

# Moleküler Tanı Yöntemlerinin Yeri Solunum yolu Enfeksiyonları

Alper Şener  
Onsekiz Mart Üniversitesi  
Enfeksiyon Hastalıkları  
[dr.alpersener@gmail.com](mailto:dr.alpersener@gmail.com)

# Sunum içeriği

- Giriş (Önemi-Tanım-Uygulama alanları)
- Tarihçe
- Tanı Testleri
  - Viral
  - Bakteriyel
  - Kombine (virüs-virüs/ virüs- bakteri)
  - TB
- Maliyet
- Ufukta neler var?
- Rehberler ne diyor?
- Eve gidecek mesajlar

# Molecular Diagnostics: Past, Present, and Future

GEORGE P. PATRINOS<sup>1</sup> AND WILHELM ANSORGE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Erasmus University Medical Center, Faculty of Medicine and Health Sciences, MGC Department of Cell Biology and Genetics, Rotterdam, The Netherlands;

<sup>2</sup>European Molecular Biology Laboratory, Biological Structures and Biocomputing Programme, Heidelberg, Germany

- ‘Tıpta yüzyılın yeni yüzü’
- ‘Kişiselleştirilmiş tanı ve tedaviye giden yolun başlangıcı’

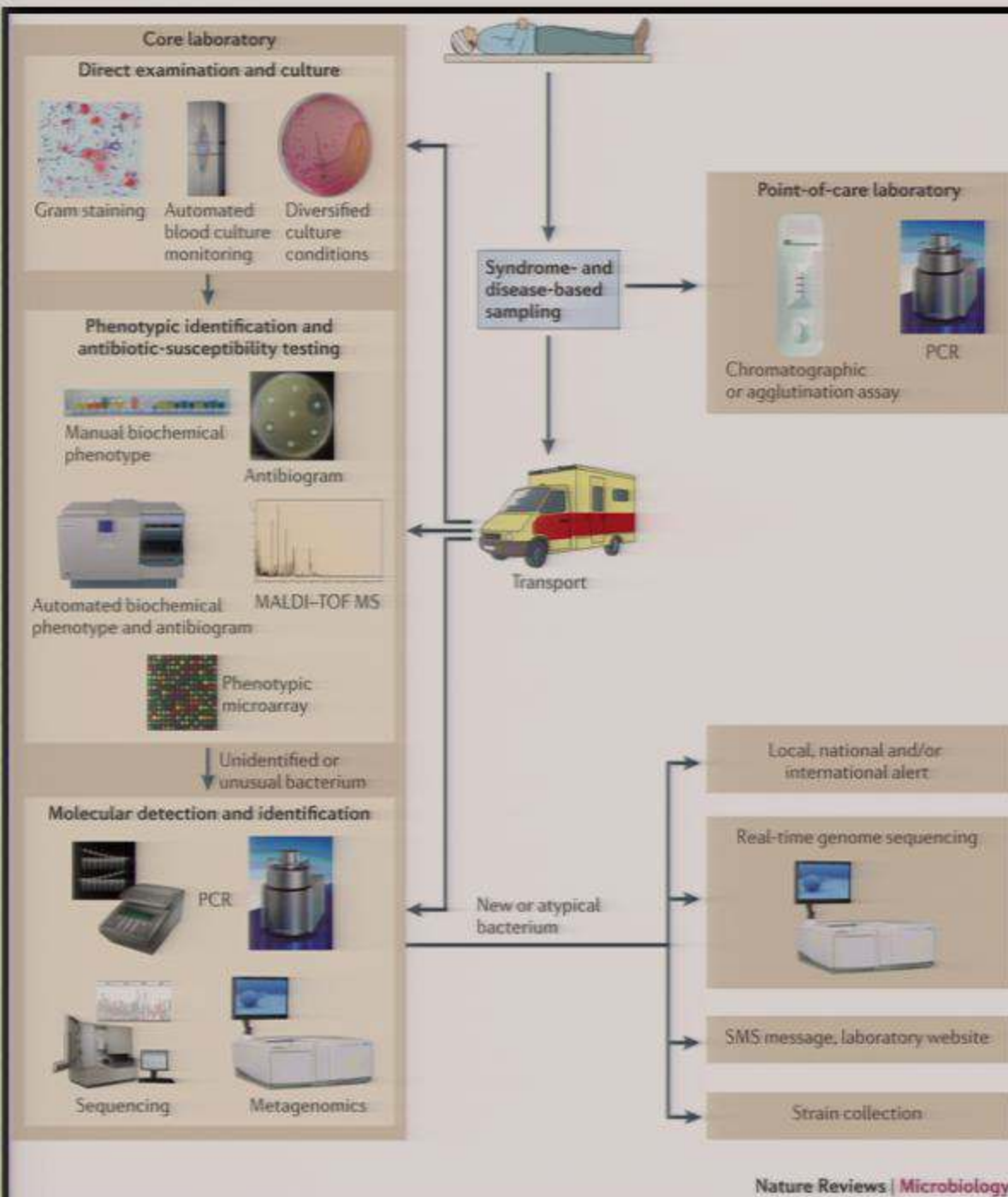
Perspective  
JULY 22, 2010

**The Path to Personalized Medicine**

Margaret A. Hamburg, M.D., and Francis S. Collins, M.D., Ph.D.

N ENGL J MED 363:4 NEJM.ORG JULY 22, 2010

The New England Journal of Medicine



# ‘PoC’: Point of Care

- Hasta başında
- Kişiselleştirilmiş
- Tedaviyi hızlı yönlendirme
- Toplum sağlığı açısından önemli bulaşıcı hastalıklar için vazgeçilmez

# Tanım

- Moleküler Tanı

DNA ve/ veya RNA'da olan patojenik mutasyonları gösteren testler

- Moleküler Mikrobiyolojik Tanı

Mikro organizmaların kendisinin veya komponentlerinin direkt veya dolaylı olarak gösteren testler

# Moleküler mikrobiyolojik testler



**CİHAZ**



**İNSAN**

# Moleküler mikrobiyolojinin uygulama alanları

## Pneumonia

Influenza viruses  
Respiratory syncytial virus  
*Mycoplasma pneumoniae*  
*Bordetella pertussis*  
*Staphylococcus aureus*  
*Pneumocystis jirovecii*  
Legionella urinary antigen  
Pneumococcal urinary antigen



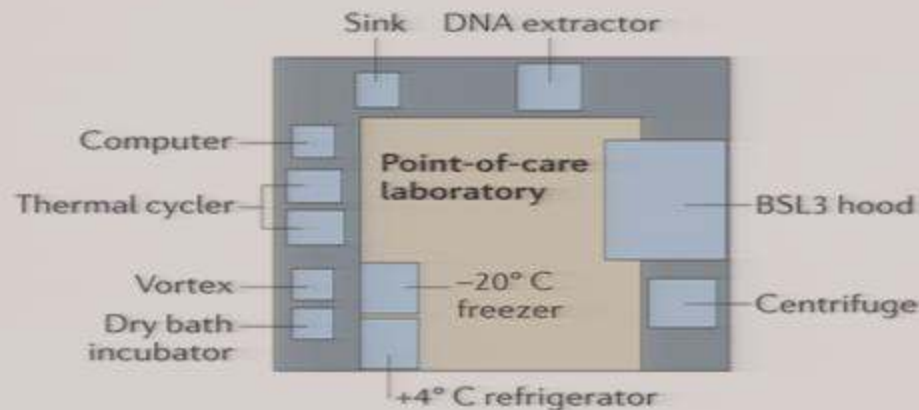
## Fever in returning travellers

*Plasmodium* spp.  
Dengue virus



## Gastroenteritis

Rotavirus  
Adenoviruses  
*Clostridium difficile*  
*Helicobacter pylori*



## Sexually transmitted diseases

*Neisseria gonorrhoeae*  
Herpes simplex virus  
HIV  
*Chlamydia trachomatis*



## Pharyngitis

*Streptococcus pyogenes*  
Epstein-Barr virus

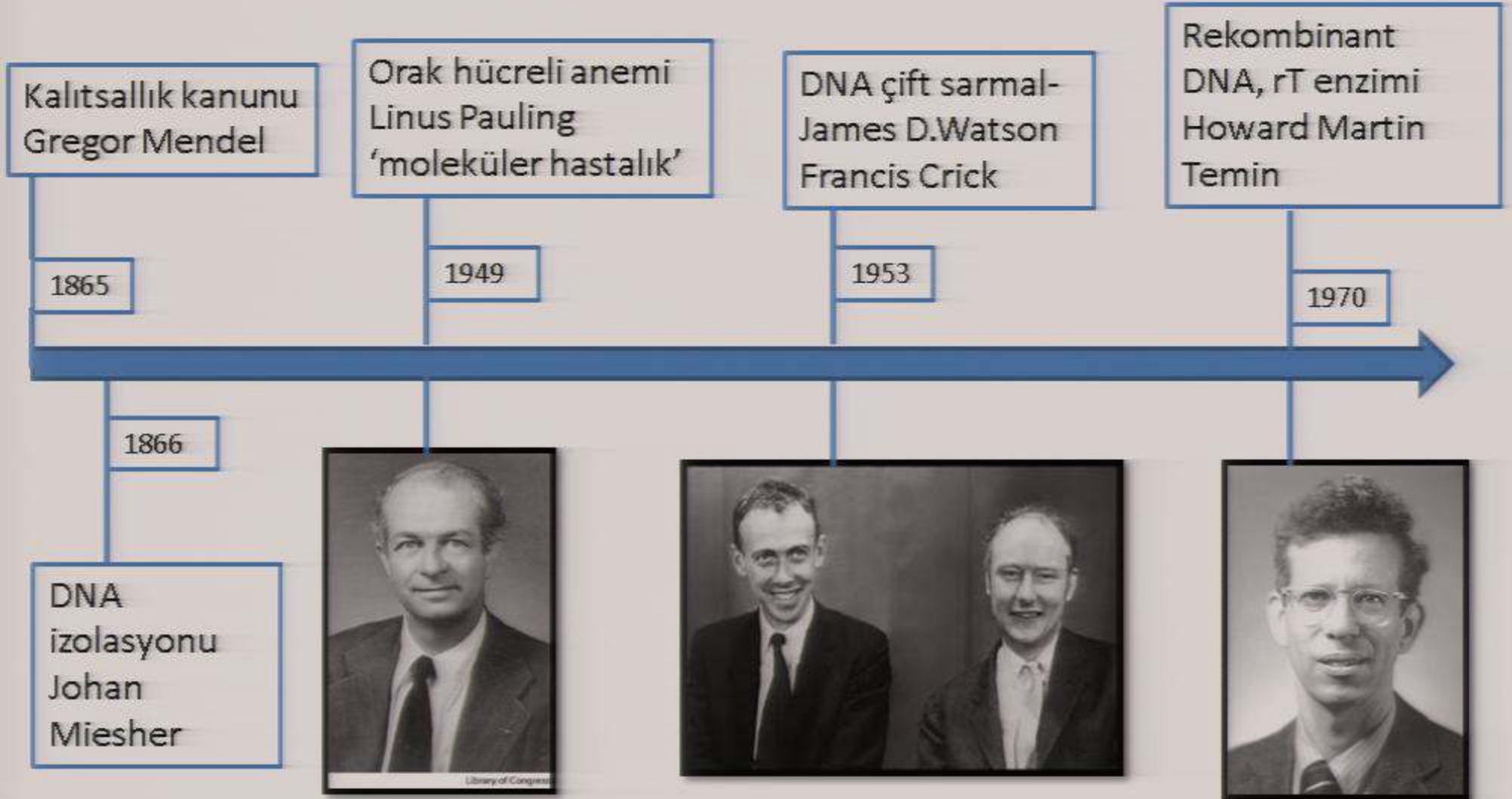


## Meningitis

Enteroviruses  
Varicella-zoster virus  
*Streptococcus pneumoniae*  
Pneumococcal urinary antigen  
Cryptococcus neoformans



# Tarihçe-Moleküler Tanı





# Tarihçe-Moleküler Tanı

İlk DNA sekanslama  
Alan Maxam  
Walter Gilbert

1977

İlk PCR  
Kary B. Mullis

1985

İnsan genom  
projesi

2001



Walter Gilbert (1932 - )



# Tarihçe-Moleküler Tanı

## CHAPTER 1

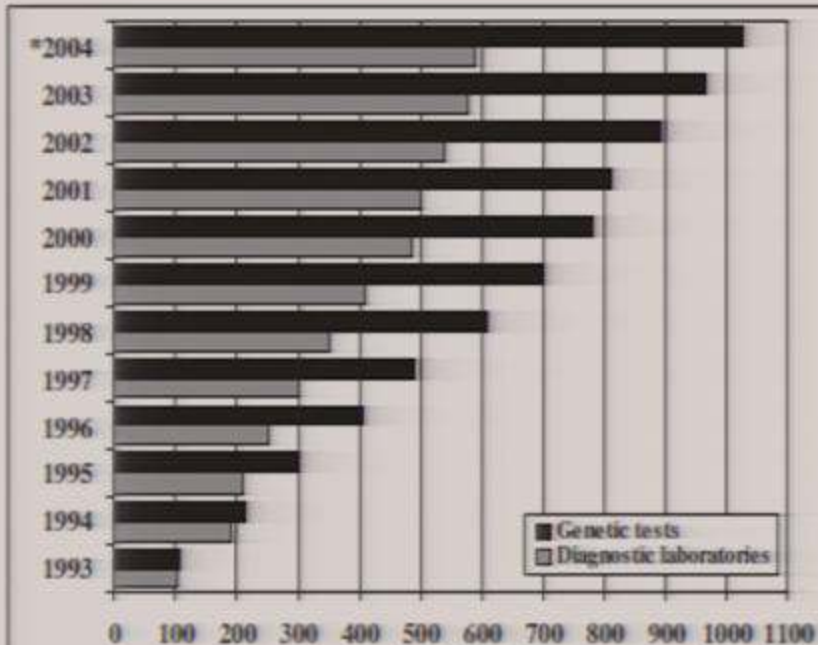
Copyright © 2005 by Elsevier, Inc.  
All rights reserved.

## Molecular Diagnostics: Past, Present, and Future

GEORGE P. PATRINOS<sup>1</sup> AND WILHELM ANSORGE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Erasmus University Medical Center, Faculty of Medicine and Health Sciences, MGC Department of Cell Biology and Genetics, Rotterdam, The Netherlands;

<sup>2</sup>European Molecular Biology Laboratory, Biological Structures and Biocomputing Programme, Heidelberg, Germany



- 2001 yılına kadar geliştirilen test sayısı; toplam 500'iken
- 2001-2004 arası sadece üç yılda geliştirilen 500'dür

Comment



## Rapid diagnostics urgently needed for killer infections

\*Alimuddin Zumla, Vanya Gant, Matthew Bates,  
Peter Mwaba, Markus Maeurer, Ziad A Memish  
Centre for Clinical Microbiology, Division of Infection and  
Immunity, University College London, London NW3 2PF, UK (AZ,  
MB); Department of Medical Microbiology, University College

Bugün SS enfeksiyonları testleri;

- Kültürde üretilenmeyen yada zor üreyen;
  - Ab dirençli bakteriler (MDR-TB dahil)
  - Azol dirençli mantarlar
  - B.pertusis*
  - MRSA
- Viral patojenler veya viral-bakteriyel koenfeksiyonlar

## Gelecekte aranacak özellikler ;

- Ucuz
- İnsandan bağımsız hazırlık yapabilen (robotize-tam otomatize)
- Kullanıcı dostu/ kolay uygulanan
- Ortalama 1 saat içinde sonuç veren
- Çoğul m.o. analizi yapabilen
- Kabul edilebilir sensitivite
- Yüksek spesifite
- Ab/antiviral direnci gösteren
- Taşınabilen/ hasta başı uygulanabilen
- Alternatif enerji kaynakları ile çalışabilen (güneş)

# Solunum Sistemi Enfeksiyonları

SUPPLEMENT ARTICLE

S284 • CID 2011:52 (Suppl 4) • Pavia

## Viral Infections of the Lower Respiratory Tract: Old Viruses, New Viruses, and the Role of Diagnosis

Andrew T. Pavia

Syndrome	Etiologic agents
Bronchiolitis	<b>RSV, hMPV, PIV, adenovirus</b> , coronaviruses, influenza viruses, <i>Chlamydophila pneumoniae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , rhinovirus, bocavirus,
Exacerbations of Wheezing/Asthma	<b>RSV, hMPV, rhinovirus</b> , adenovirus, PIV, coronaviruses, influenza viruses, <i>Chlamydophila pneumoniae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , bocavirus
Croup	<b>PIV</b> , Influenza, adenovirus,
Pneumonia	<b>Influenza, Streptococcus pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, PIV, adenovirus, RSV, hMPV, Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus</b>
Pneumonitis in Transplant Recipients	<b>RSV, PIV, influenza, hMPV, adenovirus, rhinovirus</b>

**NOTE:** Pathogens in bold are thought to be the most common etiologies. hMPV, human metapneumovirus; PIV, parainfluenza virus 1, 2, 3; RSV, respiratory syncytial virus.

Virüs ailesi	Genus	Tür/Serotip/ genotip sayısı
RNA		
Coronaviridae	Coronavirus	3 grup, 3 subtip
Orthomyxoviridae	Influenza A	1tür- HA ve NA subtipler
	Influenza B	1 tür
	Influenza C	1 tür
Paramyxoviridae		
<i>subfamily Paramyxovirinae</i>	Respiravirus	PIV-1 ve PIV-3
	Rubulavirus	PIV-2 ve PIV-4
	Pneumovirus	1 insan RSV tür-iki tip
<i>subfamily Pneumovirinae</i>	Metapneumovirus	1HMPV tür-iki serotip
Picornaviridae	Enterovirus	4 tür, >60 serotip
	Rhinovirus	2 (veya 3) tür, >100 serotip
	Parechovirus	2 serotip

Virüs ailesi	Genus	Tür/Serotip/ genotip sayısı
DNA		
Adenoviridae	Mastadenovirus	6 tür(A-F), 51 serotip
Herpesviridae		
<i>subfamily</i>	Simplexvirus	2 tür (HSV-1 ve 2)
Alfaherpesvirinae	Varicellovirus	1 serotip
<i>subfamily</i>		
Betaherpesvirinae	Cytomegalovirus	1 serotip
<i>subfamily</i>		
Gammaherpesvirinae	Lymphocryptovirus	1 serotip (EBV)

Tablo adaptasyon alındı; Atmar RL, Greenberg SP. Respiratory virus infections, in Informa healthcare. Lennet's Laboratory Diagnosis of Viral Infections. Eds: Keith R. Jerome. 2010;247-271.

# YENİ VİRÜSLER?

248

ATMAR AND GREENBERG

**Table 2** New Viruses Detected in the Respiratory Tract since 2000

Virus	Year reported
Human metapneumovirus	2001
SARS-coronavirus	2003
Coronavirus NL63	2004
Coronavirus HKU1	2005
Human bocavirus	2005
Human rhinovirus C	2007
Human polyomavirus WU and KI	2007

Atmar RL, Greenberg SP. Respiratory virus infections, in Informa healthcare: Lennet's Laboratory Diagnosis of Viral Infections. Eds. Keith R. Jerome. 2010;247-271.



# Örnek Alımı ve Taşınması?

- Nasofaringeal sürüntü (NF)
- Nasofaringeal aspirasyon (NFA)
- Nasal yıkama
- Orofaringeal sürüntü
- Orofaringeal yıkama
- Balgam
- BAL

## Comparison of Nasopharyngeal Aspirate and Nasopharyngeal Swab Specimens for Respiratory Syncytial Virus Diagnosis by Cell Culture, Indirect Immunofluorescence Assay, and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

GURMUKH AHLUWALIA,<sup>1</sup> JOANNE EMBREE,<sup>2,3†</sup> PATRICIA McNICOL,<sup>1,2</sup> BARBARA LAW,<sup>2,3</sup> AND GREGORY W. HAMMOND<sup>1,2\*</sup>

- Üst solunum yolu örnekleminde NF sürüntü ile NFA arasında üstünlük yok

### SHORT REPORT

RSV testing in bronchiolitis: which nasal sampling method is best?

P Macfarlane, J Denham, J Assous, C Hughes



ELSEVIER



Dry cotton or flocked respiratory swabs as a simple collection technique for the molecular detection of respiratory viruses using real-time NASBA

Catherine Moore<sup>\*</sup>, Sally Corden, Jaisi Sinha, Rachel Jones

Tek farkı yaratan yöntem; ‘flocked’ sürüntü; spreyle nemlendirilmiş pamuklu çubuk



ELSEVIER



Comparison of nasopharyngeal flocked swabs and aspirates for rapid diagnosis of respiratory viruses in children

K.H. Chan<sup>a</sup>, J.S.M. Peiris<sup>a,e</sup>, W. Lim<sup>d</sup>, J.M. Nicholls<sup>b</sup>, S.S. Chiu<sup>c,\*</sup>

# **Lenette's Laboratory Diagnosis of Viral Infections**

Fourth Edition

## **15 | Respiratory Virus Infections**

**Robert L. Atmar and Stephen B. Greenberg**

*Department of Medicine and Department of Molecular Virology and Microbiology, Baylor College of  
Medicine, Houston, Texas, U.S.A.*

- Direkt Mikroskopi (Elektron /İmmun floresans
- EIA
- NAT (Monoplex/ Multiplex RT-PCR, NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification), LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)
- Virüs kültürü
- Seroloji (CF, ELISA, HAI, Nötralizasyon)

Table 5 Commercially Available Immunofluorescence Assay Kits for Respiratory Viruses

Test format	Test (manufacturer)	Viruses detected (sensitivity; specificity)						
		Adenovirus	Influenza A	Influenza B	PIV-1	PIV-2	PIV-3	RSV
DFA	Bartels RSV DFA (Trinity Biotech)	No	No	No	No	No	No	Yes (88–100%; 100%)
	D <sup>3</sup> DFA Respiratory virus Screening and ID Kit (Diagnostic Hybrids, Inc.)	Yes (100%; 100%)	Yes (97–100%; 100%)	Yes (100%; 100%)	Yes (100%; 100%)	Yes (100%; 100%)	Yes (100%; 100%)	Yes (100%; 100%)
	Inagen (Remel Inc.) <sup>a</sup>	Adenovirus DFA (86–100%; 100%)	Influenza A&B DFA (96%; 100%)	Influenza A&B DFA (87%; 99.5%)	Parainfluenza DFA (100%; 100%)	Parainfluenza DFA (100%; 100%)	Parainfluenza DFA (92%; 99%)	RSV DFA (93%; 98%)
	Light Diagnostics Simulfluor Diagnostic Assays (Millipore)	Yes Confirmation only	RSV/Flu A (96%; 99.6%) Flu A/Flu B (80%; 99%)	Flu A/Flu B (50%; 100%)	Yes Confirmation only	Yes Confirmation only	Yes Confirmation only	Yes (98%; 98.9%)
	PathoDx Respiratory Virus Panel (Oxoid)	Yes (92–100%; 100%)	Yes (75–100%; 100%)	Yes (100%; 100%)	Yes (100%; 100%)	Yes (93–100%; 100%)	Yes (100%; 100%)	Yes (90–100%; 100%)
IFA	Bartels Respiratory Viral Detection Kit (Trinity Biotech)	Yes (100%; 99.9%)	Yes (86–100%; 99–99.9%)	Yes (65–100%; 98–100%)	Yes (52–100%; 100%)	Yes (100%; 100%)	Yes (85–100%; 99–99.9%)	Yes (86–100%; 97–100%)
	Inagen Respiratory Virus Screen Kit (Remel Inc.)	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	
	Light Diagnostics Respiratory Virus Screen (Millipore)	Yes Confirmation only	Yes Confirmation only	Yes Confirmation only	Yes Confirmation only	Yes Confirmation only	Yes Confirmation only	Yes Confirmation only

<sup>a</sup> Also makes an individual DFA kit for human metapneumovirus.

- DFA testlerinin tekli testlerde; sensitivite %75-100, spesifite %99-100
- DFA multiple (RSV/ Influenza A/B) testlerde; sensitivite %50-96, spesifite %99-100
- IFA; Sensitive %52-100, Spesifite % 99-100

Table 6 Commercially Available Enzyme Immunoassay and Other Enzyme Assay Kits for Respiratory Viruses

Test format	Manufacturer	Kit name	Acceptable clinical samples	Virus(es) detected	
				Sensitivity (%)	Specificity (%)
Chromatographic EIA (lateral flow)	Fisher Scientific	Sure-Vue RSV	NPS, NA, NW	RSV: >99	99->
	Genzyme	OSOM Flu A+B	NS	Flu A: 74 Flu B: 60	96 96
		Inverness Medical Professional Diagnostics	BinaxNow Influenza A+B	NA, NPS, NW	Flu A: 81-83 Flu B: 53-65
	Meridian Quidel Corp.	BinaxNow RSV	NPS, NW	RSV: 89-93	93-100
		Clearview RSV	NA, NPS	RSV: 93-100	88-97
		ImmunoCard STAT RSV Plus	NA, NPS, NS, NW	RSV: 78-94	78-100
		Quickvue Influenza*	NA, NPS, NW	Flu combined: 73-81	96-99
		Quickvue Influenza A+B	NA, NPS, NW	Flu A: 72-94 Flu B: 62-82	89-99 96-99
	Remel Inc.	Quickvue RSV	NA, NPS, NW	RSV: 83-99	90-92
		Xpect A&B	NS, NW, TS	Flu A: 89-100 Flu B: 83-100	100 100
	Response Biomedical Corp.	Xpect RSV	NPS	RSV: 96	94
		RAMP Influenza A/B Assay	NA, NPS, NW	Flu A: 70-92 Flu B: 56-92	94-99 95-99
	SA Scientific	SA FluAlert Influenza A Test	NA, NW	Flu A: 76	98
SA FluAlert Influenza B Test		NA, NW	Flu B: 91	100	
Flow-through EIA	Becton-Dickinson	Directigen Flu A	NA, NPS, NW, TS	Flu A: 67-96	88-97
		Directigen Flu A+B	BAL, NA, NPS, NS, NW, TS	Flu A: 76-96 Flu B: 71-88	90-100 98-100
		Directigen Flu A+B/EZ	NA, NPS, NW, TS	Flu A: 77-91 Flu B: 69-80	86-99 99-100
Optical immunoassay	Inverness Medical Professional Diagnostics	Directigen RSV	NA, NPS, NW, TA	RSV: 93-97	90-97
		Biostar Flu OIA*	NA, NPS, sputum, TS	Flu combined: 62-88	52-80
		Biostar Flu A/B OIA	NA, NPS, sputum, TS	Flu A and Flu B: Same as Biostar Flu OIA	Flu A and Flu B: Same as Biostar Flu OIA
Neuraminidase functional assay	ZymeTx	Biostar RSV OIA	NW, NPS	RSV: 67-87	83-96
		ZstatFlu*	NA, NW	Flu combined: 62	99

\* Does not differentiate influenza A and B virus infections.

Abbreviations: BAL, bronchoalveolar lavage; NA, nasal aspirate; NPS, nasopharyngeal swab; NS, nasal swab; NW, nasal wash; TA, tracheal aspirate; TS, throat swab.

EIA ; sensitivite % 53-100, spesifite %52-100

Table 7: Commercially Available Real-time RT-PCR Assays for Respiratory Virus Detection

Name	Test format	Manufacturer	Viruses detected	FDA approved (510 (K) number)
CDC Human Influenza Virus Real-time RT-PCR Detection and Characterization Panel	Multiplex Real-time RT-PCR	CDC	Influenza A and B viruses	Yes (K080570)
Influenza A/H5 (Asian lineage) virus Real-time RT-PCR Primer and Probe Set	Real-time RT-PCR	CDC	Subtype identification of A/H1, A/H3, A/H5 (Asian lineage) Influenza A/H5 (Asian lineage)	Yes (K060159)
MultiCode-PLx RVP	Multiplex Real-time RT-PCR, Target-specific primer extension, Fluidic microbead microarray	EraGen Biosciences	Influenza A and B viruses; RSV subtypes A and B; Parainfluenza viruses types 1-3, 4a, 4b; hMPV; rhinovirus; adenovirus species B, C and E; coronaviruses 229E, OC43, NL63	No
NGEN RVA ASR kit	Multiplex Real-time RT-PCR	Nanogen Inc.	Influenza A and B viruses; RSV; Parainfluenza viruses types 1-3	No
ProFlu+ Assay	Multiplex Real-time RT-PCR	Prodesse	Influenza A and B viruses, RSV	Yes (K073029)
Pro hMPV+ Assay	Real-time RT-PCR	Prodesse	hMPV	Yes (K082688)
Pro Paraflu+ Assay	Multiplex Real-time RT-PCR	Prodesse	Parainfluenza viruses types 1-3	Yes (K091053)
ResPlex II assay	Multiplex Real-time RT-PCR, Target-specific primer extension, Fluidic microbead microarray	Qiagen	Influenza A and B viruses, RSV subtypes A and B, Parainfluenza viruses types 1-4, hMPV, rhinovirus, enterovirus	No
Verigene Respiratory Virus Nucleic Acid Test	Multiplex RT-PCR	Nanosphere, Inc.	Influenza A and B viruses, RSV	Yes (K083088)
xTAG™ Respiratory Virus Panel	Multiplex Real-time RT-PCR, Target-specific primer extension, Fluidic microbead microarray	Luminex Molecular Diagnostics	Influenza A and B viruses, Influenza subtypes A/H1 and A/H3, RSV subtypes A and B, Parainfluenza viruses types 1-3, hMPV, rhinovirus, adenovirus	Yes (K081483)

Monoplex; tekil RT-PCR  
 Multiplex; çoğul RT-PCR (>20)

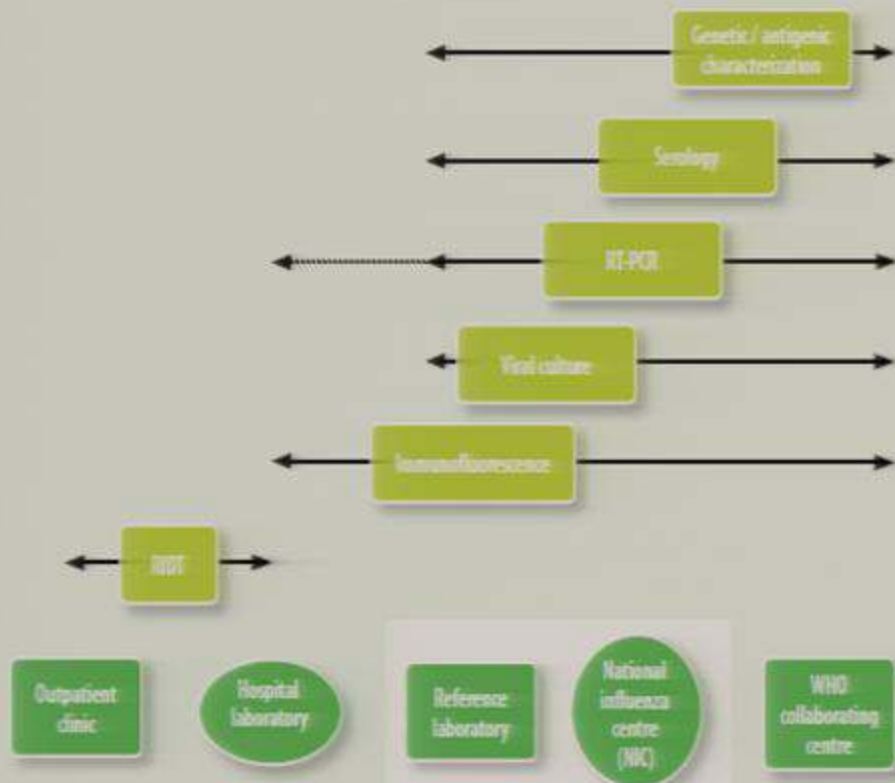
## Emerging point of care tests for influenza: innovation or status quo

Adeoluwa Tayo,<sup>a</sup> Joanna Ellis,<sup>b</sup> Luan Linden Phillips,<sup>a</sup> Sue Simpson,<sup>a</sup> Derek J. Ward<sup>a</sup>

- Influenza testi-İngiltere'de 56 farklı firma,
- Sensitivite ve spesifiteleri çok farklı?
- Influenza A/B ayrımı yapamayanlar, >60dk işlem gerektirenler ve 80 µ ile 1.4 ml arasında örnekte çalışmayanlar dışlandığında; 12 (12/27, %44,4)
- Bunlardan 10'u (%83) influenza ayrımı yapamamış 8'i influenza A alt tipi ayrımı yapamamış



# Use of Influenza Rapid Diagnostic Tests



- RIDTs (Rapid Influenza Diagnostic Tests)-Hızlı testler, IF ve RT-PCR
  - Ayaktan takip
  - Hastanelerde
- Seroloji, virüs kültürü, genetik / antijenik tiplendirme referans laboratuvarında yapılmalıdır,



•NF aspirasyon

•Burun

sürüntüsü

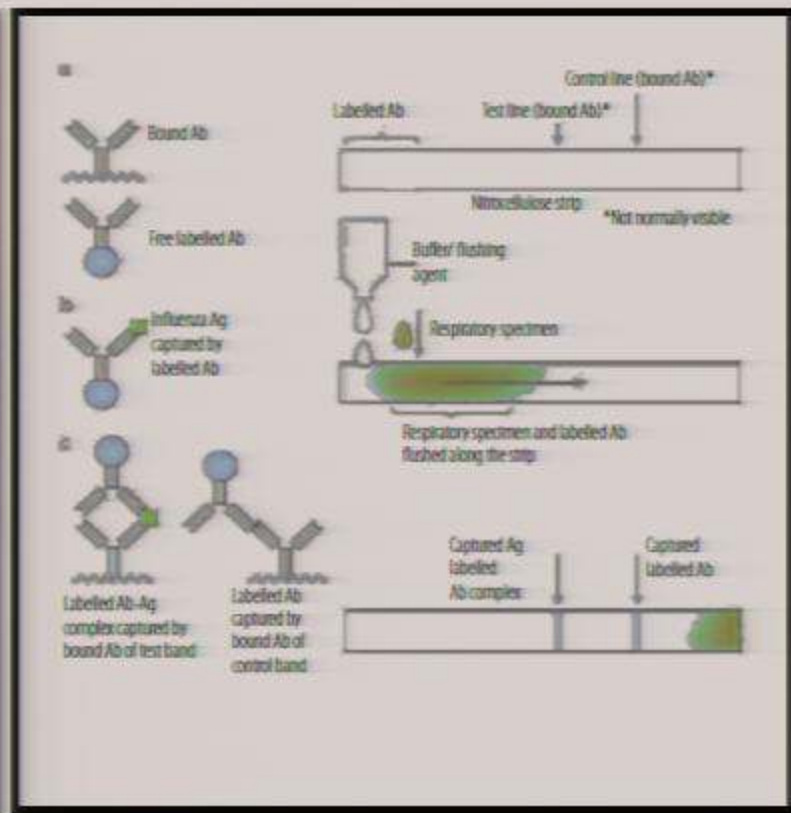
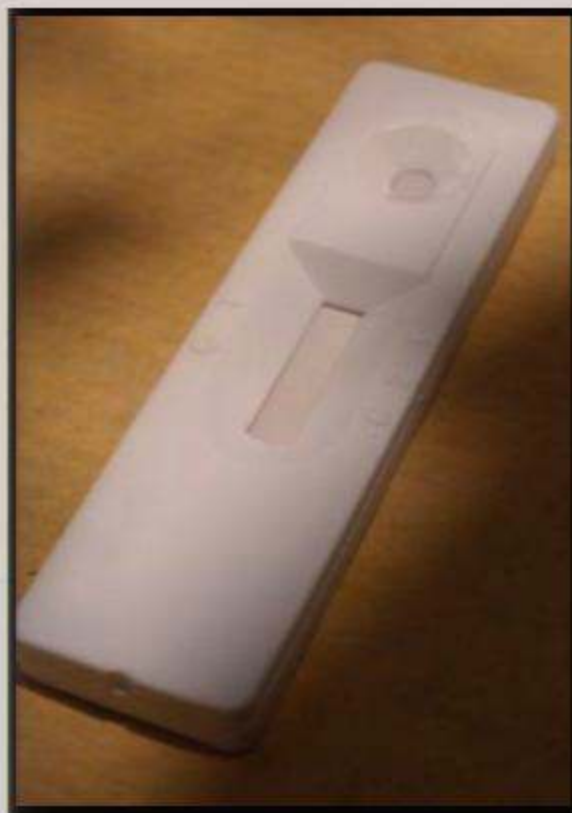
•Boğaz

sürüntüsü

•Trakeal  
aspirasyon

•BAL

\*Semptomu<5g

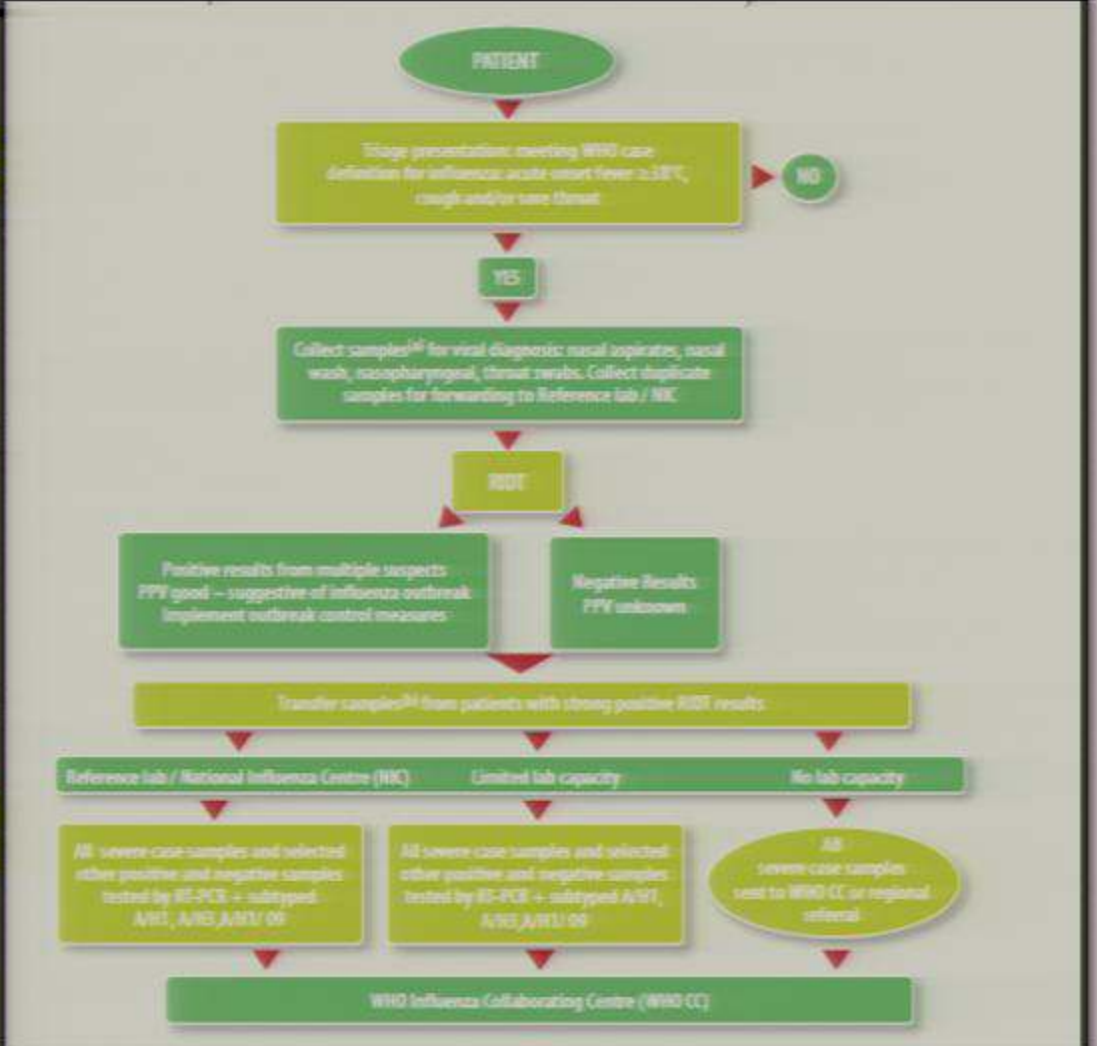
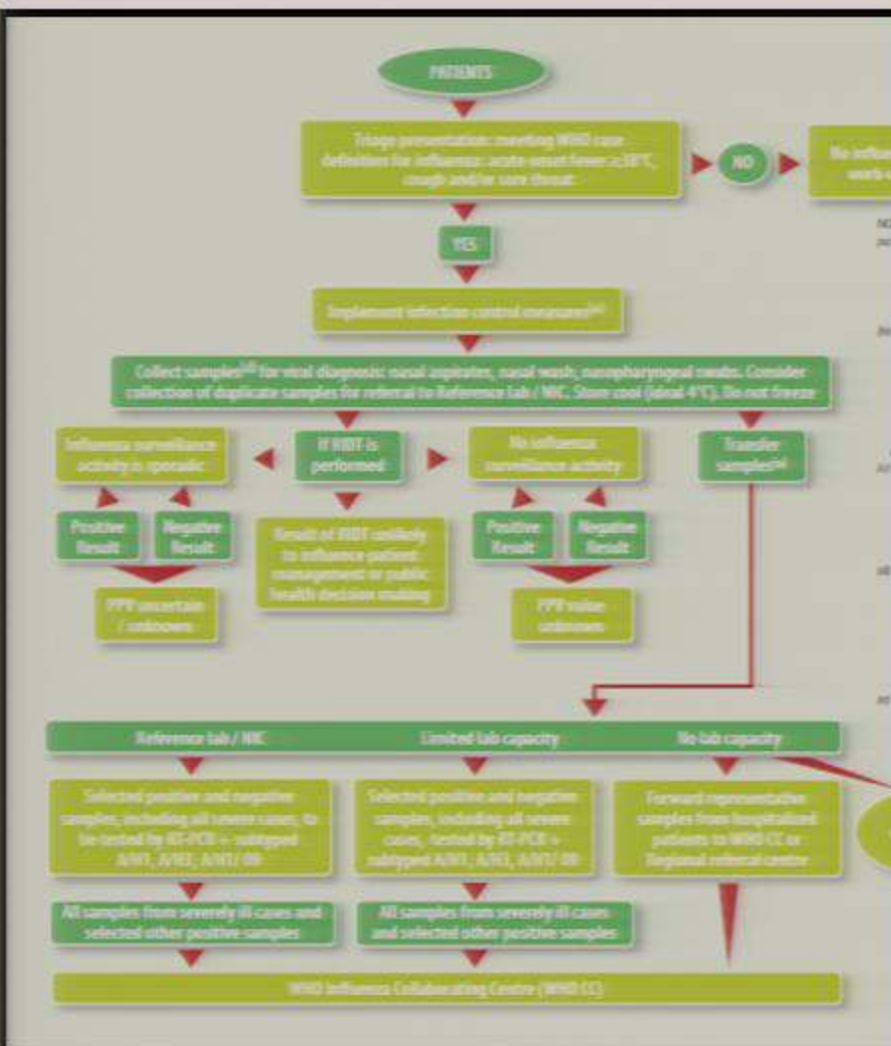


•Antikor kaplı bir bant

•Solunum örneği yerleştirildikten sonra

•Ag-Ab kompleksinin oluşturacağı bant  
görülür

•A/B ayrımı, alt tipi ayrımı yapmazlar



• Salgın durumunda ve sporadik olgularda önce RIDTs sonrasında RT-PCR veya ülke şartlarına göre virüs kültürü ile alt tiplendirme ve direnç

Prevalence	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	#False negatives	#False positives
1%	85%	95%	15	100	15	495
1%	90%	95%	15	100	10	495
1%	95%	95%	16	100	5	495
5%	85%	95%	47	99	75	475
5%	90%	95%	49	99	50	475
5%	95%	95%	50	100	25	475
10%	85%	95%	65	98	150	450
10%	90%	95%	67	99	100	450
10%	95%	95%	68	99	50	450
15%	85%	95%	75	98	225	425
15%	90%	95%	76	98	150	425
15%	95%	95%	77	99	75	425

- Sensitivite ve spesifiteleri populasyonadaki 10,000'de prevelansa göre değişir,
- Virüs kùltürü veya RT-PCR ile karşılaştırıldığında %93 -100%

Giocchio CC, Zhang F, Manji R, et al. Evaluation of multiple test methods for the detection of the novel 2009 influenza A (H1N1) during the New York City outbreak.

Vasoo S, Stevens J, Singh K. Rapid antigen tests for diagnosis of pandemic (Swine) influenza A/H1N1. *Clin Infect Dis* 2009 Oct 1;49(7):1090-3.

**Table 8** Preferred Cell Lines for Virus Isolation

<b>Virus</b>	<b>Cell line</b>
Rhinovirus	Human embryonic lung: WI-38, MRC-5
Coronavirus	
229E	MRC-5
NL63	LLC-MK2, Vero-B4
SARS	Vero E6
Adenovirus	Human embryonic kidney, A549, HeLa, HEp-2, KB
Influenzavirus A and B	Primary monkey kidney cells, Madin-Darby canine kidney (MDCK), LLC-MK2
Parainfluenzavirus	Primary monkey kidney cells, LLC-MK2
Respiratory syncytial virus	Human heteroploid cells: HEp-2, HeLa, A549
Human metapneumovirus	LLC-MK2

- Virüs izolasyonu için;
- Deney hayvanı
- Embriyonlu yumurta (Influenza)
- Organ kültürü (trakeal halka)
- Tüm solunum virüslerinin ürediği tek bir hücre kültürü yoktur

- Coronavirus 229E ve NL63, h MPV spesifik hücre kültürlerinde bile zayıf ürerler,
- Coronavirus OC43 ve HKU-1 hiçbir hücre kültüründe üremez

R-mix FreshCells line; Mv1Lu( mink AC) ve A549 (insan adenokarsinom) karışımı; influenza A,B,RSV, PIV, adenovirüsün hepsi için başarılı bulunmuştur,

Weinberg A, Brewster L, Clark J, et al. Evaluation of R-Mix shell vials for the diagnosis of viral respiratory tract infections. *J Clin Virol* 2004; 30(1):100-105.

St George K, Patel NM, Hartwig RA, et al. Rapid and sensitive detection of respiratory virus infections for directed antiviral treatment using R-Mix cultures. *J Clin Virol* 2002; 24(1-2):107-115.

Virüs kültürü sonrası IF veya EIA kullanılarak alt tiplendirme yapılır

Table 9 Methods for Virus Identification and Typing

Immunologic approaches	Molecular approaches
Immunofluorescence	RT-PCR
Enzyme immunoassay	Hybridization
Neutralization	Sequencing
Hemagglutination inhibition	Microarray

EIA; Influenza (nükleoprotein) ve RSV (füzyon proteini) Ag'ler ortaktır,

HAI; Influenza ve PIVs'larda hemaglütininler yine klinik örnekten tanıda ve tiplendirmede

Spesifite/ sensitivite : moleküler >immünolojik  
Moleküler yöntemlerde RT-PCR, İmmünolojik yöntemlerde EIA tiplendirmede en başarılıdır

- SS virüslerinde serolojik tanı zordur,
- Lokal immün yanıt daha baskındır,

**Table 10** Serologic Methods for Different Respiratory Viruses

Virus	Complement fixation	ELISA	HAI	Neutralization
Rhinovirus	NA	NA	Rarely used	Serotype-specific
Coronavirus				
229E	Serotype-specific	Serotype-specific	NA	Serotype-specific
OC43	Serotype-specific	Serotype-specific	Serotype-specific	Serotype-specific
NL63	ND	Serotype-specific	NA	Serotype-specific
SARS	ND	Serotype-specific	NA	Serotype-specific
Adenovirus	Genus-specific	Genus-specific	Serotype-specific	Serotype-specific
Influenzavirus A and B	Type-specific	Type- or subtype-specific	Subtype-specific	Subtype-specific
Parainfluenzavirus	Serotype-specific; cross-reactivity between serotypes	Type-specific	Serotype-specific; cross-reactivity between serotypes	Serotype-specific
Respiratory syncytial virus	Genus-specific	Genus- or type-specific	NA	Genus- or type-specific
Human metapneumovirus	ND	Genus- or type-specific	NA	Serotype-specific

Abbreviations: NA, not available; ND, not described.

- Yöntemsel olarak en kolay uygulanan CF'dur,
- Ama hepsi için CF testi yoktur,

SS virüslerinin serolojik tanısında en geniş yelpazeye ELISA ve Nötralizasyon sahiptir,



# The Diagnosis of Viral Respiratory Disease in Older Adults

H. Keipp Talbot<sup>1</sup> and Ann R. Falsey<sup>2</sup>

**Table 1. Summary of Test Characteristics of Different Diagnostic Tests for Various Respiratory Viral Pathogens in Older Adults**

Virus	Culture	Rapid EIA	DFA/IFA	PCR	Serological testing
Influenza virus A	++	+	+	+++	++ <sup>a</sup>
Influenza virus B	++	+	+	+++	++ <sup>a</sup>
RSV	+	+/-	+/-	+++	+++
hMPV	+/-	0	+/-	+++	+++
Parainfluenza virus	+	0	+/-	+++	+++
Coronaviruses	0	0	0	+++	+++
Adenoviruses	+	0	+/-	+++	+ <sup>b</sup>
Rhinoviruses	+	0	0	+++	0 <sup>c</sup>

**NOTE.** DFA, direct fluorescent antibody; EIA, enzyme immunoassay; hMPV, human metapneumovirus; IFA, immunofluorescent antibody; PCR, polymerase chain reaction; RSV, respiratory syncytial virus; 0, not available; +/-, available but poor sensitivity; +, fair sensitivity; ++, good sensitivity; +++, optimal sensitivity.

<sup>a</sup> Interpretation is complicated by vaccination.

<sup>b</sup> Available for some serotypes (eg, 4, 7, and 14).

<sup>c</sup> Because there are  $\geq 100$  serotypes, serological testing is not feasible.

- İnfluenza A ve B için serolojik testler aşılama nedeniyle yaşlılarda güvenilirliği düşük
- RT-PCR daha uygun bir seçenek,

# Molecular Diagnosis of Respiratory Tract Infection in Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease

Molecular Diagnosis in AECOPD • CID 2011;52 (Suppl 4) • S291

Sanjay Sethi

Table 2. Viral Infection Detected by Culture and/or Serologic Testing in Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) in 8 Studies Published During 1960–1980 [15]

Variable	No. of exacerbations included	Percentage viral	Percentage of total viral isolates					
			Rhinovirus	Influenza	Para influenza	Respiratory syncytial virus	Coronavirus	Adenovirus
Total	1081							
Mean	135	36	38	26	15	11	10	3
Range	42–522	20–61	0–78	0–45	0–39	0–40	6–18	0–10

- >%30 hastada birden fazla virüs etken,
- Sırasıyla; Rhino, İnfluenza, PIV, RSV, Corona ve Adeno
- Moleküler test yapılacaksa; multiplex testler daha akılcı

**Table 1. Microbial Pathogens in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)**

Microbe	Role in exacerbations	Role in stable disease
<b>Bacteria</b>		
<i>Haemophilus influenzae</i>	20–30% of exacerbations	Major pathogen
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	10–15% of exacerbations	Minor role
<i>Moraxella catarrhalis</i>	10–15% of exacerbations	Minor role
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5–10% of exacerbations, prevalent in advanced disease	Likely important in advanced disease
<i>Enterobacteriaceae</i>	Isolated in advanced disease, pathogenic significance undefined	Undefined
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	Isolated frequently, unlikely cause	Unlikely
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Isolated frequently, unlikely cause	Unlikely
<i>Staphylococcus aureus</i>	Isolated infrequently, unlikely cause	Unlikely
<b>Viruses</b>		
Rhinovirus	20–25% of exacerbations	Unlikely
Parainfluenza	5–10% of exacerbations	Unlikely
Influenza	5–10% of exacerbations	Unlikely
Respiratory syncytial virus	5–10% of exacerbations	Controversial
Coronavirus	5–10% of exacerbations	Unlikely
Adenovirus	3–5% of exacerbations	Latent infection seen, pathogenic significance undefined
<i>Human metapneumovirus</i>	3–5% of exacerbations	Unlikely
<b>Atypical Bacteria</b>		
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	3–5% of exacerbations	Commonly detected, pathogenic significance undefined
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1–2% of exacerbations	Unlikely
<b>Fungi</b>		
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Undefined	Commonly detected, pathogenic significance undefined

# Molecular Laboratory Tests for the Diagnosis of Respiratory Tract Infection Due to *Staphylococcus aureus*

Molecular Tests For Staphylococcal RTI • CID 2011;52 (Suppl 4) • S361

Lance R. Peterson

- S.aureus ABD'de %24,4 ile VIP'de birinci sıradadır
- Bunlarında yaklaşık %50'si MRSA'dır,
- 1999-2005 yılları arasında MRSA oranı tüm ülkede iki kat artmıştır,

Table 1. Results of a Multicenter Xpert MRSA/SA SSTI (Cepheid) Trial on Clinical Wound Swabs Testing for *Staphylococcus aureus* and MRSA

Organism	Sensitivity, % (n/N)	Specificity, % (n/N)	NPV, % (n/N)
MSSA and MRSA	100 (55/55)	96.6 (57/59)	100 (57/57)
MRSA	97.1 (34/35)	96.2 (76/79)	98.7 (76/77)

**NOTE.** Data are from [24]. MSSA, methicillin-susceptible *S. aureus*; NPV, negative predictive value.

- Yarada MRSA / MSSA ayırımında %98,7 etkin,
- <2 saat,
- FDA onay (+)

# Diagnostic Tests for Agents of Community-Acquired Pneumonia

John G. Bartlett

## Guideline Recommendations

The recommendations of the IDSA/ATS for CAP are for “routine microbiology only for pathogens that would significantly alter empiric decisions” [66]. The major concerns for routine microbiological analysis expressed in this document were cost, the problems of poor quality specimens and low yield, and the impression that empiric treatment was usually effective. Exceptions noted included illnesses due to some selected pathogens, such as important viral pathogens (such as influenza and severe acute respiratory syndrome), agents of bioterrorism, *M. tuberculosis*, endemic fungi, and *S. aureus*.

TKP’de moleküler testlerin önündeki tek engel ‘maliyet’ tir. Maliyetin düşünölmeyeceği durumlar;

- Influenzae
- Ciddi solunum yetmezliği
- biyoterörizm
- M.tuberculosis*
- Endemik mantarlar
- S.aureus*

# Molecular Laboratory Tests for the Diagnosis of Respiratory Tract Infection Due to *Staphylococcus aureus*

Molecular Tests For Staphylococcal RTI • CID 2011:52 (Suppl 4) • S361

Lance R. Peterson

- S.aureus ABD'de %24,4 ile VIP'de birinci sıradadır
- Bunlarında yaklaşık %50'si MRSA'dır,
- 1999-2005 yılları arasında MRSA oranı tüm ülkede iki kat artmıştır,

Table 1. Results of a Multicenter Xpert MRSA/SA SSTI (Cepheid) Trial on Clinical Wound Swabs Testing for *Staphylococcus aureus* and MRSA

Organism	Sensitivity, % (n/N)	Specificity, % (n/N)	NPV, % (n/N)
MSSA and MRSA	100 (55/55)	96.6 (57/59)	100 (57/57)
MRSA	97.1 (34/35)	96.2 (76/79)	98.7 (76/77)

**NOTE.** Data are from [24]. MSSA, methicillin-susceptible *S. aureus*; NPV, negative predictive value.

- Yarada MRSA / MSSA ayırımında %98,7 etkin,
- <2 saat,
- FDA onay (+)

**Table 2. Results of a Single-Center Study of the BD GeneOhm Real-Time Polymerase Chain Reaction Test for Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) and Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA), Compared with a US Food and Drug Administration–Cleared Test for Nasal MRSA Surveillance (BD GeneOhm) and an In-House Test for MSSA (NorthShore) on 200 Clinical Samples**

Test	Sensitivity, % (95% CI)	Specificity, % (95% CI)	PPV, % (95% CI)	NPV, % (95% CI)
MSSA BD GeneOhm	96 (89–99)	97 (92–99)	97 (90–99)	96 (91–99)
NorthShore Developed MSSA	94 (87–98)	99 (95–100)	99 (94–100)	96 (90–99)
MRSA BD GeneOhm	95 (83–99)	99 (96–100)	95 (83–99)	99 (96–100)
MRSA Nasal	98 (87–100)	98 (94–99)	91 (78–97)	99 (97–100)

**NOTE.** Clinical samples included 123 wound samples, 34 respiratory specimens, 20 tissue specimens, 16 body fluid specimens, 2 catheter samples, and 5 other samples [26–27]. CI, confidence interval; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

Solunum örneğinde veya nasal sürüntüde RT-PCR ile MRSA tesbiti başarısı?

- MRSA Gene Ohm ve MRSA nazal daha başarılı
- Kolonizasyon ayırıcı tanıda devam eden bir problem,
- MRSA için ‘ara ve yok et’ (Hollanda örneği\*) klinik hedefse kullanılabilir AMA sadece MRSA için moleküler test kullanmak rasyonel değil

\*Vos MC, Behrendt MD, Melles DC, et al. 5 Years of experience implementing a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* search and destroy policy at the largest university medical center in the Netherlands. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009; 30:977–84.

# Are We Ready for Novel Detection Methods to Treat Respiratory Pathogens in Hospital-Acquired Pneumonia?

Andrea Endimiani,<sup>1,5</sup> Kristine M. Hujer,<sup>1,5</sup> Andrea M. Hujer,<sup>1,5</sup> Sebastian Kurz,<sup>1,5</sup> Michael R. Jacobs,<sup>2</sup> David S. Perlin,<sup>6,7</sup> and Robert A. Bonomo<sup>1,3,4,5</sup>

- Hastane kökenli pnömonilerdeki etkenlerin çoğu >3 antibiyotiğe dirençlidir
- En büyük sorun; ESKAPE (*E.faecium*, *S.aureus*, *K.pneumonia*, *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, *Enterobacter spp*)
- Hedef ESKAPE'te erken tanı olmalı



## GeneXpert

- RT-PCR, hedef sekans *orfX*'deki stafilokokkal kaset mec geni (SCCmec)
- Yara, kan, nazal sürüntü, periton örneğinde
- Sensitivite %94,3, Spesifite %97
- MRSA pnömonisi tanısında henüz kullanımı yok,

Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, et al. New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1875–84.

Rossney AS, Herra CM, Brennan GI, Morgan PM, O'Connell B. Evaluation of the Xpert methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) assay using the GeneXpert real-time PCR platform for rapid detection of MRSA from screening specimens. *J Clin Microbiol* 2008; 46:3285–90.

Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, Ito T. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 2002; 292:67–74.

Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2001; 357:1225–40.

Wolk DM, Picton E, Johnson D, et al. Multicenter evaluation of the Cepheid Xpert methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) test as a rapid screening method for detection of MRSA in nares. *J Clin Microbiol* 2009; 47:758–64.

Parra M, Goebel M, Matloobi M, Stager C, Musher DM. Identification of methicillin-resistant or methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in blood cultures and wound swabs by GeneXpert. *J Clin Microbiol* 2009; 47:1609–10.

## AccuProbe

- Kemolüminan DNA prob ile hedef bakterinin rRNA ve nükleik asidini yakalar,
- NA hibridizasyon ile çalışır,
- Bakteriyel etkenler yanında, viral ve mantar etkenleride çalışmak mümkün,
- *S.aureus*, *S.pneumonia*, *M.pneumonia*, *L.pneumophila* için Sensitivite %100, Spesifite %96

Allaouchiche B, Meugnier H, Freney J, Fleurette J, Motin J. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in bronchoalveolar lavage fluid using a DNA probe (Accuprobe). *Intensive Care Med* 1996; 22:683-7.

Finkelstein R, Brown P, Palutke WA, et al. Diagnostic efficacy of a DNA probe in pneumonia caused by *Legionella* species. *J Med Microbiol* 1993; 38:183-6.

Kaijalainen T, Rintamaki S, Herva E, Leinonen M. Evaluation of genetechnological and conventional methods in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *J Microbiol Methods* 2002; 51:111-8.

Kleemola M, Jokinen C. Outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* infection among hospital personnel studied by a nucleic acid hybridization test. *J Hosp Infect* 1992; 21:213-21.

## BD GeneOhm MSSA ve BD GeneOhm MRSA

- Hızlı (2<saat), direkt klinik örnekten MRSA ve MSSA nükleik asid tesbiti,
- Multiplex RT-PCR'dır,
- Cilt, yara, nazal örneklerde etkili, kanda etkin değil,
- Solunumda onayı yok,

Svent-Kucina N, Pirs M, Mueller-Premru M, Cvitkovic-Spik V, Kofler, Seme K. One-year experience with modified BD GeneOhm MRSA assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pooled nasal, skin, and throat samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 63:132-9.

Bartels MD, Boye K, Rohde SM, et al. A common variant of staphylococcal cassette chromosome mec type IVa in isolates from Copenhagen, Denmark, is not detected by the BD GeneOhm methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* assay. *J Clin Microbiol* 2009;47:1524-7.

Thomas L, van Halbeek H, O'Sullivan M, Kyme P, Iredell J. Failure of the BD GeneOhm StaphS/R assay for identification of Australian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: duplex assays as the "gold standard" in settings of unknown SCCmec epidemiology. *J Clin Microbiol* 2008; 46:4116-7.

Stamper PD, Cai M, Howard T, Speser S, Carroll KC. Clinical validation of the molecular BD GeneOhm StaphSR assay for direct detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 2007; 45:2191-6.

## ResPlex ve StaphPlex

- Bakteriyel ve viral etkenleri birlikte-multiplex PCR (Microarray teknolojisi),
- ResPlex; *S.pneumoniae* (*lytA*), *N.meningitidis* (*ctrA*), kapsüllü/-süz *H.influenzae* (*bexA* and *ompP2*), *L.pneumophila* (*mip*), *M.pneumoniae* (*adenosine triphosphatase*), *C.pneumoniae* (*ompA*). Sensivite %100, Spesifite %99,8
- StaphPlex MRSA (18 gen bölgesi), KNS (*tuf*) ve ab direnç genleri (*mecA*, *SCCmecl-IV*, *aacA*, *ermA*, *ermB*, *tetM*, and *tetK*). Sensitivite %99,9, Spesifite %99,9.

## Roche LightCycler MRSA ve SeptiFast MecA

- Asıl olarak nazal sürüntü uygulama alanı,
- mecA geni ve *S. aureus*-specific Sa442 geni
- 188-bp fragment within the mecA gene and
- Yeni versiyonda; *ITS* (internal transcribed spacer 16S and 23S geni arası) hedeftir,
- SeptiFast; kan dolaşımı enfeksiyonlarında erken tanıda umut verici,

## MALDI-TOF MS



- Bakteri protein/peptid tesbiti,
- Özellikle kan örneklerinde çalışılmış; sensitivite %95, spesifite %84,1
- Ortalama 5 dk tanımlama, maliyet %20 ↓
- Karışık örneklerde *S.aureus* ve *S.viridans* spesifiteyi azaltıyor,

**Table 2. Summary of Selected Molecular Diagnostic Tests Discussed Here and Their Applications**

Commercial Test/Molecular Assay (manufacturer)	Advantages	Application to bacterial pneumonia and/or point-of-care testing
GeneXpert System (Cepheid)	Detects MRSA in 1 h in blood cultures and wound swabs	Undetermined
AccuProbe (Gen-Probe)	Detects <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , and <i>Legionella pneumophila</i>	Mostly for point-of-care <i>L. pneumophila</i> testing
GeneOhm (Becton-Dickinson)	Detects MRSA, MSSA, and CoNS	Undetermined
ResPlex and StaphPlex (Qiagen)	Detects <i>S. pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>L. pneumophila</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> , and <i>S. aureus</i>	Yes, but large clinical trials are needed for point-of-care <i>S. aureus</i> testing
Light Cycler (Roche)	Detects MRSA	Undetermined
MALDI-TOF MS/Autoflex II (Bruker Daltonic)	Protein-based assays with broad microbiological applicability	Undetermined
FilmArray systems (Idaho Technologies)	Detects <i>Bordetella pertussis</i> , <i>L. pneumophila</i> , <i>C. pneumoniae</i> , and <i>M. pneumoniae</i>	Undetermined <b>2012; FDA onayladı</b>
Check KPC/ESBL microarray (Check-Points)	Detects $\beta$ -lactamase resistance genes conferring resistance to cephalosporins and carbapenems in 7–8 h	Undetermined
5000 and PLEX-ID PCR/ESI-MS Biosensors (Abbott Molecular, Inc.)	Multiple species detected and typed and resistance genes mapped ( <i>gyrA</i> , <i>parC</i> , <i>mecA</i> , and <i>bla<sub>KPC</sub></i> )	Undetermined

# Multiplex PCR and Emerging Technologies for the Detection of Respiratory Pathogens

Angela M. Caliendo

**Table 1. Summary of Emerging Multiplex Technologies for the Diagnosis of Respiratory Pathogens<sup>a</sup>**

Characteristic	Test System					
	RespPlex	Infiniti	Jaguar	FilmArray	STAR	PLEX-ID
Pathogens detected	Viruses and bacteria	Viruses	Viruses	Viruses and bacteria	Viruses	Viruses and bacteria
Degree of multiplexity, no. of targets	>15	>15	2-6	>15	>15	>15
Complexity	High	High	Low	Low	High	High
Fully integrated system (all steps)	No	No	Yes	Yes	No	No
Testing location	Laboratory	Laboratory	Near-patient facility and/or laboratory	Near-patient facility and/or laboratory	Laboratory	Laboratory
Time required for result, h	5-6	6.5-10	1.5-2	1	5-6	6-8
Throughput	Moderate to high	Moderate to high	Moderate	Low	Moderate to high	Moderate to high
Carryover contamination risk	Moderate	Moderate	Low	Low	Low	Low
Quantification	No	No	No	No	Yes	No
Pathogen discovery	No	No	No	No	No	Yes

<sup>a</sup> These data reflect the state of technology as of October 2009; manufacturers may alter their test systems in the future.



	Sensitivite	Spesifite	En önemli avantajı
ResPlex	%84-100	>%99	Bakteri+virüs
Infiniti	%80	%94	-
Jaguar	%99-100	%99,4	Süre, hasta başı, küçük volüm
FilmArray	%98-100	>%99	Bakteri+virüs En hızlı sonuç, hasta başı
STAR	%99	>%99	En küçük volüm,
PLEX ID	%88-100	%100	Bakteri+virüs

- Multiplex testlerde; sensitivite/ spesifite mikroorganizmaya göre değişir,
- En çok aranan özellikler; 'hasta başı uygulama', 'hızlı sonuç' ve 'kolay uygulanabilirlik'

## Strengths and Weaknesses of FDA-Approved/ Cleared Diagnostic Devices for the Molecular Detection of Respiratory Pathogens

Christine C. Ginocchio

- 2009 H1N1 Influenza pandemisi- FDA , SS –moleküler testleri desteklenmesi
- Takip eden yıllarda da artarak özellikle;
  - Kültürü mümkün olmayan hMPV, bocavirüs, parainfluenza 4, *C. Pneumonia*)
  - Kültürü tehlikeli (SARS-corona)
  - Geleneksel metodlarla tanısı geç olan (*M.tuberculosis*)

## Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test (AMTD, Gen-Probe)

- *M. tuberculosis complex* (*M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, and *M. tuberculosis*) ribosomal RNA (rRNA) tesbitine yönelik
- Yayma pozitif ve negatif TB için FDA onaylı
- Yayma pozitiflerde sensitivite >%95, spesifite >%98
- Yayma negatiflerde sensitivite %>60, spesifite >%72

Gamboa F, Fernandez G, Padilla E, et al. Comparative evaluation of initial and new versions of the Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol*. 1998; 36:684-9.

Lemaître N, Armand S, Vachère A, Capilliez O, Dumoulin C, Courcol RJ. Comparison of the real-time PCR method and the Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test for detection of Mycobacterium tuberculosis in pulmonary and nonpulmonary specimens. *J Clin Microbiol*. 2004; 42:4307-9.

O'Sullivan CE, Miller DR, Schneider PS, Roberts GD. Evaluation of Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test by using respiratory and nonrespiratory specimens in a tertiary care center laboratory. *J Clin Microbiol*. 2002; 40:1723-7.

# Amplicor Mycobacterium tuberculosis Test (Amplicor, Roche Diagnostics)

- Yayma pozitif hastalar için FDA onaylıdır,
- Sensitivitesi %92,9-100, spesifitesi %77.3 -% 100
- Yayma negatiflerde sensitivite %51,2-73,1, spesifite %99-%99,8
- Menenjit ve solunum dışı örnekler içinde uygulanır

Tevere VJ, Hewitt PL, Dare A, et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis by PCR amplification with pan- Mycobacterium primers and hybridization to an M. tuberculosis-specific probe. J Clin Microbiol 1996; 34:918-23.

D'Amato RF, Wallman AA, Hochstein LH, et al. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using the Roche AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis PCR test. J Clin Microbiol 1996; 33:1832-4.

Bonington A, Strang JIG, Klapper PE, et al. Use of Roche AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis PCR in early diagnosis of tuberculous meningitis. J Clin Microbiol 1998; 36:1251-4.

D'Amato RF, Hochstein LH, Colaninno PM, et al. Application of the Roche AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis (PCR) test to specimens other than respiratory secretions. Diagn Microbiol Infect Dis 1996;24:15-7.

## Xpert MTB/RIF (Cepheid)

- Tüberküloz basilini ve RIF direncini gösteren, 15-20 dk sonuç veren, toplam süre <2saat
- Sensitivite %98,2(tek örnek), %99,8(üç örnekte)
- Sadece Avrupa'da lisanslı

Van Rie A, Page-Shipp L, Sanne I, Stevens W. Xpert M. tuberculosis/RIF for point-of-care diagnosis of TB in high-HIV burden, resourcelimited countries: hype or hope? *Expert Rev Mol Diag* 2010;10:937-46.

# Developing Molecular Amplification Methods for Rapid Diagnosis of Respiratory Tract Infections Caused by Bacterial Pathogens

Fred C. Tenover

Cepheid, Sunnyvale, California

Molecular Tests for Respiratory Infection • CID 2011:52 (Suppl 4) • S339

**Table 1. Potential Targets for Multiplex or Individual Molecular Amplification Assays by Syndrome [2, 4, 6, 8, 41]**

CAP/exacerbations of COPD	HAP/VAP	Individual organisms
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>mecA</i> gene <sup>a</sup>	<i>Bordetella pertussis</i>
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> gene <sup>b</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	...
<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub> , <i>bla</i> <sub>IMP</sub> genes <sup>c</sup>	...
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Acinetobacter</i> spp	...
<i>mecA</i> gene <sup>a</sup>	<i>bla</i> <sub>OXA</sub> genes <sup>d</sup>	...
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae	...
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub> gene <sup>e</sup>	...
<i>Chlamydomphila psittaci</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	...
<i>Legionella pneumophila</i>	...	...

## SUMMARY

There are many challenges to developing molecular tests for bacterial respiratory pathogens, particularly organisms that can be both asymptomatic colonizers and overt pathogens of the respiratory tract. Defining the reference method and the intended use of the product before initiating clinical studies is critical. Input from the FDA also is highly desirable. Although expectorated sputum may be the clinician's specimen of choice because of ease of collection, the poor quality of such specimens may require development of a unique host cellular target to ensure specimen adequacy. Molecular amplification assays will be costly to develop and clinical trials will be expensive, yet the need is great. There are still many gaps in our understanding of the interplay between colonization and infection. The key question industry must answer is: "Is the juice worth the squeeze?"

FDA halen bu konuda isteğini sürdürse de;

- Asemptomatik taşıyıcılık
- Moleküler test gelişimi pahalı
- Klinik araştırmalar maliyetlidir

Aslında endüstrinin cevap vermesi gereken soru; 'portakal sıkmanıza değecek kadar sulu mu?'

In Turkish version; 'attığınız taş ürküttüğünüz kurbağaya değecek mi?'



## INVITRO DIAGNOSTICS DATABASE Solunum Yolu Moleküler Test Onayları

	RSV	Influenza	TB
<1990	11	14	1
1990-2000	7	5	2
2000-2010	20	15	3
>2010	7	19	1

- 2010 ve sonrasında kombine testler daha baskın
- Kombinasyonlarda halen viral >virüs+bakteri



**Table 2. Food and Drug Administration Microbiology Devices Cleared Through the 510(k) Pathway or Approved Through the Premarket Approval Pathway<sup>a</sup>**

FDA Center for Devices and Radiological Health Division  
of Microbiology Devices: Devices Cleared/Approved  
January 2011–February 2013

Year	510(k) Molecular	510(k) Serology/ Other	CLIA Waived <sup>b</sup>	PMA Molecular	PMA Serology/ Other
2013	7	2	0	0	0
2012	16	33	3	2	2
2011	17	25	6	3	9
Total	40	60	9	5	11

Abbreviations: 510(k), Section 510(k) of the Food, Drug, and Cosmetic Act; CLIA, Clinical Laboratory Improvement Amendments; FDA, Food and Drug Administration; PMA, premarket approval.

<sup>a</sup> FDA regulatory pathways for in vitro diagnostics (IVDs) are based on the risk of a false-negative or false-positive result for a particular microorganism on subsequent patient management. IVDs are grouped into 3 categories depending on level of risk and knowledge of a particular disease state: Class I and II analytes are regarded as having a low (I) or moderate (II) risk of harm and require a 510(k) submission to be sent to the FDA for premarket clearance. Class III analytes are considered to have a high or unknown risk and require more detailed information to be submitted to the FDA in the form of a PMA submission to determine if they are safe and effective.

<sup>b</sup> CLIA-waived assays are those that demonstrate that they are simple enough to be run by untrained personnel in settings such as physicians' offices and that results obtained are similar to those generated by a high/moderate complexity laboratory with trained technical staff.

Testlerin yöntemsel dağılımına bakıldığında ise;  
-Toplamda seroloji>NAT  
-2013 yılı için NAT testleri en fazladır,

# Better Tests, Better Care: Improved Diagnostics for Infectious Diseases

Angela M. Caliendo,<sup>1</sup> David N. Gilbert,<sup>2,3</sup> Christine C. Ginocchio,<sup>4,5,6</sup> Kimberly E. Hanson,<sup>7,8</sup> Larissa May,<sup>9</sup> Thomas C. Quinn,<sup>10,11</sup> Fred C. Tenover,<sup>12</sup> David Alland,<sup>13</sup> Anne J. Blaschke,<sup>14</sup> Robert A. Bonomo,<sup>15,16,17,18</sup> Karen C. Carroll,<sup>19,20</sup> Mary Jane Ferraro,<sup>21,22</sup> Lisa R. Hirschhorn,<sup>23,24</sup> W. Patrick Joseph,<sup>25,26,27,28</sup> Tobi Karchmer,<sup>29</sup> Ann T. MacIntyre,<sup>30,31</sup> L. Barth Reller,<sup>32,33</sup> and Audrey F. Jackson,<sup>34</sup> for the Infectious Diseases Society of America (IDSA)

**Table 1. Historical Evolution of Diagnostic Methods and the Associated Time Required for Pathogen Identification**

Diagnostic Method	Time for Pathogen Identification
Microscopy	Morphology in minutes
Gram stain	General category in minutes
Culture and phenotypic biochemistry on/in artificial media (bacterial, mycobacterial, fungal)	Days to weeks
In vitro antimicrobial susceptibility	Days to weeks
Acute and convalescent antibody	Weeks
Monoclonal antibodies	Hours
Antigen detection	Minutes to hours
Real-time polymerase chain reaction for microorganisms and drug resistance genes	One to several hours
Mass spectrometry	Seconds to minutes, after growth on/in media

Gelecekte test süreleri önemli;  
 -kültür; günler-haftalar  
 -Seroloji-saatler  
 -Ag-dakikalar  
 -NAT-saatler  
 -Kütle spekt.-kültür sonrası saniyeler

**Table 3. Potential of New Technologies to Address Unmet Clinical Needs**

Unmet Need	Example of Pathogen/Syndrome	Potential Technologies
Rapid testing from clinical specimen ( $\leq 60$ minutes)	HSV-1/2, VZV, enterovirus, parechovirus, influenza, RSV, bacterial resistance (KPC, NDM-1)	Single-step molecular cartridge-based tests
Rapid testing from clinical isolate ( $\leq 60$ minutes)	Bacterial, fungal, or mycobacterial isolate	MALDI-TOF MS, single-step molecular cartridge-based tests
POC or near-patient testing ( $\leq 60$ minutes)	Respiratory infections (viral and bacterial), meningitis	Single-step molecular cartridge-based tests, handheld devices for molecular testing, LAMP coupled with Biosensors
Simplicity (CLIA waived)	Influenza, tuberculosis, malaria	Handheld devices for molecular testing, single-step molecular cartridge-based tests
Syndromic testing	Sepsis, pneumonia (HAP, VAP, CAP), meningitis, diarrheal diseases	Highly multiplexed single-step molecular cartridge-based tests, PCR coupled with T2 magnetic resonance
Screening for infection	Biomarkers to distinguish infection from no infection, bacterial from viral infection	Biosensors, biomarkers
Resource-constrained settings	HIV-1, tuberculosis, malaria	Handheld devices for molecular testing, single-step molecular cartridge-based tests
Infection control/hospital epidemiology	Outbreak evaluations of multidrug-resistant organism, rapid strain typing	Next-generation sequencing
Discovery of emerging pathogens	Influenza A H5 and H7, MERS-CoV	PCR coupled with ESI-TOF, next-generation sequencing

Abbreviations: CAP, community-acquired pneumonia; CLIA, Clinical Laboratory Improvement Amendments; ESI-TOF, electrospray ionization time-of-flight; HAP, hospital-associated pneumonia; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; HSV-1/2, herpes simplex viruses 1 and 2; KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; LAMP, loop-mediated amplification; MALDI-TOF MS, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; MERS-CoV, Middle Eastern respiratory syndrome coronavirus; NDM-1, New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1; PCR, polymerase chain reaction; POC, point-of-care; RSV, respiratory syncytial virus; VAP, ventilator-associated pneumonia; VZV, varicella zoster virus.

Solunum Sistemi Enf'da potansiyel yenilikler;  
NAT, Ag tarama ve MALDI-TOF sık kullanacağımız  
yöntemler ve sendromik testler (Ag/NAT+ T2 MRG)

A Guide to Utilization of the Microbiology  
Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases:  
2013 Recommendations by the Infectious  
Diseases Society of America (IDSA) and the  
American Society for Microbiology (ASM)<sup>a</sup>

A Guide to Utilization of the Microbiology  
Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases:  
2013 Recommendations by the Infectious  
Diseases Society of America (IDSA) and the  
American Society for Microbiology (ASM)<sup>a</sup>

**Table Introduction-1. Transport Issues (General Guide)<sup>a</sup>**

Specimen Type	Specimen Required	Collection Device, Temperature, and Ideal Transport Time
Aerobic bacterial culture	Tissue, fluid, aspirate, biopsy, etc	Sterile container, RT, immediately
	Swab (2nd choice) – flocked swabs are recommended	Swab transport device, RT, 2 h
Aerobic and anaerobic bacterial culture	Tissue, fluid, aspirate, biopsy, etc	Sterile anaerobic container, RT, immediately
	Swab (2nd choice) – flocked swabs are effective	Anaerobic swab transport device, RT, 2 h
Fungus culture; AFB culture	Tissue, fluid, aspirate, biopsy, etc	Sterile container, RT, 2 h
	Swab (2nd choice) (for yeast and superficial mycobacterial infections only)	Swab transport device, RT, 2 h
Virus culture	Tissue, fluid, aspirate, biopsy, etc	Viral transport media, on ice, immediately
	Swab – flocked swabs are recommended	Virus swab transport device, RT, 2 h
Suspected agent of bioterrorism	Refer to Centers for Disease Control and Prevention website: <a href="http://emergency.cdc.gov/documents/PPTResponse/table2specimenselection.pdf">http://emergency.cdc.gov/documents/PPTResponse/table2specimenselection.pdf</a>	
Serology	5 mL serum	Clot tube, RT, 2 h
Antigen test	As described in the laboratory specimen collection manual	Closed container, RT, 2 h
NAAT	5 mL plasma	EDTA tube, RT, 2 h
	Other specimen	Closed container, RT, 2 h

Abbreviations: AFB, acid-fast bacillus; NAAT, nucleic acid amplification test; RT, Room Temperature.

<sup>a</sup> Contact the microbiology laboratory regarding appropriate collection and transport devices and procedures since transport media such as Cary-Blair or parasite preservative transport for stool specimens, boric acid for urines, specialized containers for *Mycobacterium tuberculosis* are often critical for successful examination. The time from collection to transport listed will optimize results; longer times may compromise results.

- Seroloji- 5 mL serum, oda ısısında, 2 s
- NAT- 5 mL plazma, EDTA lı tüpte ve ya diğer örnekler oda ısısında 2 s
- Ag – kapalı tüpte, oda ısısında 2 s

Table VI-1. Laboratory Diagnosis of Bronchitis and Bronchiolitis

Etiologic Agents	Diagnostic Procedures	Optimum Specimens	Transport Issues; Optimal Transport Time
<b>Bacteria</b>			
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	NAAT <sup>a,b</sup>	Throat swab <sup>c</sup> , nasopharyngeal (NP) swab, sputum	NP swab, aspirate or wash Suitable transport device, RT, 2 h
	<i>Mycoplasma</i> IgG and IgM serology (enzyme immunoassay [EIA])	5 mL serum	Clot tube, RT, 2 h
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	NAAT <sup>a,b</sup>	Nasopharyngeal (NP) swab, sputum	Suitable transport device, RT, 2 h
	<i>Chlamydia</i> IgG and IgM serology (microimmunofluorescent stain; MIF)	5 mL serum	Clot tube, RT, 2 h
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Bordetella</i> culture and/or NAAT	Nasopharyngeal (NP) swab	Suitable transport device, RT, 2 h
<b>Viruses</b>			
Influenza virus	Rapid antigen detection tests <sup>d</sup>	Nasal aspirates or washes, NP swabs or aspirates, throat washes or swabs	Suitable transport device, wet ice, 2 h
Adenovirus	Virus culture		
Parainfluenza virus			
Respiratory syncytial virus	NAAT <sup>e</sup>	Nasal aspirates or washes, NP swabs or aspirates, throat washes or swabs	Suitable transport device, wet ice, 2 h
Human metapneumovirus			
Rhinovirus			
Coronavirus			

NAT testleri; virüsler, B.pertussis, M.pneumoniae, C.pneumonia  
Salgın döneminde Influenza için hızlı ag testleri (RDIT)

Biologic Agents	Diagnostic Procedures	Optimum Specimens	Transport Issues; Optimal Transport Time
<b>Acute Exacerbation of Chronic Bronchitis</b>			
<b>Bacteria</b>			
<i>Haemophilus influenzae</i> (nontypeable)	Gram stain	Expectorated sputum	Sterile container, RT, 2 h
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Aerobic bacterial culture		
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	See above under Acute Bronchitis	See <i>Chlamydia</i> and <i>Mycoplasma</i> above	See above
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	See above under Acute Bronchitis	See <i>Chlamydia</i> and <i>Mycoplasma</i> above	See above
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Gram stain Aerobic bacterial culture Urine Antigen <sup>f</sup>	First voided clean catch urine specimen	Sterile container, RT, 2 h
<b>Viruses</b>			
Influenza virus	Rapid antigen detection tests <sup>d</sup>	Nasal aspirates or washes, NP swabs or aspirates, throat washes or swabs	Suitable transport device, RT, 2 h
Coronavirus	Virus culture		Note that transport on wet ice is preferable, and recommended if transport will take >2 h
Parainfluenza virus (most often PIV3)			

• KOAH alevlenmede viral etkenler için Ag tarama/ NAT testleri

• *M.pneumonia* ve *C.pneumonia* içinde NAT

• Diğerleri için klasik kültür



**Table VI-2. Laboratory Diagnosis of Community-acquired Pneumonia**

Etiologic Agents	Diagnostic Procedures	Optimum Specimens	Transport Issues; Optimal Transport Time
<b>Bacteria</b>			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Gram stain	Sputum, bronchoscopic specimens	Sterile container, RT, 2 h; >2–24 h, 4°C
	Culture		
	Urine antigen <sup>a</sup>	Urine	Sterile container, RT, 24 h; >24 h–14 d, 2–8°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram stain	Sputum, bronchoscopic specimens	Sterile container, RT, 2 h; >2–24 h, 4°C
<i>Haemophilus influenzae</i>	Culture		
Enterobacteriaceae			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
<i>Legionella</i> species	Urine antigen	Urine	Sterile container, RT, 24 h; >24 h–14 d, 2–8°C
	<i>L. pneumophila</i> serogroup 1		
	Selective culture on BCYE	Induced sputum, bronchoscopic specimens	Sterile container, RT, 2 h; >2–24 h, 4°C
	NAAT <sup>b</sup>	Induced sputum, bronchoscopic specimens	Sterile container, RT, 2 h; >2–24 h, 4°C
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	NAAT <sup>b</sup>	Throat swab, NP swab, sputum, bronchoalveolar lavage (BAL)	Transport in M4 media or other <i>Mycoplasma</i> -specific medium at RT or 4°C up to 48 h; ≥48 h, –70°C
	Serology IgM, IgG antibody detection	Serum	Clot tube, RT, 24 h; >24 h, 4°C
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	NAAT <sup>b</sup>	NP swab, throat washings, sputum, bronchial specimens	Transport in M4 or other specialized medium at RT or 4°C up to 48 h; ≥48 h, –70°C
	Serology (MIF) IgM antibody titer; IgG on paired serum 2–3 wk apart	Serum	Clot tube, RT, 24 h; >24 h, 4°C
Mixed anaerobic bacteria (Aspiration pneumonia)	Gram stain	Bronchoscopy with protected specimen brush	Sterile tube with 1 mL of saline or thioglycolate; RT, 2 h; >2–24 h
	Aerobic and anaerobic culture	Pleural fluid (if available)	Sterile container RT, without transport ≤60 min; Anaerobic transport vial RT, 72 h

Etiologic Agents	Diagnostic Procedures	Optimum Specimens	Transport Issues; Optimal Transport Time
<b>Mycobacteria</b>			
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> and Nontuberculous mycobacteria	AFB smear	Expectorated sputum; induced sputum; bronchoscopically obtained specimens	Sterile container, RT, ≤2 h; ≤24 h, 4°C
	AFB culture		
	NAAT (No FDA-cleared direct test available)		
<b>Fungi</b>			
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Calcofluor-KOH or other fungal stain	Expectorated sputum; induced sputum, bronchoscopically obtained specimens; tissue	Sterile container, RT, <2 h; ≤24 h, 4°C
	Fungal culture		
	Histology	Tissue	Sterile container 4°C; Formalin container, RT, 2–14 d
	Antigen Tests	Serum, urine, pleural fluid (if available)	Clot tube, RT, 2 d; 2–14 d, 4°C Sterile container (urine), RT 2 h; >2–72 h, 4°C
	Serum antibody (CF)	Serum	Clot tube, RT, 24 h; 4°C, >24 h
<i>Coccidioides immitis/posadasii</i>	Calcofluor- KOH or other fungal stain	Expectorated sputum; induced sputum, bronchoscopically obtained specimens	Sterile container, RT, <2 h; ≤24 h, 4°C
	Fungal culture		
	Histology	Tissue	Formalin container, RT, 2–14 d; Sterile container 2–14 d, 4°C
	Serum antibody IgM (ID, LA, EIA) IgG antibody (CF, EIA)	Serum	Clot tube, RT, 24 h; >24 h, 4°C

Solunum sisteminde TB- NAT'ın FDA onayı yoktur

## Eve Gidecek Mesajlar

- Solunum sistemi enfeksiyonlarının moleküler tanısında; kombine testler ön plana çıkmaktadır,
- Bakteri ve virüsün birlikte yüksek duyarlılık ve özgüllükte gösterilmesi gelecek hedeftir,
- Yöntemsel olarak bakıldığında; Ag tarama ve RT-PCR bugün ve gelecekte diğer hepsinden birkaç adım öndedir,

## Eve Gidecek Mesajlar

- Tüm bu testlerin günümüzdeki en büyük dezavantajı maliyettir,

'Ak akçe kara gün içindir'



# MSS Enfeksiyonlarında Moleküler Tanı Yöntemlerinin Yeri

Aslıhan Candevir Ulu

ÇÜTF Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji  
AD

# Tanım

- Moleküler testler
- Nükleik asit amplifikasyon testleri
- Spesifik enfeksiyöz mikroorganizmaların DNA ve RNA larını tespit için kullanılırlar
- MSS enfeksiyonları gibi hızlı, doğru tespitinin hayat kurtarıcı olduğu durumlarda önemli

# Moleküler testler

- MSS enfeksiyonları için uygun
  - BOS steril
  - Saptanan mikroorganizma sıklıkla etken
  - Monomikrobiyal
  - Heme, endonükleazlar, ve ekzonükleazlar gibi PCR inhibitörlerini içermez

# Moleküler testler

- Daha düşük yanlış negatiflik ve yanlış pozitiflik
- Kültür bazlı veya antijen saptama yöntemlerine göre daha duyarlı
- Kültürü yapılamayan ve kolay ölen mikroorganizmaların tespiti için faydalı
- Ancak çoğu MSS enfeksiyonunun gerçek klinik duyarlılığı referans standart kullanan az sayıda çalışma olduğu için bilinmiyor
  - HSV ve JC hariç



# Moleküler testler

- Viral enfeksiyonların kesin tanısını arttırdı
- (+) PCR 88 kat daha fazla kesin tanı sağlıyor
- Testi yapacak laboratuvarın tam deneyimli olması gerekli
- Multiplex PCR kullanılarak aynı anda birden fazla etkene bakılabilir

DeBiasi RL, Tyler KL. Clin Microbiol Rev 2004; 17: 903–925

Jeffery KJMet al. Lancet 1997; 349: 313–317

# Ticari vs Ticari olmayan testler

- MSS'de kullanılabilir
- Ticari olarak bulunan testlerin çoğunda FDA onayları yok
- Laboratuvarda geliştirilen testler ise sadece çok komplike testleri yapabilecek sertifikalı referans laboratuvarları için valide
- Çoğu test laboratuvarlar arasında standardize değil, değişken
- Analitik duyarlılık ve kantitatif sonuçlar lab.lar arasında belirgin değişkenlik
- Testin özgüllüğü hedefin özgül olmasına bağlı

# Yanlış negatiflik nedenleri

- Testin analitik duyarlılığının düşük olması - m.o. konsantrasyonunun fonksiyonel limitin altında olması
- Amplifikasyonun inhibisyonu - kanlı örnek
- Testin çalışmaması - tanımlanmayan genetik varyasyon, yüksek mutasyon hızı
- Yetersiz klinik duyarlılık - düşük konsantrasyon
- Örnekleme hatası
- Etken m.o. için uygun olmayan test

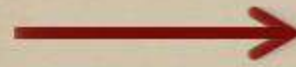
# Yanlış pozitiflik nedenleri

- Kontamine m.o.'nın amplifiye edilmesi
- Kan beyin bariyerinin bozulmasıyla gelen lökositler içindeki m.o.'ların amplifikasyonu
- Latent enfeksiyon etkeninin amplifikasyonu
- Test primeri veya prob sekanslarının özgüllüğünün düşük olması

# Klinik korelasyonun önemi

- Test sonuçları enfeksiyon olasılığıyla beraber değerlendirilmeli

Lökosit artışı yok ve  
normal protein  
seviyeleri



gerçek  
pozitif  
PCR  
olasılığı

# Klinik korelasyonun önemi

- Moleküler testler orta veya yüksek olasılıklı enfeksiyon durumlarında kullanılmalı
  - Klinik durum
  - Hastalık prevalansı
  - Artmış BOS parametreleri

# Klinik korelasyonun önemi

- 798 örneklilik retrospektif inceleme, moleküler test öncesi klinik değerlendirme kriterleri
  - HSV PCR pozitif gelen 13 hastanın hepsinde artmış BK veya protein seviyeleri
  - Normal BOS değerleri olan hiç bir hastada PCR pozitifliği yok
- Bu değerlendirme; immün komprezite , yenidoğan ve parenkimal inflamasyonu olan hastalar için uygun değil

Tang YW, et al. Infect Dis. 1999;29(4):803

Davies NW, et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2005;76(1):82

Simko JP, et al. Clin Infect Dis. 2002;35(4):414

# Duyarlılık Özgüllük

- Testler değerlendirilirken mutlaka duyarlılık ve özgüllük ile beraber değerlendirilmeli
- HSV ensefaliti için %96'nın üzerinde

Cinque P, Bossolasco S, Lundkvist A. J Clin Virol 2003; 26: 1–28

Kennedy PGE, et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2002; 73: 237–238.

Mitchell BM, et al. J Neurovirol 2003; 9: 194–204



# Duyarlılık Özgüllük

- Testler değerlendirilirken mutlaka duyarlılık ve özgüllük ile beraber değerlendirilmeli
- HSV ensefaliti için %96'nın üzerinde

Cinque P, Bossolasco S, Lundkvist A. J Clin Virol 2003; 26: 1–28

Kennedy PGE, et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2002; 73: 237–238.

Mitchell BM, et al. J Neurovirol 2003; 9: 194–204

# Kantitatif PCR

- Real-time PCR ile viral yük gibi kantitatif sonuçlar almak mümkün
- Hastalığın ciddiyeti, yaygınlığı, prognozunun belirlenmesi
- CMV, JC virüs

DeBiasi RL, Tyler KL. Clin Microbiol Rev 2004; 17: 903–925

Cinque P, Bossolasco S, Lundkvist A. J Clin Virol 2003; 26: 1–28

Moleküler Tanı  
Yöntemlerinin Klinik  
Tablolarda Rolü

# Menenjit

- Menenjitte özellikle de viral etiyoloji düşünölen hastalarda moleköler testler rutinde kullanılabilir
- Geleneksel testler klinik olarak hala faydalı ve çoğu vakada NAAT ile beraber kullanılmalı



# Bakteriyel etkenler

- Bakteriyel ajanların tespitinde Gram boyama ve kültür ana seçenek
- Müşkülpesent veya kültür yapılamayan bakteriler için veya önceden antibiyotik kullanımında NAAT testleri faydalı olabilir



# Bakteriyel menenjitte NAAT

- Geniş bant 16s rRNA bazlı bakteriyel PCR toplum kökenli bakteriyel menenjitte hızlı identifikasyon sağlar
  - 10-200 mo/ml BOS
- Real-time kantitatif multiplex PCR'ın ise duyarlılığı çok yüksek
  - 2 kopya *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*
  - 16 kopya *Listeria monocytogenes*
  - 28 kopya grup B streptococcus
- Nested PCR ise *Borrelia*, *Listeria* veya *Mycoplasma* tespitinde faydalı - düşük sayılı bakteriyel DNA ve daha az 16s rRNA

# Bakteriyel menenjitte NAAAT

- Kullanılan PCR metotları
- *Hemophilus influenzae*, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*,  
*L.monocytogenes*
- Duyarlılık %87-100 ve özgüllük %98-100
- Günümüzde kantitatif multiplex RT-PCR akut bakteriyel menenjitteki sık görülen etkenleri tespitite tercih edilen yöntem

Chaudhuri A, et al. EFNS guideline on the management of community acquired bacterial meningitis: report of an EFNS Task Force on acute bacterial meningitis in older children and adults. Eur J Neurol 2008; 15: 649-659.

# Bakteriyel menenjitte NAAAT

- Önceden tedavi almış hastalarda PCR'in pozitiflik oranı konvansiyonel kültürden belirgin yüksek
- Ventriküler kateteri olan ve nozokomiyal menenjitli hastalarda da PCR daha üstün
- Geniş bant PCR;
  - PPD, %98
  - NPD, %100
  - Negatif PCR akut bakteriyel menenjit tanısını dışlıyor



# Bakteriyel menenjitte NAAAT

- Laboratuvarda geliştirilen (in-house) testler, lab.lar ve testler arası değişkenlik fazla olduğu için rutinde önerilmiyor
- Ticari olarak bulunan standardize kantitatif RT-PCR konvansiyonel yöntemlere ek olarak öneriliyor

# Mikobakteriler için NAAT

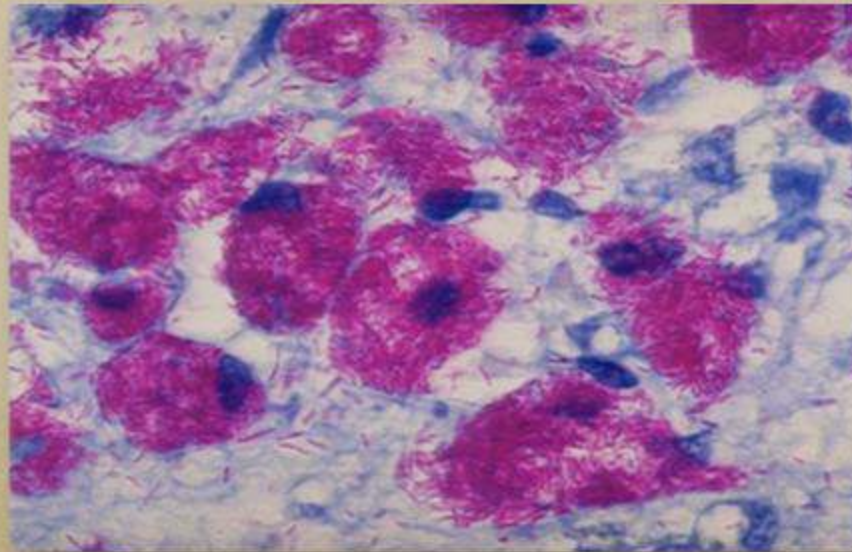
- ARB (+)'liği <%10
- Kültür için bekleme süresi uzun
- Kantitatif RT-PCR tanı koymayı arttırıyor
- Duyarlılık %46-66, zgllk %97-99
- BOS sedimetri yerine BOS filtratı kullanılınca daha yüksek duyarlılık
- Xpert MTB/RIF, hızlı RT-PCR yöntemi, pulmoner MDR Tbc'i belirlemede umut vadediyor
  - BOS'da test edilmedi

# Mikobakteriler için NAAT

- Çapraz kontaminasyon görülebilir
- Yanlış pozitiflik görülebileceği gibi negatif sonuç uygun klinik tablo ve görüntülemede tanıyı dışlamaz
- Tedaviden 1 ay sonra bile PCR pozitifliği saptanabilir
  - Tedavi cevabını değerlendirmede sıkıntı
  - Tekrarlayan PCR'lar ile tanı koyma olasılığı artıyor

# Mikobakteriler için NAAT

- Mikobakteriyel enfeksiyon şüphesi yüksek ise rutin kültür yanında önerilir
- Duyarlılığı düşük



# Lyme için NAAT

- Sadece nöroborelyozun erken safhalarında yardımcı
- Tanısal test olarak ve tedavinin değerlendirilmesinde önerilmez
- Atipik eritema migrans olgularında cilt biyopsisinde pozitifliği erken borelyoz tanısında faydalı olabilir

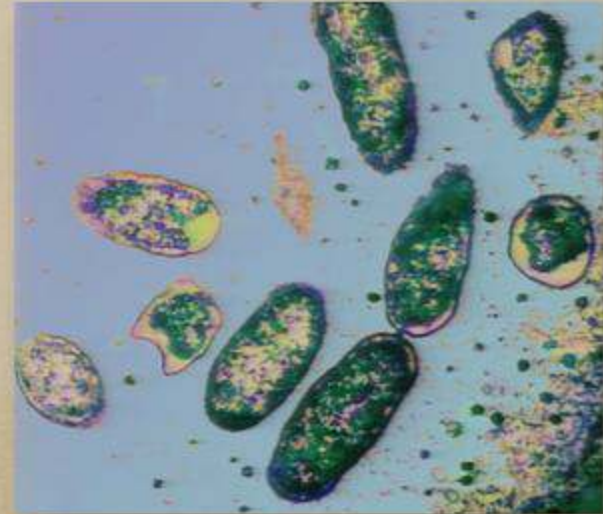
# *Brucella* için NAAT

- Real-time PCR, kültür ve Wright agg testine göre üstün

Colmenero JD, et al. Real time polymerase chain reaction: a new powerful tool for the diagnosis of neurobrucellosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2005 Jul;76(7):1025-7

# Rickettsia ve spiroketler için NAAT

- Araştırma aşamasında
- Rutin uygulamada yok
- Seroloji ve titreleri tanıda ana metot



# MO'lar için NAAT Testleri

Etiyoloji	Kullanılabilirlik	Endike olma durumu	Tercih edilen metot
<i>S.pneumoniae</i> , <i>H.influenzae</i>	Sınırlı	Gr (+), kültür negatif; tedavi öncesi	Gram boyama, kültür
<i>Mycoplasma spp.</i> <i>Tropheryma spp.</i> <i>Brucella spp.</i>	Evet	Klinik şüphe durumunda	Seroloji, NAAT +/- kültür
<i>M.tuberculosis</i>	Evet	Klinik şüphe durumunda	ARB, kültür ve NAAT
Önceden antibiyotik kullanımı	Araştırma safhasında	Seyrek olarak	Tedavi öncesi kültür



# Virüsler için NAAT

- Hem hastalığa tanı koyulmasını hem de hastalığın spektrumunu göstermeyi sağlar
- Fazla sayıda hastaya uygulanması ile hangi virüslerin hangi klinik tabloya yol açtıklarını ve sıklığını saptayabiliriz

# BOS'ta viral etkenler

- 3231 hasta, retrospektif
- Ensefalit, menenjit, miyelit
- %46 hastada viral etken
- VZV, HSV, enterovirüsler, influenza A

Koskiniemi M, et al. Infections of the central nervous system of suspected viral origin: a collaborative study from Finland. *J Neurovirol* 2001; 7: 400–408.

# Viral etkenlerin PCR ile tespiti

- 787 BOS örneği retrospektif değerlendirilmiş
- HSV, enterovirüsler, EBV
- PCR viral enfeksiyon düşünölmeyen hastaların sadece %5'inde pozitif

Davies NWS, et al. Factors influencing PCR detection of viruses in cerebrospinal fluid of patients with suspected CNS infections. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2005; 76: 82–87

# Virüsler için NAAT

- HSV, VZV, CMV, EBV için NAAT kullanımını artık standart haline gelmiştir
- Çoğu enteroviral PCR testleri paraekovirüsleri saptamaz
- Artropod ile bulaşan virüsler için Batı Nil virüsü hariç moleküler testler daha az tanımlanmış
- Batı Nil virüsü için rutin NAAT testleri mevcut
  - Ancak hasta immünkompresimize değilse kanda veya BOS'ta antikor cevabının değerlendirilmesi tercih edilir
- Respiratuvar sistem virüslerinden şüpheleniliyor ise solunum örneklerinin kullanımını tanı şansını arttırır

# Virüsler için NAAT

- PCR'in bakılma zamanı da önemli
- İlk 3 günde HSV PCR negatif gelebilir
- Birkaç gün sonra tekrar edilmeli
- Benzer şekilde çok geç örnek alınır da negatif sonuçla karşılaşılabilir
- Viral yük ilk haftada en fazla
- Tedavi ile PCR pozitifliği ilk haftada azalmıyor

# Virüsler için NAAT

- PCR VZV için nörolojik hastalığın tanısında kanıtlanmış değere sahip
- 3231 hastalık retrospektif bir çalışmada nörolojik hastalığa neden olmuş kanıtlanmış etkenlerin %29'unu oluşturmaktaydı
- VZV ilişkili nörolojik hastalıkta duy/özg ; %80/%98
- BOS'taki viral yükü menenjit ve ensefalit hastalarında kraniyel sinir tutulumu olanlara göre daha yüksek bulundu
- VZV'in önceden düşünüleneye göre daha fazla reaktivasyonsuz klinik tabloya neden olduğu gösterildi
  - Vaskülopati, zoster sine herpete, miyelopati, meningoensefalit, polinöritis kraniyalis

# Virüsler için NAAT

- CMV'ye bağlı MSS enfeksiyonunda hızlı ve güvenilir yöntem
- Duyarlılık ve özgüllük yüksek; %92-100 vs %94
- Klinik şüphe durumunda PCR kullanılması öneriliyor
  - Ensefalit ventrikülit, akut poliradikülopati, miyeloradikülopati, periferal nöropati, retinit

# Virüsler için NAAT

- Primer MSS lenfoması olan HIV pozitif hastalarda EBV PCR kullanılmasının faydalı olduğu gösterilmiş
  - Duy %97-100, özg %98,5
  - Kantitatif PCR kemoterapi cevabında
- EBV ilişkili nörolojik hastalık
  - Ensefalit
  - Aseptik nörit, serebellar ataksi, miyelit,
  - Periferal sinir bozuklukları
  - Guillain-Barre sendromu,
  - Kraniyel nöropati



# Virüsler için NAAT

- Enteroviral PCR kullanımını hem doğru tanı koymada hem de daha iyi hasta yönetimin için etkili bulunmuş
- RT-PCR duy %86-90, özg %92-100
- Bir çalışmada duyarlılık %31 bulunmuş
- Daha fazla çalışmaya ihtiyaç var

# Virüsler için NAAT

- Progresif multifokal lökoensefalopati hastalarında JC virüs PCR kullanılması rutin haline geldi
- Özgüllüğü %98,5-100
- PML'den şüphelenilen hastalarda JCV DNA bakılmalı
- Kantitatif PCR
  - Yüksek viral yük, kısa yaşam süresi

Virus	Reported sensitivity and specificity of CSF PCR	Evidence class and level of recommendation
Herpes simplex virus (HSV)-1 Encephalitis	96% and 99% [15]	Class I Level A May be false negatives during first 3 days
Varicella-Zoster virus (VZV)	80% and 98% [25]	Class III Level C CSF anti-VZV IgG more sensitive than PCR in VZV vasculopathy
Cytomegalovirus (CMV)	92% and 94% [32]	Class II Level B Quantitative PCR may also be clinically useful
Epstein-Barr Virus (EBV)	97-100% and 98.5% [33,34,36]	Class IV Level C Quantitative PCR may also be clinically useful
Enteroviruses	31-95% and 92-100% [37,40, 41]	Class II Level B
JC virus (JCV)	50-82% and 98.5-100% [48-50]	Class II Level B Quantitative PCR may also be clinically useful
Human immunodeficiency virus (HIV)	Diagnosis will already have been made on the blood	CSF viral load a useful tool in assessing neurological involvement
Human T-cell lymphotropic Virus (HTLV-1)	75-99.4% and 98.5% [40,57]	Class III Level C Combination of CSF PCR and anti-HTLV-1 antibody index useful in diagnosis

Etiyoloji	Kullanılabilirlik	Endike olma durumu	Tercih edilen metot
Adenovirüs	Evet	Seyrek	Alternatif bölgelerden örnek alınması
Arbovirüs	Sınırlı	Klinik şüphe durumunda	Seroloji, NAAT
CMV	Evet	Klinik şüphe durumunda	Kantitatif NAAT
EBV	Evet	Klinik şüphe durumunda	Seroloji kNAAT
Enterovirüsler	Yaygın	Klinik şüphe durumunda	NAAT
HHV-6	Evet	Klinik şüphe durumunda	Kantitatif NAAT
HSV	Yaygın	Klinik şüphe durumunda	NAAT
Influenza	Evet	Seyrek	Alternatif bölgelerden örnek
Lenfositik koryomenenjit virüsü	Sınırlı	Seyrek	Seroloji
Kabakulak	Sınırlı	Seyrek	Viral kültür, seroloji, NAAT
Paraekovirüsler	Evet	<5 yaş çocuklar	NAAT
VZV	Evet	Seyrek (immünsuprese değilse)	NAAT
Batı Nil virüsü	Evet	Ara sıra	Seroloji

# Mantar ve parazitler için NAAAT

- Bu ajanlar için moleküler testler daha az olarak bulunabilir
- Resmi bir öneri yapmak için yeterince iyi tanımlanmamışlardır



Etiyoloji	Kullanılabilirlik	Endike olma durumu	Tercih edilen metot
Rickettsia	Sınırlı	Ara sıra	Seroloji
Leptospira	Sınırlı	Seyrek	Seroloji
<i>Borelia burgdorferi</i>	Evet	Evet	Seroloji, NAAT
<i>T.pallidum</i>	Sınırlı	Hayır	Seroloji, CSF VDRL
<i>Criptococcus spp.</i>	Sınırlı	Hayır	Antijen tespiti, kültür
Diğer mantarlar	Sınırlı	seyrek	Kültür, seroloji
Parazitler	Sınırlı	Seyrek	Seroloji, histoloji, NAAT

# Ensefalit

- Moleküler testler epidemiyoloji, risk faktörleri, erişilebilirlik, klinik tablo rehberliğinde kullanılmalı
- Moleküler testlerin öncesinde veya beraberinde geleneksel tanı yöntemleri, ve BOS dışı örneklem yapılmalı
- HSV ensefaliti dışında parankimal hastalığın BOS'tan test edilmesinin klinik duyarlılığı ve prediktif değeri tam olarak bilinmemekte
- Negatif testler hastalığı dışlamaz
- Tanıda kombine yaklaşım önerilir

# Bakteriyel ensefalit

- Nadir, seçilmiş vakalarda faydalı olabilir
- *Coxiella burnettii* gibi müşkülpesent, yavaş üreyen veya kültürü yapılamayan bakteri ile temas öyküsü veya uygun hasta hikayesi olan durumlarda
- *Mycoplasma pneumoniae* daha sık non-viral ensefalit etkeni olabilir ancak BOS'ta serolojiye göre daha düşük tanı olasılığı



# Parazitler ve NAAT

- Çok düşük sayıda mo ile gerçekleşen enfeksiyonların tanısında faydalı
- Konvansiyonel yöntemlere göre daha yüksek duyarlılık ve özgüllük
- Avrupa lab.larında referans tanısal araç, tropikal bölgelerde araştırma amaçlı
- Rutinde kullanmak için pahalı
- Sadece toksoplazma ensefalitinde PCR ce RT-PCR rutin kullanımda öneriliyor

Protozoal pathogen	CNS manifestation	Molecular-based diagnostic technique	Evidence class	Recommendation
Free living amoebae	Granulomatous amebic encephalitis	PCR [85] Nested PCR [86]	IV	—
<i>Acanthamoeba</i> sp.	Acute primary amebic meningoencephalitis	Real-time PCR [87] PCR [88] Real-time PCR [89] Multiplex real-time PCR [90]		
<i>Balamuthia mandrillaris</i>				
<i>Naegleria fowleri</i>				
<i>Entamoeba histolytica</i>	Brain abscess	Real-time PCR [91] Multiplex tandem real-time PCR [92,93] High through put multiplex PCR [84] Probe-based detection with luminex beads [84]	In stools: II In abscess aspirate: IV	—
<i>Babesia microti</i>	Anemia, hypoxic encephalopathy	PCR [94,95]	IV	—
<i>Plasmodium falciparum</i>	Cerebral malaria, multi-organ malaria	Real-time PCR [96] PCR multiplex real-time PCR [80,97] quantitative nucleic acid sequence-based amplification [98] Real-time quantitative nucleic acid sequence-based amplification [99] Loop-mediated isothermal amplification [100–102] Polymerase chain reaction/ligase detection reaction fluorescent microsphere-based assay [103] PCR ELISA [104,105] Nested PCR [106] Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) [106]	II (depending whether patient lives in holoendemic region or in non-endemic region)	C

# Mantarlar için NAAT

- Bu alanda diğer mo.lar kadar ilerleme yok
  - Göreceli olarak seyrek görülmeleri
  - Duyarlılık ve özgüllük çalışmaları için altın standart yok
- Çoğu mo için araştırma aşamasında ve klinik olarak kullanılabilir değil
- MSS kriptokoku (duy ve özg >%93) ve asperjillozu için ek olarak kullanılabilir
- Rutinde kullanılmalarını önermek için yeterli kanıt yok

histoplasmosis	–	150	Spain (2010)	IV	1	CSF					1
occidiodomycosis	–	154	USA (2010)	IV	5	CSF	1		2		0
		182	USA (2011)	IV	2	CSF	1		1		2
cryptococcosis	Level C <sup>a</sup>	155	India (2009)	III	46 (30)	CSF	44	43	46		46 (0 in controls)
		156	Italy (1998)	III	21 (19)	CSF	21	21			21 (0 in controls)
		157	Brazil (2004)	III	56 (16)	CSF	43	48			52 (0 in controls)
		158	India (2002)	IV	25	CSF	25				25
		159	India (2002)	IV	17	CSF	13	13			13
andidiasis	–	163	Sweden (2006)	IV	24	CSF		1			4
		164	Canada (2001)	IV	4	CSF	0		2		2
		165	Canada (1996)	IV	7	CSF	1				3
aspergillosis	Level C <sup>a</sup>	172	Japan (1999)	III	5 (11)	CSF	0		EIA 4/LA 4		5 (0 in controls)
		166	The Netherlands (1999)	III	26 (30)	CSF			26	0	4 (0 in controls)
		170	Japan (1999)	IV	1	CSF	0				0
		174	Japan (2004)	IV	1	CSF			0	0	1
		175	Germany (2006)	IV	35	CSF					14
		173	The Netherlands (1999)	IV	2	CSF			1		1
		176	Italy (2002)	IV	2	CSF	2		1		1

# Postenfeksiyöz ensefalit

- Moleküler testler negatif olmalıdır
- Seroloji, klinik tablo ve diğer yöntemler tanıda kullanılır

# Transvers miyelit

- Başarılı sonuçlar yayınlansa da yeterli veri yok
- Postenfeksiyöz veya nonenfeksiyöz tablolarda NAAT negatif olmalı
- Viral etkenlere bağlı, *Mycoplasma* spp. ve *M.tuberculosis*'te özellikle klinik şüphe durumlarında kullanılır

# Beyin apsesi

- Moleküler olmayan testler tanıda hala ana metotlar
- Amip apsesi şüphesi gibi durumlarda faydalı olabilir

# Sonuç

- Moleküler testlerin kullanımı, hızlı ve doğru tanının hayat kurtarıcı olduğu MSS enfeksiyonlarında bu enfeksiyonların tanı ve yönetimini etkilemiştir
- Moleküler yöntemler BOS'ta kullanım için uygundur
- NAAT çoğunlukla kültür bazlı veya antijen tespit eden yöntemlere göre daha duyarlı
- HSV ve JC hariç gerçek klinik hassasiyet?
- Test sonuçları her zaman enfeksiyon olasılığıyla beraber değerlendirilmeli