



Antibiyotik Dirençli Patojenler İçin Hızlı

Tanı:

Gerçekten Mümkün mü?

Doç. Dr. Duygu ÖCAL

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı





Hızlı Tanı?

Maliyet?

Laboratuvar
koşulları?

Kimler için
kullanılacak

Kim
isteyecek

Yorumlama



AMAÇ

Doğru test

- Test, klinik ortam için uygun mu?
- Duyarlılık ve özgüllük
- Prediktif değerler
- Test hacmi
- Tanısal verim
- Laboratuvar uygulanabilirliği
- Maliyet
- Klinik etki



ANAHTAR SORU

Doğru hasta

- Test sonucu, hastanın klinik bakımını etkiler mi?
- Laboratuvar test kullanım komitesi
- Otomatik laboratuvar refleksi
- Bilgisayarlı hekim siparişi girişi (CPOE) karar desteği
- Uygun kullanım kriterleri
- Endikasyon seçimi
- Önceden yetkilendirme
- Karşılaştırmalı değerlendirme
- Numune reddi



POTANSİYEL STRATEJİLER

Doğru zaman

- Sonuç, bakımı en iyi şekilde etkileyecek zamanda mevcut olacak mı?
- Numune teslim alma süresi
- Merkezileştirilmiş vs yerinde test
- İstek üzerine vs toplu test
- Numune hazırlık süresi
- Çalışma süresi
- Sonuç raporlama süresi

Neden hızlı
ve doğru
tanı?

Azalmış ölüm oranı

İyileştirilmiş antimikrobiyal
yönetim sistemi

Hastanede kalış süresinin
kısılması

Maliyet etkinlik

Hibridizasyon Temelli Testler

FISH, hedef organizmanın varlığını nicel olarak görselleştirmek için oldukça spesifik bir yöntemdir.

PNA-FISH, DNA/RNA problemlerinden daha hızlı ve spesifik bağlanmayı sağlayan peptid nükleotid asidi (PNA) problemleri kullanır.

Aktif olarak büyüyen hücrelerde, RNA DNA'dan daha bol bulunur ve bu nedenle probleme için iyi bir hedef oluşturur.

Hibridizasyon Temelli Testler

- XpressFish, *mecA* genini özel olarak tespit eder ve QuickFish tabanlı tanımlamanın ardından kullanıldığında, kan kültürü pozitif hale geldikten yalnızca 2 saat sonra metisiline direnç tanısı!
- Genefluidics Inc. (CA, ABD) tarafından geliştirilen biyosensör tabanlı ADT (b-ADT) sistemi, elektrokimyasal bir biyosensör ile 16S rRNA moleküllerini nicelendirerek bakteriyel büyümeyi ölçer.
 - Bu sistem, klinik idrar ve kan örneklerinde hızlı ADT için 10^4 cfu/ml tespit limitine ulaşmıştır
- Genefluidics UtiMax™, idrar örneklerinden 30 d tanı ve 2 saatte ADT
 - Bu kitin genel hassasiyeti %100 ve özgüllüğü %98,2'dir

Nükleik Asit Amplifikasyon Temelli Testler



NAAT, patojen tanımlamada çok güçlü bir araçtır, özellikle de sendromik bir yaklaşım ile birleştirildiğinde.



BioMérieux, Elitech, Bosch, Eplex, Qiagen veya Becton Dickinson gibi birçok tanı paneli, belirli direnç genlerinin tespitini içermektedir.



Bu paneller, özellikle ayrıntılı bir antibiyogramın gerekmediği durumlarda klinik olarak önemli sonuçlar sağlayabilir.

Nükleik Asit Amplifikasyon Temelli Testler



Belirli antimikrobiyal direnç genlerinin tespiti sağlanır.

Ayrıca; antibiyotik direncinin kesin bir kanıtını veremez.



Tanımlanan direnç genleri, hastalığa neden olan patojenle ilişkilendirilmemiş olabilir veya bulunan direnç geni fonksiyonel değildir



NAAT, MİK değerlerini net tanımlamaz.



Ancak qRT-PCR cihaz ve reaktanın maliyeti rutin ADT için kabul edilebilir seviyenin üzerinde olmakla birlikte; ekspresyon düzeyi verir



NAAT, hem bakteriyel hem de viral patojenlerin tanımlanmasında güçlü bir araçtır.



Temel olarak, kültür olmadan değerlendirilmeye olanak tanır.

- Farklı floresan etiketlerin geniş yelpazesi sayesinde, aynı örnekten birden fazla hedef gen paralel olarak kolayca test edilebilir.
- Sistemler, DNA dizilerine hibridizasyon uygulayarak daha fazla hassasiyet ve spesifiklik elde edebilir.
- Halihazırda birçok FDA onaylı çoklu tanı paneli mevcuttur.

Xpert®
(Cepheid Inc.),

ePlex
(GenMark
Diagnostics),

Unyvero
(Curetis AG),

BD Max
(Becton-
Dickinson)

SeptiFast
(Roche)

Magicplex
(SeeGene),

Novodiag
(Mobidiag)

GenomEra
(Abacus Diagnostics)

-
- **PCR/electrospray ionization-kütle spektrometresi** (IRIDICA PCR/ESI-MS, Abbott Laboratories Inc., ABD) tek bir testle 750'den fazla farklı bakteriyel türün tespitini sağlar
 - **Yüksek Çözünürlüklü Erime Sistemi** (HRM*, ThermoFisher tarafından) nükleik asit dizilerindeki varyasyonları, PCR erime eğrilerindeki küçük farklılıkları tespit ederek tanımlar.
 - **Dijital PCR** uygulandığında, büyüyen bakteriyel kültürler için *E. coli*, *E. faecalis*, *P. mirabilis* ve *S. aureus* için hem tanımlama hem de antimikrobiyal duyarlılık profillerini yaklaşık 6.5 saatte, makine öğrenimi algoritmalarıyla analiz ederek ortaya koymuştur.*

HRM: High resolution melting system

*Athamanolap et al. Integrated bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing using pcr and high-resolution melt. Anal. Chem. 2017;89, 11529–36. doi:

-
- **NUCLISENS® EASYQ® (bioMerieux)**, NASBA ve gerçek zamanlı tespiti moleküler beacon prob kullanarak birleştiren ilk otomatik sistemdir.
 - *Klebsiella* spp.'de karbapenemaz genlerinin hızlı tespitine olanak sağlamıştır
 - **LCR**, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* ve *Yersinia pestis*'te siprofloksasin ve doksisisiklin direnç genlerinin tespitinde başarıyla kullanılmıştır
 - **LAMP**, standart PCR'a göre inhibitörlere daha az duyarlı olduğu için özellikle dayanıklıdır.
 - Kan, idrar veya dışkı gibi örneklerin minimal işlem sonrası analizine olanak tanır.
 - LAMP, DNA veya RNA ekstraksiyonunun mümkün olmadığı düşük kaynaklı saha ortamlarında uygulanabilir.

Spanu T et al. (2012). Evaluation of the new NucliSENS EasyQ KPC Test for rapid detection of *klebsiella pneumoniae* carbapenemase gen s (*blaKPC*). J. Clin. Microbiol. 50, 2783–2785. doi: 10.1128/JCM.00284-12

Oblath EA et al. (2013). A microfluidic chip integrating DNA extraction and real-time PCR for the detection of bacteria in saliva. Lab. Chip. 13, 1325–1332. doi: 10.1039/c3lc40961a

Sahoo PR. et al. (2016). Loop mediated isothermal amplification: an innovative gene amplification technique for animal diseases. Vet. World 9, 465–469. doi: 10.14202/vetworld.2016

İmmünolojik Yöntemler



Antibiyotik direnç proteinlerinin doğrudan tespiti için birkaç ürün mevcuttur. LF testi, *P. aeruginosa* örneklerinde kloramfenikol direncini tespit etmektedir.



Alere Inc., MRSA tespiti için, PBP2a'ya spesifik tavuk IgY antikoruna dayanan bir immünochromatografi testi piyasaya sürmüştür



PBP2a SA Kültür Koloni Testi, MRSA'yı 6 dakikada tanımlayabilmektedir



Coris Bioconcept (Belçika), enterobakteriyel izolatlardan karbapenemazların (OXA-48-benzeri, KPC ve NDM türleri) tespitine yönelik testler sunmuştur



Boutal ve arkadaşları, karbapenemazlar için TX-M-15, NDM, OXA-48-benzeri, KPC, IMP ve VIM gibi LF testlerini tanıtmıştır (Boutal ve diğ., 2017). LF testleri, izole edilmiş klinik izolatlarla iyi çalışmaktadır.



Ancak, bu testler genellikle klinik örneklerin doğrudan analizi için uygulanabilir değildir.

İmmünolojik Yöntemler

Ticari MultiPath™ platformu (First Light Diagnostics Inc., ABD), antikor kaplı floresan nanoparçacıklarla etiketlenmiş biyomoleküllerin tespiti için büyütülmemiş dijital görüntüleme kullanmaktadır.

ArcDia Ltd. tarafından geliştirilen mariPOC® sistemi, İki-Foton Uyarım Floreskopi teknolojisine (TPX) dayanmaktadır.

MALDI-TOF

MALDI-TOF MS, hızlı dönüş süresi, minimum tüketim maliyeti sağlayan yenilikçi, hızlı ve güvenilir bir tanı aracıdır.

Bu teknik, iyonize olmuş mikroorganizma parçacıklarının uçuş süresinin belirlenmesine dayanarak izole patojeni (mycobacteria ve mantarlar dahil) tanımlar ve direnç işaretlerini bile tespit edebilir.

Dönüş süresi 1 saatten kısa olup, geleneksel yöntemlere göre tanımlama süresini 48 saate kadar azaltmıştır.

Ancak, bu teknik, öncelikle geleneksel kültürlerin yapılması gerekliliği ile sınırlıdır.

MALDI-TOF

- Ayrıca, çok mikroplu örneklerde performansı suboptimaldır ve düşük ve orta gelirli ülkelerde nadiren erişilebilir.
- Örneğin, MALDI-TOF'u, hızlı antimikrobiyal duyarlılık testini ve yakın gerçek zamanlı antimikrobiyal yönetim sistemini entegre eden kanıta dayalı bir müdahale,
 - Tanımlama için ortalama sürede (36.6 saat vs. 11 saat, $p < 0.001$),
 - Duyarlılığı elde etme süresinde (47.1 saat vs. 24.4 saat, $p < 0.001$) ve
 - Tedavi ayarlama süresinde (75 saat vs. 29 saat, $p = 0.004$) önemli farklar bildirmiştir.
- Bu bulgular, MALDI-TOF ve AMS'nin birleştirilmesinin yatış süresini ve maliyetleri azalttığını ve en önemlisi, optimal tedaviye başlama süresini kısalttığını göstermektedir.

MALDI-TOF

- Kütle spektrometrisi, özellikle sepsis teşhisinde diğer ADT teknolojileriyle sıkı bir şekilde entegre hale gelme potansiyeline sahiptir.
- MALDI-TOF Direct-On-Target Microdroplet Growth Assay (DOT-MGA) yönteminde;
 - Örnek damlaları (kültür ve antibiyotiklerin 6 µL hacminde karışımı) doğrudan tek kullanımlık MS hedef plakalarına damlatılır, 3–4 saat inkübe edilir ve ardından MS ile analiz edilir.
- Enterobacterales'lerde ESBL ve AmpC β-laktamazları için tarama panelleri halihazırda mevcuttur

- Idelevich EA et al.(2018). Rapid direct susceptibility testing from positive blood cultures by the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometrybased direct-on-target microdroplet growth assay. J. Clin. Microbiol. 56, 00913–00918. doi: 10.1128/JCM.00913-18
- Correa-Martínez CL et al. (2019). Rapid detection of extended-spectrum β-lactamases (ESBL) and AmpC β-lactamases in enterobacterales: development of a screening panel using the MALDI-TOF MS-based direct-on-target microdroplet growth assay. Front. Microbiol. 10:13. doi: 10.3389/fmicb.2019.00013

- 1005 hasta
- Randomize kontrollü çalışma
- **MALDI-TOF** ile geleneksel mikrobiyolojik yöntemleri (Gram boyası, standart kültürler) karşılaştırılıyor
- Antimikrobiyal Yönetim Sistemi programı olmaksızın iki grup arasında optimal antimikrobiyal tedavi alan hasta oranları açısından anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiştir.

-
- Q-Linea AStar® sistemi, kan kültürlerinin tam otomatik izlenmesi ile bakteriyel izolasyonların hazırlanmasını ve izlenmesini zaman atlamalı mikroskopi kullanarak gerçekleştirir.
 - Aynı anda 12 örnek işleyip günde 50 örnek işleyebilir,
 - 6 saat içinde 48 antibiyotik için gerçek MİK değerleri sunar.
 - Tanımlama yapmamaktadır, ancak herhangi bir tanımlama sistemiyle bağlantı kurulabilir.

-
- BacterioScan 216Dx sistemi (St. Louis, MO, ABD), bir örneğin optik yoğunluğunu (OD) ve ileri lazer ışığı saçılması ile dağılmış yoğunluğu ölçerek, normal OD ölçümlerine göre 10–100 kat daha yüksek hassasiyet sağlar.
 - Bu sistem, 16 örneği aynı anda işleyebilir ve gerçek zamanlı sürekli büyüme ölçümü yapabilir.
 - Klinik idrar örneklerinde 10^4 cfu/ml'den fazla *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* vb..., varlığında bakteriyel büyümeyi 3 saat içinde saptayabilir
 - Hızlı ADT Sistemi ile ilgili çalışmalar da mevcuttur

mNGS (Metagenomic Next Generation Sequencing)

mNGS, antimikrobiyal ilaçların başlatılmasından sonra bile neden olan organizmayı tespit edebilir, bu da antimikrobiyal ajanların uygunluğunu artırmaya yardımcı olabilir*



Bu nedenle, mNGS kullanıldığında yanlış pozitif sonuçlar ve gereksiz antimikrobiyal tedavi riski ?



Önlemek için karar destek sisteminin kritik önemi vardır

Geleneksel yöntemlere kıyasla, birçok patojeni ve direnç genlerini kısa bir süre içinde kültür yapmadan doğru bir şekilde tanımlayabilir



NGS, kontamine olmuş DNA'dan etkilenebilir ve kolonizasyon ile enfeksiyonu ayırt edemez



mNGS'nin klinik kullanımını değerlendiren bir meta-analiz, mükemmel bir performansa ve yüksek tanısal etkinliğe sahip olduğunu ortaya koymuştur. Ancak, RNA virüsleri, mantarlar ve hücre içi bakteriler ile aynı derecede etkili olmayabilir

Kanıt Niteliğinde Teknolojiler

Akıllı Telefon Bazlı Okuyucular

- Akıllı telefon teknolojisini antibiyotikle kaplanmış mikrotüp plakaları kullanan bir mikrofotometrik sistemle birleştirildi.
 - Tetrazolium tuzu WST-8'
 - 10^1 ile 10^6 cfu/mL arasındaki konsantrasyonlara sahip örnekler, ön zenginleştirme işlemi olmadan doğrudan test edilebildi.
- Farklı bir sistemde, *K. pneumoniae* izolatları Gram-negatif bakterilere yönelik 17 antibiyotik için test edilerek %99.23 doğrulukla ilaç duyarlılığı yorumlaması sağlandı.

Kadlec M et al. (2014). A cell phone–based microphotometric system for rapid antimicrobial susceptibility testing. J. Lab. Autom. 19, 258–266. doi: 10.1177/2211068213491095

Feng S et al. (2016). High-throughput and automated diagnosis of antimicrobial resistance using a cost-effective cellphone-based micro-plate reader. Sci. Rep. 6:39203. doi: 10.1038/srep39203



Optik veya Mikroskopik Yöntemler

- *P. aeruginosa* için hızlı (3 saat) antimikrobiyal duyarlılık testi (AST) gerçekleştiren bir mikroakışkan kanal yöntemi tanımlanmıştır.
 - Bu sistem, hücre sayısı ve hücre morfolojisinin otomatik mikroskopik tespiti ile çalışmaktadır
- Nanowell ADT'de 0.5 µl kültürler için faz kontrast mikroskobu ve optik sinyal analizi ile morfotip analizi yapılmaktadır.
 - Bu sistem, üropatojenler için antibiyotik duyarlılık verilerini 4 saatten daha kısa sürede elde edebilir. Sistem, standart disk difüzyon testleri ile %97.9 oranında toplam kategorik uyum göstermiştir,
 - Hücre yoğunluklarının dikkatli bir şekilde standartlaştırılması gereklidir

Matsumoto Y et al.(2016). A microfluidic channel method for rapid drug susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS ONE 11:e0148797. doi: 10.1371/journal.pone.0148797

Veses-Garcia M et al. (2018). Rapid phenotypic antibiotic susceptibility testing of uropathogens using optical signal analysis on the nanowell slide. Front. Microbiol. 9:1530. doi: 10.3389/fmicb.2018.01530

Minyatür ve Çip Tabanlı Büyüme İzleme Sistemleri

- Lab-on-a-chip sistemleri, bir veya daha fazla laboratuvar işlevini tek bir entegre devrede birleştirir.
- Mikroakışkan ADT platformları genellikle önceden yüklenmiş kurutulmuş antibiyotikler içeren kanallar kullanır.
- On-chip kültürün ardından, kanallar faz kontrast mikroskobu gibi bir algılama cihazı ile izlenebilir.

Biyosensör sistemleri

- Biyosensörler, bir analiz madde konsantrasyonuna orantılı sinyaller üreterek biyolojik veya kimyasal reaksiyonları ölçen cihazlardır.
- Antibiyotiklere maruz kalma; bakteriyel membranlarda, morfolojide, metabolizmada, hareketlerde, kütle, ısı üretimi ve nükleik asit içeriğinde ölçülebilir değişiklikler meydana getirir.
- Hızlı ve hassas olmalarına rağmen, saf kültür ve oldukça yüksek sayıda bakteri hücresi gerektirir.
- İzotermal mikrok calorimetri, vankomisin direnci olan *S.aureus*'u 8 saatten kısa bir sürede tespit etti

Biyosensör sistemleri

- Çeşitli elektrokimyasal raporlayıcılar, hücre canlılığı analizleri ve ilaç duyarlılığı ölçümleri için uygulanmıştır.
- Besant ve arkadaşlarının sistemi, nanolitre kuyucuklarında hapsolmuş hücreleri izlemek için rezazurin boyasını (oksidasyon-reduksiyon göstergesi) kullanmaktadır.
 - Bu mikro fabrikasyon cihazı, ampisilin ve siprofloksasin ile maruz bırakılan *E. coli* ve *K. pneumoniae*'nin tepkisini 1 saat içinde tespit edebilmektedir ve bakterilerin 1 cfu/ μ L gibi düşük konsantrasyonlarında idrar örneklerinde bu tespiti yapabilmektedir.

TABLE 1 | Properties of technologies applicable to rapid identification of bacteria

Technology	Company or product (examples)	Time for AST (h)	Simultaneous ID and AST	Clinical polymicrob. samples	Online AST	Provides MICs	Detects new resistances	AST for non-culturable microbes	Enables virus ID	Level of commercialization	References
Standard cultivation tests											
Broth dilution test	Several	18–36	–	–	✓	✓	✓	–	–	Gold standard	
Disk diffusion test and E-test	Several	18–24	–	–	✓	✓	✓	–	–	Gold standard	
Automated readers for cards or microtiter plates											
Broth microdilution-based instruments	bioMérieux, BD, Siemens	5–16 h	–	–	✓	✓	✓	–	–	Commercial	
Disk diffusion-based instruments	Giles Scientific, Orion, BioRad, BD	5–16 h	–	–	✓	✓	✓	–	–	Commercial	
Mass spectrometry (biochemical profiling, follow-up of antibiotic degradation, detection of anti-microbial protein)											
MALDI-TOF (Bruker MBT)	Bruker, Shimadzu, Sciex, Waters	2–4 h	–	–	–	–	✓	–	–	Commercial	
MBT-ASTRA (biochem. profiling after antibiotic exposure)	Bruker Daltonik GmbH	2–4 h	–	–	–	✓	✓	–	–	Commercial	Sparber et al., 2016
Direct-On-Target Microbial Growth Assay (DOT-MGA)	All instrument providers	4 h	–	–	–	✓	✓	–	–	Experimental	Idelevich et al., 2018; Corea-Martinez et al., 2019
Fluorescence & hybridization											
FISH (fluorescent probes, microscope)	XpressFISH	2–4 h	✓	✓	–	–	✓	–	–	Commercial	Salmela et al., 2014
Multiplexed automated microscopy/FISH	Accelerate Diagnostics	6.5 h	✓	✓	✓ (fs)	✓	✓	–	–	Commercial	Hill et al., 2017
Automated fluorescence detection for expression profiling	NanoString Technologies	24 h	✓	✓	✓ (fs)	✓	✓	–	✓	Commercial, under testing	Barczak et al., 2012; Bhattacharyya et al., 2017, 2019; Kelley, 2017; Koehler et al., 2018
Non-microscopic imaging, fluorescent antibody-bound nanoparticles, magnetic beads for concentrating	First Light Diagnostics	4 h	✓	✓	✓	✓	✓	–	✓	Commercial, under testing	https://www.firstlightdx.com/publications/

(Continued)

Kan kültürü pozitif sinyal verdi

- MALDI-TOF MS ve RAST
- Bazı bakteriler için
- 8 saatte ADT sonuç

Kan kültürü pozitif sinyal verdi

Test	Patojenler	Direnç paternleri	Sonuç alma süresi
PNA-FISH	Gram pozitif <i>S. aureus</i> ve KNS	Yok	1,5- 3 s
QuickFISH	<i>E. faecalis</i> ve diğer enterokok türleri Gram negatif <i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i>	Yok	<30d
Gene Xpert MRSA	<i>S. aureus</i>	<i>mecA</i>	<1 s
Verigene Gram-pozitif	<i>S. aureus</i> ve KNS <i>Streptococcus</i> spp. <i>E. faecalis</i> ve <i>E. faecium</i> <i>Listeria</i> spp .	<i>mecA</i> , <i>vanA</i> , <i>vanB</i>	<1 s
Verigene Gram-negatif	<i>E. coli</i> <i>Shigella</i> spp . <i>K. pneumoniae</i> and <i>K. oxytoca</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Acinetobacter</i> spp . <i>Proteus</i> spp . <i>Citrobacter</i> spp . <i>Enterobacter</i> spp .	KPC, NDM, CTX-M, VIM, IMP, OXA	2 s

Kan kültürü pozitif sinyal verdi

Test	Patojenler	Direnç paternleri	Sonuç alma süresi
MALDI-TOF		Çoğul	10-30 d
FilmArray (BCID)	Gram pozitif <i>S. aureus</i> ve KNS <i>Streptococcus</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp. <i>L. monocytogenes</i> Gram negatif <i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> ve <i>K. oxytoca</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. marcescens</i> <i>H. influenzae</i> <i>N. meningitidis</i> <i>Enterobacter cloacae</i> complex <i>A. baumannii</i> <i>Proteus</i> spp .	IMP, KPC, NDM, VIM, OXA-48-like, <i>mcr-1</i> , CTX-M,	1 h

İlginiz için teşekkür ederim