

MİKROBİYOLOJİDE
MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİ:
NEREDEN NEREYE?

Doç. Dr. Alpaslan Alp
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Sunum Akışı:

- 1. Son 20 yıllık sürece, örneklerle bakış**
- 2. Altın standart yöntem haline gelen moleküler testler:
Virus örnekleri**
- 3. Meta analiz çalışmalarından örnekler:**
 - Solunum yolu enfeksiyonları viral etkenleri**
 - Sepsis tanısı**
 - Tüberküloz tanısı**
- 4. Zor örneklerde güncel durum:**
 - Yayma-negatif tüberküloz**
 - Tüberküloz menenjitisi**
- 5. İlaç direnci sorunu ve yeni bakış açıları**
- 6. Bakterilerde adaptif immünite**
- 7. CRISPR-Cas sistemi; yeni antimikrobiyal kavramları**
- 8. Moleküler tanı yöntemlerinde nereden nereye geldik?
Kendimize bakış ve değerlendirme...**

Moleküler Yöntemlerin Kullanım Alanları

- **Tanı**
- **Tür düzeyinde tanımlama**
- **İlaç direnci saptanması**
- **Genotiplendirme**

Artan Laboratuvar Etkinliđi: Kantitatif Moleküler Yöntemler

- **Tanı**
- **Prognoz**
- **Tedavi izlemi**

Artan Laboratuvar Etkinliđi: Kantitatif Moleküler Yöntemler

Son yirmi yıllık süreç:

- **‘Competitive PCR’ (Yarışmalı PZT)**
- **‘Real-Time PCR’ (İzlenebilir PZT)**
- **Dijital PZT**

Kantitasyon Çalışmaları: 1993

- **Hibridizasyon-PZT kıyaslamaları.**
- **Kantitasyon gerekliliği: HBV, HCV, HIV.**
- **Yarışmalı PZT**

PZT Uygulamaları: 2002

- **Özellikle viral etkenlerin tanısında giderek artan uygulamalar**
- **Ticari testler sınırlı sayıda etken için var**
- **Laboratuvar-yapımı (in-house) testlerde standardizasyon sorunu**

'Real-Time PCR' Uygulamaları: 2002

- **Viral etkenlerin tanısında altın standart**
- **Güvenilir kantitasyon imkanı**
- **Geleneksel PZT'den daha pahalı**
- **Yarının laboratuvarları için hedef:
Multipleks uygulamalar !**

Aşılması Gereken Sorunlar ve Çözüm Önerileri: 2004

- **Doğru kantitasyon**
- **Evrensel iç ve dış kalite kontrolleri**
- **Daha verimli nükleik asit izolasyonu**
- **Daha hızlı sonuç: Otomasyon**
- **Laboratuvar yapımı testler arası uyumsuzluklar**

Hangi tür PZT Yöntemi?

- **Laboratuvar yapımı (in house) yöntemler**
 - **Optimizasyona açık**
 - **Ucuz**
- **Hazır ticari kitleler**
 - **Standardizasyon imkanı**
 - **Belirli örnek türleri için optimize edilmiş**

Hangi tür PCR Yöntemi?

- **Laboratuvar yapımı yöntemlerle hazır ticari kitlerin duyarlılık ve özgüllükleri arasında önemli bir fark olmadığı gösterilmiştir:**

Huang TS et al: Comparison of the Amplicor assay and Digene system with in house PCR... J Clin Microbiol 1996, 34:3092-3096.

Yuen KY et al: Comparison of two automated DNA amplification systems with a manual one-tube nested PCR... J Clin Microbiol 1997, 35:1385-1389.

Cohen RA et al: Diagnosis of pulmonary tuberculosis using PCR assays on sputum... Am J Respir Crit Care Med 1998, 157:156-161.

HIV Viral Yük Tayininin nemi

- **Tedaviye bařlandıktan sonraki süreç:**
 - **1-4 hafta: HIV RNA seviyesinde hızlı düşüş.**
 - **Daha uzun süreli (birkaç ay), fakat daha yavař bir düřüř.**
 - **Maksimum antiviral etki 4-6 ayda saęlanır.**

Tedavi etkinliğinin anlaşılabilmesi amacıyla kullanılan en önemli parametre:

Kantitatif HIV RNA lçm = Viral Yük Tayini

Tedavi Etkinliđinin HIV Viral Y¼k Ölçümü ile İzlenmesi

- **HIV RNA;**
 - **Tedaviye başlarken,**
 - **3-4 aylık aralıklarla, bakılmalı.**
 - **Anlamalı değişim: Viral yükte en az %50 azalma.**
- **Tedavi başarısı:**
 - **24-48 haftada viral yükün 50 kopya/ml'nin altına düşürülmesi.**

Scand J Infect Dis 2003; 35:155.

Tedavi Etkinliđinin HIV Viral Y¼k Ölçümü ile İzlenmesi

- **Lancet 2003; 362:679**
 - **Altı ay süreyle HAART uygulanan 9323 hastada,**
 - **Klinik düzelmenin en önemli göstergeleri,
CD4 sayısı ve viral yük.**

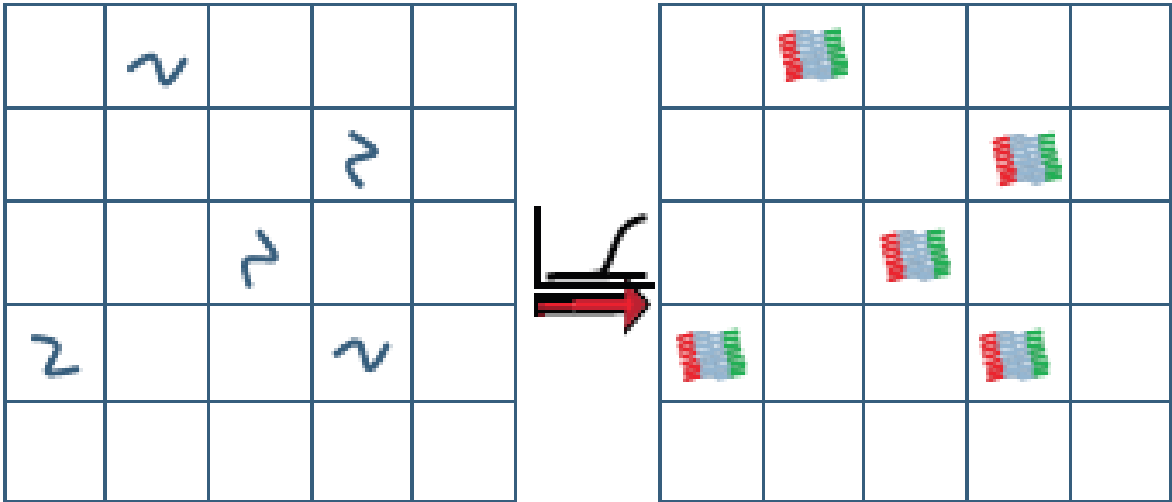
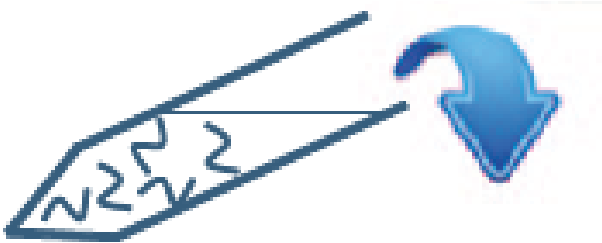
HIV ile Enfekte Kişilerin Değerlendirilmesi

- **Avrupa AIDS Klinik Birliği (EACS) Kılavuzu:**
 - **HIV viral yüküne ne zaman bakılmalı?**
 - ✓ İlk vizitte,
 - ✓ Tedavi almayan asemptomatik hastalarda 6 ayda bir,
 - ✓ Tedaviye başlarken,
 - ✓ Tedavi sürerken 3 ayda bir.

Dijital PZT

- **‘Önce böl; sonra elde et’**
- **Örnek yüzlerce/milyonlarca kompartmana dağıtılır.**
- **Amaç: Her kompartmanda tek bir hedef kopya bulunması (veya sıfır).**
- **Her kompartmanda PZT yapılır.**
- **Pozitif ve negatif sonuçlu kompartmanlar sayılarak orijinal örnekteki kopya sayısı bulunur.**

Dijital PZT



Baker M: Digital PCR hits its stride. Nature Methods 2012; 9:541-544.

Dijital PZT

- **Uygulaması zor;**
- **İlk uygulama; 1992:**
 - **384 kuyucuklu plak**
 - **5 mikrolitre/kuyucuk**
- **Günümüzde:**
 - **Mikroçipler üzerinde nanolitre veya pikolitre ölçekli kuyucuklar**
 - **Toplam örnek hacmi: 5-50 mikrolitre**
 - **Özgüllük problemi**
 - **Cihaz ve çipler çok pahalı**

Dijital PZT



Baker M: Digital PCR hits its stride. Nature Methods 2012; 9:541-544.

Moleküler Mikrobiyolojik Tanı için;

İdeal Test Var mı?

- Duyarlılığı yüksek olsun,
- Özgüllüğü yüksek olsun,
- Uygulaması çok zor olmasın,
- Hızlı sonuç alınabilsin,
- Ucuz olsun...



Meta Analiz: Solunum Yolu PZT

Incidence of viral infection detected by PCR and real-time PCR in childhood community-acquired pneumonia: A meta-analysis

MIN WANG,¹ FENG CAI,¹ XIAODONG WU,² TING WU,¹ XIN SU^{1,†} AND YI SHI^{1,†}

¹*Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Jinling Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing, and*
²*Department of Respiration, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, China*

© 2015 Asian Pacific Society of Respirology

Respirology (2015) 20, 405–412
doi: 10.1111/resp.12472

Meta Analiz: Solunum Yolu PZT

Yayın tarama kriterleri:

- Kesitsel, olgu-kontrol veya kohort çalışma olması;
- Olguların 19 yaş altında olması;
- Viral insidans verisi bulunması;
- PZT veya izlenebilir PZT kullanılmış olması.

Meta Analiz: Solunum Yolu PZT

- İlk tarama sonucu bulunan çalışma sayısı: **337**
- Kriterlere uygun olup incelemeye alınan çalışma sayısı: **21**
- Toplam hasta sayısı: **10.196**
- Zaman aralığı: **2000-2014**

Meta Analiz: Solunum Yolu PZT

	Incidence (%)
RSV	17.5
Rhinovirus	18.9
Influenza	6.3
hMPV	6.1
Bocavirus	12.7
Parainfluenza	7.8
Adenovirus	6.0
Coronavirus	3.9

Meta Analiz: Solunum Yolu PZT

YORUM:

- **Kültür, antijen saptama ve seroloji gibi konvansiyonel yöntemlerle bütün bu virüslerin saptanması mümkün değildir.**
- **Daha fazla sayıda virüs saptayabilen testler kullanıldıkça viral enfeksiyon insidansı artmaktadır.**
- **İzlenebilir PZT kullanılan çalışmalarda viral enfeksiyon insidansının daha yüksek olduğu gözlenmiştir.**

Rutin Bakteriyolojik Tanıda Moleküler Testler

- **Vankomisin dirençli enterokoklar**
- **Metisilin dirençli *S. aureus***
- ***H. pylori***
- ***M. tuberculosis***
- **...**
- **Multipleks PZT uygulamaları**
 - **Sepsis etkenleri**
 - **Gastrointestinal sistem patojenleri**

Meta Analiz: Sepsis PZT

16S Ribosomal Ribonucleic Acid Gene Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Bloodstream Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis

Guoming Su¹✉, Zhuqing Fu²✉, Liren Hu³, Yueying Wang¹, Zuguo Zhao², Weiqing Yang¹*

1 Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics, Guangdong Medical College, Dongguan, China, 2 Department of Microbiology and Immunology, Guangdong Medical College, Zhanjiang, China, 3 Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Guangdong Medical College, Zhanjiang, China

PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0127195 May 21, 2015

Meta Analiz: Sepsis PZT

Yayın tarama kriterleri:

- **16S rRNA PZT;**
- **Neonatal sepsis veya bakteriyemi olguları;**
- **Altın standart: Kan kültürü sonrasında konvansiyonel bakteriyolojik yöntemler.**

Meta Analiz: Sepsis PZT

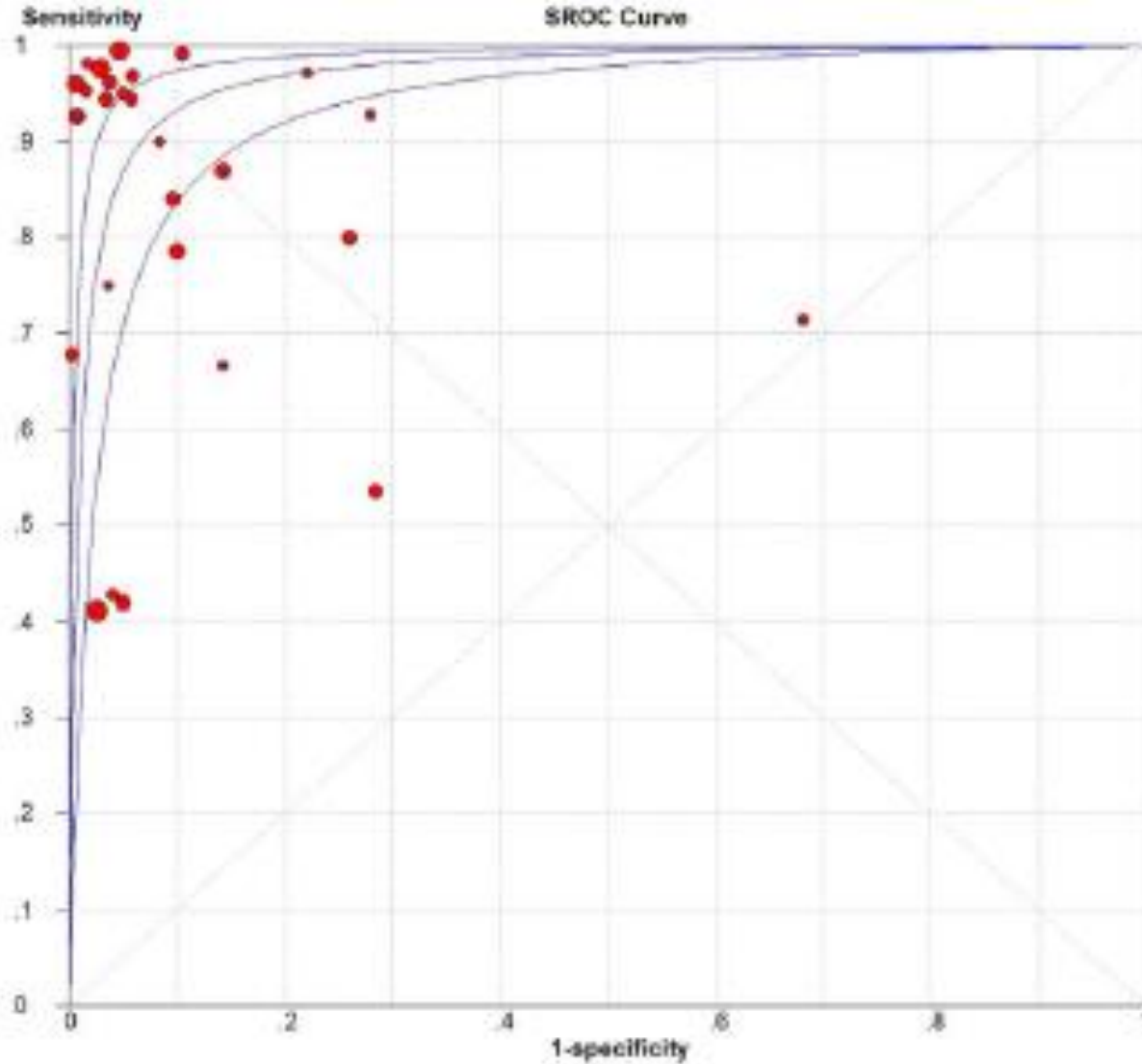
- İlk tarama sonucu bulunan çalışma sayısı: **1286**
- Kriterlere uygun olup incelemeye alınan çalışma sayısı: **28**
- Toplam hasta sayısı: **7378**
- Zaman aralığı: **1997-2014**

Meta Analiz: Sepsis PZT

SONUÇLAR:

- **Duyarlılık: %87**
- **Özgüllük: %94**
- **Klinik olarak anlamlı bir tanısal doğruluk derecesi var.**

Meta Analiz: Sepsis PZT



Meta Analiz: Sepsis PZT

YORUM:

- **16S rRNA PZT testi sepsis tanısının doğrulanmasında hızlı, pratik ve geçerli bir testtir.**
- **Bu test, altın standart yöntemi destekleyen bir yöntem olarak kullanılabilir.**

Meta Analiz: Tüberküloz PZT-1

Commercial Nucleic-Acid Amplification Tests for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Respiratory Specimens: Meta-Analysis and Meta-Regression

Daphne I. Ling¹, Laura L. Flores², Lee W. Riley^{1,3}, Madhukar Pai^{4*}

1 Division of Epidemiology, School of Public Health, University of California, Berkeley, California, United States of America, 2 Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, San Francisco General Hospital, San Francisco, California, United States of America, 3 Division of Infectious Diseases, School of Public Health, University of California, Berkeley, California, United States of America, 4 Department of Epidemiology, Biostatistics and Occupational Health, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

Citation: Ling DI, Flores LL, Riley LW, Pai M (2008) Commercial Nucleic-Acid Amplification Tests for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Respiratory Specimens: Meta-Analysis and Meta-Regression. PLoS ONE 3(2): e1536. doi:10.1371/journal.pone.0001536

Background. Hundreds of studies have evaluated the diagnostic accuracy of nucleic-acid amplification tests (NAATs) for tuberculosis (TB). Commercial tests have been shown to give more consistent results than in-house assays. Previous meta-analyses have found high specificity but low and highly variable estimates of sensitivity. However, reasons for variability in study results have not been adequately explored. We performed a meta-analysis on the accuracy of commercial NAATs to diagnose pulmonary TB and meta-regression to identify factors that are associated with higher accuracy. **Methodology/Principal Findings.** We identified 2948 citations from searching the literature. We found 402 articles that met our eligibility criteria. In the final analysis, 125 separate studies from 105 articles that reported NAAT results from respiratory specimens were included. The pooled sensitivity was 0.85 (range 0.36–1.00) and the pooled specificity was 0.97 (range 0.54–1.00). However, both measures were significantly heterogeneous ($p < .001$). We performed subgroup and meta-regression analyses to identify sources of heterogeneity. Even after stratifying by type of commercial test, we could not account for the variability. In the meta-regression, the threshold effect was significant ($p = .01$) and the use of other respiratory specimens besides sputum was associated with higher accuracy. **Conclusions/Significance.** The sensitivity and specificity estimates for commercial NAATs in respiratory specimens were highly variable, with sensitivity lower and more inconsistent than specificity. Thus, summary measures of diagnostic accuracy are not clinically meaningful. The use of different cut-off values and the use of specimens other than sputum could explain some of the observed heterogeneity. Based on these observations, commercial NAATs alone cannot be recommended to replace conventional tests for diagnosing pulmonary TB. Improvements in diagnostic accuracy, particularly sensitivity, need to be made in order for this expensive technology to be worthwhile and beneficial in low-resource countries.

Meta Analiz: Tüberküloz PZT-1

Yayın tarama kriterleri:

- Pulmoner tüberküloz tanısı için NAAT kullanılmış olması;
- Altın standart kültür yöntemiyle karşılaştırma yapılmış olması;
- Duyarlılık ve özgüllük değerlerinin verilmiş olması;
- En az 50 örnekle çalışılmış olması.

Ling DI, Flores LL, Riley DW, Pai M. Commercial nucleic acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: Meta-analysis and meta-regression. PLoS One 2008; 3(2): e1536

Meta Analiz: Tüberküloz PZT-1

- İlk tarama sonucu bulunan çalışma sayısı: **2948**
- Kriterlere uygun olup incelemeye alınan çalışma sayısı: **125**
- Ortalama örnek sayısı: **715 (57-7539)**

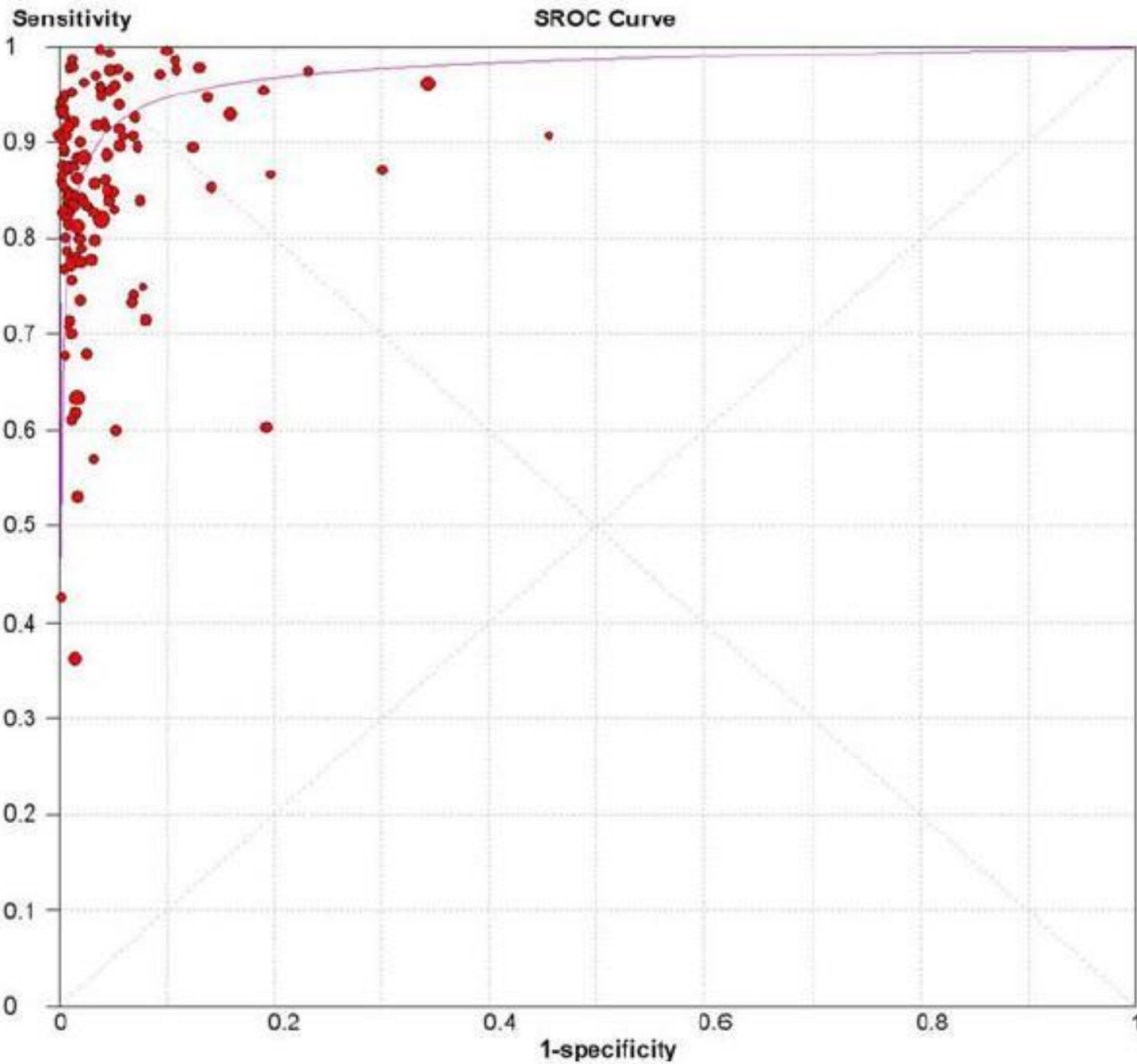
Ling DI, Flores LL, Riley DW, Pai M. Commercial nucleic acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: Meta-analysis and meta-regression. PLoS One 2008; 3(2): e1536

Meta Analiz: Tüberküloz PZT-1

SONUÇLAR:

- **Duyarlılık ve özgüllük sonuçları çok değişken.**
- **Duyarlılık: %85**
- **Özgüllük: %96**
- **Klinik olarak anlamlı bir tanısal doğruluk derecesi yok.**

Ling DI, Flores LL, Riley DW, Pai M. Commercial nucleic acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: Meta-analysis and meta-regression. PLoS One 2008; 3(2): e1536



Meta Analiz: Tüberküloz PZT-1

YORUM:

- **Bu duyarlılık seviyelerindeki bir test grubuna rutin uygulamada tek başına güvenilemez.**
- **Bu test grubu, ancak altın standart yöntemi destekleyen bir yöntem olarak kullanılabilir.**

Ling DI, Flores LL, Riley DW, Pai M. Commercial nucleic acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: Meta-analysis and meta-regression. PLoS One 2008; 3(2): e1536

Xpert MTB/RIF Testi

- **Ortak bir çalışmanın ürünü:**
 - **FIND (Foundation for Innovative New Diagnostics)**
 - **Cepheid (A.B.D.)**
 - **University of Medicine and Dentistry of New Jersey**
- **İki saat içerisinde *M. tuberculosis* varlığının ve rifampin direncinin saptanması**
- **Üç primer ve beş prob kullanılarak uygulanan “hemi-nested real-time PCR”**

1

Sputum liquefaction and inactivation with 2:1 sample reagent



2

Transfer of 2 ml material into test cartridge



3

Cartridge inserted into MTB-RIF test platform (end of hands-on work)

4
Sample automatically filtered and washed

5
Ultrasonic lysis of filter-captured organisms to release DNA

6
DNA molecules mixed with dry PCR reagents

7
Seminested real-time amplification and detection in integrated reaction tube

8

Printable test result

Assay Name: MTB-RIF

Test Result: **MTB DETECTED LOW;**
RIF Resistance NOT DETECTED

Graph showing fluorescence intensity over time (Cycles).

Time to result, 1 hour 45 minutes

Xpert MTB/RIF Testi

2010 yılında yayınlanan ilk çalışmalarda tatmin edici sonuçlar alınmış:

- **Yayma-pozitif, kültür-pozitif örneklerde duyarlılık : %99**
- **Yayma-negatif, kültür pozitif örneklerde duyarlılık: %90**



ELSEVIER

BIAA
British Infection Association

www.elsevierhealth.com/journals/jinf

Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: A meta-analysis

Kai Chang^a, Weiping Lu^a, Junji Wang, Kejun Zhang, Shuangrong Jia, Fake Li, Shaoli Deng, Ming Chen*

Department of Clinical Laboratory Medicine, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Accepted 21 February 2012

Available online ■ ■ ■

Meta Analiz: Tüberküloz PZT-2

- Toplam 90 çalışma içinden 18'i seçilmiş.
- Toplam 10.224 örnek
 - 2983 bakteriyolojik TB tanısı
 - 6183 yayma ve kültür negatif
- TB tanısı için ortalama duyarlılık: %90.4
- TB tanısı için ortalama özgüllük: %98.4

Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: A meta-analysis

Kai Chang ^a, Weiping Lu ^a, Junji Wang, Kejun Zhang, Shuangrong Jia, Fake Li, Shaoli Deng, Ming Chen*

Department of Clinical Laboratory Medicine, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Accepted 21 February 2012

Meta Analiz: Tüberküloz PZT-2

- Rifampisin direnci için ortalama duyarlılık: %94.1
- Rifampisin direnci için ortalama özgüllük: %97.0
- Akciğer-dışı örneklerde ortalama duyarlılık: %80.4
- Akciğer-dışı örneklerde ortalama özgüllük: %86.1

Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: A meta-analysis

Kai Chang ^a, Weiping Lu ^a, Junji Wang, Kejun Zhang, Shuangrong Jia, Fake Li, Shaoli Deng, Ming Chen*

Department of Clinical Laboratory Medicine, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Accepted 21 February 2012

Meta Analiz: Tüberküloz PZT-2

YORUM:

- Xpert MTB/RIF testi klinik örneklerden tüberküloz tanısı ve rifampisin direncinin saptanmasında hızlı ve güvenilir bir yöntemdir.
- Ancak rifampisin direncine neden olan mutasyonların %5'inin, bu test ile bakılan bölgenin dışında görülebileceği unutulmamalıdır.

Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: A meta-analysis

Kai Chang ^a, Weiping Lu ^a, Junji Wang, Kejun Zhang, Shuangrong Jia, Fake Li, Shaoli Deng, Ming Chen*

Department of Clinical Laboratory Medicine, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Accepted 21 February 2012

DSÖ'nün Xpert MTB/RIF Testi Değerlendirmesi-2011

- **Xpert MTB/RIF testi:**
 - **Analitik duyarlılık: 5 genom kopyası/saf DNA veya 131 cfu/ml balgam (kültürde 10-100 cfu/ml balgam)**

DSÖ'nün Xpert MTB/RIF Testi Değerlendirmesi-2011

Tavsiyeler:

- Xpert MTB/RIF testi ÇİD-TB veya HIV+TB şüphesi bulunan olguların ilk tanısal testi olarak kullanılmalıdır.
- Xpert MTB/RIF testi, ÇİD-TB veya HIV+TB olgularının çok olmadığı bölgelerde, özellikle yayma-negatif olguların tanısında mikroskobiye ek olarak kullanılabilir.

DSÖ'nün Xpert MTB/RIF Testi Değerlendirmesi-2011

Son Not:

- Ancak, Xpert MTB/RIF testinin kullanımı, geleneksel mikroskopi, kültür ve ilaç duyarlılık testlerine olan ihtiyacı ortadan kaldırmaz.

Meta Analiz: Yayma-Negatif Tüberküloz

Diagnostic value of nucleic acid amplification tests on bronchoalveolar lavage fluid for smear-negative pulmonary tuberculosis: a meta-analysis

Panwen Tian^{*1}, Yongchun Shen^{*1}, Ye Wang^{*}, Chun Wan^{*}, Mei Feng^{*}, Jing Zhu^{*}, Ting Yang^{*}, Lei Chen^{*} and Fuqiang Wen^{*2}

^{*}Department of Respiratory and Critical Care Medicine, West China Hospital of Sichuan University and Division of Pulmonary Diseases, State Key Laboratory of Biotherapy of China, Chengdu 610041, China

Bioscience Reports (2015) **35**, e00232, doi:10.1042/BSR20140186

Meta Analiz: Yayma-Negatif Tüberküloz

Yayın tarama kriterleri:

- **Yayma-negatif bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısı tüberküloz örnekleri ile çalışılmış olması;**
- **Duyarlılık ve özgüllük değerlerinin verilmiş olması;**
- **Her grup için en az 10 örnek bulunması.**

Meta Analiz: Yayma-Negatif Tüberküloz

- İlk tarama sonucu bulunan çalışma sayısı: **46**
- Kriterlere uygun olup incelemeye alınan çalışma sayısı: **9**
- Toplam örnek sayısı: **1214**

Meta Analiz: Yayma-Negatif Tüberküloz

SONUÇLAR:

- **Duyarlılık: %54**
- **Özgüllük: %97**
- **Klinik olarak anlamlı bir tanısal doğruluk derecesi var.**

Meta Analiz: Yayma-Negatif Tüberküloz

YORUM:

- **BAL sıvısı örneklerinde düşük duyarlılık nedeniyle yayma-negatif örneklerde NAAT tarama amaçlı olarak kullanılmamalıdır.**
- **Bu test, altın standart yöntemi destekleyen bir yöntem olarak kullanılabilir.**

Meta Analiz: Tüberküloz Menenjitisi

Commercial nucleic acid amplification tests in tuberculous meningitis—a meta-analysis ☆,☆☆

Regan S. Solomons^{a,*}, Sabine L. van Elsland^{a,b}, Douwe H. Visser^b, Kim G.P. Hoek^c, Ben J. Marais^d, Johan F. Schoeman^a, Anne M. van Furth^b

^a Department of Pediatrics and Child Health, Faculty of Health Sciences, Stellenbosch University, PO Box 19063, Tygerberg 7505, Cape, South Africa

^b Department of Pediatric Infectious Diseases and Immunology, Vrije Universiteit Medical Center, PO Box 7057, 1007 MB, Amsterdam, The Netherlands

^c Division of Medical Microbiology, Faculty of Health Sciences, National Health Laboratory Service and University of Stellenbosch, Tygerberg 7505, Western Cape, South Africa

^d Sydney Emerging Infectious Diseases and Biosecurity Institute (SEIB) and the Children's Hospital, Westmead, C29 - Children's Hospital Westmead, The University of Sydney, Westmead, NSW 2006, Australia

R.S. Solomons et al. / Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 78 (2014) 398–403

Meta Analiz: Tüberküloz Menenjit

Yayın tarama kriterleri:

- BOS örnekleri ile çalışılmış olması;
- Duyarlılık ve özgüllük değerlerinin verilmiş olması;
- Her grup için en az 10 örnek bulunması.

Meta Analiz: Tüberküloz Menenjit

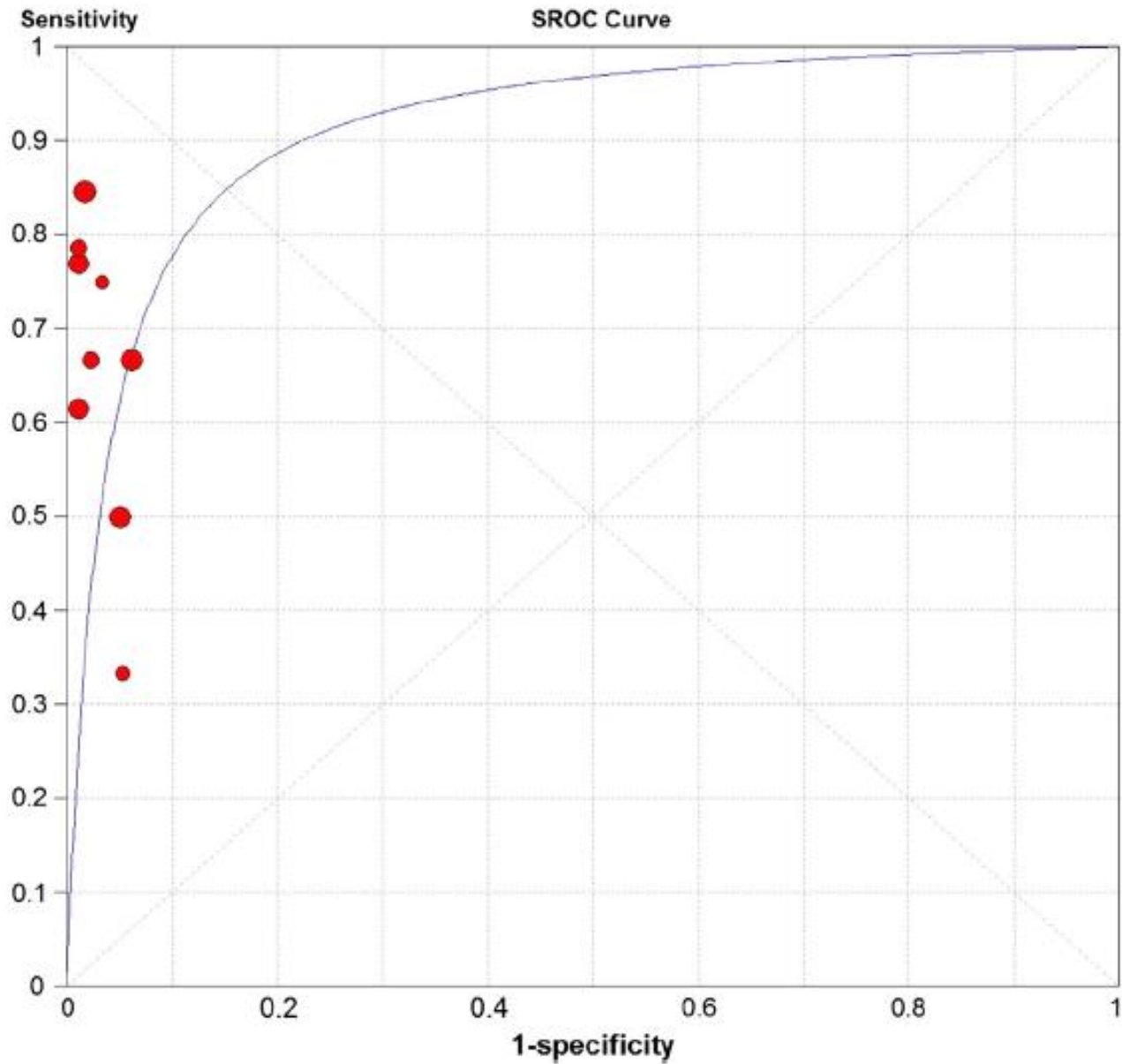
- İlk tarama sonucu bulunan çalışma sayısı: **1125**
- Kriterlere uygun olup incelemeye alınan çalışma sayısı: **30**
- Zaman aralığı: **2003-2013**

Meta Analiz: Tüberküloz Menenjitisi

SONUÇLAR:

- **Ticari testler (9):**
 - Duyarlılık: %64
 - Özgüllük: %98
- **Laboratuvar yapımı testler (40):**
 - Duyarlılık: %73
 - Özgüllük: %92

Meta Analiz: Tüberküloz Menenjit



Meta Analiz: Tüberküloz Menenjitisi

Author	Study design	Reference standard	NAAT used	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Jönsson and Ridell (2003)	Retrospective case-control	Clinical criteria	Cobas Amplicor	0.96 (0.21–0.86)	0.97 (0.93–0.99)
Johansen et al. (2004)	Prospective cross-sectional	CSF culture	standard BD ProbeTec ET	0.62 (0.32–0.86)	0.99 (0.94–1.00)
Johansen et al. (2004)	Prospective cross-sectional	CSF culture	modified BD ProbeTec ET	0.77 (0.46–0.95)	0.99 (0.94–1.00)
Thwaites et al. (2004)	Retrospective case-control	CSF culture	enhanced MTD	0.50 (0.34–0.66)	0.95 (0.88–0.99)
Causse et al. (2011)	Prospective cross-sectional	CSF culture	Xpert MTB/Rif	0.83 (0.36–1.00)	1.00 (0.92–1.00)
Causse et al. (2011)	Prospective cross-sectional	CSF culture	Cobas Taqman MTB	0.67 (0.22–0.96)	0.98 (0.88–1.00)
Malbrunoy et al. (2011)	Prospective cross-sectional	CSF culture	Xpert MTB/Rif	1.00 (0.03–1.00)	1.00 (0.77–1.00)
Vadwai et al. (2011)	Prospective cross-sectional	CSF culture	Xpert MTB/Rif	0.33 (0.01–0.91)	0.95 (0.74–1.00)
Tortoli et al. (2012)	Retrospective case-control	CSF culture	Xpert MTB/Rif	0.85 (0.55–0.98)	0.98 (0.94–1.00)
Patel et al. (2013)	Prospective cross-sectional	CSF culture	Xpert MTB/Rif	0.67 (0.53–0.79)	0.94 (0.85–0.98)

◆ XpertMTB/RIF Testi (5):

- Duyarlılık: %70
- Özgüllük: %97

Meta Analiz: Tüberküloz Menenjit

YORUM:

- **Bu testler, altın standart yöntemi destekleyen yöntemler olarak kullanılabilir.**

Tüberküloz Menenjitisi Tanısında Moleküler Yöntemler

Meta-Analiz; 2003'e kadar:

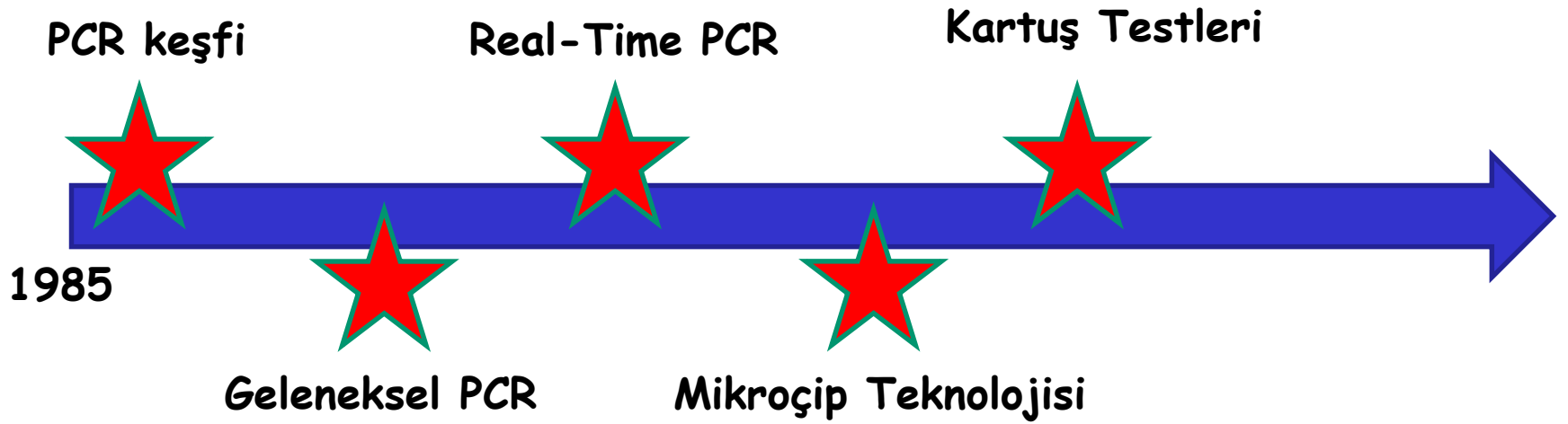
- **Duyarlılık: %56; özgüllük: %98**

Meta-Analiz; 2003-2014:

- **Duyarlılık: %64; özgüllük: %98**

Meta-Analiz; 2011-2014:

- **Xpert MTB/RIF Testi;**
Duyarlılık: %70; özgüllük:%97



PCR keşfi

Real-Time PCR

Kartuş
Testleri



Geleneksel PCR

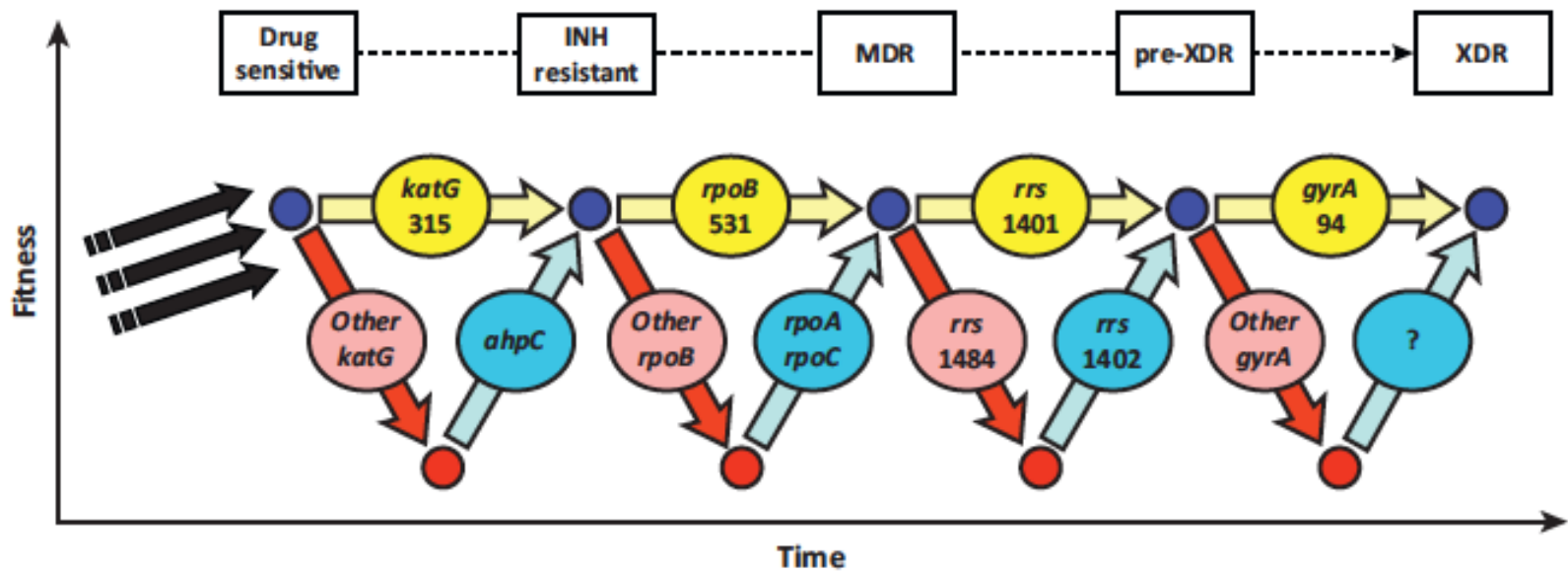
Mikroçip
Teknolojisi





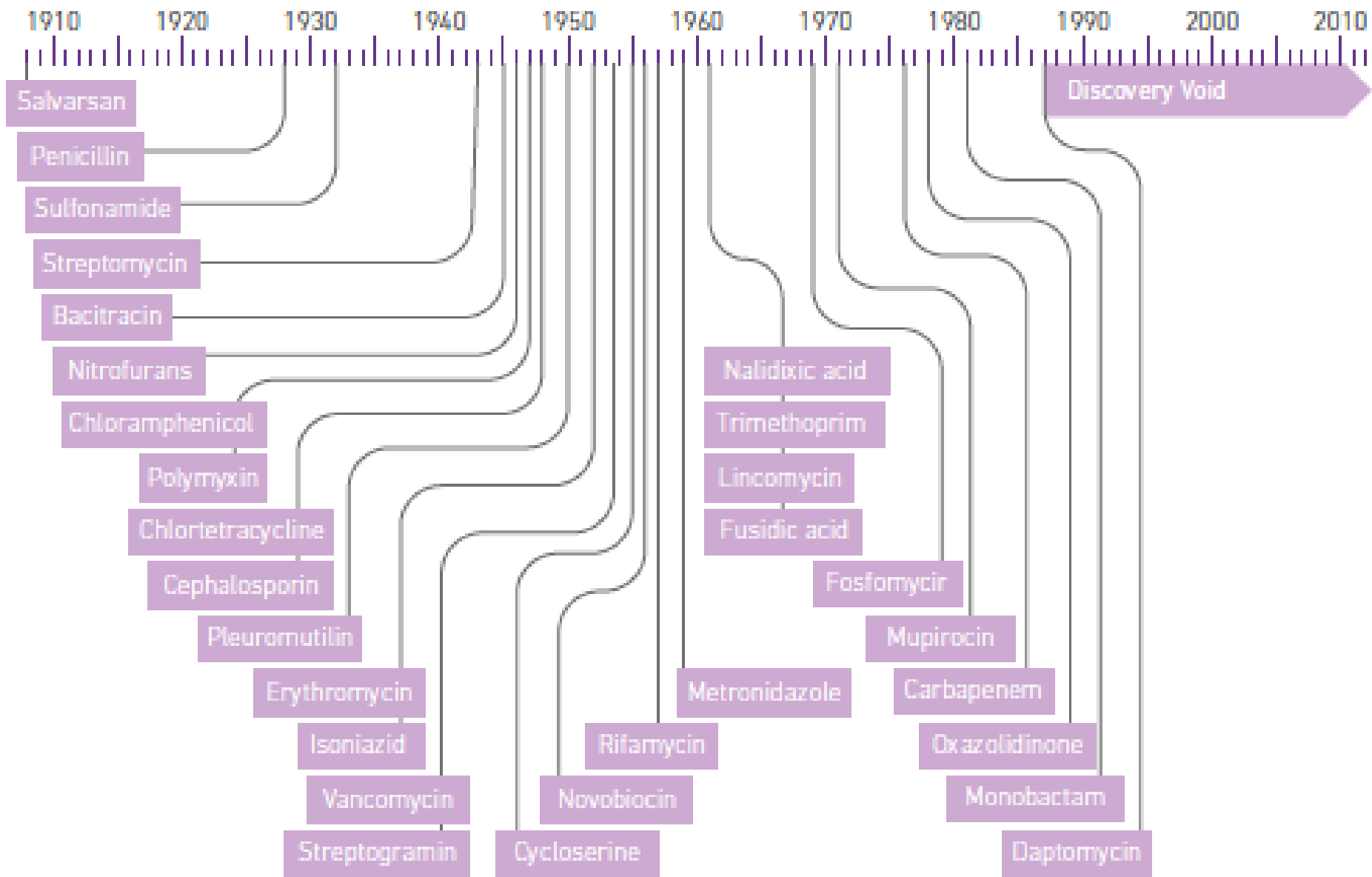
Dirençli bakteri evriminin bir sonu olabilir mi?

- **Cevap şimdilik HAYIR!**
- **Hatta, evrim devam ederse:
Antibiyotik Sonrası Döneme giriş riski!
(Post-antibiotic Era)**
- **30 Nisan 2014 DSÖ Raporu:
21. yüzyıl içinde Antibiyotik Sonrası Döneme
girilebilir.**
- **<http://www.nature.com/news/who-warns-against-post-antibiotic-era-1.15135>**



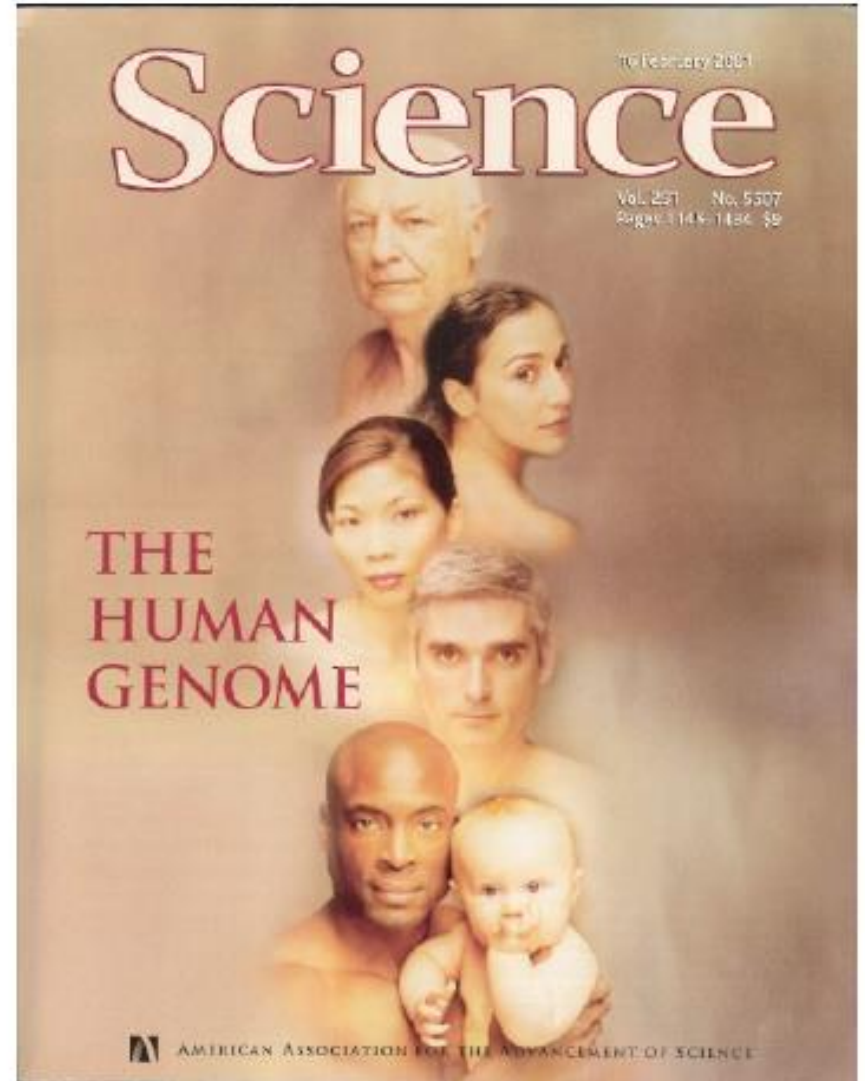
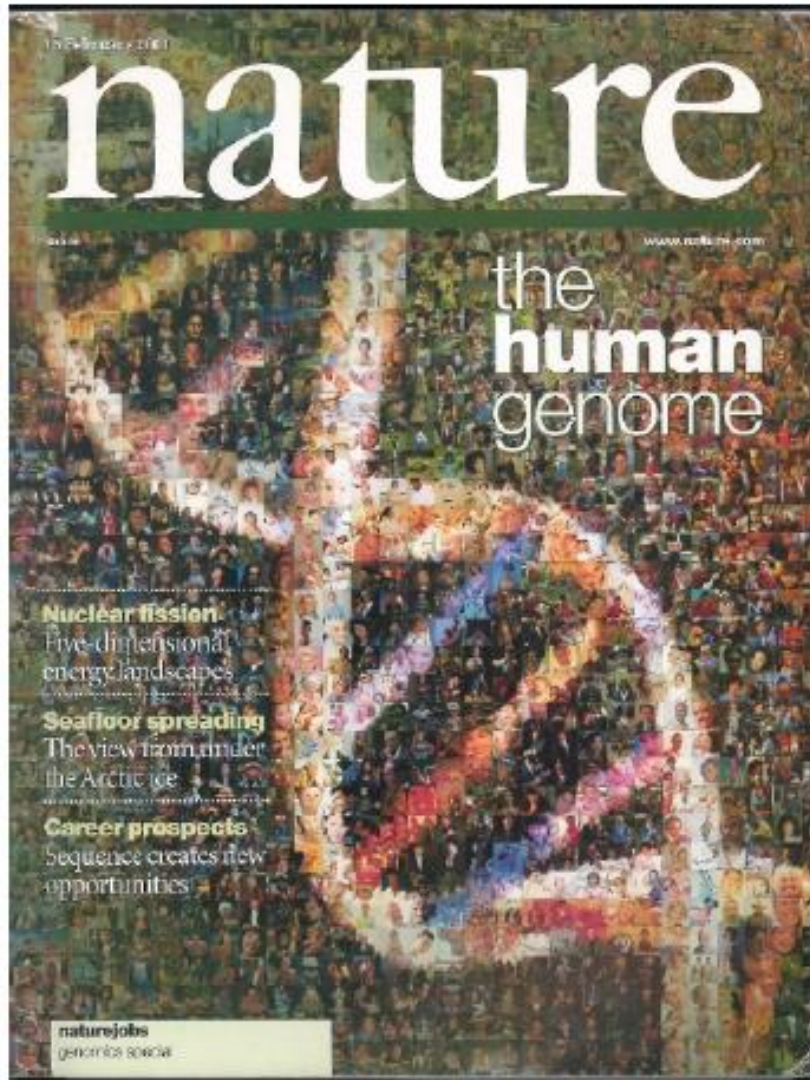
TRENDS in Genetics

Müller B, et al. The heterogeneous evolution of multidrug-resistant *M. tuberculosis*. *Trends in Genetics* 2013; 29:160-169.



WHO: Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014

2001



Human genome ~ 3,000.000 Mb

30 000 genes

Bakterilerde Adaptif İmmünite

- **Hücre içerisine invaziv elementlerin girişi,**
- **Belirli kısımların bakteri genomuna insersiyonu,**
- **Takip eden enfeksiyonları tanıma ve önleme.**

Tekrarlayan DNA Dizileri

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Dec. 1987, p. 5429-5433
0021-9193/87/125429-05\$02.00/0
Copyright © 1987, American Society for Microbiology

Vol. 169, No. 12

Nucleotide Sequence of the *iap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia coli*, and Identification of the Gene Product

YOSHIZUMI ISHINO, HIDEO SHINAGAWA, KOZO MAKINO, MITSUKO AMEMURA, AND ATSUO NAKATA*

Department of Experimental Chemotherapy, The Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

Received 1 May 1987/Accepted 22 August 1987

TGAAAATGGGAGGGAGTTCTACCGCAGAGGGCGGGGGA**ACTCCAAGT**GATATCCATCATCGCATCCAGTGC**GCC** (1,451)
 (1,452) CGGTTTATCCCCGCTGATGCGGGGAACACCAGCGTCAGGCGTGAAATCTCACCGTCGTTGC (1,512)
 (1,513) CGGTTTATCCCTGCTGGCGCGGGGGA**ACTCTCGGTTCA**GGCGTTGCAAACCTGGCTACCGGG (1,573)
 (1,574) CGGTTTATCCCCGCTAACGCGGGGA**ACTCGTAGTCCATCAT**TCCACCTATGTCTGAACTCC (1,634)
 (1,635) CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGG**AACTCG** (1,664)

consensus: CGGTTTATCCCCGCT^{GG}_{AA}CGCGGGGAACTC

An unusual structure was found in the 3'-end flanking region of *iap* (Fig. 5). Five highly homologous sequences of 29 nucleotides were arranged as direct repeats with 32 nucleotides as spacing. The first sequence was included in the putative transcriptional termination site and had less homology than the others. Well-conserved nucleotide sequences containing a dyad symmetry, named REP sequences, have been found in *E. coli* and *Salmonella typhimurium* (28) and may act to stabilize mRNA (18). A dyad symmetry with 14 nucleotide pairs was also found in the middle of these sequences (underlining, Fig. 5), but no homology was found between these sequences and the REP sequence. So far, no sequence homologous to these has been found elsewhere in procaryotes, and the biological significance of these sequences is not known.

CRISPR

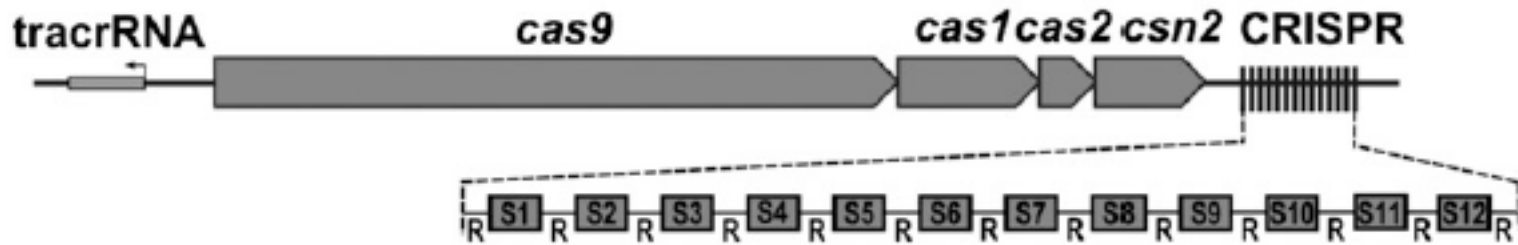
•‘**Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats**’

Düzenli Aralıklarla Dizilmiş Kısa Palindromik Tekrarlar

•**Kritik element: CRISPR’ları ayıran diziler.**

•**Bu ayırıcı dizilerin bazı yabancı plazmid ve bakteriyofaj dizilerine homolog olduğu gösterilmiş.**

Bakterilerde Adaptif İmmünite: CRISPR-Cas Sistemleri; -Aşılama Etkisi-



- **CRISPR dizileri: 28-37 nükleotid**
- **Ayrırcı diziler: 32-38 nükleotid**
- **CRISPR lokuslarındaki tekrar sayısı genellikle 50'den az.**

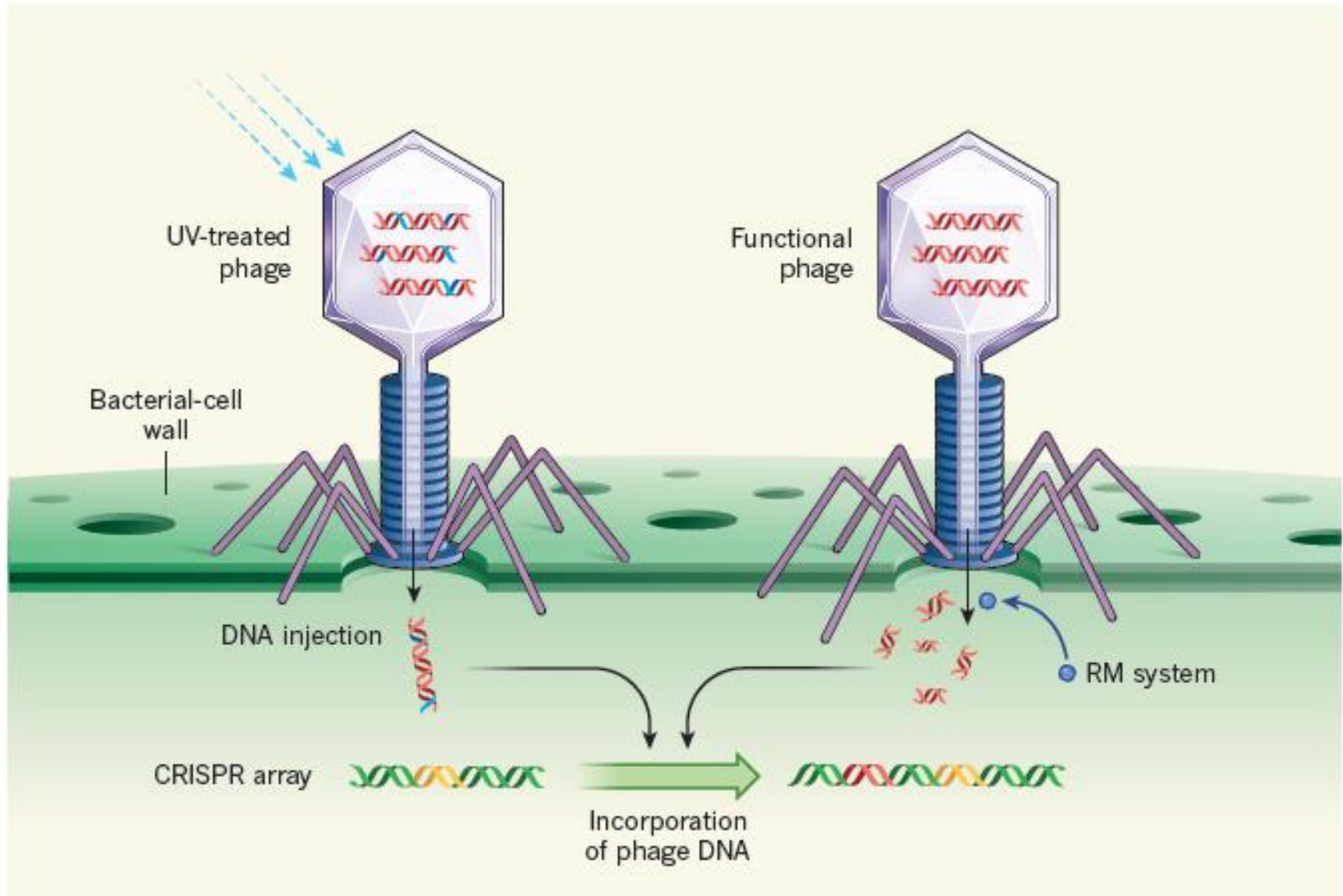
Adaptif İmmünite

- Evrım

- Seleksiyon

- ‘Fitness’ : Yaşamsal faaliyetlerin üst seviyede olması

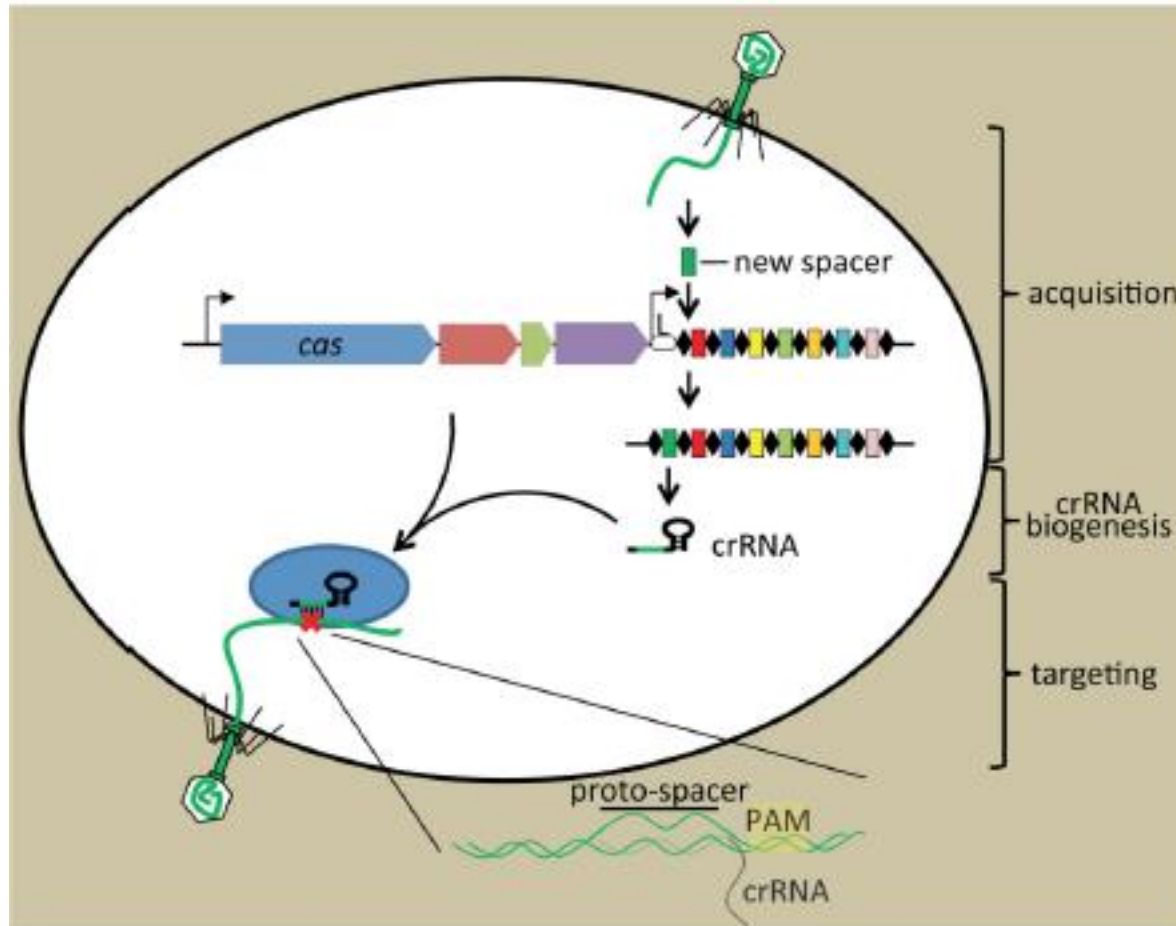
Bakterilerde Adaptif İmmünite: CRISPR-Cas Sistemleri; -Aşılama Etkisi-



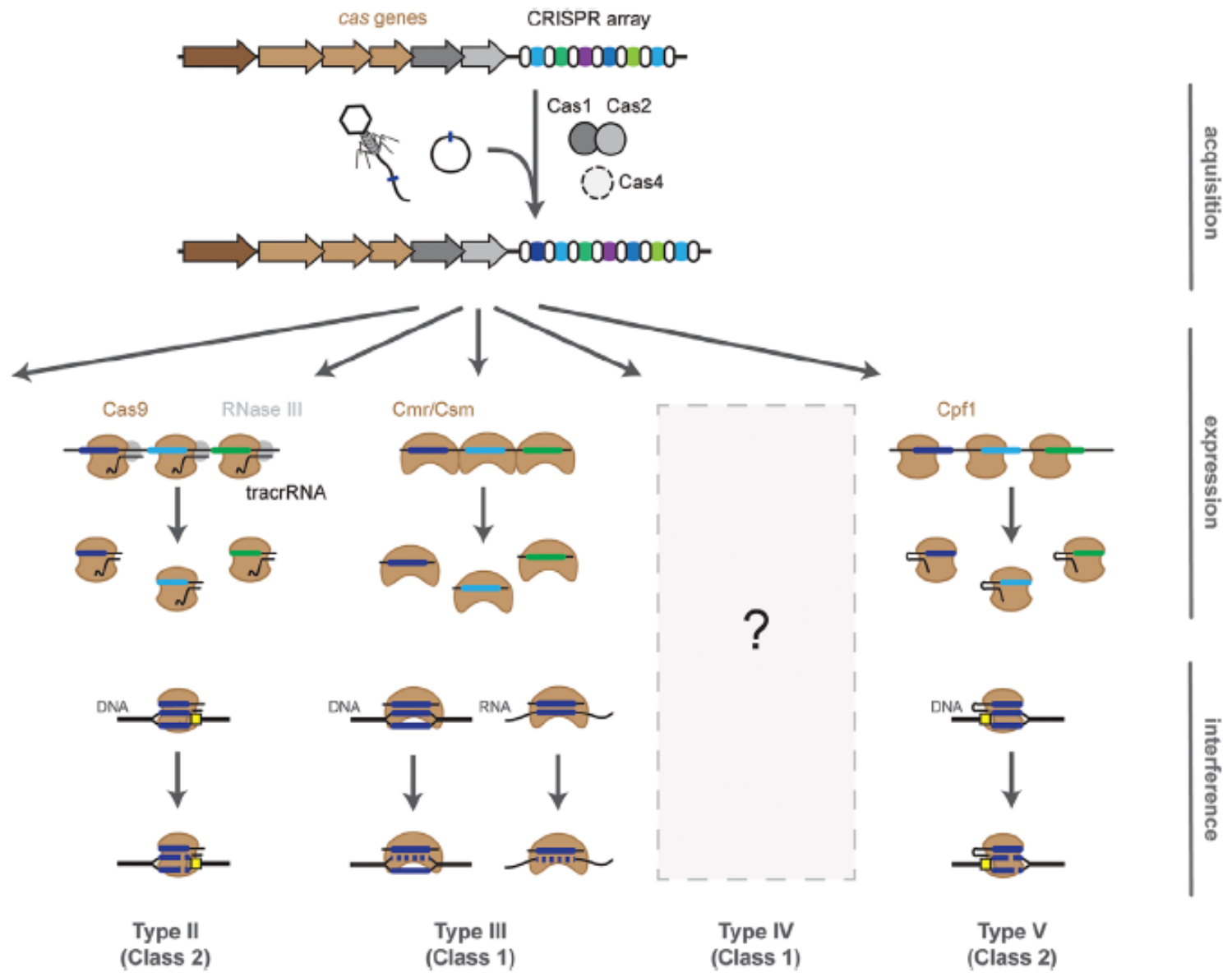
Bakterilerde Adaptif İmmünite: CRISPR-Cas Sistemleri; -Aşılama Etkisi-

- 1. Hücre içine enjekte edilen DNA genom içerisine, CRISPR dizileri arasında ayırıcı dizi (spacer) olacak şekilde yerleşir (Kazanım; adaptasyon).**
- 1. Bu CRISPR bölgesinin transkripsiyonu: Küçük interfere edici CRISPR RNA'lar oluşur (Biyogenez; ekspresyon)**
- 1. CRISPR RNA'lar Cas enzimlerinin hedefi (ayırıcı dizilerin komplementeri) bularak parçalamasını sağlar (Hedefe saldırı; müdahale).**

Bakterilerde Adaptif İmmünite: CRISPR-Cas Sistemleri;



Barrangou R, et al: CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell* 2014; 54:234-244. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.011.



Luo ML, et al: Current and future prospects of CRISPR-based tools in bacteria. *Biotechnology and Bioengineering* 2016; 113:930-943.

CRISPR İlişkili Biyomoleküler Teknolojiler

Genom düzenlemeleri:

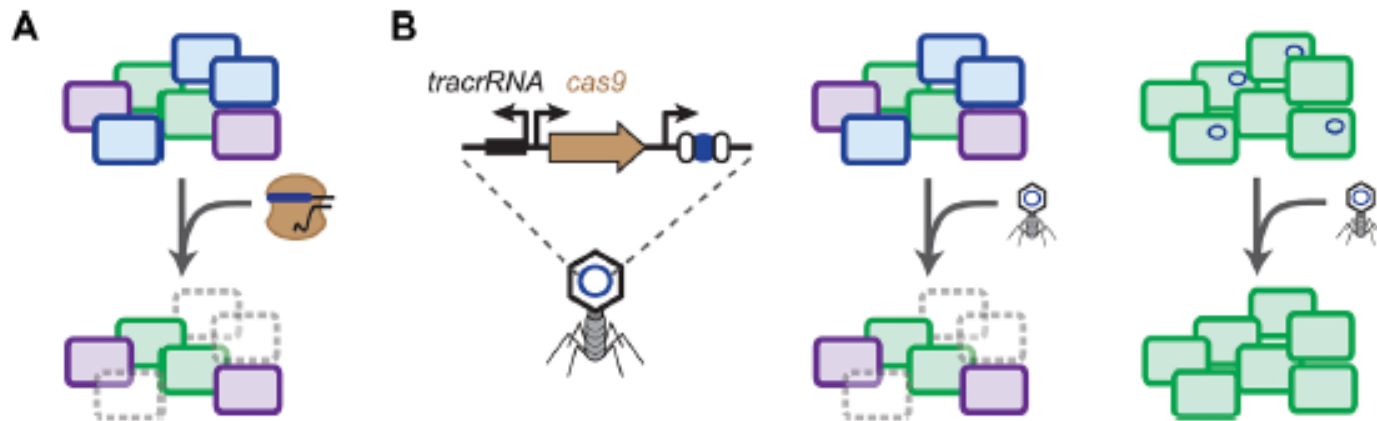
- **Belirlenen hedef bölgede Cas9'un çift zincirli DNA'da kırık oluşturması,**
- **Endojen mekanizmalarla onarım,**
- **Ancak bakterilerin onarım kapasitesi ökaryotlara göre daha düşük.**

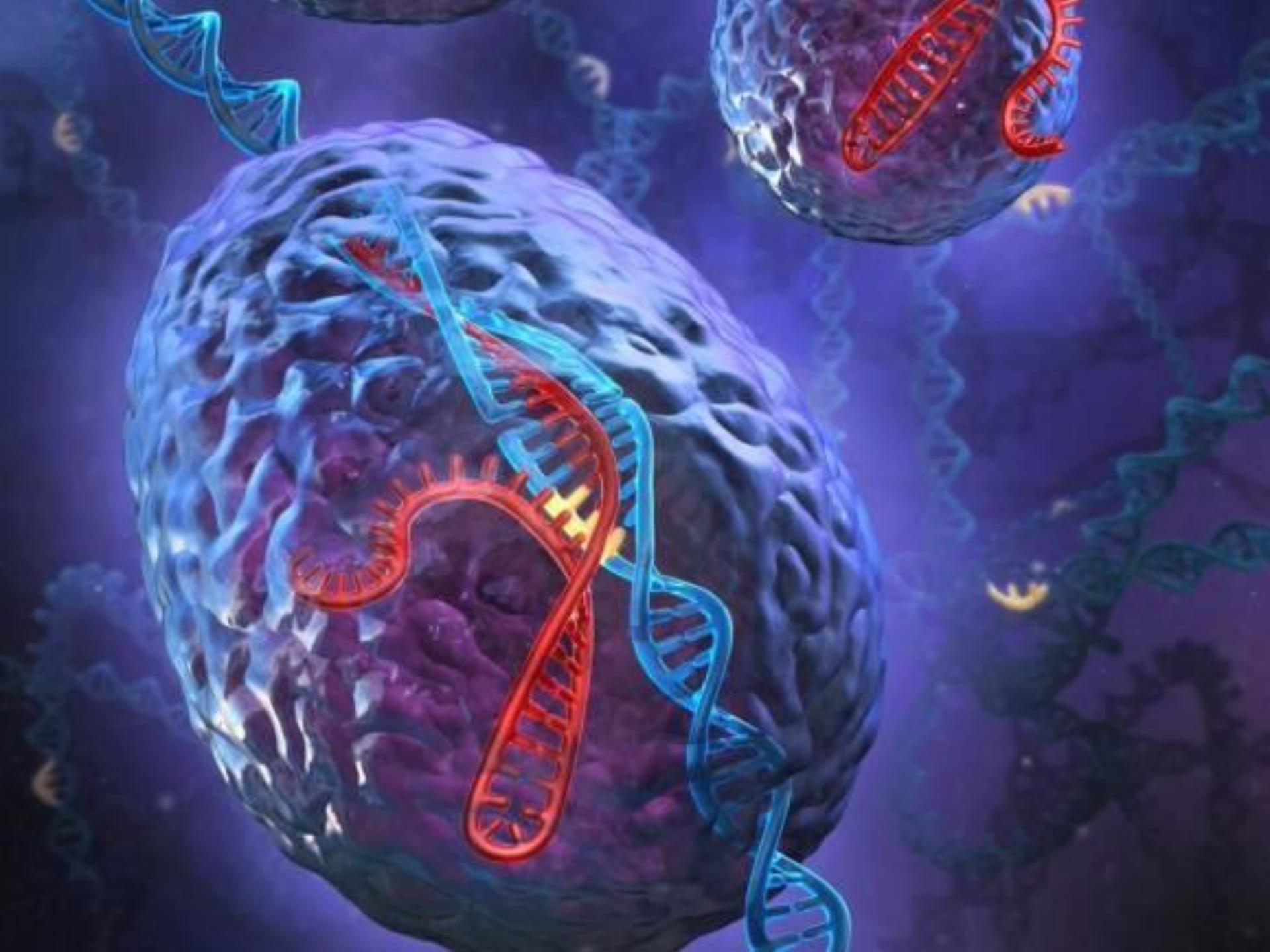
CRISPR İlişkili Biyomoleküler Teknolojiler

Gen düzenlemeleri:

- Cas9 nükleaz, aktif bölgelerindeki mutasyonlarla bir DNA-bağlayan proteine dönüştürülür.**
- Katalitik olarak inaktif olan bu Cas9'un DNA parçalama özelliği kalmamıştır; ancak ona bağlanabilir.**
- Hedef genin promotor veya orf bölgesine bağlanan Cas9, transkripsiyonun başlamasını önler:**
Gen ekspresyonunun inhibisyonu.

CRISPR Temelli Antimikrobiyaller





Moleküler Tanı Uygulamalarında Nereden Nereye Geldik?

- Laboratuvar mekanları**
- Ticari firmalar**
- Kalite kontrol**
- Fiyatlar**
- İnsan gücü**
- Sağlık politikaları**

Moleküler Tanı Uygulamalarında Nereden Nereye Geldik?

Laboratuvar mekanları:

- **Uygun mimari**
- **Yeterli alt yapı:**
 - **Elektrik tesisatı**
 - **Klima sistemi**
 - **Su boruları**

Moleküler Tanı Uygulamalarında Nereden Nereye Geldik?

Ticari Firmalar:

- Teknik destek**
- Dışa bağımlılık**
- Yerli üretici**

Moleküler Tanı Uygulamalarında Nereden Nereye Geldik?

Kalite Kontrol:

- **Uluslararası kalite kontrol programları**

- QCMD
- NEQAS

- **Ulusal kalite kontrol programları**

- THSK
- MOTAKK

Moleküler Tanı Uygulamalarında Nereden Nereye Geldik?

Fiyatlar:

- SUT karşılıkları
- Değişken fiyatlar

Moleküler Tanı Uygulamalarında Nereden Nereye Geldik?

Sağlık politikaları:

- İstikrar
- Cemiyet ve dernekler

Moleküler Tanı Uygulamalarında Nereden Nereye Geldik?

İnsan Gücü:

- Laboratuvar personeli**
- Klinisyen**
- Uzman hekim**



Keles'in Gelemiç köyünde hindiyle oynamanın mutluluğu

İbrahim Peynirci