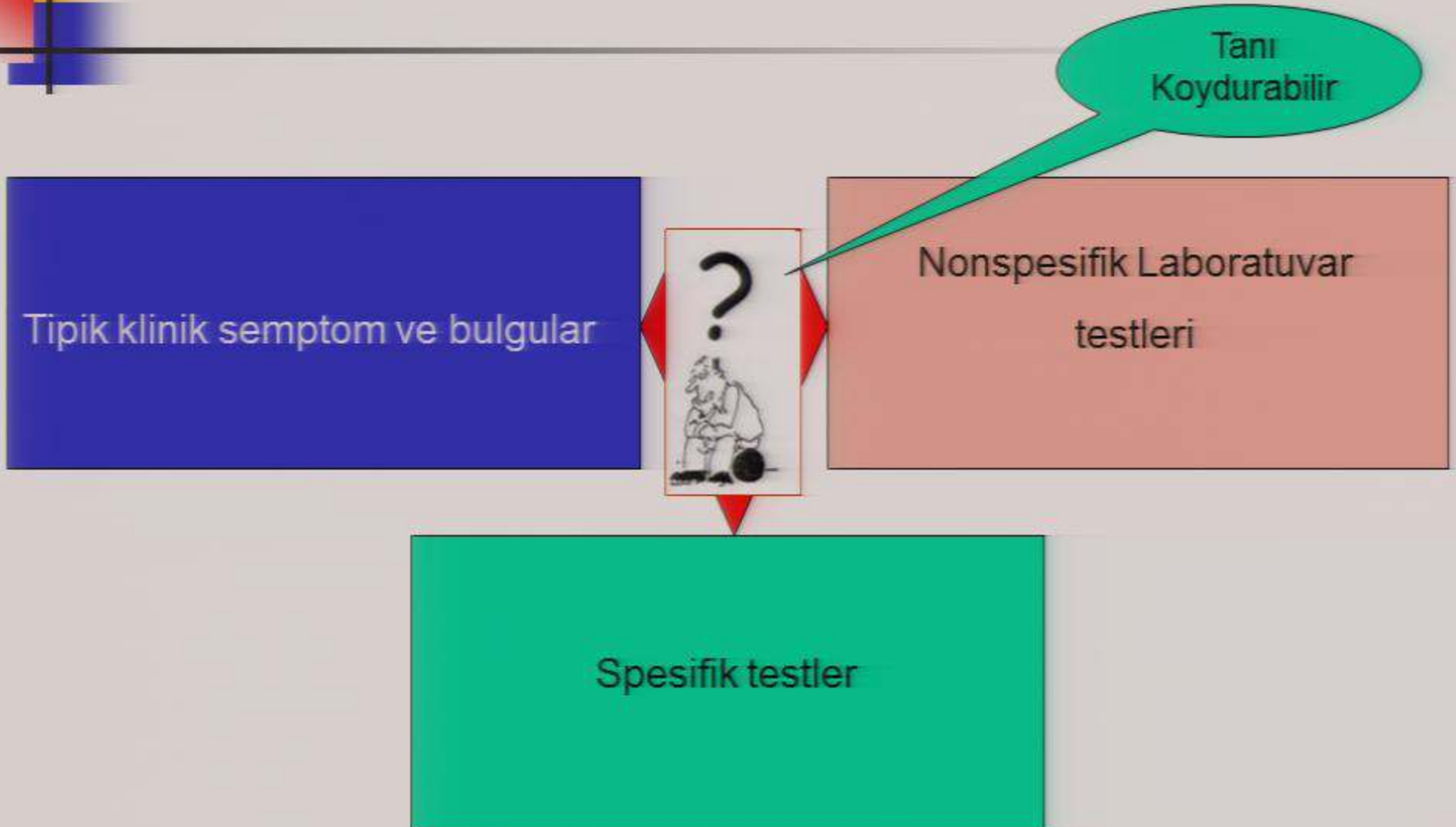
Klinik

Fizik Muayene

F. muayene



ENFEKSİYON HASTALIKLARININ TANISI



ENFEKSIYON HASTALIKLARININ TANISI



Bakteri izolasyon ve identifikasyonu (Konvansiyonel yöntemler)

- Fenotipik identifikasyonu
 - Gram boyama
 - En ucuz, en hızlı sonuç
 - Üreme karakteristikleri
 - Kültür-Antibiyogram
 - Hızlı üreyen bakteriler için etkin, ucuz; bazı bakteriler için yavaş veya olanaksız
 - Biyokimyasal yöntemler
 - Tam veya kısmi otomatize sistemler (vitek, Phonix,....)



Bakteri izolasyon ve identifikasyonu (Konvansiyonel yöntemler)



Bakteri izolasyon ve identifikasyonu (Konvansiyonel yöntemler)



BAKTERİ İDENTİFİKASYONUNDA KULLANILAN STANDART, BİYOKİMYASAL VE FİZYOLOJİK TESTLER

FİZYOLOJİK TESTLER

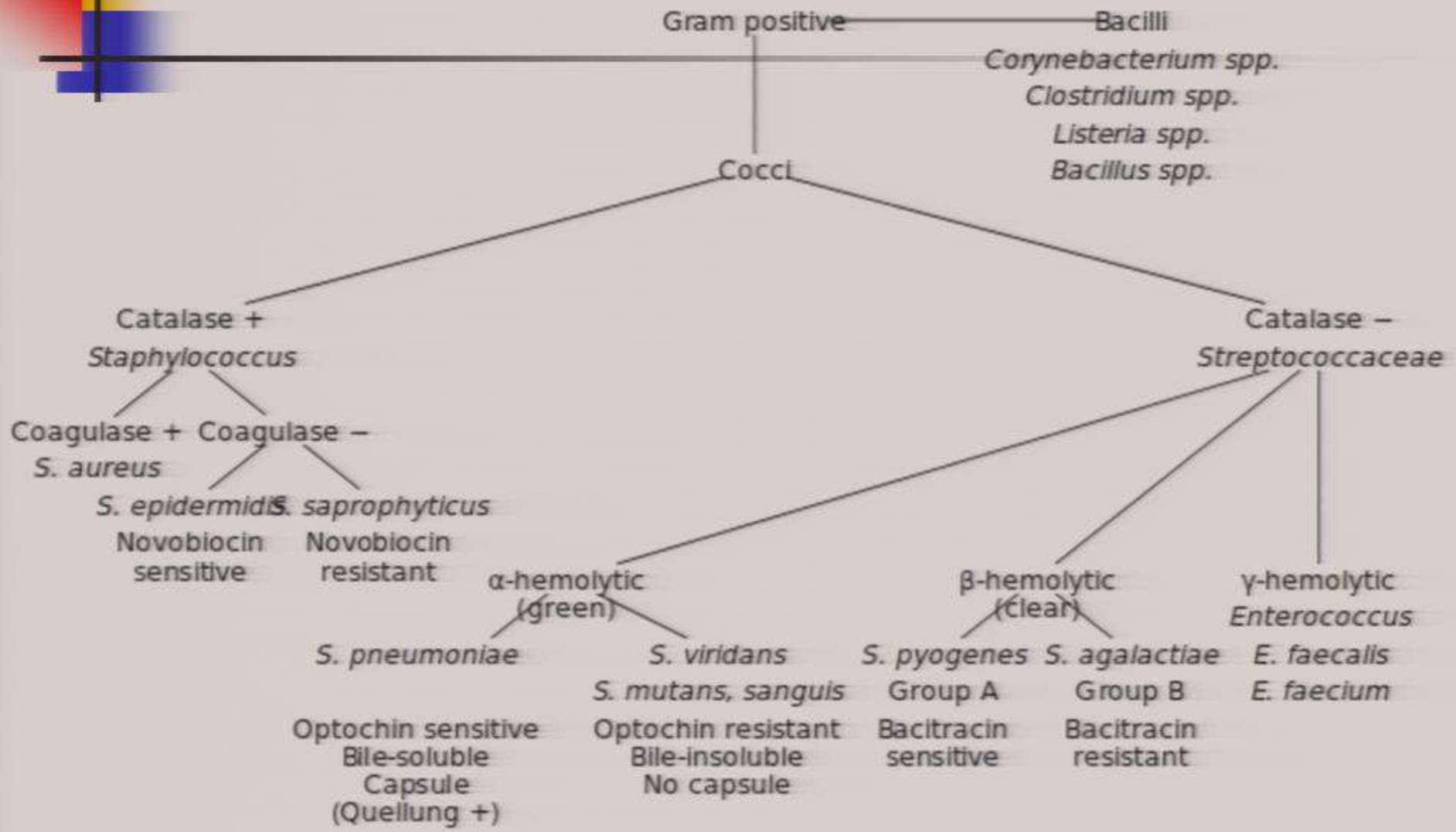
Bakteri hücresinin metabolik faaliyetlerine dışardan hiçbir müdahalenin yapılmadığı, sadece gözlem esaslı testlerdir. Başlıca fizyolojik testler aşağıdadır;

- ✓ Anaerop üreme
- ✓ Gram boyama
- ✓ Hareket muayenesi
- ✓ Kapsül muayenesi
- ✓ Selüler morfoloji
- ✓ Spor muayenesi
- ✓ Değişik sıcaklıklarda üreme (5, 22, 42°C' de üreme)

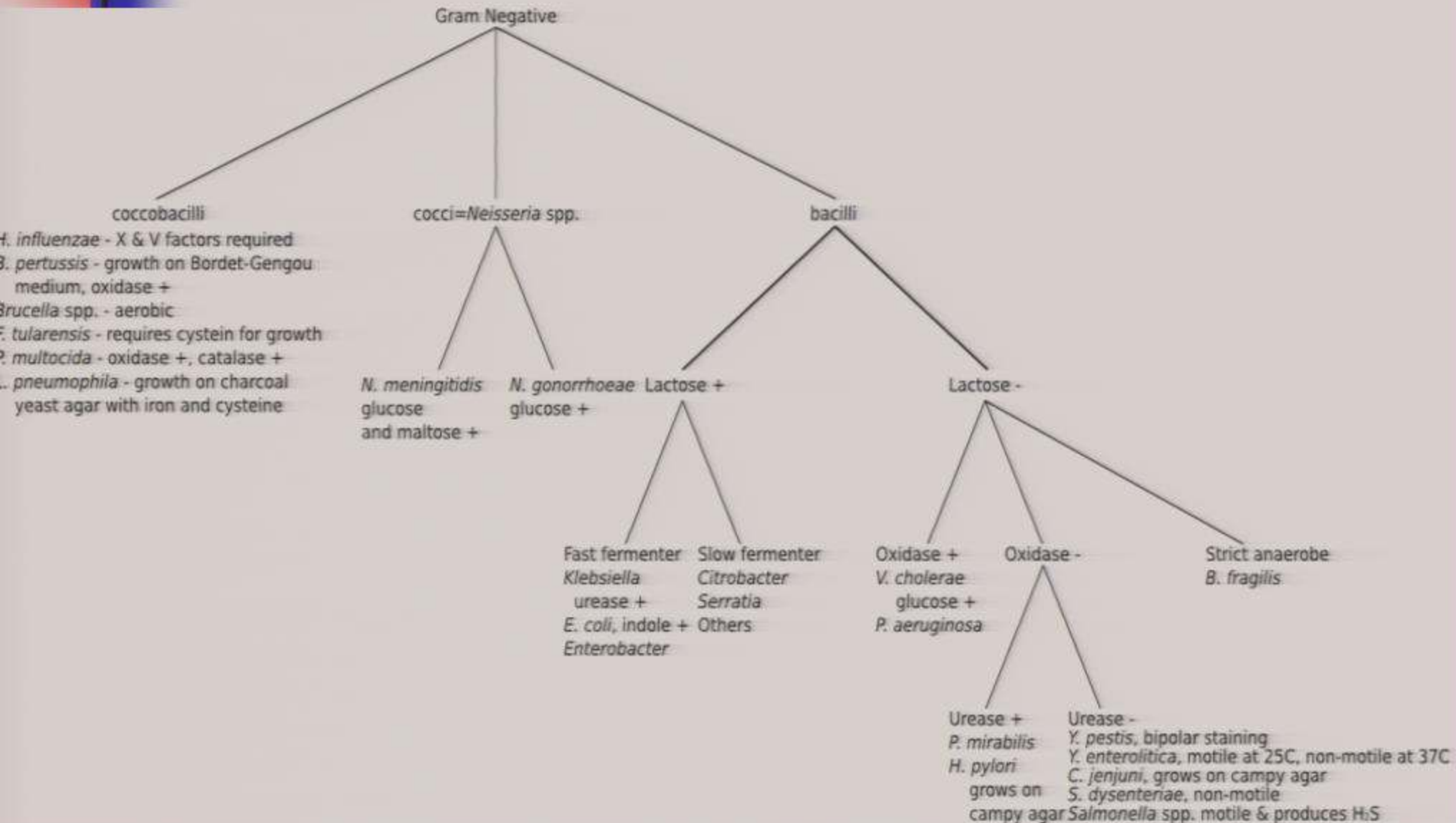
BİYOKİMYASAL TESTLER

- ✓ Şeker fermantasyon testleri
- ✓ Bir bakteri hücresinde hangi şekerleri fermente edebilen metabolizmanın bulunduğu o bakteri şuşu için identik değer taşır.
- ✓ Aminoasit (*Arginin-Lysin-Omithin*) dekarboksilasyonu
- ✓ DNAz testi
- ✓ Eskulin hidrolizi
- ✓ Fenil alanin deaminasyonu
- ✓ Tirozin saydamlaştırma
- ✓ İndol testi (Triptofan' dan indol yapma)
- ✓ Hidrojen sülfid (H_2S) yapımı
- ✓ Hemoliz testi
- ✓ Jelatinaz testi
- ✓ Katalaz testi
- ✓ Potasyum siyanit (KCN)'te üreme
- ✓ Koagülaz (Coagulase) testi
- ✓ Lipaz ve Lesitinaz testi
- ✓ Malonat fermentasyonu
- ✓ Mukat fermentasyonu
- ✓ Metil kırmızısı testi
- ✓ Voges-Proskauer testi
- ✓ Nitrat redüksiyonu
- ✓ Oksidaz testi
- ✓ Safraya tolerans
- ✓ Safrada lizis
- ✓ Sitrat kullanımı
- ✓ Üreaz testi
- ✓ Diğer biyokimyasal testler

BAKTERİ İDENTİFİKASYONUNDA KULLANILAN STANDART, BİYOKİMYASAL VE FİZYOLOJİK TESTLER



BAKTERİ İDENTİFİKASYONUNDA KULLANILAN STANDART, BİYOKİMYASAL VE FİZYOLOJİK TESTLER



Otomatize identifikasyon sistemleri

API

- API® FEATURES & SPECS

API® Gram negative Identification

- API 20E – 18-24 hour identification of Enterobacteriaceae and other non-fastidious gram negative bacteria
- API Rapid 20E – 4-hour identification of Enterobacteriaceae
- API 20NE – 24 to 48-hour identification of Gram negative non-Enterobacteriaceae
- API NH – 2-hour identification of Neisseria Haemophilus and Branhamella catarrhalis

API® Gram positive Identification

- API Staph – Overnight identification of clinical staphylococci and micrococci
- RAPIDEC® Staph – 2-hour identification of the commonly occurring staphylococci
- API 20 Strep – 4 or 24-hour identification of streptococci and enterococci
- API Coryne – 24-hour identification of Corynebacteria and coryne-like organisms

API® Anaerobe Identification

- API 20A® – 24-hour identification of anaerobes
- Rapid ID 32A – 4-hour identification of anaerobes

API® Yeast Identification

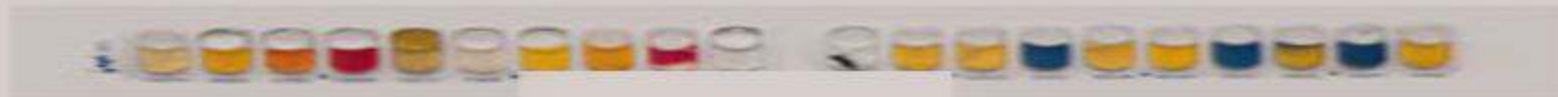
- API 20C AUX – 48 to 72-hour identification of yeasts

Others

- API® 50 CH – Performance of carbohydrate metabolism tests
- API ZYM® – Semiquantitation of enzymatic activities

Commercial Test Systems for Biotyping

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Negative	White	Orange	Orange	Orange	Green	White	Orange	Orange	White	White	White	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Positive	Yellow	Red	Red	Red	Blue	Black	Pink	Brown	White	Red	Black	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
Test	White	Orange	Red	Orange	Green	Black	Orange	Orange	White	White	White	Yellow	Yellow	Blue	Yellow	Blue	Blue	Yellow	Blue	Blue

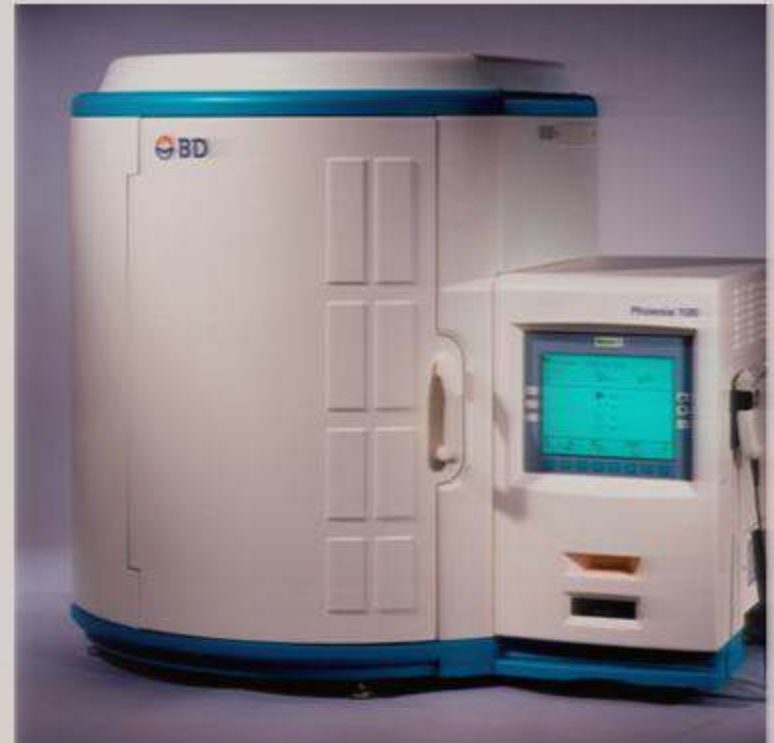


Otomatize identifikasyon sistemleri

VITEK® 2 Compact



BD Phoenix





Otomatize identifikasyon sistemleri

- Bakteri tanımlama testlerinin uygulama ve değerlendirilmesi aşamasında yoğun bir iş yükü ve kalifiye eleman ihtiyacı vardır
- Otomatize sistemler işlemlerin standardizasyonu sağlar, analitik hataları ve iş yükünü oldukça azaltır



Otomatize identifikasyon sistemleri

- Bu sistemler identifikasyon ve antimikrobiale duyarlılık testlerini birlikte yapabilir, içerdikleri “uzman” (expert) sistem yazılımları ile sonuçları yorumlar ve onaylanan sonuçları klinisyene kısa sürede ulaştırabilirler
- Ayrıca epidemiyolojik ve istatistik bilgiler ile sürveyans ve ampirik tedavilerin belirlenmesinde faydalanılabilecek verileri istendiğinde ulaşılabilir durumda belleğinde saklar



Otomatize identifikasyon sistemleri

- Tibbi cihazlardaki gelişmeler, veritabanlarının genişlemesi, verilerin yorumu, saklanması ve yönetilmesi, tanı koyma zamanının azalmasını sağlamıştır

Otomatize identifikasyon sistemlerinin Avantajları

- Standardizasyon,
- Uygulama kolaylığı,
- Zaman tasarrufu,
- Panel oluşturma,
- Ürün yelpazesi genişliği,
- Erken sonuç alabilme,
- Digital ortamdaki veri tabanından otomatik tanımlama,
- Birlikte antibiyotik hassasiyet testi sonuçlarını da alabilme,
- Digital ortamda kayıt ve sonuç gönderme, arşivleme

Otomatize identifikasyon sistemlerinin Dezavantajları

- Pahalı ?
- Cihazların bakımı, teknik servis bağımlılığı,
- Kalibrasyon ve kontrol gerekliliği,
- İnternal ve eksternal kontroller ihmal edildiğinde hatalı sonuç verebilme,
- Veri tabanı güncelleme gereksinimi,
- Bazı durumlarda yetersiz kalma (ek test gereksinimi),
- Kit bağımlılığı

Otomatize identifikasyon sistemleri

- Stafilokok suşlarının hızlı ve geçerli tanımlanması konusunda yapılan çalışmada toplam 198 izolat ve 11 kontrol suşu 22 test içeren referans metod ile tanımlanmış ve sonuçlar,
 - MicroScan WalkAway ile,
 - dokuz testten oluşan basit bir metod ile karşılaştırılmıştır.
 - Otomatize metodun doğru tanımlama oranı %79.3,
 - Basitleştirilmiş metodun doğru tanımlama oranı %98.5 olarak ($P < 0.001$) bulunmuştur.
- Sonuç olarak; basitleştirilmiş metod geçerli, daha pratik ve ekonomik bulunmuştur.



Otomatize identifikasyon sistemleri

- Bu çalışmada MicroScan WalkAway' in *E.faecalis* ve tipik *E.faecium* izolatlarını tanımlamada iyi performans gösterdiği görülmüş fakat atipik *E.faecium* tiplerini tanımlamada yetersiz bulunmuştur

d' Azevedo PA. Dias CA. Goncalves AL. Et al. Evaluation of an automated system for the identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2001; 157 161.

Otomatize identifikasyon sistemleri

- Bu çalışmada beş ticari sistemin (API 20 NE, GNI+ Vitek 1 cards, ID-GNB Vitek 2 cards, Neg Combo 20 Microscan panels, and NMIC/ID-5 BD Phoenix panels) tür seviyesinde *Vibrio vulnificus* biyotip 3'ün tanımlanmasına bakılmış
- Neg Combo 20 Microscan paneli ve API 20 NE bu suşu tanımlayamadığı görülmüştür.
- Vibrionaceae ailesinin diğer türleri ile çoğunlukla karıştırıp yanlış tanımlamalar yaptığı görülmüştür

Colodner R, Raz R, Meir I, et al. Identification of the Emerging Pathogen *Vibrio vulnificus* Biotype 3 by Commercially Available Phenotypic Methods. J Clin Microbiol. 2004: 4137 - 4140.

Otomatize identifikasyon sistemleri

- Gram pozitif ve Gram negatif bakteri identifikasyonu için VITEK 2 kolorimetrik kartların performansının değerlendirildiği bu çalışmada GP ve GN kartlar ve fluorimetrik kartlar (ID-G PC and IDGNB) değerlendirilmiştir
- 580 izolatın dahil edildiği çalışmada,
 - 249 Gram pozitif izolat IDGPC ve GP kartlarla sırası ile %87.5 ve %94.4 oranında doğru olarak tanımlanmış
 - 331 Gram negatif izolat ise ID-G NB ve GN kartla sırası ile %89.2 ve %97 oranında doğru tanımlanmıştır

Wallet F, Loiez C et al. Performances of VITEK 2 colorimetric cards for identification of gram positive and gram negative bacteria. J Clin Microbiol. 2005; 43: 4402-4406.

Otomatize identifikasyon sistemleri

- MicroScan, VITEK 2 ve Crystal GP' in kullanılarak koagülaz negatif stafilokokun (KNS) fenotipik olarak tanımlanma oranlarının değerlendirildiği bu çalışmada 120 klinik izolat MicroSeq 500 v2.0 veritabanı ile 16S rRNA sekans analizi ile doğrulandı
- Tanımlama oranları MicroScan, VITEK 2 ve Crystal GP için sırası ile %82.5, %87.5 ve %67.5 olarak bulunmuştur
- MicroScan (10.8%) ve Crystal GP (23.3%) için temel problem yanlış tanımlama iken VITEK 2 için düşük düzey ayırım (7.5%) temel problemi oluşturmuştur

Otomatize identifikasyon sistemleri

- VITEK 2 ve ID 32 STAPH identifikasyon sistemlerinin karşılaştırılması amacı ile 405 klinik stafilokok izolatu değerlendirilmiştir;
- VITEK 2 sistem; 387 (%95.6) izolatu doğru olarak değerlendirmiş,
 - 8 tanesi için destekleyici testler gerekmiş,
 - bir suş yanlış identifiye edilmiş,
 - dört suş identifiye edilememiş,
 - kalan 13 suş için iki tür arasında ayırım yapılamamıştır.
- Sonuç olarak VITEK 2 sistem güvenilir olarak hızlı, hassas ve tür düzeyinde identifikasyon yapabilen bir sistem olarak değerlendirilmiştir.

Otomatize identifikasyon sistemleri

- VITEK 2 Neisseria-Haemophilus kartın tanımlama performansını değerlendirmek için yapılan bu çalışmada Actinobacillus, Campylobacter, Capnocytophaga, Cardiobacterium, Eikenella, Gardnerella, Haemophilus, Kingella, Moraxella, ve Neisseria içeren 188 bakteri suşu kullanılmıştır.
 - 171 suş (%91) extra testlere gerek duyulmadan doğru tanımlanmış,
 - 1 suş (%0.5) yanlış tanımlanmış,
 - 5 suş (%2.7) tanımlanamamıştır

Otomatize identifikasyon sistemleri

- Gram pozitif bakterilerde Phoenix' in tanımlama performansının değerlendirildiği ve 424 gram pozitif kok ile yapılan bir çalışmada;
- cins düzeyinde %99.7 oranında
- tür düzeyinde %99.3 oranında doğru tanımlama bildirilmiştir
- Ayrıca bu çalışmada;
 - tüm *S.aures* ve enterokoklar doğru olarak tanımlanmıştır
 - KNS suşlarının hiçbiri *S.aureus* olarak tanımlanmamıştır
 - hastane kaynaklı ve toplum kaynaklı MRSA' yı doğru saptamıştır
 - 14 VISA suşu da doğru olarak tanımlanmıştır

Carrol KC, Borek AP et al. Evaluation of the BD Phoenix microbiology system identification and antimicrobial susceptibility testing of staphylococci and enterococci. *J Clin Microbiol.* 2006: 2072-2077

Otomatize identifikasyon sistemleri

- 384 Enterobacteriaceae ve 110 nonfermentatif, toplam 494 Gram- negatif bakteri ile yapılan bir çalışmada tanımlamada;
 - Genel olarak tür düzeyinde %98,6 oranında,
 - Enterobacteriaceae' larde %98,4 oranında,
 - nonfermentatif Gram negatif bakterilerde % 99,1 oranında uyumluluk tespit edilmiştir
- Bu çalışmada araştırmacılar Phoenix sisteminin genel olarak tatmin edici bir performans gösterdiği sonucuna varmıştır

Otomatize identifikasyon sistemleri

- 507 Enterobacteriaceae ile yapılan çalışmada;
 - 456 (89.9%) izolat tür ve cins düzeyinde,
 - 20 (3.9%) izolat sadece cins düzeyinde doğru tanımlanmış,
 - 9 (5.7%) izolat ise yanlış tanımlanmıştır. En fazla Salmonella türlerinin yanlış tanımlandığı görülmüştür
- 57 nonenterik gram -negatif basilden (Acinetobacter , Aeromonas, Burkholderia, Plesiomonas, Pseudomonas ve Stenotrophomonas spp.);
 - 48 (% 84.2) izolat cins ve tür düzeyinde,
 - 7 (% 12.3) suş ise cins seviyesine doğru tanımlanmıştır.
- Vibrionaceae türleri ise % 89.1 oranında doğru tanımlanmıştır

2014'de değişen ne?

- Kromojenik agarlar gibi geliştirilmiş besiyerleri kullanılmaya başlanmış olsa da agar plakları halen mikrobiyoloji laboratuvarlarının omurgasını oluşturmaktadır
- Agar plaklarının manual ekimi ilk kullanıldığından bugüne değişmedi
- Etüvler temelde deęiřmedi
- Iřık mikroskobu temelde deęiřmedi
- Plakların okunması hatta koklanması değişmedi
- Laboratuvarların büyük bölümünde antibiyogramda halen disk difüzyon kullanılmaya devam etmekte

2014'de değişen ne?

- İdentifikasyonda biyokimyasal substratlar minyatürize edilerek kompartmanlara yerleştirilmiş kolometrik veya flourometrik yarı veya tam otomatize araçlar kullanılmakta
- Birçok antimikrobiyal ajan farklı dilüsyonlarda kartlara/panellere yerleştirilmiş üreme otomatik okunarak MIC belirlenebilmektedir
- Otomatize sistemler daha kısa inkübasyon süresine sahip

TÜRKİYE' DEKİ MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARLARINDA TEKNOLOJİ / OTOMASYON

- Yaklaşık 1000 laboratuvardan
- 250 laboratuvarda
 - Yarı-otomatize fenotipik temelli identifikasyon / ADT sistemleri: Vitek (Biomerieux), Phoenix (BD), Microscan (Siemens)
 - Yarı-otomatize Kan Kültür sistemleri: Bactec (BD), BacT/Alert (Biomerieux)
- Yaklaşık 50 laboratuvarda
 - Yarı-otomatize TBC Kültür Tanımlama/İlaç Duyarlılık Sistemleri Bactec/MGIT (BD)
- 12 laboratuvarda
 - MALDI-TOF MS

Sayın Uğur Çiftçi' nin sunumundan alınmıştır



Son sözler

- Klinisyen ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı Uzmanları işbirliği; klinik, mikrobiyolojik testler ve nonspesifik testlerin birlikte ve dikkatli yorumu zorlukların üstesinden gelmek ve başarı için esastır
- Erken tanı koyduran, gereksiz ve yanlış tedaviyi önleyen hiçbir tanı yöntemi pahalı değildir

TEŞEKKÜRLER



Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında Bakteri Tanımlanmasında Yeni Yöntemler mi?

Dr. Tuba Turunç

**Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Adana**

5. Türkiye EKMUD Kongresi, 21-25 Mayıs, Antalya

Sunum Planı

- Neden yeni yöntemler
- Hangi yeni yöntemler

Neden Yeni Yöntemler



Hangi Yeni Yöntemler

Hangi Yeni Yöntemler

Nükleik Asit Temelli Yöntemler

LOOXTER/VYOO

Septi-Test Blood

Hyplex BloodScreen

Septi-Fast

Prove-it Sepsis

Hangi Yeni Yöntemler

Nükleik Asit Temelli Yöntemler

LOOXTER/VYOO

Septi-Test Blood

Hyplex BloodScreen

Septi-Fast

Prove-it Sepsis

Proteomik Temelli Yöntemler

Matrix associated laser desorption
ionization time of flight mass
spectrometry (MALDI-TOF MS)

Konvansiyonel Yöntemlerin Dezavantajları

Mikroskopi

- Düşük duyarlılık

Seroloji

- Yalancı pozitif-negatif sonuçlar
- Çapraz-özgül olmayan reaksiyonlar
- Önceki antikor titreleri
- Akut enfeksiyon tanısında sorunlar

Kültür

- Yavaş
- Sadece kültürde üreyen bakteriler için uygulanabilir
- Antibiyotik kullanan hastalarda duyarlılık düşüktür

Klinik Bakteriyolojide Moleküler Tanı Yöntemleri

Kültür güçlüğü olan etkenlerin tanımlanması

- Negatif kültür
 - Pahalı kültür
 - Yavaş üreyen bakteriler
 - Güç üreyen bakteriler
 - Hücre bağımlı bakteriler
-
- Serolojik testlerin sınırlı olduğu durumlar
-
- Antibiyotik kullanımı sonrası etken tanımlanma
-
- Kültür ve serolojinin negatif olduğu infeksiyonlarda uygun tedavinin yapılabilmesi

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA'nın çoğaltılabileceği bu teknik ilk kez 1983 de **Kary Mullis** adlı bir biyokimyacı tarafından geliştirilmiştir.

İlk kez başarılı in vitro DNA amplifikasyonu **Saiki ve ark.** tarafından 1985 yılında gerçekleştirildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA'nın çoğaltılabileceği bu teknik ilk kez 1983 de **Kary Mullis** adlı bir biyokimyacı tarafından geliştirilmiştir.

İlk kez başarılı in vitro DNA amplifikasyonu **Saiki ve ark.** tarafından 1985 yılında gerçekleştirildi.



Kary Mullis 1983

Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

- Her bir patojen için özgül primer setinin kullanımı sonucu
- Farklı hedeflerin bir tüp içerisinde
- Aynı anda amplifikasyonuna dayalı
- Multipleks PZR prensibine dayanmaktadır.

Septi-Fast

Septi-Fast

Sepsisten % 90 üzerinde
sorumlu olan ve kültürü
yapılabilen 25
mikroorganizmayı
tanımlayabilmektedir

Septi-Fast

Sepsisten % 90 üzerinde
sorumlu olan ve kültürü
yapılabilen 25
mikroorganizmayı
tanımlayabilmektedir

Kan dışında plevral sıvı,
periton sıvısı gibi
örneklerde
çalışma imkanı

Septi-Fast

Sepsisten % 90 üzerinde sorumlu olan ve kültürü yapılabilen 25 mikroorganizmayı tanımlayabilmektedir

Kan dışında plevral sıvı, periton sıvısı gibi örneklerde çalışma imkanı

3-30 cfu/ml gibi düşük sınır mikroorganizma tanımlama imkanı sağlamaktadır.

Septi-Fast

Sepsisten % 90 üzerinde sorumlu olan ve kültürü yapılabilen 25 mikroorganizmayı tanımlayabilmektedir

Kan dışında plevral sıvı, periton sıvısı gibi örneklerde çalışma imkanı

3-30 cfu/ml gibi düşük sınır mikroorganizma tanımlama imkanı sağlamaktadır.

6 saat gibi kısa sürede analize olanak sağlamakta

Septi-Fast

Sepsisten % 90 üzerinde sorumlu olan ve kültürü yapılabilen 25 mikroorganizmayı tanımlayabilmektedir

Kan dışında plevral sıvı, periton sıvısı gibi örneklerde çalışma imkanı

3-30 cfu/ml gibi düşük sınır mikroorganizma tanımlama imkanı sağlamaktadır.

6 saat gibi kısa sürede analize olanak sağlamakta

Kan kültürüne göre daha az kontaminasyon oranına sahiptir

SeptiFast Paneli

Gram-negatif bakteriler	Gram-pozitif bakteriler	Fungal patojenler
<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KNS	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Streptococcus spp</i>	<i>Candida crusei</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Proteus mirabilis</i>		
<i>P. aerogenes</i>		
<i>A. baumannii</i>		
<i>S.maltophilia</i>		

Septi-Test

İnsan DNA'sını ortadan kaldırmak için DNAz ile muamele edilmekte

50 cfu/ml'e kadar kanda mikroorganizma varlığını saptayabilme
114 farklı Gram negatif bakteri türünü tanımlayabilmekte

Test için örneğin laboratuvara ulaşımı ile sonuç verilmesi arasındaki süre 8-12 saat kadardır.

Septi-Test

İnsan DNA'sını ortadan kaldırmak için DNAz ile muamele edilmekte

50 cfu/ml'e kadar kanda mikroorganizma varlığını saptayabilme
114 farklı Gram negatif bakteri türünü tanımlayabilmekte

Test için örneğin laboratuvara ulaşımı ile sonuç verilmesi arasındaki süre 8-12 saat kadardır.

Yöntemin bir dezavantajı, hücre içi yerleşimli bakterilerin insan lökosit DNA'sı yıkımı ile kaybedilmesidir

Hyplex BloodScreen

Gram pozitif ve Gram negatif paneli ile 10 farklı bakteri türünü tanımlayabilmektedir.

Bu yöntem pozitif kan kültürlerinde uygulanmakta olup test süresi 3 saat civarındadır.

Farklı bakteri türlerinde % 96.6-100 arasında değişen duyarlılık, % 92.5-100 arasında değişen özgüllük

LOOXTER/VYOO

Prove-it Sepsis

LOOXTER/VYOO

Prove-it Sepsis

16S rRNA amplifikasyonu yapan
bir yöntemdir.

LOOXTER/VYOO

Prove-it Sepsis

16S rRNA amplifikasyonu yapan bir yöntemdir.



34 farklı bakteri, 6 Kandida türünü, *A.fumigatus* ile beş farklı antibiyotik direnç determinantını tanımlayabilmektedir.

LOOXTER/VYOO

Prove-it Sepsis

16S rRNA amplifikasyonu yapan bir yöntemdir.



34 farklı bakteri, 6 Kandida türünü, *A.fumigatus* ile beş farklı antibiyotik direnç determinantını tanımlayabilmektedir.



Yöntem 8 saat gibi kısa bir sürede sonuç verebilmekte ve örnekte 3-30 cfu/ml düzeyinde bulunan patojeni tanımlama duyarlılığı göstermektedir.

LOOXTER/VYOO

Prove-it Sepsis

16S rRNA amplifikasyonu yapan bir yöntemdir.

60 bakteri, 13 mantar türü ile mecA-vanA/B direnç genlerini tanımlama özelliğine sahiptir

34 farklı bakteri, 6 *Candida* türünü, *A.fumigatus* ile beş farklı antibiyotik direnç determinantını tanımlayabilmektedir.

Yöntem 8 saat gibi kısa bir sürede sonuç verebilmekte ve örnekte 3-30 cfu/ml düzeyinde bulunan patojeni tanımlama duyarlılığı göstermektedir

LOOXTER/VYOO

16S rRNA amplifikasyonu yapan bir yöntemdir.

34 farklı bakteri, 6 *Kandida* türünü, *A.fumigatus* ile beş farklı antibiyotik direnç determinantını tanımlayabilmektedir.

Yöntem 8 saat gibi kısa bir sürede sonuç verebilmekte ve örnekte 3-30 cfu/ml düzeyinde bulunan patojeni tanımlama duyarlılığı göstermektedir.

Prove-it Sepsis

60 bakteri, 13 mantar türü ile *mecA-vanA/B* direnç genlerini tanımlama özelliğine sahiptir.

Klinik olarak şüpheli sepsis tanısı olan 3318 hastada yapılan bir araştırmada Prove-it Sepsis % 94.7 duyarlılık, % 95.7 özgüllüğe sahip bulunmuştur.

LOOXTER/VYOO

16S rRNA amplifikasyonu yapan bir yöntemdir.

34 farklı bakteri, 6 *Kandida* türünü, *A.fumigatus* ile beş farklı antibiyotik direnç determinantını tanımlayabilmektedir.

Yöntem 8 saat gibi kısa bir sürede sonuç verebilmekte ve örnekte 3-30 cfu/ml düzeyinde bulunan patojeni tanımlama duyarlılığı göstermektedir.

Prove-it Sepsis

60 bakteri, 13 mantar türü ile *mecA-vanA/B* direnç genlerini tanımlama özelliğine sahiptir.

Klinik olarak şüpheli sepsis tanısı olan 3318 hastada yapılan bir araştırmada Prove-it Sepsis % 94.7 duyarlılık, % 95.7 özgüllüğe sahip bulunmuştur.

Bu yöntem pozitif kan kültür örneklerinde analiz yapma imkanı sunmaktadır. Yöntemin sonuç verme süresi 3 saattir.

Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae*

G. Tzanakaki, M. Tsopanomichalou, K. Kesanopoulos, R. Matzourani, M. Sioumala, A. Tabaki and J. Kremastinou

National Meningococcal Reference Laboratory, National School of Public Health, Athens, Greece

Clin Microbiol Infect 2005; 11: 386–390

139 bakteriyel menenjit olgusu

- 94 kültür pozitif
- 12 yayma pozitif
- 33 klinik bulgu

Multipleks PCR

Duyarlılık ; *H. influenzae* % 88
S. pneumoniae % 92
N. meningitidis % 94

Özgüllük ; %100

Dynamics of PCR-based diagnosis in patients with invasive meningococcal disease

E. Bronská^{1,2}, J. Kaimová², O. Dzuráň³, V. Maresová², P. Krz² and J. Benš²

¹Second Medical Faculty, Charles University, First Department of Infectious Diseases, ²National Institute of Public Health National Reference Laboratory for Meningococcal Infections and ³Third Medical Faculty, Charles University, Department of Infectious Diseases, Prague, Czech Republic

ABSTRACT

Invasive meningococcal disease continues to be a life-threatening illness. It is important for the administration of appropriate treatment, diagnosis of meningococcal aetiology and the dynamics of biological samples. Sixty cerebrospinal fluid (CSF) and 1 week of hospitalisation from 37 patients with laboratory-confirmed meningococcal disease were investigated. Overall, 91.9% of CSF samples and 41.9% of blood culture was positive for only 35% of results were obtained until day 7 with CSF and until day 5 with blood culture for molecular diagnosis should be collected in meningococcal disease.

Keywords: Diagnosis meningococcal disease, molecular diagnosis.

Original Submission: 1 April 2005; Revised Submission: 18 July 2005

Clin Microbiol Infect 2006; 12: 137–141

	Test ^a	Tests done	Positive (%)	p value
Collection of CSF samples				
Before onset of antibiotic treatment	PCR	21	21 (100)	
	LA	15	9 (60)	
	Culture	23	12 (52)	
After onset of antibiotic treatment	PCR	16	13 (81)	0.07
	LA	9	2 (22)	0.10
	Culture	14	1 (7)	0.01
Collection of blood samples				
Before onset of antibiotic treatment	PCR	17	8 (47)	
	LA	12	5 (42)	
	Culture	26	12 (46)	
After onset of antibiotic treatment	PCR	20	9 (45)	1.00
	LA	14	4 (29)	0.68
	Culture	10	2 (20)	0.25

LA, latex agglutination test.

^aFor CSF, only the first samples collected on the day of admission were included. A

Çok İlacı Dirençli Hastane Enfeksiyonu Etkenlerinin Moleküler Yöntemler ile Tanımlanması

Çok İlaça Dirençli Hastane Enfeksiyonu Etkenlerinin Moleküler Yöntemler ile Tanımlanması

MRSA

Çok İlaça Dirençli Hastane Enfeksiyonu Etkenlerinin Moleküler Yöntemler ile Tanımlanması

MRSA

GeneOhm MRSA
2 h sonuç alınır
Duyarlılık %92
Özgüllük %96

GeneExpert
75 dakikada
sonuçlanır
Duyarlılık %86
Özgüllük %94

Çok İlaça Dirençli Hastane Enfeksiyonu Etkenlerinin Moleküler Yöntemler ile Tanımlanması

MRSA

VRE

GeneOhm MRSA
2 h sonuç alınır
Duyarlılık %92
Özgüllük %96

GeneExpert
75 dakikada
sonuçlanır
Duyarlılık %86
Özgüllük %94

Çok İlaça Dirençli Hastane Enfeksiyonu Etkenlerinin Moleküler Yöntemler ile Tanımlanması

MRSA

GeneOhm MRSA
2 h sonuç alınır
Duyarlılık %92
Özgüllük %96

GeneExpert
75 dakikada
sonuçlanır
Duyarlılık %86
Özgüllük %94

VRE

Multipleks PZR ile
van A/B/C1/C2

Duyarlılık %88.5
Özgüllük %99.6
Sonuçlar 6-8 h

Proteomik Temelli Teknolojiler

Belli bir zamanda, belli bir hücrede, belli bir dokuda, belli bir organizmada bulunan gereken tüm biyokimyasal tepkimeleri yürüten proteinlerin tamamı **proteom**

Proteomik Temelli Teknolojiler

Belli bir zamanda, belli bir hücrede, belli bir dokuda, belli bir organizmada bulunan gereken tüm biyokimyasal tepkimeleri yürüten proteinlerin tamamı **proteom**

Proteomik ise belli bir organizmada bulunan proteinlerin toplamını incelemek için kullanılan yöntemlerin tümü

Kimya Nobel Ödülü 2002

Biyolojik makro-moleküllerin yapısal analizi ve tanımlanması yöntemlerinin geliştirilmesi



John Fenn



Koichi Tanaka

MALDI-TOF MS

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight, Mass Spectrometry

Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi

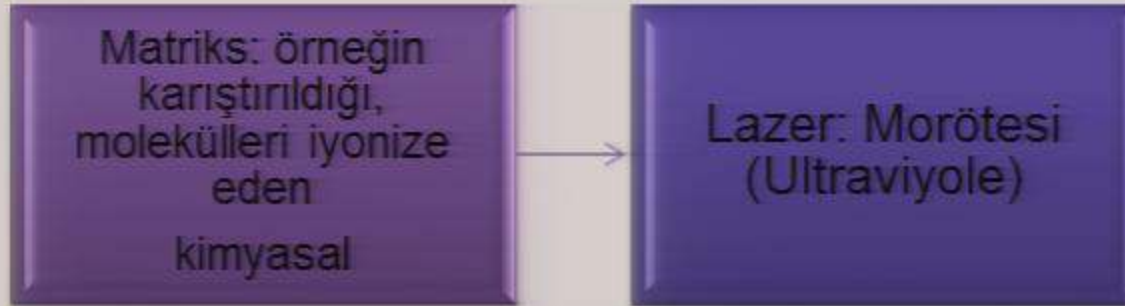


MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS

Matriks: örneğin
karıştırıldığı,
molekülleri iyonize
eden
kimyasal

MALDI-TOF MS



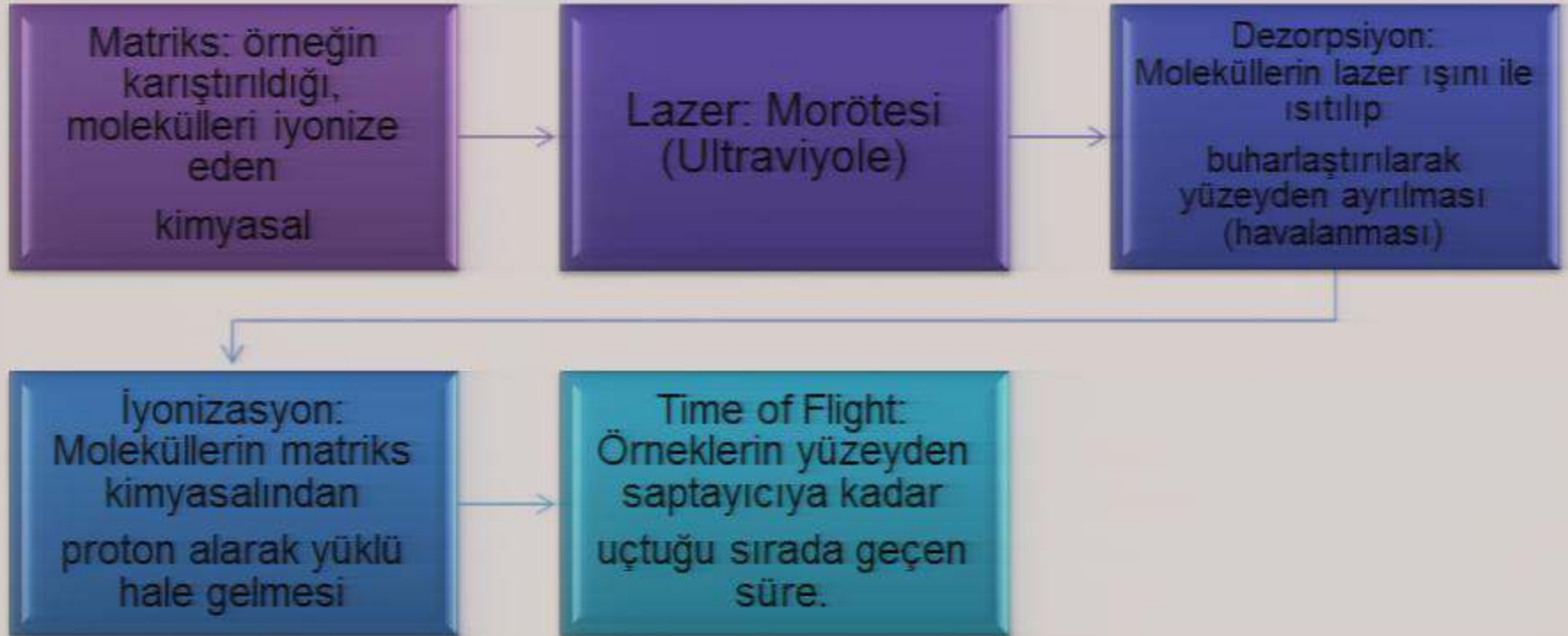
MALDI-TOF MS



MALDI-TOF MS

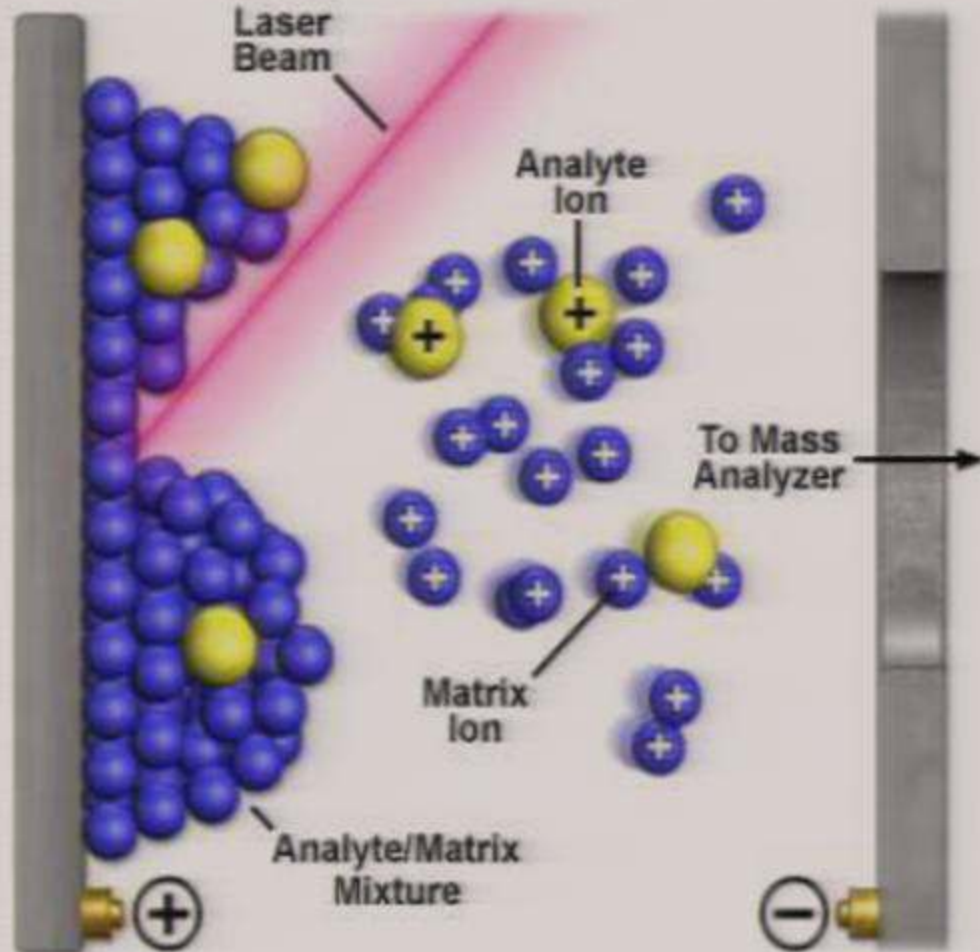


MALDI-TOF MS



Matriks

- Zayıf asit çözeltilisidir. Kolayca proton (H^+) verir.
- Lazer ışını tutup ortamın ısınmasını da bu maddenin sağladığı düşünülmektedir.
- Ortamın ısınması molekküllerin buharlaşması ve yüzeyden ayrılmasını sağlar
- Matriks maddesi hidrojen iyonlarını (H^+) hücrelerden gelen moleküllere aktararak onların (+) yüklü hale gelmesini sağlar

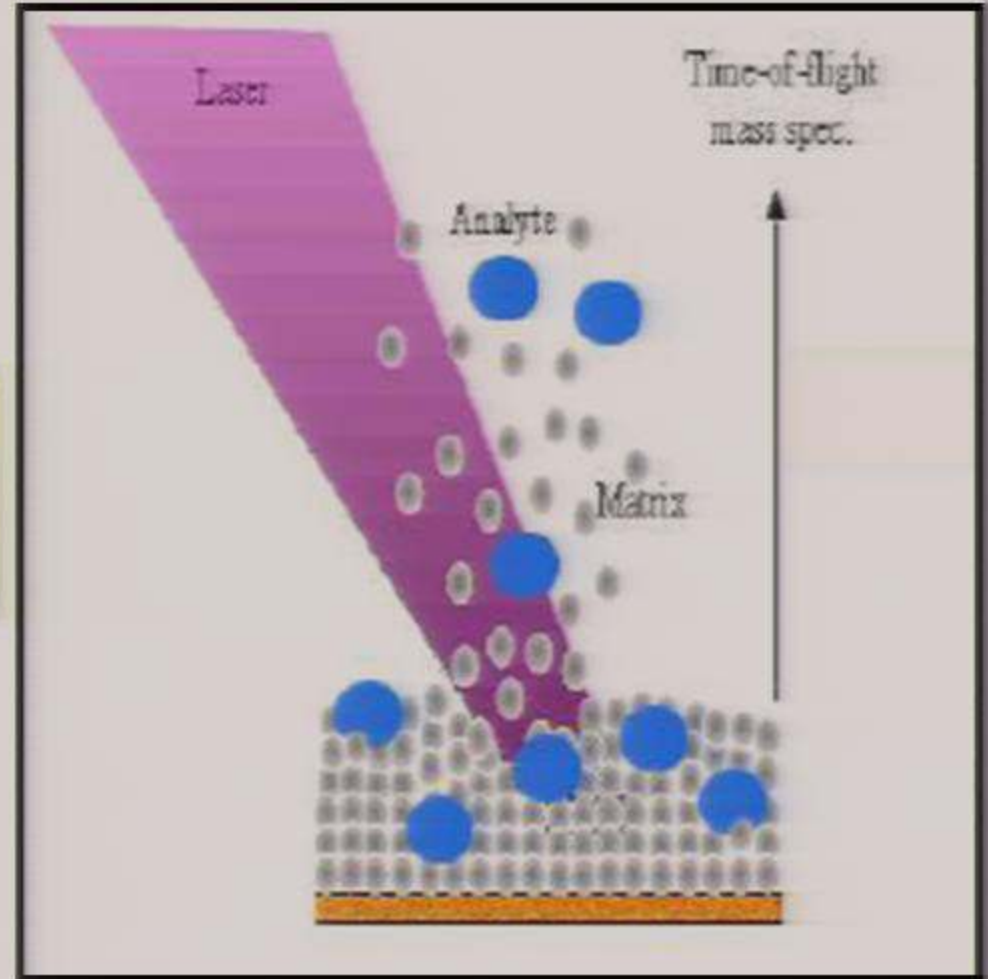


Lazer ile Dezorpsiyon ve İyonizasyon

İyonizasyon morötesi ışınlar ile sağlanıyor

Diğer iyonizasyon yöntemleri DNA, protein gibi biyopolimerleri parçalayabildiğinden MALDI yumuşak bir iyonizasyon yöntemi olarak değerlendiriliyor

Moleküllerin bütünlüğünün korunması incelemenin güvenilirliği açısından çok önemli



Uçuş Süresi (TOF)

İyonize olup havalanan moleküller aygıtın tüpü içerisindeki yüksek elektrik gerilimi nedeni ile buldukları yüzeyden algılayıcıya doğru hızlandırılırlar.

İncelenen moleküllerin ağırlığı ne kadar az ise hızlanma o kadar fazla, algılayıcıya ulaşma süresi o kadar kısa olur.

Moleküllerin uçuş sırasında hava molekülleri ile çarpışmasını ortadan kaldırmak için incelemenin yapıldığı tüpün içindeki hava boşaltılarak vakum oluşturulur.

Uçuş Süresi (TOF)

Moleküller aynı yüke sahip olduklarında kütleleriyle orantılı bir hızla hareket ederler

Peptidler kütlelerine göre uçuş tüpünün içinden geçerler ve farklı zaman aralıklarında detektöre çarparlar

Kütle spektrometrisi verileri kolayca m/z oranına dönüştürür.

Uçuş Süresi (TOF)

Lazer vuruşları ile oluşan dijitalize veriler TOF kütle spektrumu oluşturacak şekilde toplanır.

TOF kütle spektrumu zamanın bir fonksiyonu olarak saptayıcı sinyalin bir kayıdır.

Kütlenin (m) bir molekülünün uçuş zamanı ve bu mesafeyi geçerken yüklendiği akım (z) $(m/z)^{1/2}$ ye orantılıdır.

Biyoinformatik Analiz

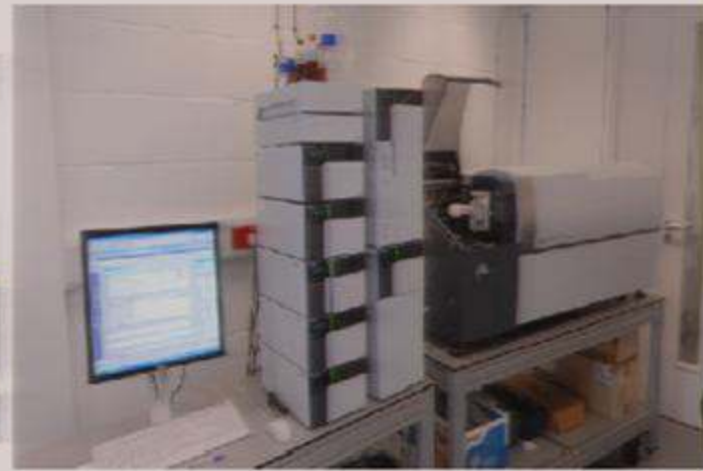
BioTyper(Bruker Daltonics Inc., Bremen, Almanya)

Saramis (AnagnosTec GmbH, Potsdam-Golm, Almanya)

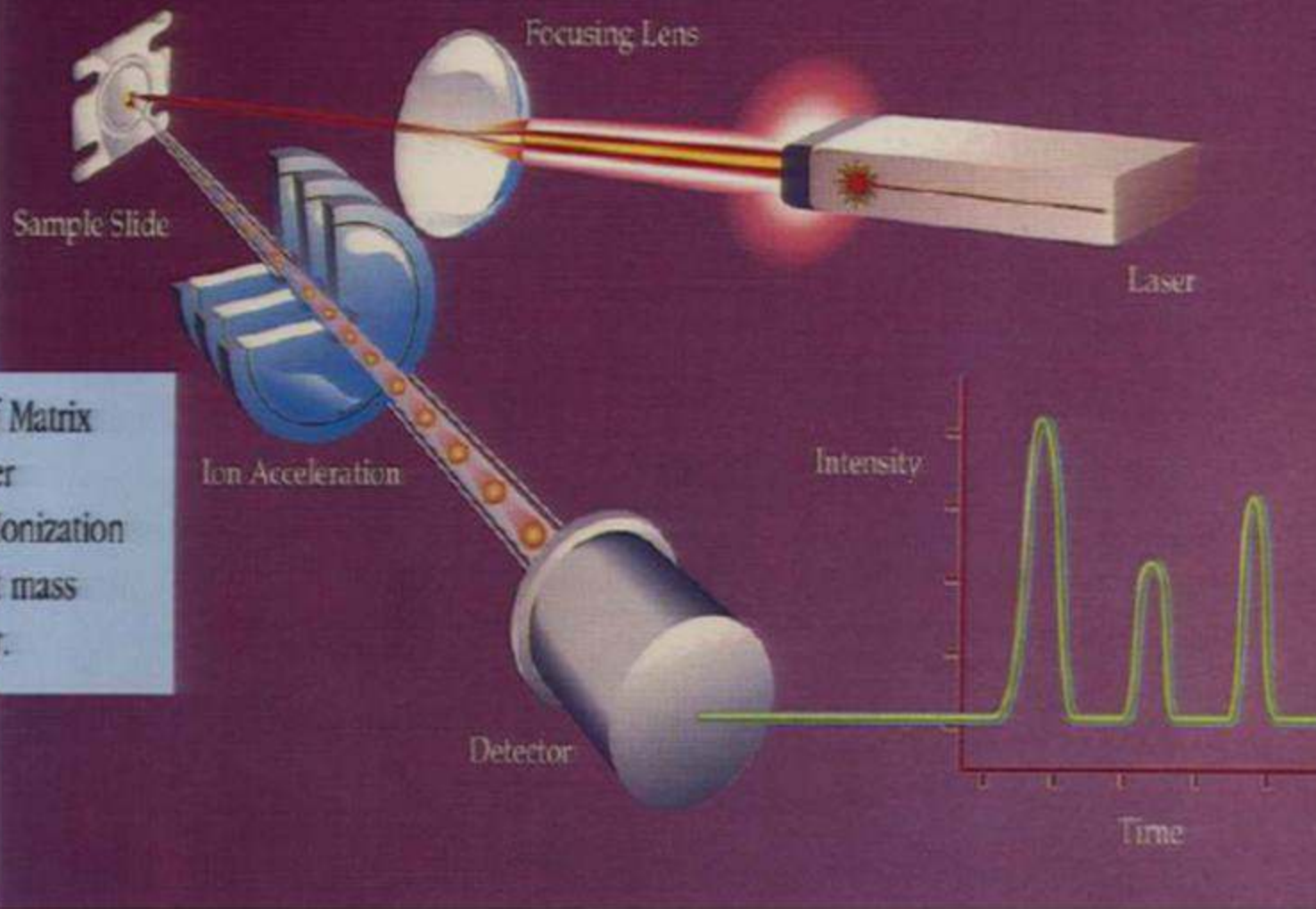
Kullanılan Cihazlar



Applied Biosystems Voyager
DE Pro MALDI-TOF
Applied Biosystems Q-Star ESI-
Quadrupole-TOF
Shimadzu LC MS IT-TOF mass
spectrometer
Sequenom Mass ARRAY
Compact Analyser



Schematic of Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight mass spectrometry.



MALDI-TOF Yöntemi ile Tespit Edilebilen Mikroorganizmalar

- Gram-pozitif koklar
 - Stafilokok, streptokoklar
- Enterobacteriaceae
 - *Escherichia coli*
 - *Yersinia enterocolitica*
 - *Erwinia* türleri
 - *Salmonella enterica*
- Nonfermenter bakteriler
- *Campylobacter*
- *Helicobacter pylori*
- *Aeromonas*
- *Haemophilus influenzae*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Bartonella henselae*
- *Neisseria*, *Listeria*, mikobakteri
- Antibiyotik direncinin dakikalar içinde belirlenmesi

Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry

Piseth Seng,² Michel Drancourt,² Frédérique Gouriet, Bernard La Scola, Pierre-Edouard Fournier, Jean Marc Rolain, and Didier Raoult

Clinical Infectious Diseases 2009; 49:543–51

1660 bakteri izolatının **%95.4 doğru** tanımlanmış
1 izolat için **6 dakika**

Maliyet konvansiyonel fenotipik tanımlamanın **%22-32**



COLONY



MALDI-TOF



GRAM-STAINING

Identification and stop

Delay 6 min

Cost 2.44 €

Manual susceptibility test

Semi automated susceptibility test

Delay: 5 min

Cost: 0.60 €

Current methods of identification

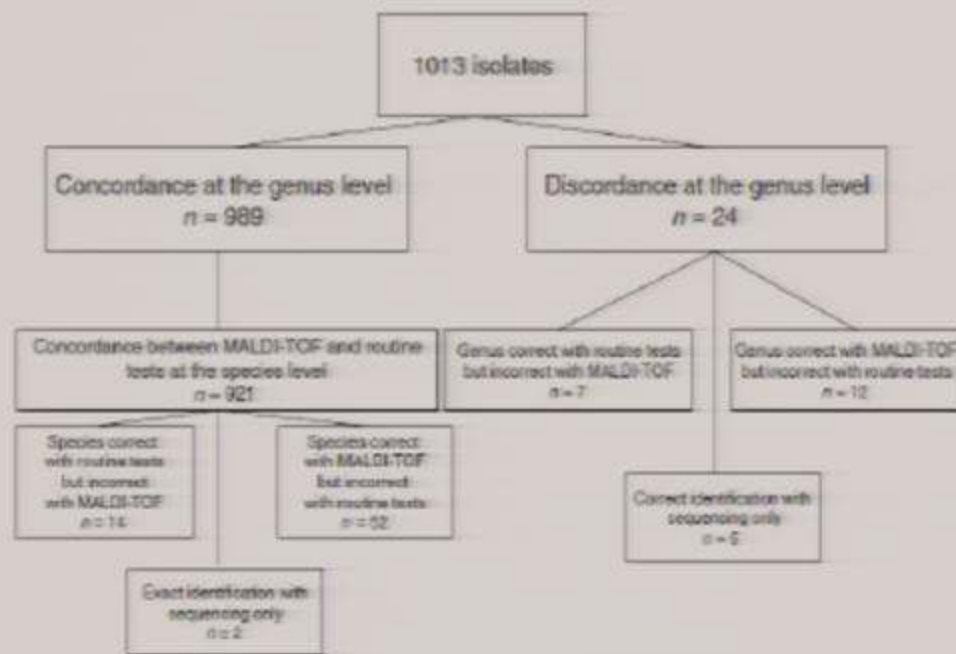
Current methods of identification and susceptibility tests

Total delay	6 min	24-28 h	24-48 h	5-48 h	5-48 h
Total cost	2.44 €	6.60-7.40€	9.04-9.54 €	4.60-13.85 €	11.2-15.45 €

Matrix-assisted laser-desorption/ionization BIOTYPER: experience in the routine of a University hospital

E. Bessède^{1,2,3}, M. Angla-gre¹, Y. Delagarde¹, S. Sep Hieng¹, A. Ménard^{1,2,3} and F. Mégraud^{1,2,3}

Mayis 2010



MALDI-TOF %99

Fenotipik yöntem %98

MALDI-TOF Süren Çalışmalar

Anaerop bakterilerin MALDI TOF ile doğru tür saptama düzeyi %67,2'de kalmıştır.

Bir bakteri türünden tanımlanan MALDI TOF biçemleri, değerlendirme programlarına ne kadar çok tanıtılırsa, bu bakteri türünün doğru tanımlanma oranı o ölçüde artmaktadır.

Mikobakteriler ve dermatofitler için standardizasyon çalışmaları devam etmektedir.

Salmonella Türlerinin Hızlı Tanısında Kromojenik Besiyeri İle Birlikte "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry" Yönteminin Phoenix Otomatize Sistemi ile Kıyaslanması

Işın AKYAR *  Simgen CAN **

* Acıbadem Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Üsküdar, İstanbul - TÜRKİYE

Özet

İnsan ve hayvanlarda gıda ile bulaşan hastalıklara yol açan etkenlerin en başta gelenlerinden biri olan *Salmonella* identifikasyonu genellikle 2-3 günden fazla sürmektedir. Kütle spektrometrisi esasına dayanan bir yöntem olan MALDI-TOF ile rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan otomatize sistemlere göre daha kısa sürede, güvenilir ve maliyet etkin sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu çalışmanın amacı, "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) yönteminin Phoenix otomatize identifikasyon sistemi ile karşılaştırmasını yaparak bu patojen organizmaların yol açtığı gastrointestinal enfeksiyonlarda kısa sürede sonuç veren, pratik, maliyet etkin ve güvenilir bir yöntem olduğunun değerlendirilmesidir. Ağustos 2007 ve Ağustos 2011 tarihleri arasında toplanan 11186 hasta örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta örnekleri rutin olarak CHROMagar *Salmonella* plus ve Mac Conkey agar besiyerlerine ekilmişlerdir. 347 *Salmonella* türü hem Phoenix otomatize sisteminde hem de MALDI-TOF cihazında çalışılmıştır. 2 yöntemin sonuçları birbirini %100 uyumludur. Her iki cihazda da tür düzeyinde tanımlama yapılabilmekte, alttür tanımlamaları için konvansiyonel olarak *Salmonella* antiserumları ile serolojik tiplendirmeye gereksinim duyulmaktadır. CHROMagar *Salmonella* plus besiyerinin MALDI-TOF ile birlikte kullanımı identifikasyon için gereken zamanı azaltmış, *Salmonella* türlerinin kolaylıkla isimlendirilmelerini sağlamıştır. MALDI-TOF'un rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarında kullanımı *Salmonella* türlerinin tek bir besiyeri ile ve 48 saat içerisinde antibiyotik duyarlılıkları ile birlikte maliyet-etkin ve güvenilir bir şekilde saptanabilmesini sağlamaktadır.

MALDI-TOF Yöntemi ile İleri Düzey Çalışmalar

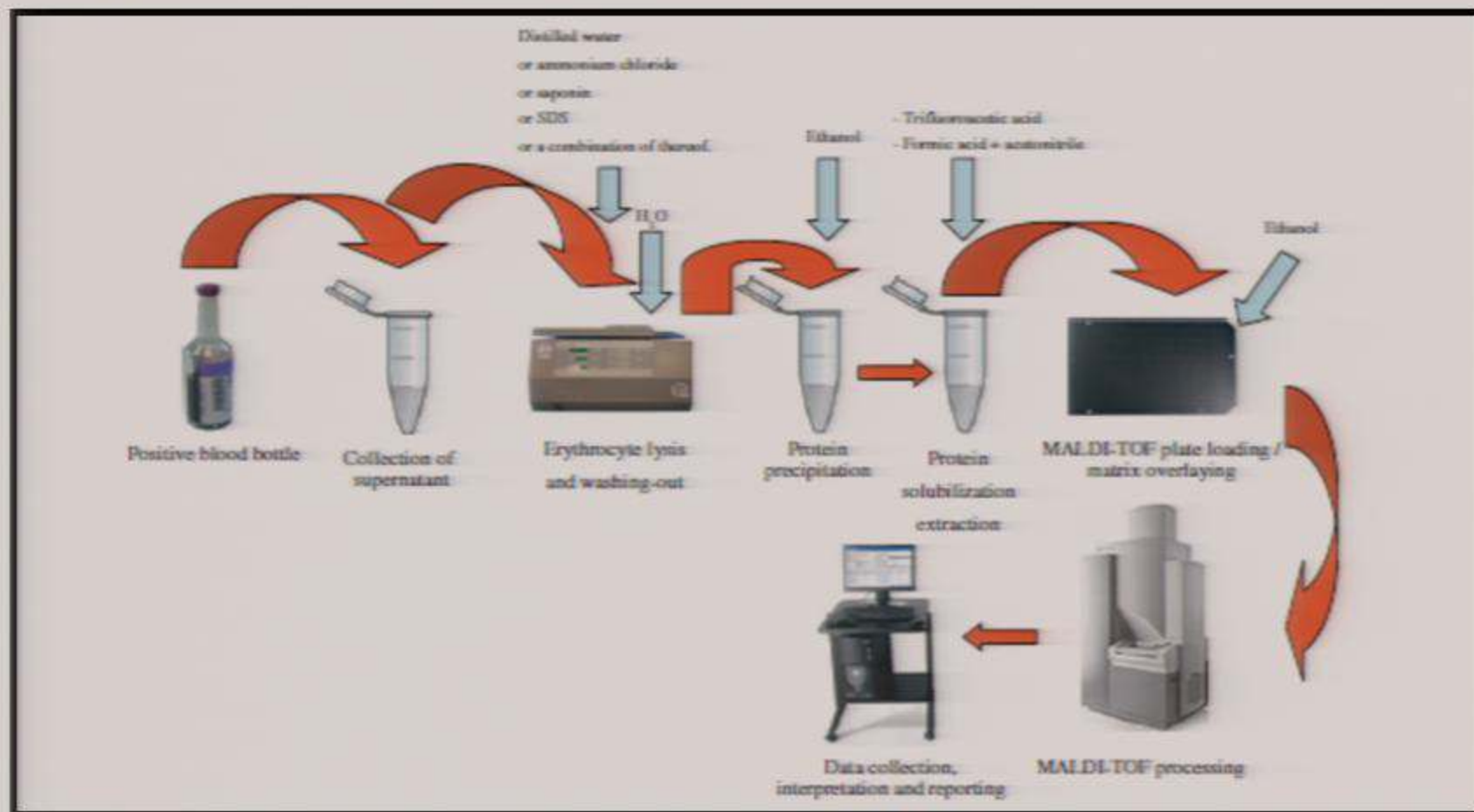
Katı besiyerine kültür ekimi yapılmaksızın doğrudan şişeden etkeni izole etmek

Direkt idrar örneklerinin kültür işlemi uygulamaksızın bakteri tür tayini yapılması

Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a review

M. Drancourt

Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses Emergentes (URMITE) UMR CNRS 6236, IRD 198, IFR48, Université de la Méditerranée, Marseille, France



Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a review

M. Drancourt

Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses Emergentes (URMITE) UMR CNRS 6236, IRD 198, IFR48, Université de la Méditerranée, Marseille, France

TABLE I. Performance in identifying bacteria in positive blood culture broth

Nature of specimen (n = number of specimens)	Organism	Percentage of interpretable spectra (%)	Percentage of correct identification: genus level (%)	Percentage of correction: identification: species level (%)	Major identification failures
Positive blood culture broth (n = 599)	Bacteria	94	76	76	<i>Streptococcus</i> spp.
Positive blood culture broth (n = 126)	Bacteria	97	79	57	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Positive blood culture broth (n = 179)	Bacteria	100*	80*	80*	<i>S. pneumoniae</i>
Spiked bottles (n = 33)					<i>Propionibacterium acnes</i>
Spiked bottles (n = 312)	Bacteria	98	98	89	<i>S. pneumoniae</i>
Positive blood culture broth (n = 388)	<i>Candida</i> spp.	96	98	91	<i>S. pneumoniae</i>
Positive blood culture broth (n = 304)	Bacteria	94.7	87	87	Uncommon species
Spiked bottles (n = 48)	<i>Candida</i> spp.	100	100	100	–
Positive blood culture broth (n = 1)	<i>Candida albicans</i>	100	100	100	–

*Not identified with species

Sonuç

Sonuç

Tanı

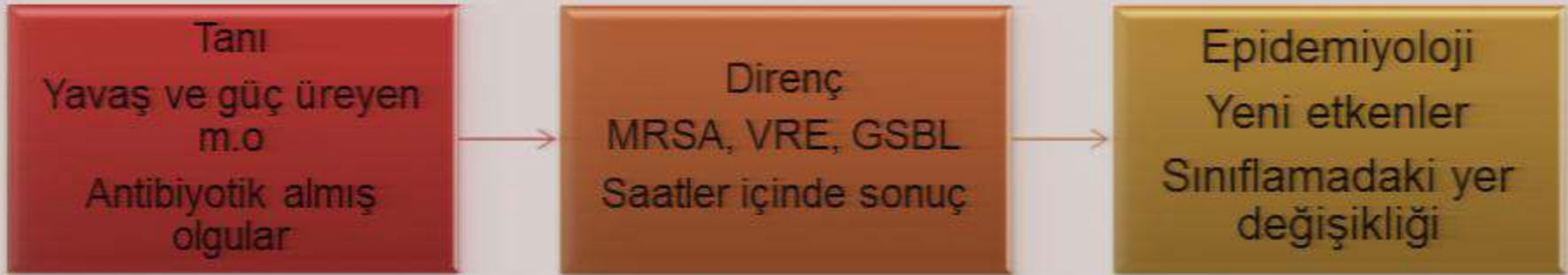
Yavaş ve güç üreyen
m.o

Antibiyotik almış
olgular

Sonuç



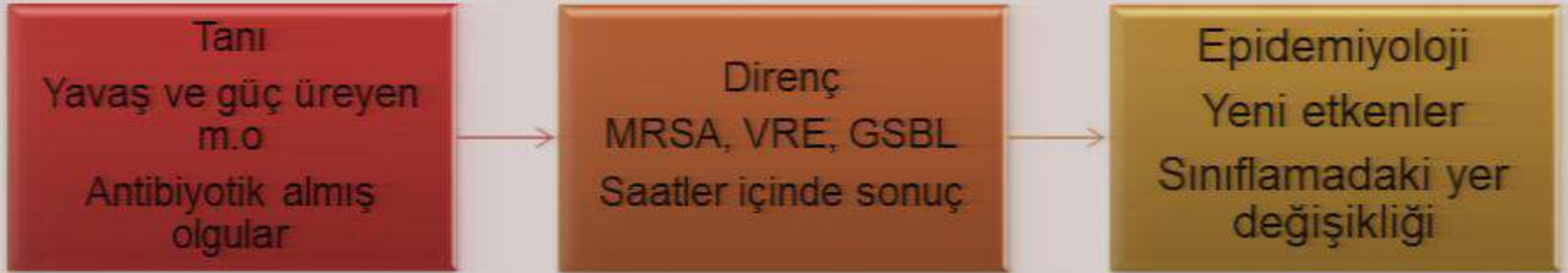
Sonuç



Sonuç



Sonuç



Sonuç



Sonuç





...
*Yüz karası değil, kömür karası
Böyle kazanılır ekmek parası.*

O. Veli