

HIZLI ETKEN TANIMLAMA

Doç. Dr. İpek Mumcuođlu

Ankara Numune Eđitim ve Arařtırma Hastanesi



Konu Başlıkları

- Giriř
- Hızlı Etken Tanımlama Yöntemleri
 - Mikroskobik Tanı
 - Kromojenik agarlar
 - Otomatize sistemler
 - Flowsitometri
 - Maldi-Tof MS
 - Moleküler Yöntemler
- Enfeksiyon Hastalıklarında Kullanımı
- Hızlı Etken Tanımlama Yöntemlerinin Geleceđi



Konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemler

- Sonuç süresi uzun
- Sadece kültürde üretilebilen mikroorganizmalara uygulanabilir

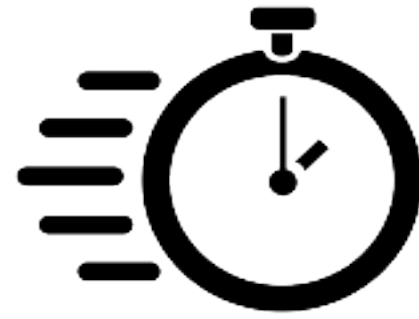


Hızlı mikrobiyolojik yöntemler

- mikroorganizmaların izole edilmesini,
- kültürde üremesini
- tanımlanma hızını veya
- Tanı verimliliğini arttıran teknik veya işlemleri içerir.

Enfeksiyon hastalıklı bir bireyin tanımlanmasından
Dünya çapında bir pandeminin yönetimine kadar
Hızlı ve doğru tanı çok önemli!

Hızlı Sonuçlar....



- Hastanın uygun tedavisinin hızlı başlanmasını
- Antimikrobiyal direncin engellenmesini
- Salgınların hızlı tanı ve müdahalesini sağlar

- Klinik örneklerden **20-120 dk** arasında kalitatif ya da kantitatif sonuçların verilmesini kapsar.
- 4 gün yerine 18 saatte
- 6 hafta yerine bir haftada sonuç veren testler de bu kapsamda

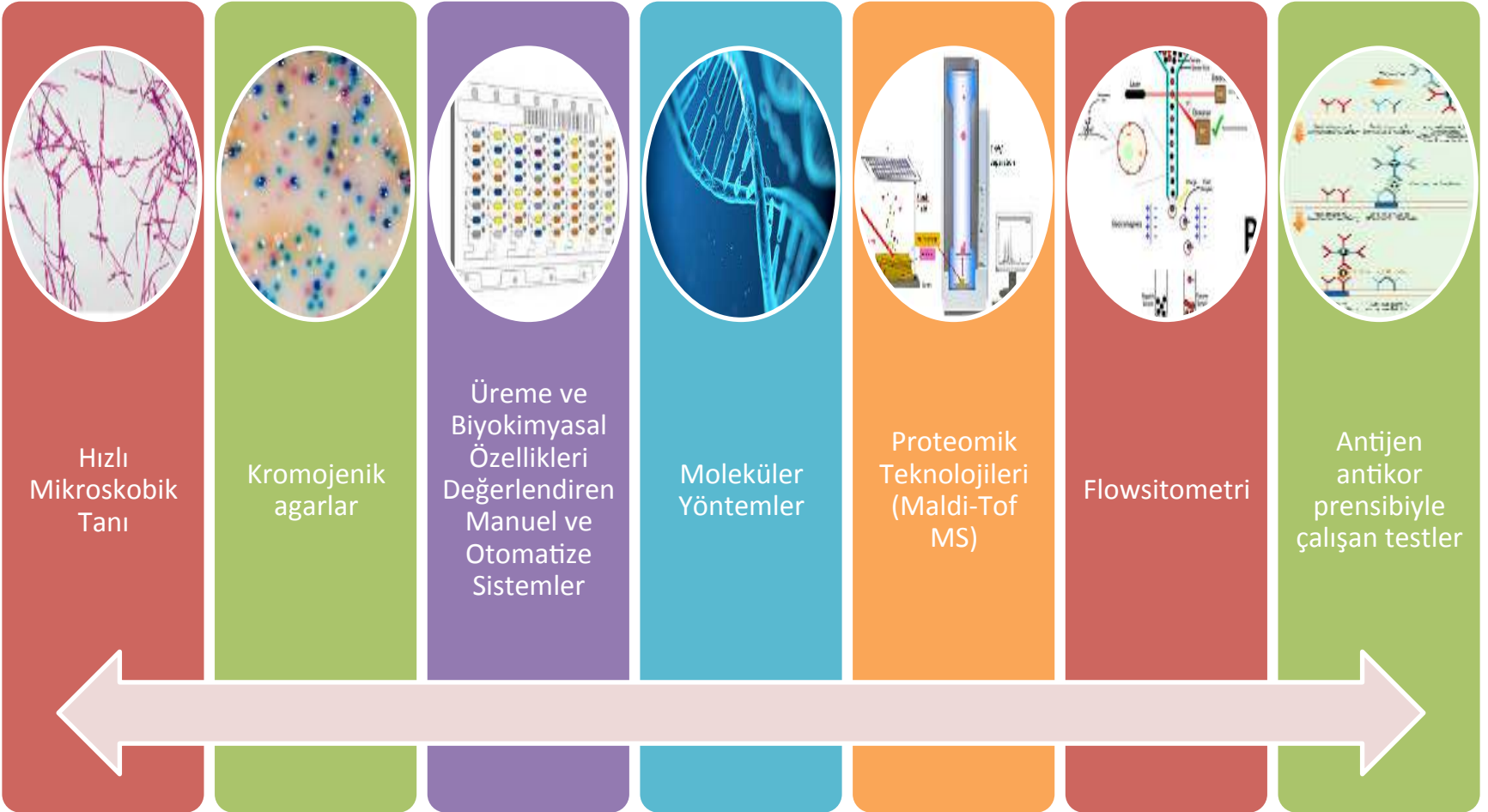


Hızlı Etken Tanımlama Testlerinden Beklenenler?

- Hasta yönetimine faydalı olmalı
- Yüksek özgüllük ve duyarlılık
- Yüksek NPD ve PPD
- Tekrarlanabilir sonuçlar
- Uygun fiyat



Hızlı Etken Tanımlama Yöntemleri



Hızlı Mikroskopik Tanı

Direkt Mikroskopi

- *Trichomonas vaginalis*
- *Giardia lamblia*
- *Entamoeba histolytica*
- Bir çok cestod ve nematod parazit

Gram boyası

- *Streptococcus pneumoniae* (balgam),
- *Neisseria gonorrhoeae* (üretral akıntı)
- Bakteriyel vaginosis (Clue cell)

Ziehl-Neelsen, Kinyoun, Modifiye ARB

- Mikobakteriler, Nocardia, Microsporidia

Çini Mürekkebi

- *Cryptococcus spp.* türleri (BOS)

Giemsa Boyama

- *Leishmania spp.*
- *Plasmodium spp.*

KROMOJENİK AGARLAR

MRSA

VRE

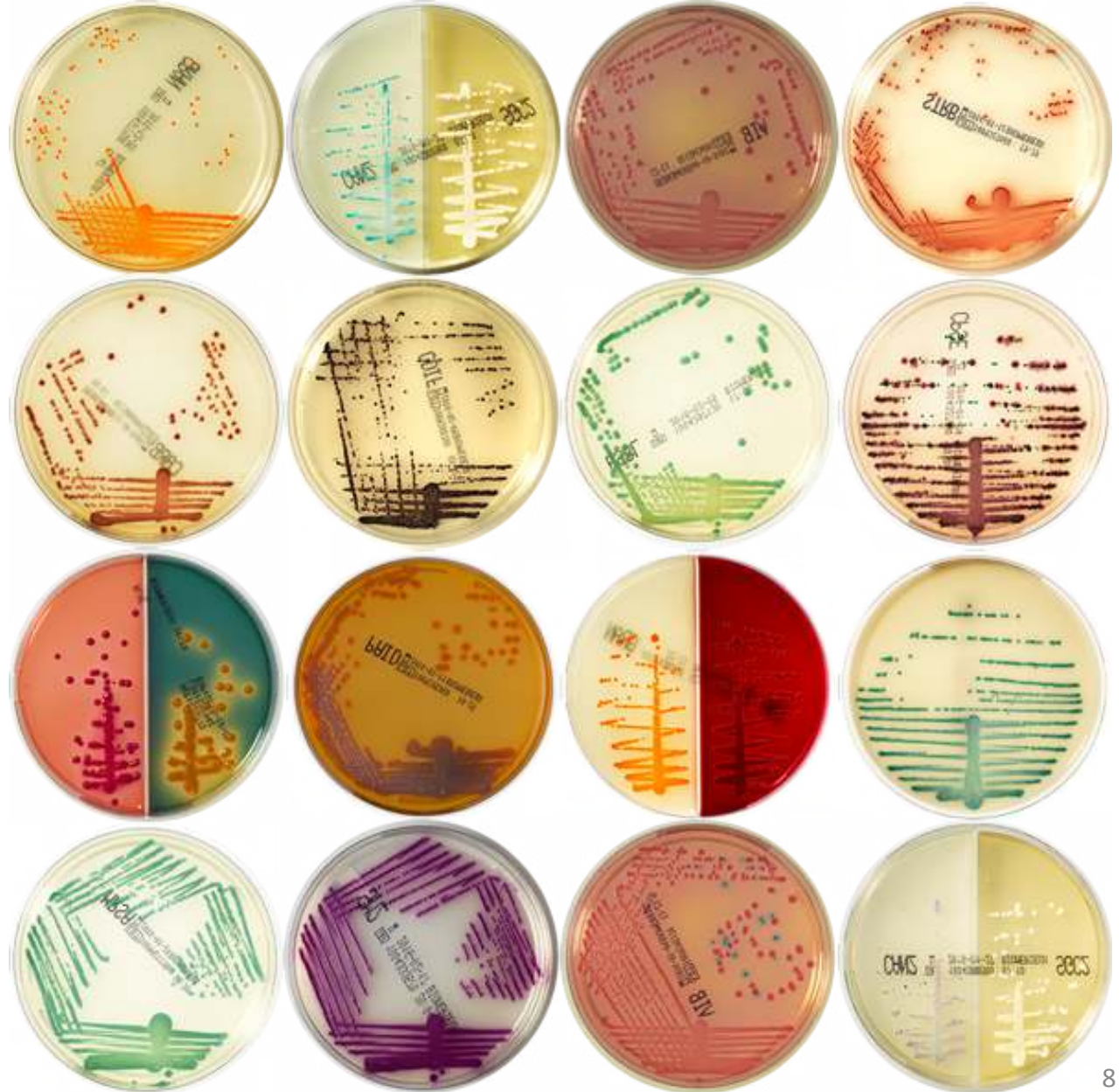
ESBL, KPC

S. agalactiae

Salmonella spp.

Candida spp.

Üriner patojenler



KROMOJENİK AGARLAR

FAYDALARI

Hızlı saptama

Yüksek Duyarlılık

İş gücü tasarrufu

Moleküler testlere kıyasla düşük maliyet

Geniş Uygulama Alanı

(Bakteri, Maya, Direnç belirteçleri, Halk Sağlığı Taramaları)

SORUNLARI

Maliyet

Yardımcı ya da ileri testlere ihtiyaç

Kısıtlı raf ömrü

Bazıları ortam ışığına duyarlı

FDA onaylı değiller



Kromojenik Agar Üreten Firmalar ve Ürünleri

| FİRMA ADI | ÜRÜN |
|----------------------------|---|
| BD | Candida, Orientation (urine), Salmonella, Listeria, 0157, S.aureus |
| bioMerieux | MRSA, SA, VRE, Salmonella, Salmonella/HE, Candida, Strepto B, CPS (urine), C. difficile |
| Remel | SpectraMRSA, SpectraVRE SpectraUTI |
| Hardy | MRSA, SA, Candida, UTI, E. coli, CRE, ESBL, Salmonella, Salmonella/Shigella |
| BioRad | MRSASelect, VRESelect UriSelect, SASelect, CandiSelect |
| Microbiology International | Candida, Listeria, Pseudomonas Stool Pathogens(Vibrio, E. coli), |

Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri Değerlendiren Sistemler

- Bakterilerin üretilmesi gereklidir
- Mikrobiyolojide yaygın kullanım
- Manuel ve Otomatize sistemler mevcut
- Tanı süresi klasik yöntemlerden daha kısa
- Expert Sistemler
- Diğer teknolojilerden yavaş



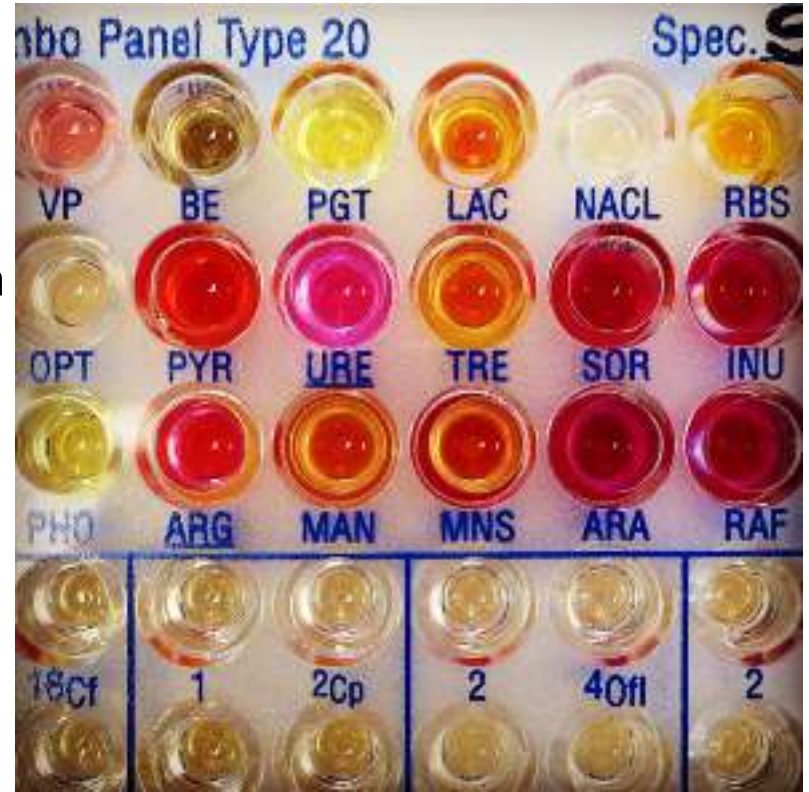
Vitek2
bioMerieux



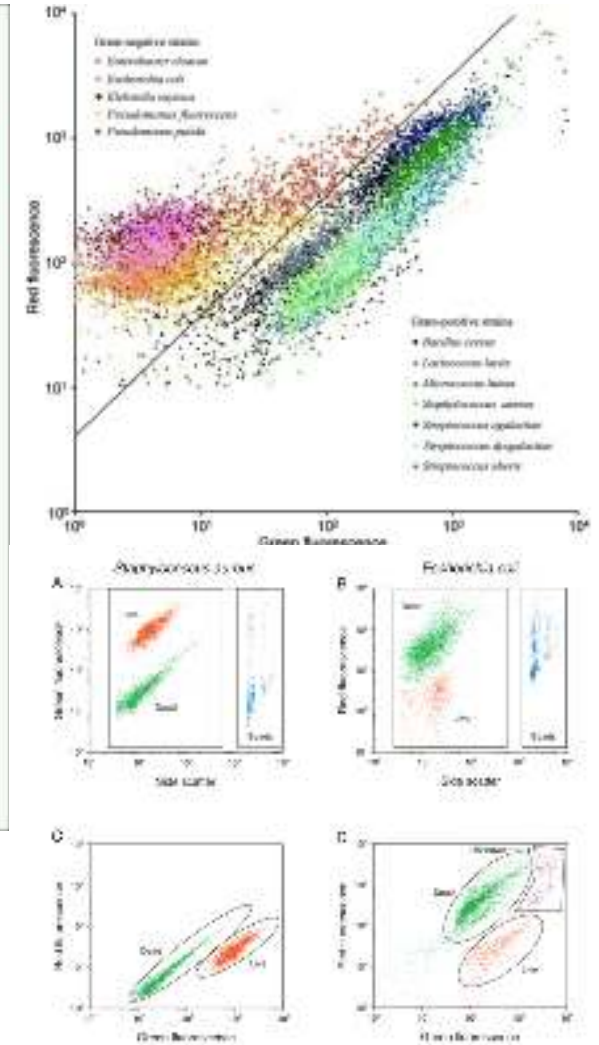
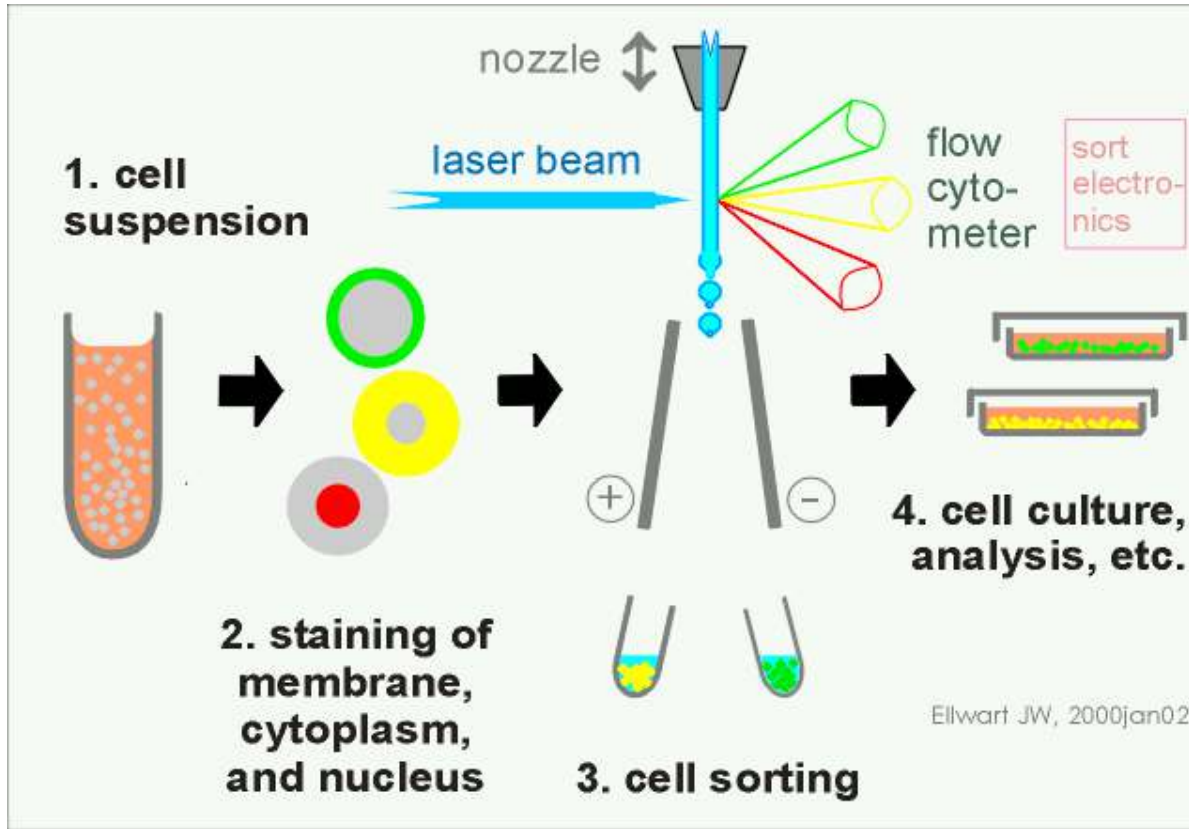
Phoenix 100
Becton Dickenson



MicroScan WalkAway
Beckman-Coulter



Flow cytometry Çalışma Prensipli



Flow sitometri floresan yoğunluğuna bağlı olarak süspansiyon halindeki hücrelerin büyüklüğüne ve granülitesine göre tek hücre seviyesinde kantitatif ölçüm yapan bir sistemdir

Mikrobiyolojide flow cytometry

- Aerop/anaerop/zor üreyen bakteri, mantar, virüs, parazit
 - sayı, canlılık, tanımlama, duyarlılık
- Direkt hasta örneğinden
 - Bakteriyemi ve bakteriüri saptanması
- Karışık bakteri popülasyonlarında antimikrobiyal ajanlara yanıtının saptanması
- Viral antijen, nükleik asit kantitatif tayini
- Sonuç < 4 saat

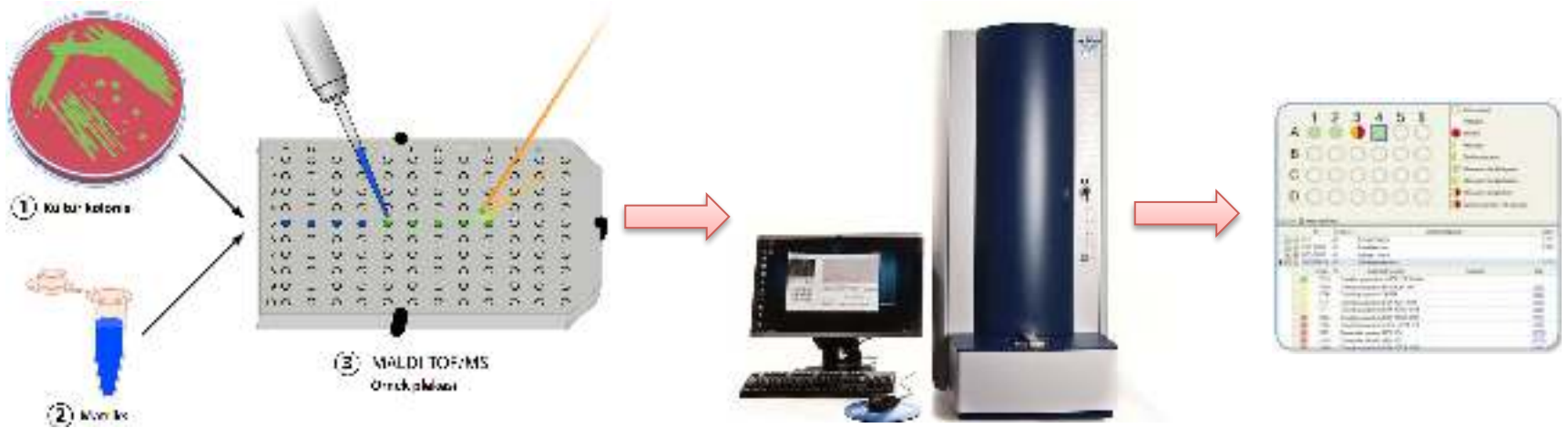


UF-4000/5000
Sysmex

MALDI-TOF MS

(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)

- Bakteri, mantar, mikobakteri ve parazitlerin hızlı tanısında klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin tanıda kullanılmaya başlayan protein analize dayalı identifikasyon sistemi



Koichi Tanaka & John Ferris, 2002



MALİYET ETKİNLİK VE SONUÇ SÜRELERİ



TITLE: MALDI-TOF Mass Spectrometry for Bacterial Species Identification: A Review of Diagnostic Accuracy and Clinical and Cost-Effectiveness

DATE: 21 April 2011

Table 2: Delays for Isolate Identification Methods in Seng et al.⁵

| Method | Delay (in minutes) |
|--|--------------------|
| API system identification | 1080-2880 |
| Phoenix system identification and susceptibility test* | 300-1200 |
| Vitek system identification | 300-480 |
| Vitek system identification and susceptibility test | 300-480 |
| MALDI-TOF | 6-8.5 |

Table 6: Costs of Isolate Identification Methods in Seng et al.⁵

| Method | Cost/isolate, € |
|---|-----------------|
| API system identification | 4.6-6.0 |
| Phoenix system identification and susceptibility test | 12.65 |
| Vitek system identification | 5.9-8.23 |
| Vitek system identification and susceptibility test | 10.38-12.71 |
| MALDI-TOF | 1.43 |

Cihaz
160.000 \$
-250.000 \$

- Moleküler testlerin maliyeti 25-75 \$
- Test sonuçlanma süresi 4-8 saat
- Patojen tayini tanımlanan hedefle sınırlı

MALDI-TOF MS KULLANIM ALANLARI

Aerop, anaerop bakteriler

Mikobakteriler

Maya ve filamentöz mantarlar

Direnç genleri

Subtiplerin karşılaştırılması

Viruslar

Parazitler



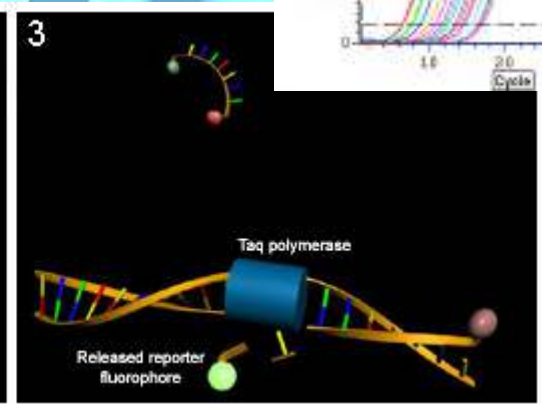
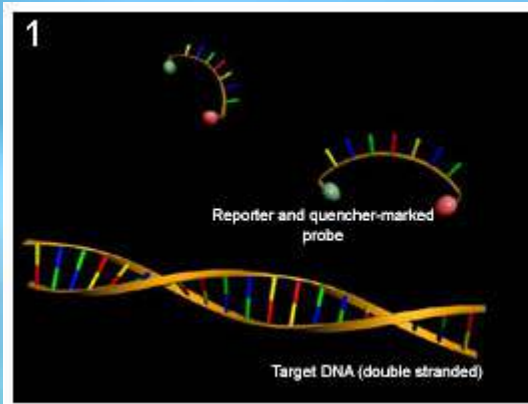
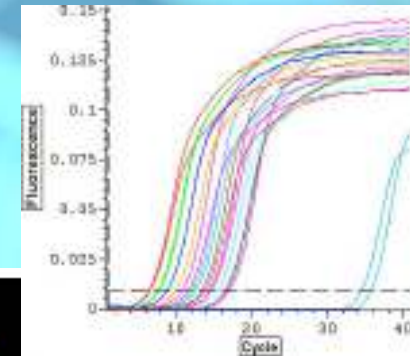
AMD için hızlı yönlendirme
Gram pozitif basil, KNS
viridans streptokok
HACEK, Anaerop,
Non-fermentatif bakteriler
Mayalar



HIZLI MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Real Time PCR

- Bu teknik, amplifikasyon ve tanımlamayı tek süreç içerisinde birleştirir (termal cykler, floresans okuyucu)
- Kantitatif sonuçlar verir
- Multipleks PCR şansı sunar



Real-Time PCR

- Avantaj
 - Duyarlı, özgül ve hızlı
 - Kantitatif sonuç
 - Kontaminasyon düşük
 - Pek çok patojeni bir arada belirleyebilir
- Dezavantajları
 - Pahalı
 - Eğitimli laboratuvar personeli gerekir



Real-Time PCR Uygulamaları

Virus uygulamaları daha çok

- Hücre kültürüne göre kolay, ucuz
- Viral yük gösterilebiliyor
- Üretilmesi tehlikeli viruslar
- HIV, HBV, HCV, CMV, BK, HSV, RSV, Entero v., Corona v.

MRSA, VRE, *Karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae*, *C. difficile*

Direnç genlerinin tespiti

- Gansiklovir-R CMV
- Rifampin dirençli *Mycobacterium*

HIZLI MOLEKÜLER YÖNTEMLER

PNA-FISH

(Peptit Nükleik Asit Floresan İn Situ Hibridizasyon)

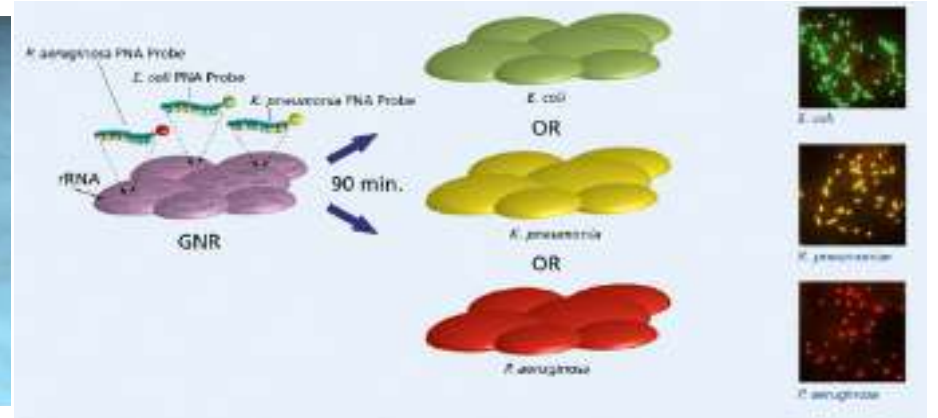
PNA-FISH, sentetik oligonükleotid flüoresan etiketli probları kullanır.

Problar türe özgü ribozomal RNA'ya hızlı hibridizasyonunu sağlar.

Hibridizasyon sonrasında, floresan mikroskopla değerlendirme

Sonuç süresi 30 dakikaya kadar inmiştir

Sonuçlar Gram boyama ile aynı zamanda çıkar



HIZLI MİKROBİYOLOJİK TANI GEREKTİREN ENFEKSİYON ETKENLERİ



Toplum kazanımlı enfeksiyonların hızlı tanısı

Toplum kazanımlı pnömoni

- En önemli ihtiyaç enfeksiyon var/yok ve varsa bakteriyel/viral ayrımının yapılması
- Klinik semptomlarla optimal tedaviye karar vermek zor → Ampirik tedavi
- Modern hızlı tanı yöntemleri ile tanı %20'den %89'a çıkarılmış

Clin Infect Dis. 2010 Jan 15;50(2):202-9. doi: 10.1093/cid/cip070.

Etiology of community-acquired pneumonia: increased microbiological yield with new diagnostic methods.

Johansson N¹, Källin M, Thelning-Lindell A, Götz CG, Hedlund J.

Author information

Abstract
BACKGROUND: The microbial etiology of community-acquired pneumonia (CAP) is still not well characterized. During the past few years, polymerase chain reaction (PCR)-based methods have been developed for many pathogens causing respiratory tract infections. The aim of this study was to determine the etiology of CAP among adults-especially the occurrence of mixed infections among patients with CAP-by implementing a new diagnostic PCR platform combined with conventional methods.

METHODS: Adults admitted to Karolinska University Hospital were studied prospectively during a 12-month period. Microbiological testing methods included culture from blood, sputum, and nasopharyngeal secretion samples; sputum samples analyzed by real-time quantitative PCR for *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*; nasopharyngeal specimens analyzed by use of PCR; serological testing for *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and viruses common in the respiratory tract; and urine antigen assays for detection of pneumococcal and *Legionella pneumophila* antigens.

RESULTS: A microbial etiology could be identified for 67% of the patients (n = 124). For patients with complete sampling, a microbiological agent was identified for 89% of the cases. The most frequently detected pathogens were *S. pneumoniae* (70 patients [36%]) and respiratory virus (53 patients [29%]). Two or more pathogens were present in 43 (35%) of 124 cases with a determined etiology.

CONCLUSIONS: By supplementing traditional diagnostic methods with new PCR-based methods, a high microbial yield was achieved. This was especially evident for patients with complete sampling. Mixed infections were frequent (most commonly *S. pneumoniae* together with a respiratory virus).

Analytes

Panel 3

Panel 4

Mycobacterium tuberculosis
ARB, kültür
Otomatize sistemler
RealTime PCR (direnç)

CYBH

- Legionella pneumophila (LF)
- Haemophilus influenzae (HI)
- Streptococcus pneumoniae (SP)
- Bordetella pertussis (BP)
- Bordetella parapertussis (BPP)

- Coronavirus NL63 (CoV NL63)
- Coronavirus 229E (CoV 229E)
- Coronavirus OC43 (CoV OC43)

Toplum kazanımlı enfeksiyonların hızlı tanısı

Gastrointestinal Sistem Enfeksiyonları

Viral/bakteriyel/protozoal etkenler

Salmonella spp.

Shigella spp.

Campylobacter spp.

EHEC

Kültürle tanı süresi 48-72 saat



Bacteria

Campylobacter (*jejuni*, *coli* and *upsaliensis*)

Clostridium difficile (toxin A/B)

Plesiomonas shigelloides

Salmonella

Yersinia enterocolitica

Vibrio (*parahaemolyticus*, *vulnificus* and *cholerae*)

Vibrio cholerae

Diarrheagenic *E. coli*/Shigella

Enteroaggregative *E. coli* (EAEC)

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)

Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) *hly*/*st*

Shiga-like toxin-producing *E. coli* (STEC) *stx1/stx2*

E. coli O157

Shigella/Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)



Parasites

Cryptosporidium

Cyclospora cayentanensis

Entamoeba histolytica

Giardia lamblia



Viruses

Adenovirus F 40/41

Astrovirus

Norovirus GI/GII

Rotavirus A

Sapovirus (I, II, IV and V)



Yatan hastalar ve YBU enfeksiyonlarında hızlı tanı

- Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonları
- Sepsis
- Pnömoniler
- Enfeksiyon Kontrolü



Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonlarının Hızlı tanısı

Mikroskopi

Real Time PCR

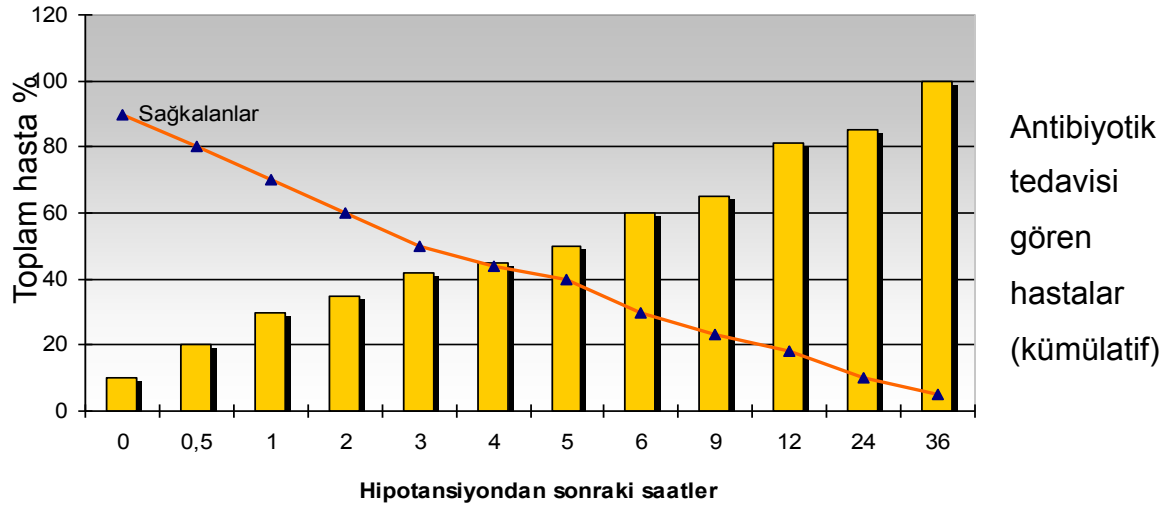
- Yetişkinlerde HSV (altın standart, FDA)
- Çocuklarda Entero virüs (FDA)

Moleküler testler+ kültür+ seroloji

- Yine de olguların çoğu tanımlanamıyor
- Yeni testler geliştirilmeli

Sepsis

- ❖ Sepsis semptomları başladıktan sonra etkin antibiyotik tedavisine başlanana kadar geçen süre sağ kalımın en kritik belirleyicisidir
- ❖ Zamanında ve uygun antibiyotik tedavisine başlanması sağ kalım şansını x5 kat ↑
- ❖ Olguların %20-30'unda yanlış ampirik tedavi başlanıyor
- ❖ Her 1 saatlik gecikme hastanın hayatta kalma şansını %7,6 ↓



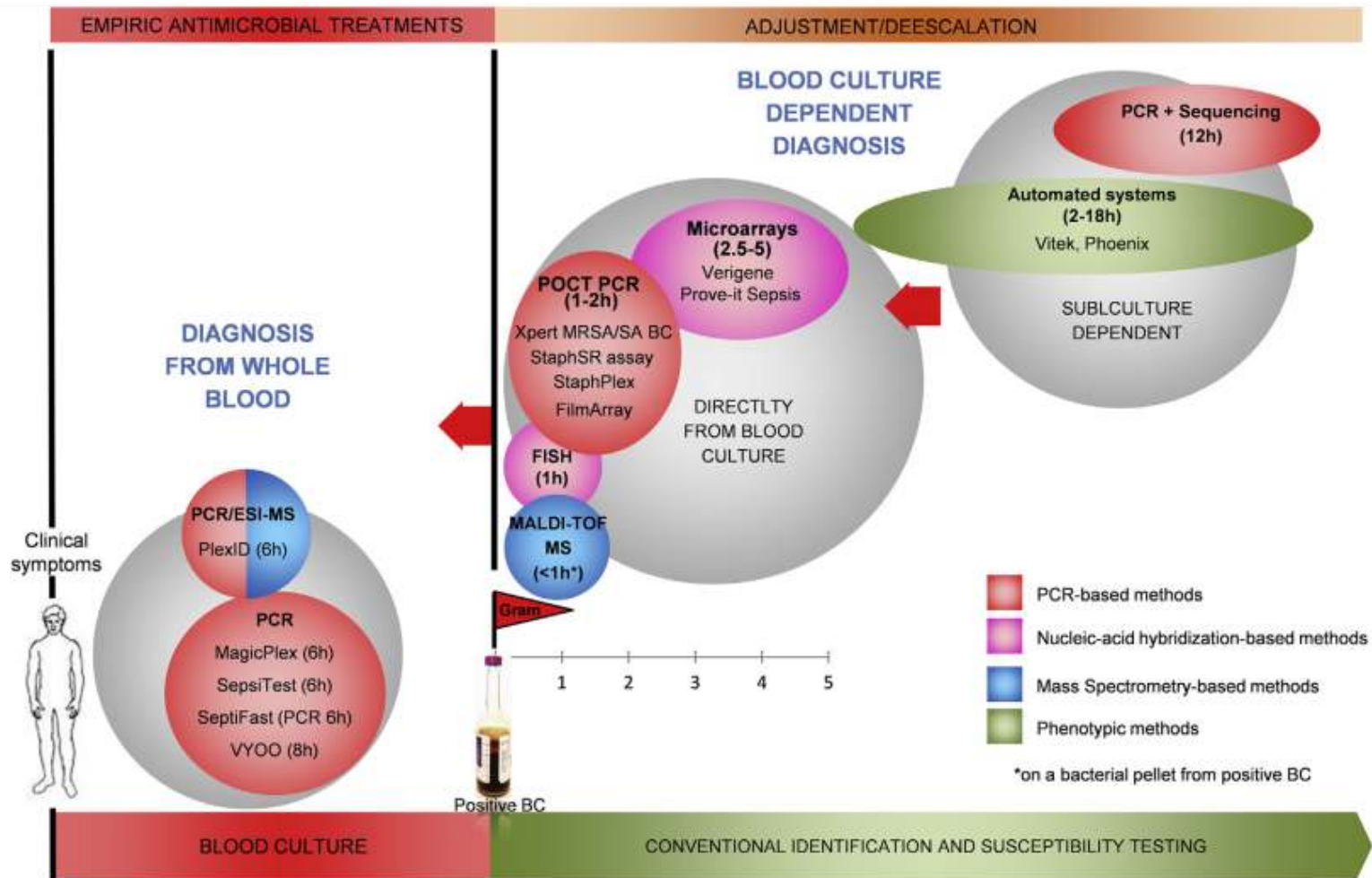


TABLE 1. Main commercially available systems for identification of microbes directly from blood samples

| System | Method | Time to result (hours) | Blood volume (mL) | Microorganism coverage | Resistance and virulence markers | Sensitivity, specificity, and correlation with conventional methods (%) | Comments | Ref. |
|---|--|------------------------|---------------------|---|--|---|--|---------------|
| SepsiTest Molzym, Bremen, Germany | Broad-range PCR + sequencing | 6 | 1–10 ^a | >345 bacteria (Gram positive and Gram negative) and fungi | 0 | 21–87, 85–96, NR | Pros: can be used in other sterile samples; Cons: variable sensitivity and specificity | [43,56,58–61] |
| SeptiFast Roche Molecular System, Basel, Switzerland | Multiple broad-range real-time PCR | 3.5–5 | 1.5 | 6 Gram positive, 8 Gram negative, 5 fungi | <i>mecA</i> ^b | 43–95, 60–100, 43–83 | Pros: time to result; Cons: variable sensitivity and specificity, no quantification | [35–53,74] |
| MagicPlex Seegene, Seoul, Korea | Multiple PCR + multiplex real-time PCR | 3–5 | 1 | 21 bacteria (Gram positive and Gram negative) at species level (90 at genus level), 6 fungi | <i>mecA</i> , <i>vanA/B</i> | 37–65, 77–92, 73 | Pros: fast; Cons: limited number of studies, succession of reaction and device, no quantification | [55,56] |
| VYOO SIRS-Lab, Jena, Germany | Multiplex PCR + electrophoresis | 8 | 5 | 14 Gram positive, 18 Gram negative, 7 fungi | 0 | NR, NR, 70 | Pros: highly sensitive; Cons: limited number of studies, several manual steps | [59,63,75] |
| PLEX-ID, Abbott Molecular, Carlsbad, CA, USA | Multiplex broad-range PCR/ESI-MS | 6 | 1.25–5 ^c | Up to 800 (Gram positive, Gram negative, fungi) | <i>mecA</i> , <i>bla_{KPC}</i> , <i>vanA/B</i> | 50–91 ^d , 98–99, 79–97 | Pros: universal, detection of mixed bacterial populations, semiquantitative; Cons: no interventional studies | [11,76,77] |

ESI-MS, electrospray ionization mass spectrometry.

^aWith an additional kit.

^bWith an additional test for patient with positive detection of *Staphylococcus aureus*.

^cFor the latest version.

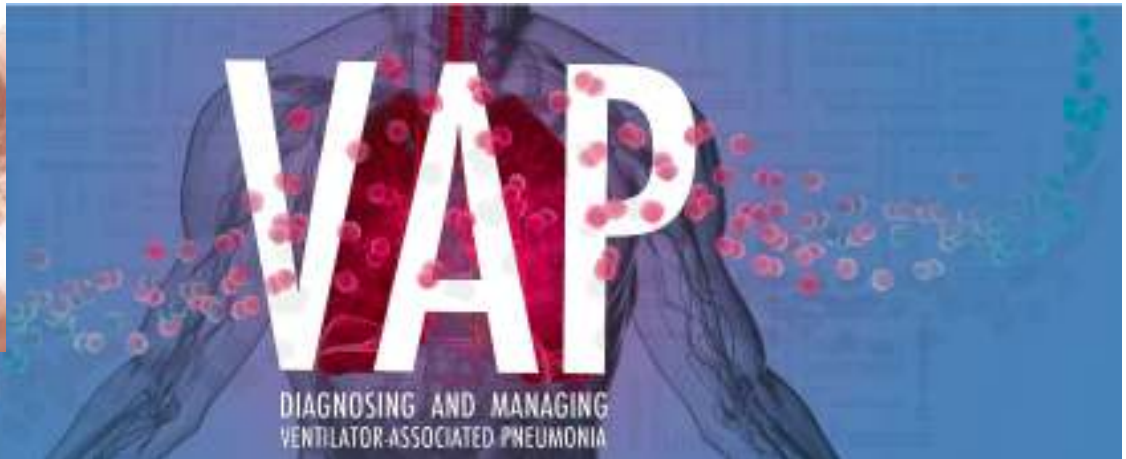
^dDepending on the sample volume (1.25 versus 5).

Sağlık Bakımı ile ilişkili pn6moniler

Tedavi gecikmesi mortaliteyi arttırır (aşırı tedavi, yan etki, direnç, *C. difficile*)

Gram boyama kolonizasyon enfeksiyon ayırımı yapamaz

Spesifik molek6ler testler mevcut değil



Enfeksiyon Kontrolü

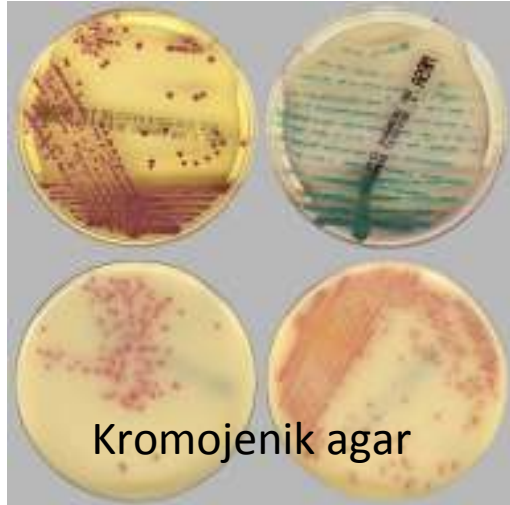
MRSA

VRE

ESBL

KPC

C. difficile



Kromojenik agar

Cost-effectiveness of universal MRSA screening on admission to surgery

A. Murthy^{1,2}, G. De Angelis¹, D. Pittet¹, J. Schrenzel³, I. Uckay⁴ and S. Harbarth¹

1) Infection Control Program, University of Geneva Hospitals and Faculty of Medicine, Geneva, Switzerland, 2) Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, MD, USA, 3) Microbiology Laboratory, University of Geneva Hospitals and Faculty of Medicine, Geneva and 4) Department of Surgery, University of Geneva Hospitals and Faculty of Medicine, Geneva, Switzerland

Abstract

Policy-makers have recommended universal screening to reduce nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection. Risk profiling of MRSA carriers and rapid PCR tests are now available, yet cost-effectiveness data are limited. The present study assessed the cost-effectiveness of universal PCR screening on admission to surgery. A decision analysis model from the hospital perspective compared costs and the probability of any MRSA infection across three strategies: (i) PCR screening; (ii) screening for risk factors pending chromogenic agar results; and (iii) no screening. The model results showed that PCR screening resulted in higher costs (CHF 1000) but a higher incremental cost-effectiveness ratio of 1000/0.01 compared with no screening.

PCR, dışkı örneklerinden toksijenik *C. difficile* suşlarının doğrudan tespiti mümkün % 93.5 ve % 94.0



Real time PCR

Klonal ilişkiyi gösterecek hızlı testler gerekli

RepPCR
MaldiTof

| Organizma | Süre (saat) | Teknoloji | Firma | Ürün | Otomatize |
|--|-------------|------------------|------------|----------------------------------|-----------|
| MRSA | 0,3 | PNA Quick Fish | AdvanDx | S. aureus PNA Quick Fish | Hayır |
| MRSA | 0,1 | İmmürokromotgrfi | Alere, | BinaxNOW | Hayır |
| MRSA,MSSA | 20-26 | Kromojenik agar | BD | BBLChromAgar | Hayır |
| MRSA | 2 | PCR | Roche | Light Cycler | Evet |
| MRSA,MSSA | 2 | Multiplex PCR | BDGeneOhm | BDGeneOhm StaphSR | Evet |
| MRSA,MSSA | 1 | Multiplex PCR | Cepheid | Xpert MRSA | Evet |
| MRSA,MSSA | 2.5 | Multiplex PCR | Nanosphere | Verigene BC:GP | Evet |
| <i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> | 0,5 | PNA Quick Fish | AdvanDx | OE PNA QuickFISH | Hayır |
| <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Micrococcus spp.</i> , <i>Listeria spp.</i> | 2,5 | Multiplex PCR | Nanosphere | Verigene BC:GP | Evet |
| <i>C. difficile</i> | 1 | LAMP | Meridian | İllumigene | Evet |
| <i>C. difficile</i> | 2 | PCR | BDGeneOhm | BDGeneOhm <i>C. difficile</i> | Evet |
| <i>C. difficile</i> | 0,5 | Multiplex PCR | Cepheid | Xpert <i>C. difficile</i> | Evet |
| <i>C. difficile</i> | 3 | PCR | GeneProbe | ProGastro CD | Evet |

| Organizma | Süre (saat) | Teknoloji | Firma | Ürün | Otomatize |
|--|-------------------------|----------------|------------------------|--------------------------------------|-----------|
| <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> | 0,5 | PNA Quick Fish | AdvanDx | GNR TrafficLight PNA Quick Fish | Hayır |
| <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Acinetobacter</i> <i>spp.</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> | 2 | Multiplex PCR | Nanosphere | Verigene BC:GN | Evet |
| <i>Candida albicans</i> , <i>C.</i> <i>parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C.</i> <i>glabrata</i> , <i>C.krusei</i> | 1,5 | PNA Quick Fish | AdvanDx | Yeast TrafficLight PNA Quick Fish | Hayır |
| Multipl bakteriyel, fungal, viral patojenler | 1 | Multiplex PCR | BioFire Diagnostics | FilmArray System and panels | Evet |
| Multipl bakteriyel, fungal, viral patojenler | 6 (direkt kandan) | Multiplex PCR | Roche | Light Cyler SeptiFast MGrade | Evet |
| Multipl bakteriyel, fungal, viral patojenler | 0,2 | MaldiTof MS | BRUKER | Maldi Biotyper CA | Evet |
| Multipl bakteriyel, fungal, viral patojenler | 0,25-1 | MaldiTof MS | bioMerieux | VITEK MS | Evet |
| Multipl bakteriyel, fungal, viral patojenler | 6-24 | Optical | bioMerieux BD | VITEK 2 Phoenix | Hayır |

Hızlı Tanı Testleri, mikrobiyolojik tanıda standart tanımlama testlerinin yerini alabilir mi?



HAYIR (henüz değil :))

Bulaşıcı hastalıkların araştırılması geleneksel metodolojilere kıyasla nispeten daha düşük duyarlılıklara sahip

Birçok bulaşıcı ajan için güvenilir moleküler tanı testleri henüz mevcut değildir.

Hızlı Tanı Testleri gerçekten tanı ve hasta bakımını iyileştiriyor mu?



- **İnfluenza, HIV ve *C. difficile* için evet**
- Tüberküloz, sıtma ve bakteriyemi hastalarında önemli bir rol oynuyorlar
 - Halk sağlığı çalışmalarında (Grup A streptokok)
 - Hastane patojenlerinin taramasında (MRSA, VRE)
- Asemptomatik CYBH etkenlerinin (HIV, frengi, gonore, klamidya) taranması (Hastalar kliniğe tekrar gelmedikleri için)

HIZLI ETKEN TANIMLAMA

- Klinik mikrobiyoloji rutin hizmetleri arasında yaygın olarak kullanılamamaktadır
- Kullanımı kısıtlayan en büyük nedenler:
 - Özgüllük, duyarlılık
 - Fiyat etkinliğinin gösterilmemesi,
 - Hekimlere iyi tanıtılmamış olması
 - Uzun vadede sürdürülebilirlik (hizmet alımına kayma)

HIZLI TANI TESTLERİNİN GELECEĞİ

- Daha ucuz ve daha kullanıcı dostu platformlar üretildikçe kullanım artacak
 - Duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD değerleri iyileşmeye devam ediyor
- Bulaşıcı hastalık salgınlarının epidemiyolojik araştırmalarında kullanımı yaygınlaşacak
- Uygun ve optimal kullanımı sağlamak için rehberlerin oluşturulması gereklidir.



Teşekkür ederim