

Sağlık Hizmetleri İle İlişkili İnfeksiyonların Kontrolünde Mikrobiyoloji Laboratuvarının Rolü Ve Önemi

Prof. Dr. Osman Şadi YENEN

KLİMİK BAHAR OKULU 2008
**Sağlık Hizmetleri ile İlişkili İnfeksiyonlar, Tedavisi ve
Kontrolü**

Kuşadası, 13 Mart 2008

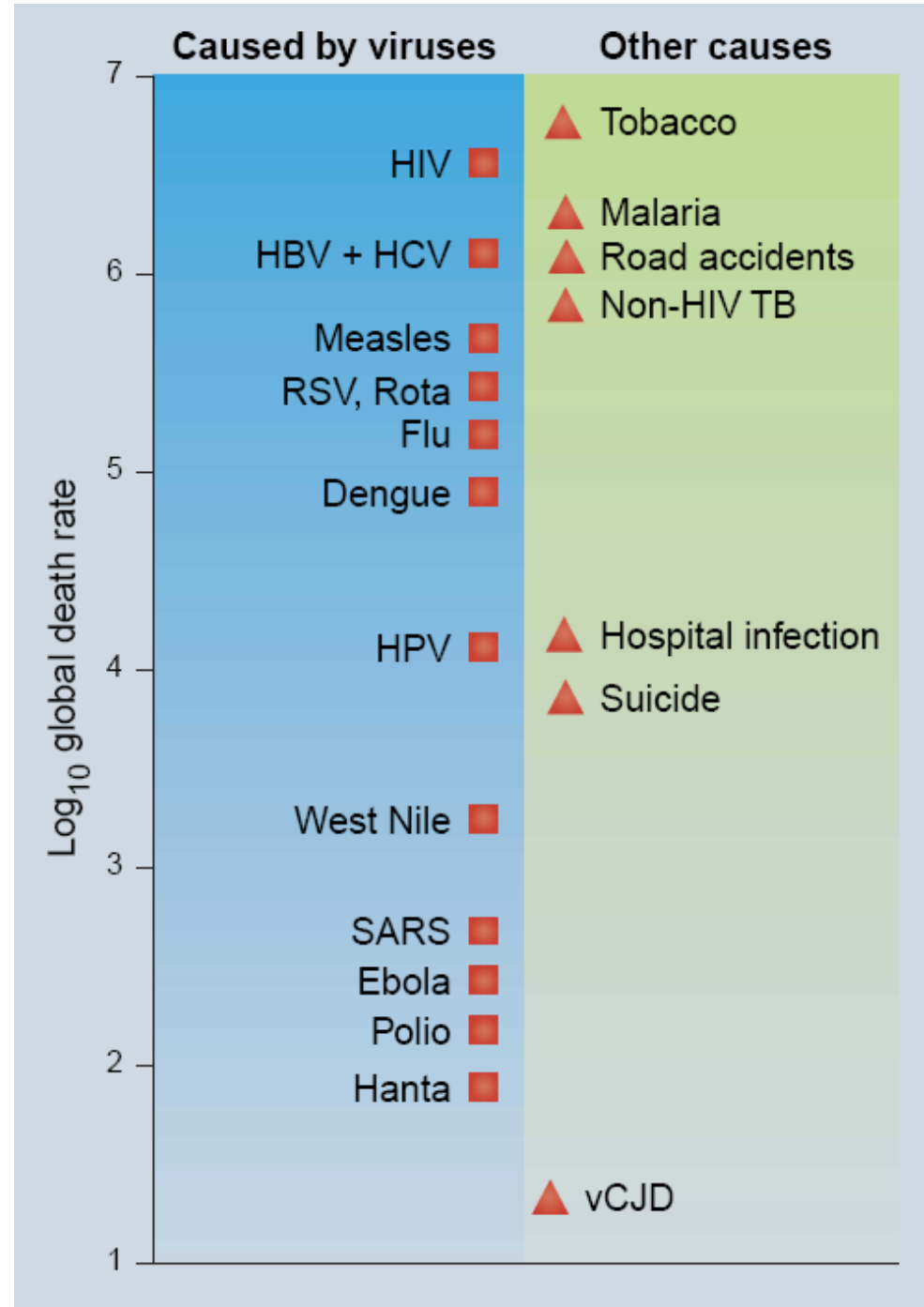
MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARI – İNFEKSİYON KONTROLÜ

- Koch, Pasteur
- Lister
- Semmelweis (1847, “cadaverous particles”)
- Nightingale (1863, “Notes on Hospitals”)
- CDC: “nosocomial infections”
- Çevre örnekleri → Yönlendirilmiş sürveyans

'RICHTER' ÖLÇEĞİNE YERLEŞTİRİLMİŞ DOĞAL KİTLE İMHA SİLAHLARI

[Değerler 2003 yılı yaklaşık
'küresel ölüm oranlarıdır'dır]

(Weiss RA, McMichael AJ: 2004)



**Antibiyotik kullanımını
azalt**

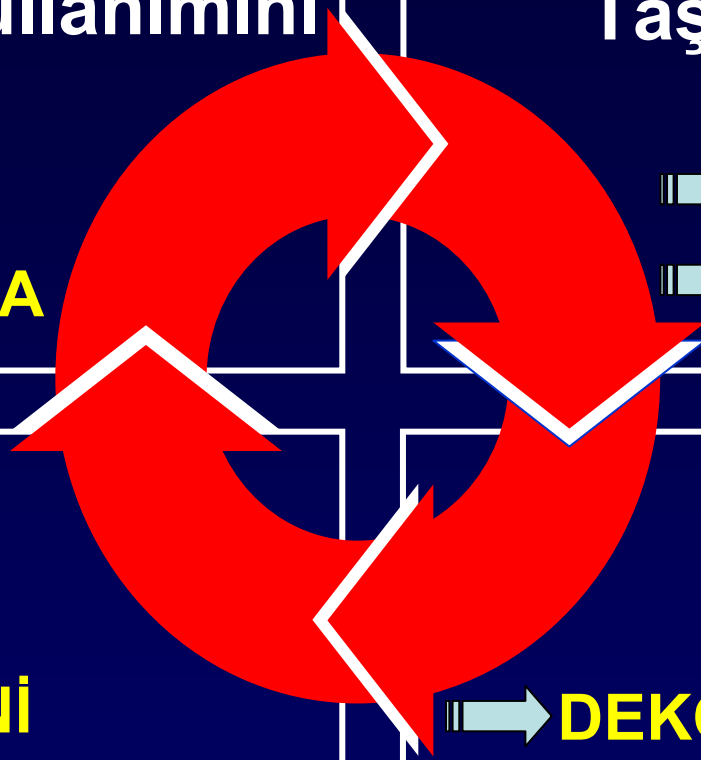
- ⇒ **EĞİTİM**
- ⇒ **SINIRLAMA**

Taşıyıcıları belirle

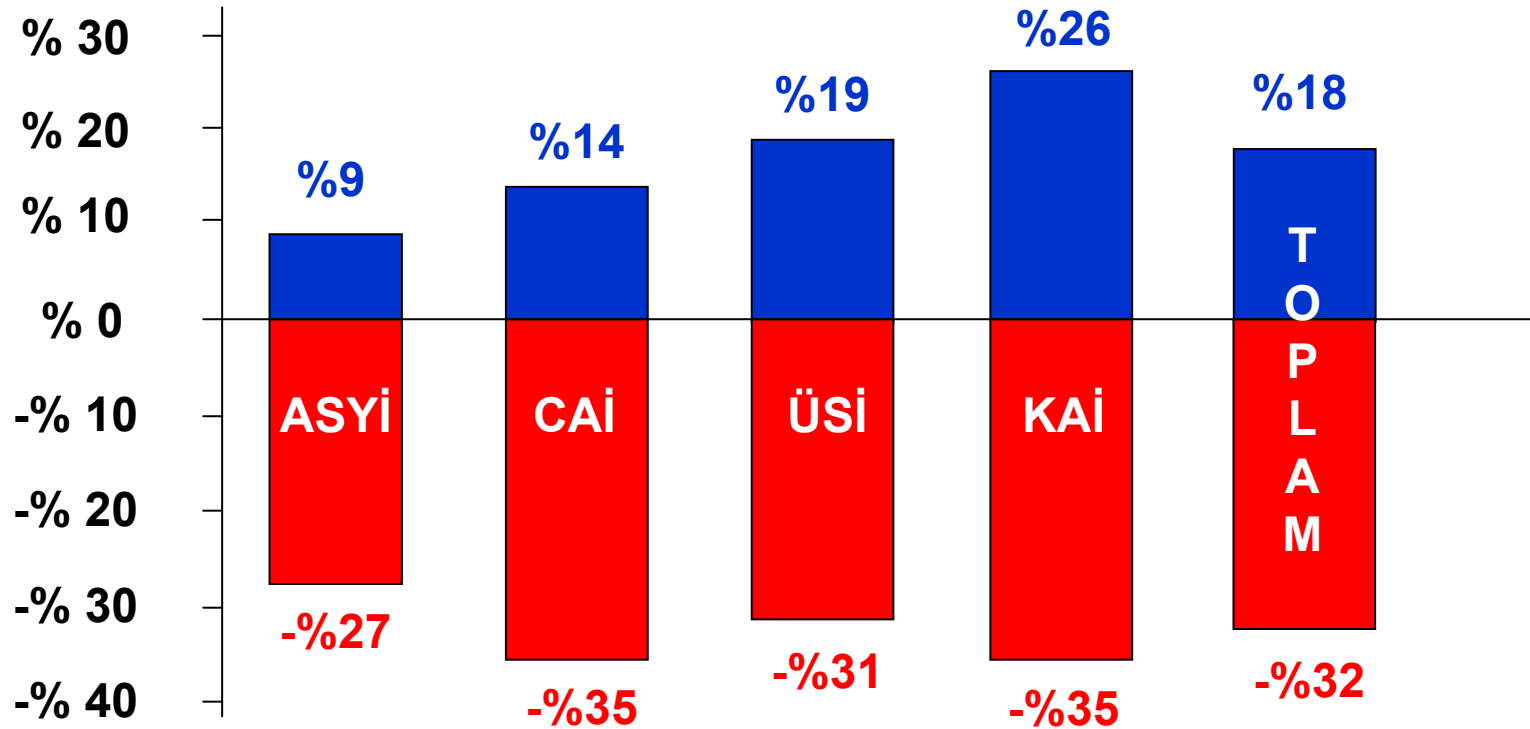
- ⇒ **TARAMA**
- ⇒ **İZOLASYON**

⇒ **EL HİJYENİ**
Bulaşmayı durdur

⇒ **DEKONTAMİNASYON**
Kaynakları yok et

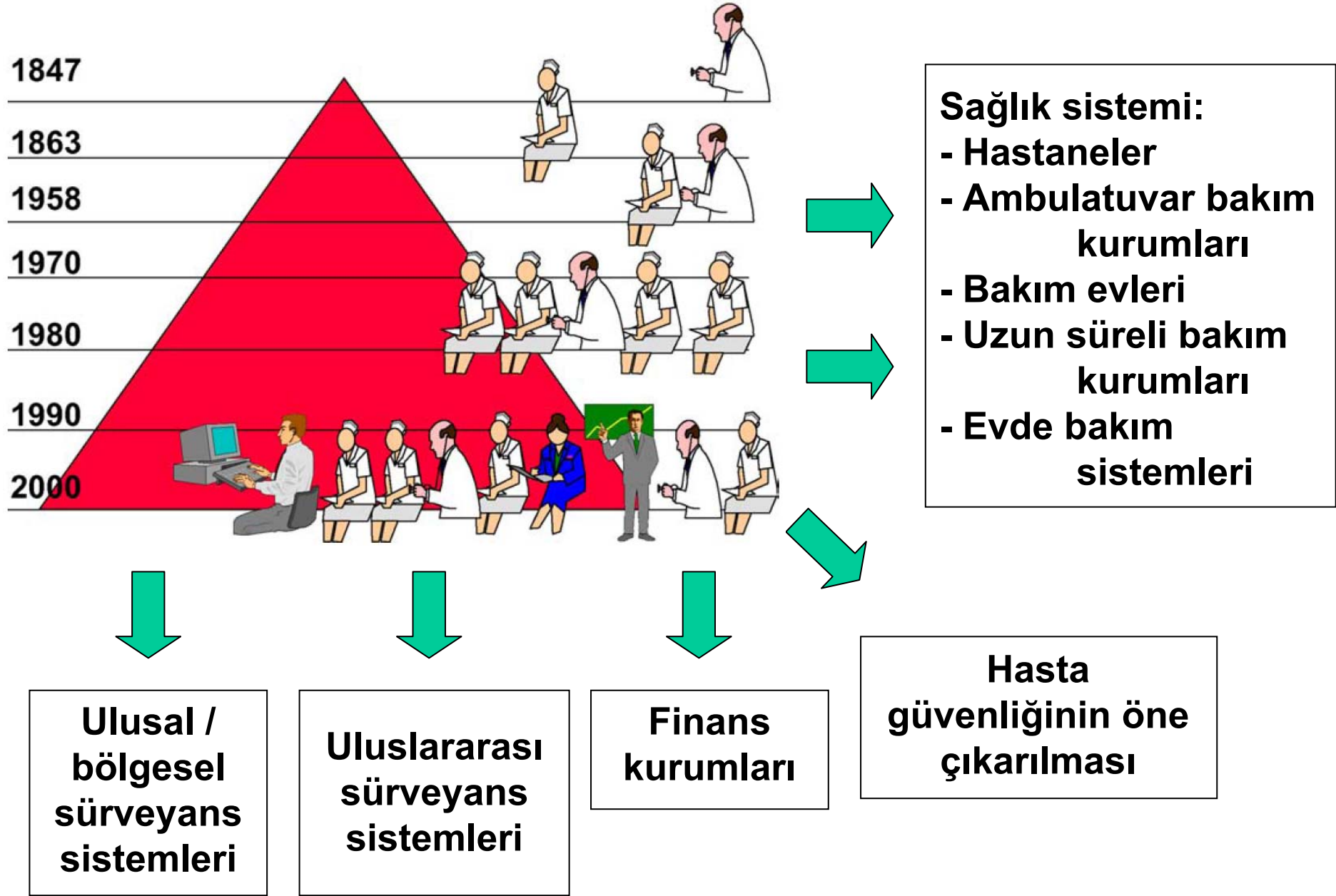


İNFEKSİYON KONTROLÜ OLMASIZIN



İNFEKSİYON KONTROLÜ İLE

**İNFEKSİYON KONTROL PROGRAMLARININ ETKİSİ
(SENIC Study): 1970-1975 döneminde hastane
infeksiyonlarındaki göreceli değişimler**



İNFEKSİYON KONTROLÜ VE NİTELİKLİ SAĞLIK BAKIMI

- Çoklu dirençli mikroorganizmalarla savaşım
- Antimikrobiyallerin denetimi
- Hasta profiline göre infeksiyon önlemi
- Yeni materyaller
- Yeni patojenler
- Hasta kayıtlarında ve veri derlenmesinde bilgisayarlar
- İnfeksiyon kontrolünde kanıta dayalı öneriler
- Yeni sorunlar
 - Transgenik tedaviler
 - Yoğun ve komple immünosüpresyon
 - Ksenotransplantasyon
 - Prion sorunu
 - SARS, H5N1, H7N7...
- Maliyetlerde kısıtlamalar
- Yeni tür sağlık hizmeti sistemleri
- Sağlık personelinin yaklaşım değişimleri

İNFEKSİYON DENETİM STRATEJİLERİ 1

- Mikrobiyolojik s rveyansta
genel tıbbi hizmet kategorilerinden,
infeksiyon alanlarından ve
hastane ölçeğinde infeksiyon
oranlarından daha çok
sorun kategorilerde yođunlaşma

İNFEKSİYON DENETİM STRATEJİLERİ 2

- İnfeksiyon denetiminde daha proaktif stratejiler (infeksiyonların önlenmesi ve direncin denetiminde etkin girişimlerde bulunmak bu parametrelerdeki değişiklikleri saptamakla eş öncelik taşır)
- İnfeksiyon denetimiyle ilgili personelin sürekli ve kalıcı eğitimi
- Hastane, toplum ve ülke düzeyindeki verilerin bilgisayar ağlarına aktarılması

YÖNLENDİRİLMİŞ MİKROBİYOLOJİK SÜRVEYANS

- Yoğun bakım birimleri
- Önlenebilir yüksek riskli infeksiyonlar (intravasküler araçlarla ilişkili infeksiyonlar vb)
- Antimikrobiyal direcin sürveyansı ve denetimi

- **SENIC** (The study on the Efficacy of Nosocomial Infection Control)
- **NNIS** (The National Nosocomial Infections Surveillance)
- **NaSH** (The National Surveillance System for Health Care Workers)
- Dialysis surveillance network
- **HELICS** (Hospital in Europe Link for Infection Control through Surveillance)
- **EARSS** (European Antimicrobial Resistance Surveillance Scheme)
- **ESAC** (European Surveillance on Antimicrobial Consumption)

HASTANE EPİDEMİYOLOJİSİNDE ARAŞTIRMA VE YAYIN STANDARTLARI

- **CONSORT** (Consolidated Standards of Reporting Trials)

*JAMA*1996; *Lancet* 2001; *BMJ* 2004

- **TREND** (Transparent Reporting Evaluations of Nonrandomised Designs):

Am J Public Health 2004

- **STROBE** (Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology)

<http://www.strobe-statement.org>

- **ORION** (Outbreak Reports and Intervention Studies Of Nosocomial Infection)

Lancet Infect Dis 2007

MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARI

- Hasta bakımı ile ilişkili infeksiyonların denetiminde vazgeçilmez bir unsurdur
- Kendine özgü *fenotipik* özellikleri olan mikrop yoğunlaşmalarını tanımlayarak erken uyarı sistemi işlevini yerine getirir
- Bu bilgiyi infeksiyon kontrol profesyonelleriyle paylaşır



SÜRVEYANS

- Kolonize ya da infekte hastaların tanımlanması
- Hastalar arasında infeksiyon bulaşma riskinin değerlendirilmesi
- Belli bir suşun bir hastadan ötekine bulaştığının kanıtlanması
- Hastane salgınlarının tanımlanması

AKTİF SÜRVEYANS

- Servislerdeki endemik oranlar (hasta-gün sayısı ya da riskte olan hasta sayısı başına infeksiyonların sayısı)
- İnfeksiyon alanları
- Mikroorganizmalar
- İşlem türleri

Endemik eşik oranları aşıldığında, alışılmadık ya da yeni mikroorganizmalar izole edildiğinde ve yeni infeksiyon alanları tanımlandığında olgu yoğunlaşmaları ve epidemiler araştırılır

DİRENCİN SÜRVEYANSI ve DENETİMİ

- Dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkışını saptayabilmek için duyarlılık kalıpları izlenir
- Dirençli mikroorganizmalar ortaya çıktığında uygun izolasyon önlemleri alınır
- Antimikrobik ilaçların kullanımları denetim altına alınır

BİLGİSAYARLI BİLDİRİM – MİKROBİYOLOJİ RAPORLARI

- Mikroorganizmanın izolasyon alanı
- Mikroorganizmanın tipi
- Hastanın hastanedeki yeri (lokasyonu)

- Raporlar günlük ve kümülatif olarak verilmelidir
- Raporlar artan infeksiyon oranlarındaki eğilimlerin saptanmasında ya da artan direncin belirlenmesinde kullanılırlar

SÜRVEYANS DENETİMİ ve ÖNLEMİYİ TETİKLER...

- Etkili bir sürveyansla çeşitli infeksiyonlar ve direnç sorunları bakımından temel endemik oranların tanımlanmasıyla alışılmadık/beklenmedik bir hastalık ya da dirençle karşılaşılması hastalık denetimi ve önlenmesi girişimlerini tetikler

SALGINLARIN TANIMLANMASI

- **Bir salgın kuşkusunu araştırmada öncelikle bu infeksiyonların her hangi bir şekilde ilişkili olup olmadığı belirlenmelidir**
[salgına neden olan patojenin tanımlanması ve salgınla ilişkili olmayan (kimi hastalardan izole edilmelerine rağmen) aynı cins ya da türden mikroorganizmalardan farklılıklarının ortaya konması]

SALGINLARIN TANIMLANMASI

- **Bir salgın, infeksiyonların insidensindeki artıştan daha çok dirençle ilişkili olabilir**
[sadece vankomisine dirençli *Staphylococcus aureus*' dan ibaret olabilir]
- **Bir salgın tek bir suşla (klonla) ilişkiliyse ortak bir kaynakla temastan ya da hastadan hastaya bulaşmadan kuşkulandır**

EPİDEMİYOLOJİK DEĞERLENDİRME

- Kuşkulu patojenin, bulaşma şekline bakılmaksızın, belli bir klondan olduğunun belirlenmesi önemlidir
- KLON: Birbirinden bağımsız olarak, farklı kaynaklardan, farklı lokasyonlardan ve muhtemelen farklı zamanlarda izole edilen, fakat çok sayıda özdeş fenotipik ve genetik özelliklere sahip bir izolatlar dizisi. Bu benzerlikler ancak onların ortak bir kökenleri olmasıyla açıklanır
- Bir salgında, ortak bir kaynaktan kökenlendiği yargısına varılmadan önce izolatlar arasında klonal ilişki kurulmuş olmalıdır.

EPİDEMİYOLOJİK DEĞERLENDİRME

- Olası bir salgında, klinik ve epidemiyolojik kanıtlar temelinde hipotez oluşturulur, bu hipotezin doğruluğu mikrobiyolojik verilerle sağlanabilir
- Epidemik izolatlar arasındaki benzerlikler ya da farklılıkların saptanması her zaman infeksiyon kaynağını ya da yayılma şeklini belirlemede yeterli olmaz, epidemiyolojik veriler de gereklidir
- Epidemiyolojik çalışma yapılmaksızın kültür ve moleküler tiplendirmeler sıklıkla yorumlanamaz sonuçlara yol açarlar

BİLGİSAYARLI BİLDİRİM – MİKROBİYOLOJİ RAPORLARI

- Kùltür istekleriyle mikrobiyoloji laboratuvarına uygun demografik bilgi akışı da olur (olmalıdır!)
- Bilgisayarlarla özgùl hasta tiplerinin (transplant hastaları vb) ve özgùl birimlerin (yoğun bakım birimi vb) gruplandırılmaları ve izlenmeleri olanaklıdır

TİPLENDİRME

- Epidemiyolojik olarak ilişkili izolatların genetik olarak da ilişkili olup olmadıklarını belirlemek amacıyla yöneliktir

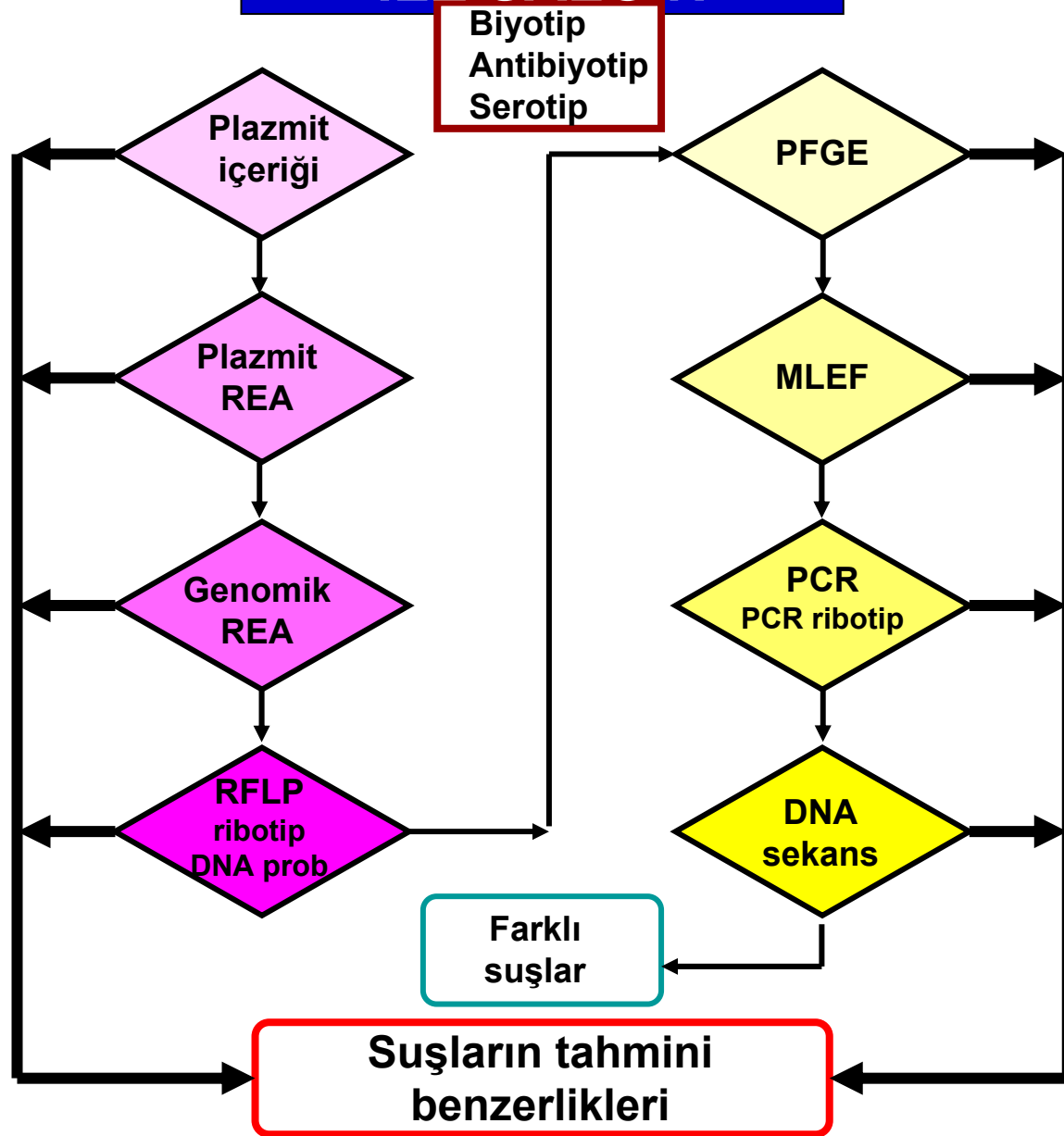
EPİDEMİK SUŞUN TANIMLANMASI

- **FENOTİPİK YÖNTEMLER** (Cins, tür, biyotip, serotip, faj tipi, bakteriyosin üretimi antimikrobiyal duyarlılık kalıbı)
- **ORTAK FENOTİPİK ÖZELLİKLİ SUŞLAR** (alt tipleme)
- **ORTAK GENOTİPİK ÖZELLİKLİ SUŞLAR** (genotipleme) : İki farklı suşun ve iki farklı kaynaktan infeksiyonun varlığı

TİPLENDİRME YÖNTEMLERİ

- Tiplendirme yeteneği
- Yinelenebilme yeteneği
- Ayırt etme gücü
- Uygulanma kolaylığı
- Yorumlanabilirliđi
- Maliyeti (zaman ve para olarak)

DİRENÇLİ BAKTERİ İLE SALGIN



(John JF: 1995)

FENOTİPİK YÖNTEMLER (1)

- BİYOTİPLEME: morfoloji, biyokimyasal reaksiyonlar ve çevresel tolerans
- SEROTİPLEME: antiserumlarla reaksiyon, taksonomik gruplama (*Salmonella*, *Legionella*, *Shigella*, *S. pneumoniae*), tür içi ayırım (*Klebsiella* ve *Pseudomonas*)
- FAJ TİPLEMESİ: Farklı bakteri suşlarında hücre yüzeyindeki bağlanma reseptörleri farklılaşabilirler (*S. aureus*, *P.aeruginosa* ve *Salmonella spp*)

FENOTİPİK YÖNTEMLER (2)

- **BAKTERİYOSİN TİPLEMESİ:** Başka bakteriler tarafından üretilen, genellikle protein yapısındaki, inhibe edici maddelere karşı duyarlılık (*P. aeruginosa*, *C. albicans*)
- **ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK:** Disk difüzyon, mikrodilüsyon yöntemler [Birçok epidemiyolojik çalışmada sınırlı değerdedir: genetik ve epidemiyolojik olarak ilişkisiz suşlar aynı duyarlılık kalıbına sahip olabilirler]

FENOTİPİK YÖNTEMLERİN SINIRLILIKLARI (1)

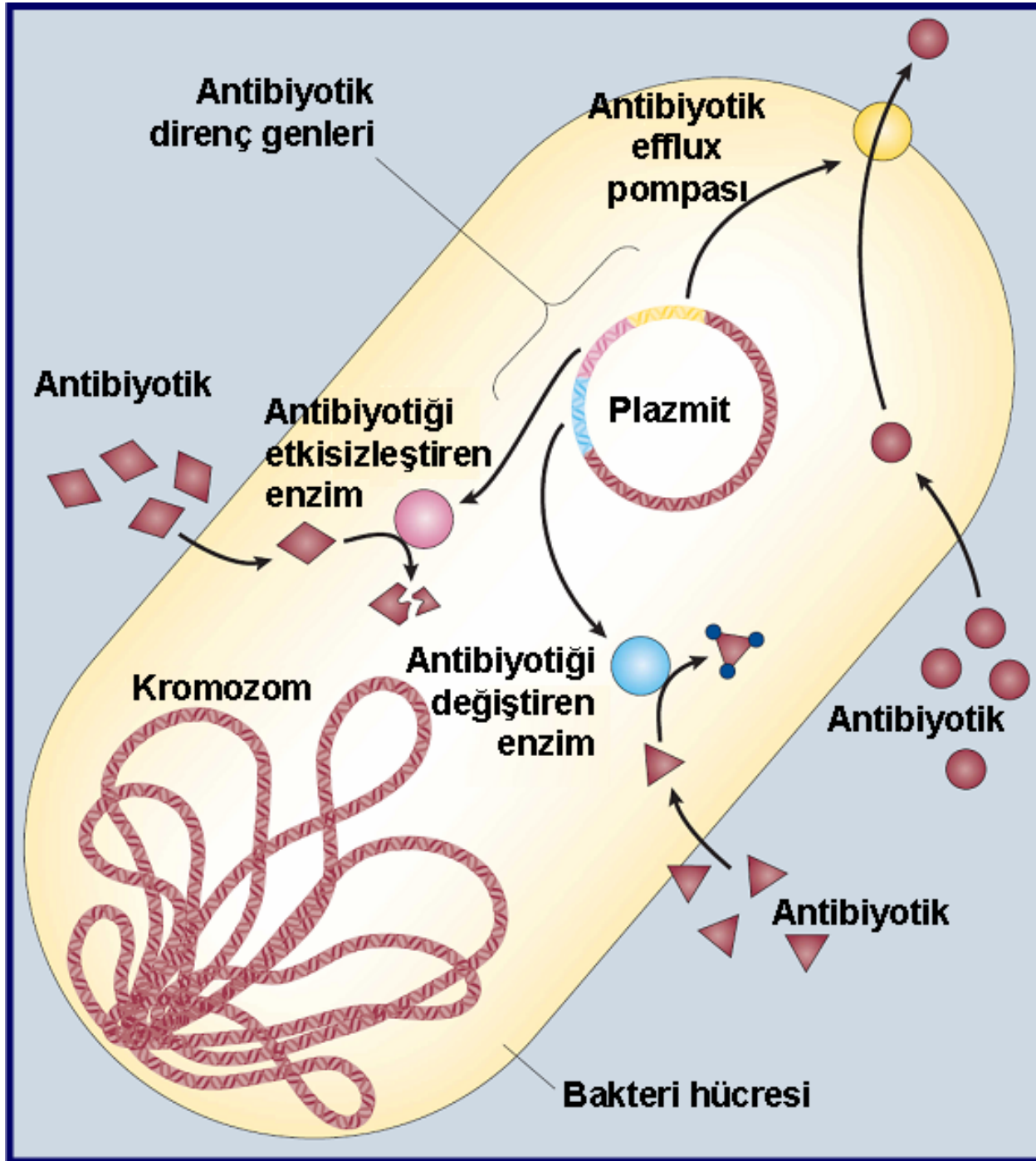
- Çevresel seçilim baskısıyla etkilenir
- Stabil olmayan antijenik yapılar (*traits*) random mutasyonlarla değiş(tiril)ebilirler
- Direnç kalıpları, antibiyotik kullanımının seçilim baskısıyla çok güçlü bir biçimde etkilenmektedir

FENOTİPİK YÖNTEMLERİN SINIRLILIKLARI (2)

- Bakteriler, incelenmekte (değerlendirilmekte) olan özelliklerinin ekspresyonunu öngörülebilir bir şekilde değiştirirler
- Gerekli reagentler ticari olarak bulunmayabilir, bu da fenotipleme açısından testlerin sayısını sınırlar
- Fenotipik yapılar (*traits*) bir türün her bir suşunu belirlemekte yeteri kadar ayırt ettirici güce sahip olmayabilirler

ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ MEKANİZMALARI

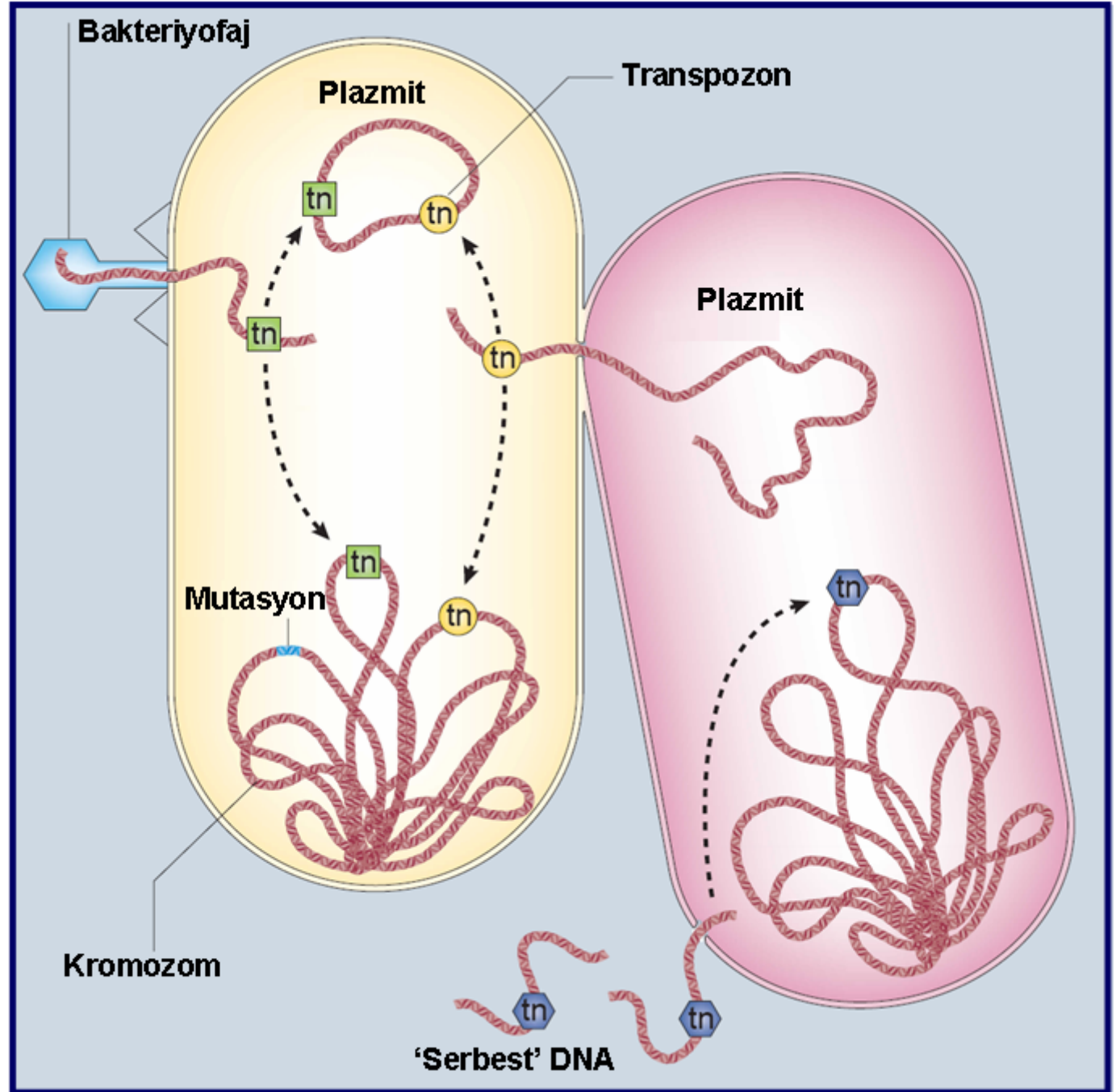
- Antibiyotiği inaktive eden enzimlerin üretimi
- Antibiyotiğe bağlanmayı önleyecek şekilde hedef alanda mutasyon
- Antibiyotik alımında azalma
- Antibiyotiği dışarı atma (efflux) mekanizmaları
- Antibiyotik hedefinin aşırı üretimi
- Post-transkripsiyonel ya da post-translasyonel olarak hedef alanın modifikasyonu
- Antibiyotiğin hedefini çevreleyen alternatif bir metabolik yolun ya da enzimin gelişimi



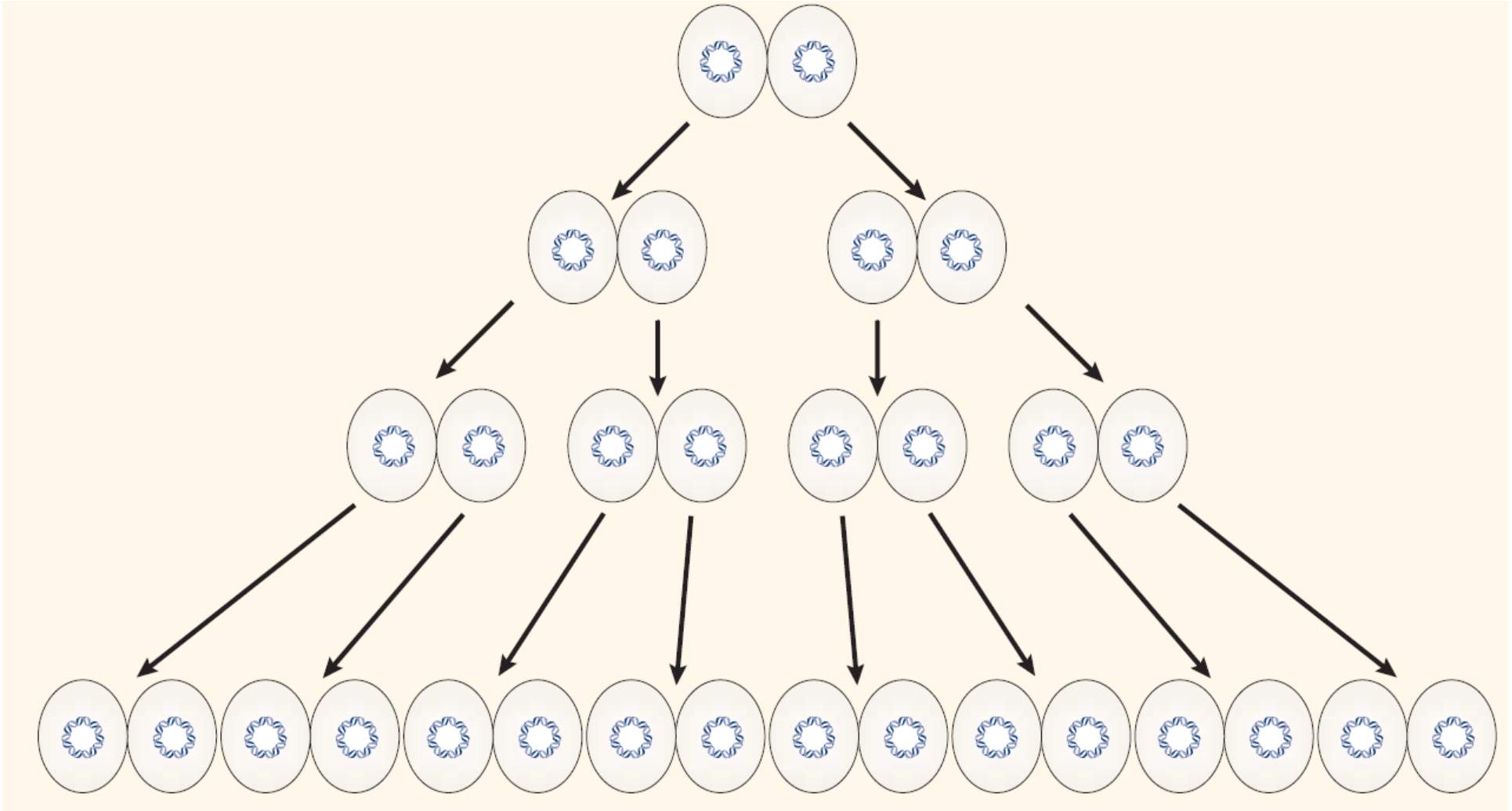
ANTİBİYOTİKLERE DİRENCİN BİYOLOJİK MEKANİZMALARI

(Levy SB, Marshall B: 2004)

İL AÇ İDRENCİNİN GENETİĞİ VE YAYILMASI



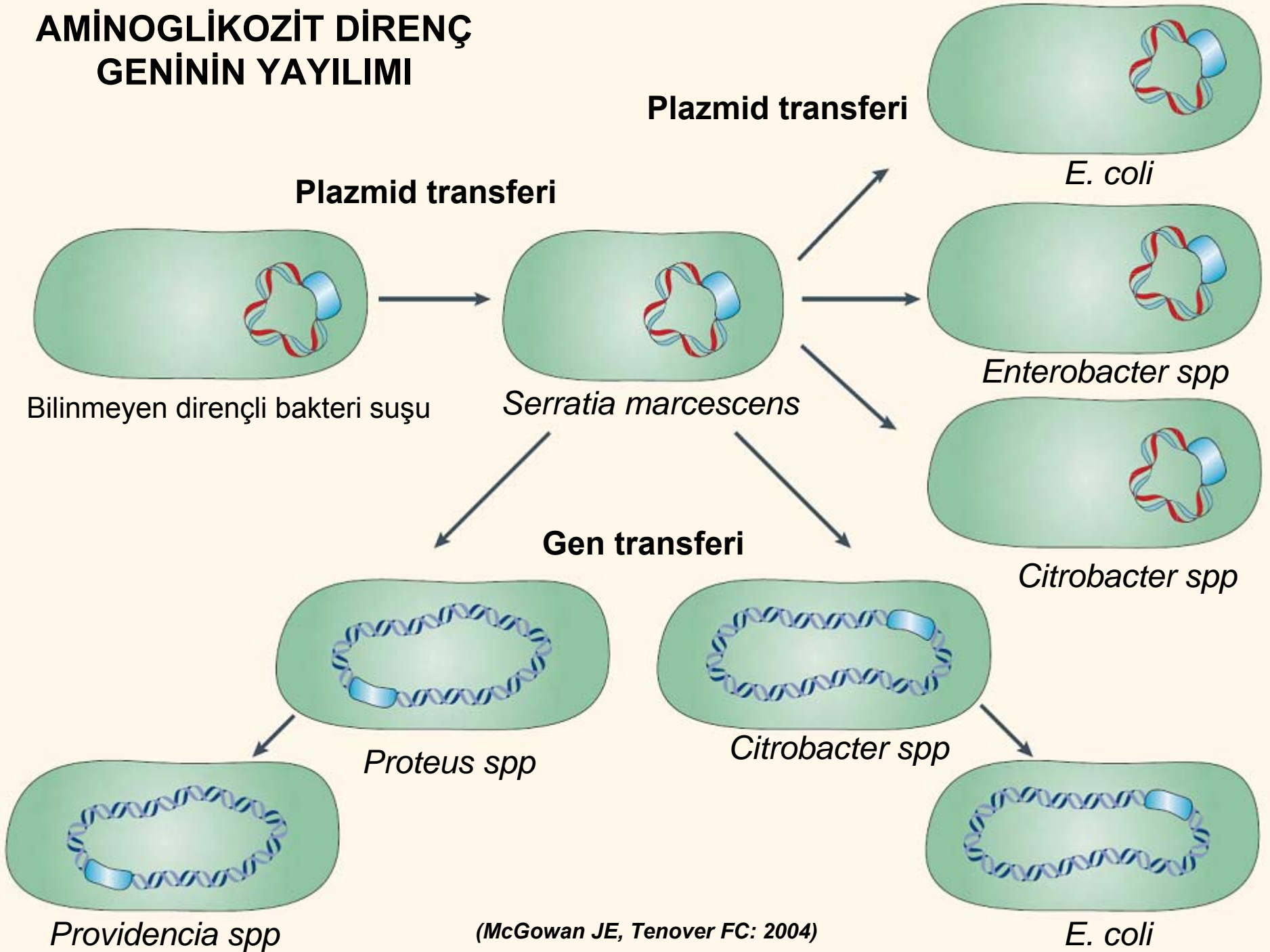
(Levy SB, Marshall B: 2004)



Bir plazmid üzerinde *vanA* direnç genini taşıyan VRE'nin yayılımı

(McGowan JE, Tenover FC: 2004)

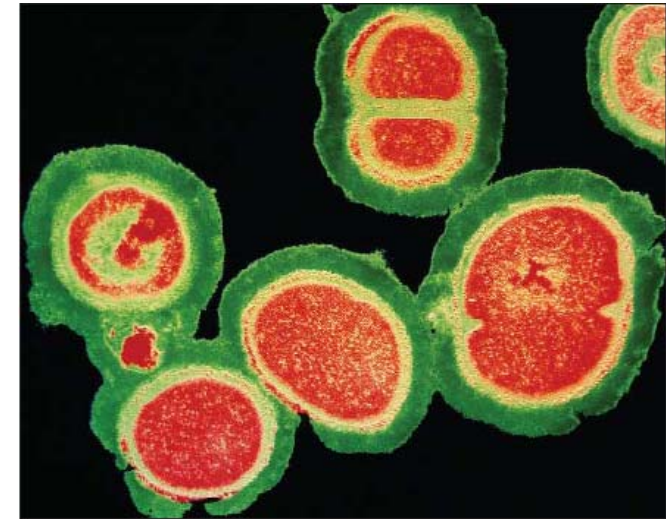
AMİNOGLİKOZİT DİRENÇ GENİNİN YAYILIMI



(McGowan JE, Tenover FC: 2004)

Multidrug Resistance in *S. aureus*

Antibiotic	MSSA (1930)	MRSA (1994)	Resistance mechanism
Penicillin	S	R	+ (1945)
Streptomycin	S	R	+ (1948)
Tetracycline	S	R	+ (1950)
Methicillin	S	R	+ (1961) <i>mecA</i>
Oxacillin	S	R	+
Cephalothin	S	R	+
Cefotaxime	S	R	+
Imipenem	S	R	+
Chloramphenicol	S	R	+
Ciprofloxacin	S	R	A
Clindamycin	S	R	+
Erythromycin	S	R	+
Gentamycin	S	R	+
Rifampin	S	R	A
Vancomycin	S	S	A (1997) <i>VISA</i>
Vancomycin	S	S	+ (2002) <i>vanA</i>
Teichoplanin	S	S	+
Trimeth/Sulfa	S	R	A



Direnç mekanizmalarının çoğu adaptif (A) değildir ve tür dışı bir kaynaktan edinilmişlerdir (+)

(Tomasz A: 2006)

Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2005) **56**, 519–523

doi:10.1093/jac/dki272

Advance Access publication 26 July 2005

JAC

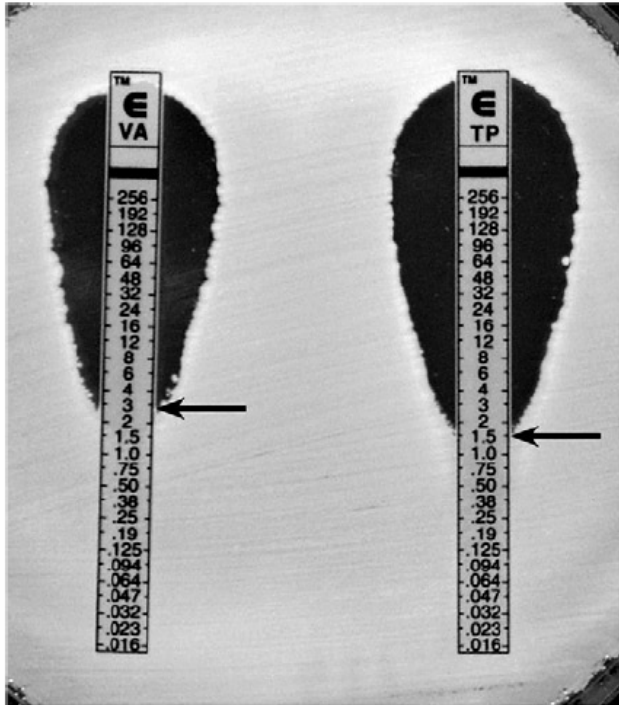
**Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously
resistant to vancomycin in a Turkish university hospital**

Banu Sancak*, Serpil Ercis, Dilek Menemenliođlu, Őule Őolakođlu and GölŐen HaŐcelik

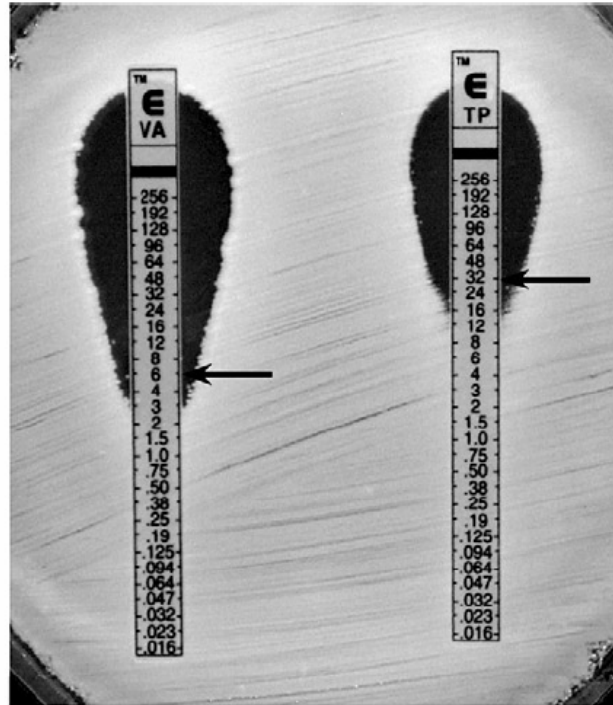
4 yıl ierisinde 256 MRSA

46 hastadan 46 hVISA izolasyonu

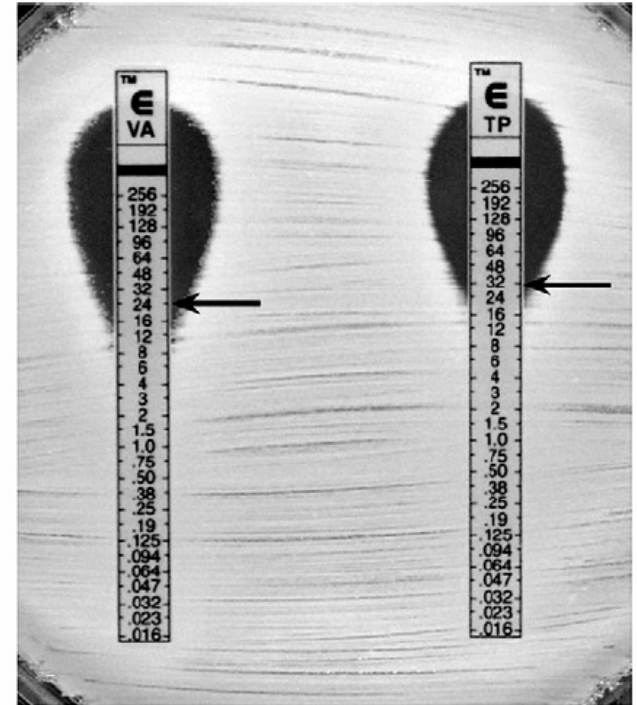
**46 hastadan 12'sinde vankomisin/teikoplanin
kullanımı yküsü**



S. aureus ATCC 43300
(MRSA)



S. aureus ATCC 700698
(Mu 3 - hGISA)



S. aureus ATCC 700699
(Mu 50 - GISA)



ELSEVIER



Management of a large healthcare-associated outbreak of Panton–Valentine leucocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Germany

F.M.E. Wagenlehner^{a,g,*}, K.G. Naber^a, E. Bambl^b, U. Raab^{c,d},
C. Wagenlehner^a, D. Kahlau^d, C. Höller^d, W. Witte^e, W. Weidner^g,
N. Lehn^c, S. Harbarth^f, H.-J. Linde^c

Table I Carrier rates of total MRSA, PVL⁺ and PVL⁻ MRSA in residents and healthcare workers (HCWs) in three long-term care facilities (LTCFs) A, B and C in periods I (2004) and II (2005)

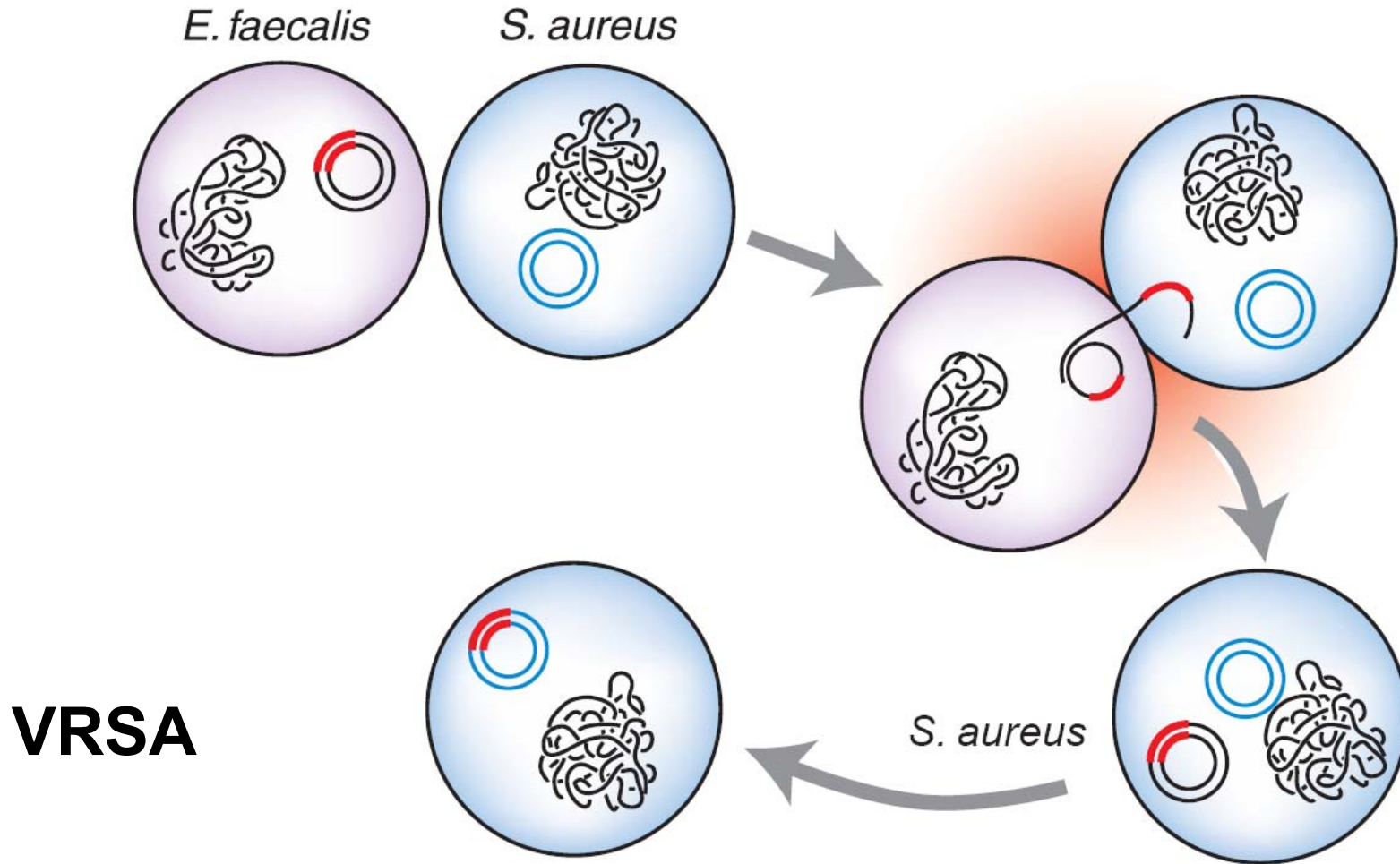
LTCF	Period I (N = 693)			Period II (N = 632)			P-value (MRSA total: period I vs II)
	MRSA total (%)	PVL ⁺ MRSA (%)	PVL ⁻ MRSA (%)	MRSA total (%)	PVL ⁺ MRSA (%)	PVL ⁻ MRSA (%)	
A							
Residents	11.2 ^d	7.7 ^a	3.6 ^b	6.4	1.6	4.8 ^c	0.014
HCWs	6.7	5.8	1.0	0.0	0.0	0.0	
Total	9.7	7.0	2.7	4.6	1.1	3.4	
B							
Residents	11.8 ^e	9.6	2.1	7.2	6.1	1.1	0.022
HCWs	14.4	13.4 [†]	1.0	6.9	2.8	4.2	
Total	12.7	10.9	1.8	7.1	5.1	2.0	
C							
Residents	12.9 ^f	10.0	2.9	7.0	7.0	0.0	0.031
HCWs	10.3	10.3	0.0	0.0	0.0	0.0	
Total	11.9	10.1	1.8	4.3	4.3	0.0	
Total of residents and HCWs of LTCF A, B and C	11.3	9.1	2.2	5.5	3.3	2.2	<0.0001

PVL, Panton–Valentine leucocidin; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

[†]Five relatives of two HCWs, two with PVL⁺ MRSA infection (recurrent abscesses); ^afour PVL⁺ MRSA, ^bone PVL⁻ MRSA, and ^cthree PVL⁻ MRSA detected in groins, not detected in anterior nares; PVL⁺ and PVL⁻ MRSA detected together in ^dthree, ^etwo, ^ftwo residents.

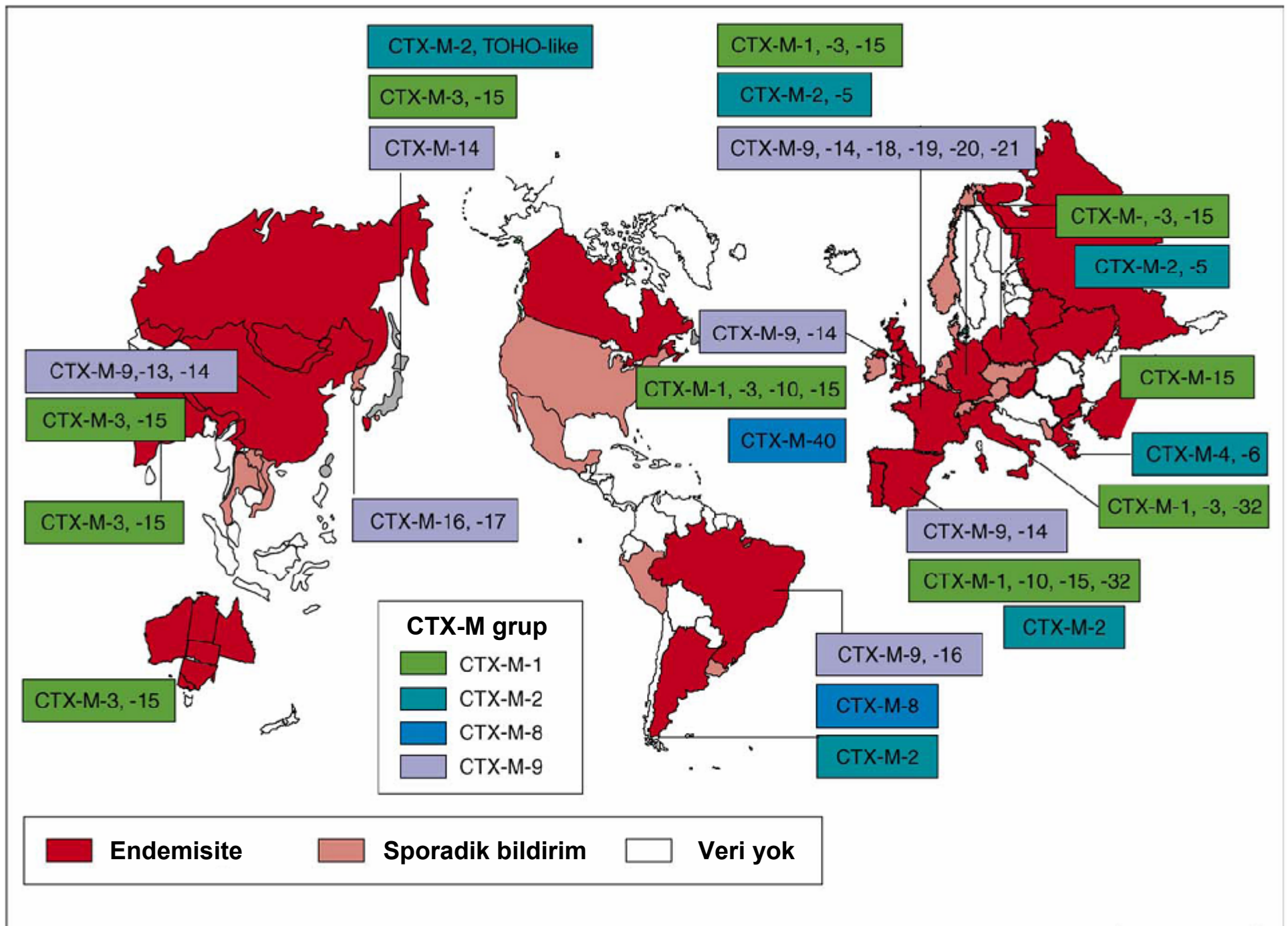
Toplum kökenli MRSA

MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLER	HASTANE KAYNAKLI MRSA	TOPLUM KAYNAKLI MRSA
Metilisine duyarlılık	yok	yok
Öteki antibiyotiklere duyarlılık (florokinolonlar, aminoglikozitler, eritromisin, klindamisin)	yok	var (büyük çoğunlukla)
<i>pvl</i> geninin varlığı	düşük (< %5)	yüksek (>%90)
SCCmecA tipi	başlıca I, II ya da III alt sınıflar	başlıca IV, V alt sınıflar
<i>agr</i> genotipi	başlıca II	başlıca I ve III



Yerli plazmidin, tür dışı bir plazmitteki tranpozonla infestasyonu

(Ferber D: 2003)



ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN GÖSTERİLMESİNDE MOLEKÜLER YÖNTEMLER

- **FENOTİPİK ANTİBİYOTİK TESTLERİ**
Antibiyotiğe duyarlılığı bildirirler
- **MOLEKÜLER TESTLER**
Antibiyotiğe direncin varlığını bildirirler

Moleküler testlerle bir antibiyotiğe karşı bir direnç mekanizmasının yok olduğunun saptanması, o mikroorganizmanın o antibiyotiğe duyarlı olduğunun kanıtı değildir; başka bir direnç mekanizmasının varlığı söz konusu olabilir!

MOLEKÜLER ANALİZ ÖNCESİ SORULAR

- Bir salgın söz konusu mu?
- Salgın ciddi mi?
- Mikroorganizmanın direnci yeni bir direnç mi?
- Kontrol için aynı patojenin duyarlı suşları mevcut mu?
- Analiz ne kadar sürecek?
- Sonuçları kim analiz edecek ? Sonuçların istatistiki bir önemi olacak mı?
- Moleküler veriler salgın yönetimini değiştirecek mi?
- Analizin maliyeti ne olacak?
- Hastane formülerinde alternatif antimikrobik ilaç var mı yoksa formülere yeni mi girecek?
- Hastane yönetimi de dahil olmak üzere ilgili bütün kesimlerin mediko-legal onayı var mı?

MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİ

- Hibridizasyona dayalı yöntemler (ribotipleme)
- Plazmit tiplemesi
- *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE)
- PCR'ye dayalı tipleme yöntemleri
- Nükleotit sekansa dayalı tipleme yöntemleri

RİBO TİPLENDİRME (RIBOTYPING)

- Agaroz jel elektroforezinde ayrılmış DNA fragmanları nitrosellüloz bir membran üzerine aktarılır (*blotted*)
- İşaretli, homolog DNA parçaları ile hibridizasyon uygulanarak (*Southern blotting*) hedeflenen genetik elemanlar aranır.
- Sıklıkla rRNA hedef alınır (*Ribotyping*)
- Ayırt edici gücü PFGE ve PCR kökenli yöntemlerden düşüktür

DNA HİBRİDİZASYONUNUN SINIRLILIKLARI

- Pahalı, gerçekleştirilmesi güç ve sorunlu
- Bireysel uygulamalarda sıklıkla kültürden daha az duyarlı
- Uygulamada radyoizotoplar gerekebilir

DNA HİBRİDİZASYONUNUN ÜSTÜNLÜKLERİ

- Patojenin üretilmesi ya da canlı olması gerekmez
- İleri derecede patojen ve üretilmesi güç mikroorganizmalar bakımından güvenli çalışma
- Restriksiyon endonükleaz analizindeki bant sayısını azaltır ve özgül olanları öne çıkarır
- Bakterilerin bireysel suşlarını ayırabilir
- Klinik örneklerde bol bulunan ancak üretilmesi güç patojenleri (CMV, Rotavirus, Papilloma virus, Klamidya ve Mikoplazma) saptayabilir
- Transpozon hareketini izleyebilir

PLAZMİT ANALİZLERİ

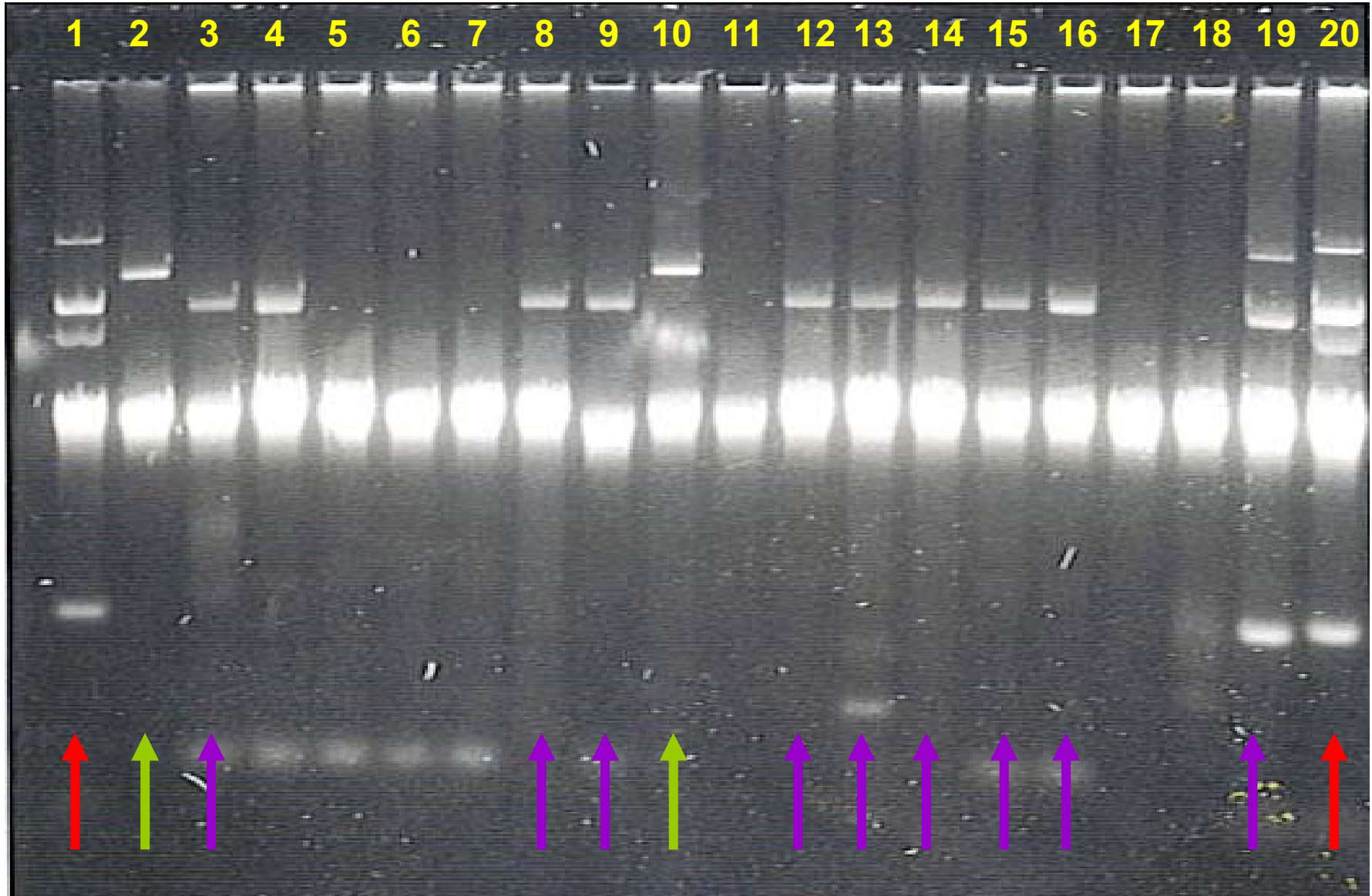
- Plazmitler prokaryot sitoplazmalarda, sıklıkla transfer edilebilen, ekstrakromozomal DNA elementlerdir ve kendi kendilerine replike olurlar
- Plazmit analiziyle tiplerede plazmit DNA'sı izole edilir ve agaroz jel elektroforezi yardımıyla plazmitlerin büyüklüğü ve sayıları karşılaştırılır
- Plazmit DNA'ları da restriksiyon enzimleriyle sindirilerek elektroforez sonrası karşılaştırılabilir
- Üç ya da daha fazla ortak plazmit bir ilişkiyi gösterir
- Aynı direnç genlerine sahip aynı tür izolatlarda farklı PFGE ve plazmit profilleri bir transpozon epidemisini düşündürür

PLAZMİT PROFİL ANALİZLERİNİN ÜSTÜNLÜKLERİ

- Birçok bakteri suşu için uygulanabilir
- Bütün analiz 1 günde tamamlanabilir
- Bir defada 24 ya da daha fazla kültürle çalışma yapılabilir
- Gen sergilenmesi (yüzey antijeninin ya da özgül proteinin üretimi vb) gerekli değildir
- Serotipleme için ileri derecede bozulmuş (*rough*) kültürler kolaylıkla analiz edilir
- Mikroteknikler reagentlerden ve yerden tasarruf sağlar
- Hızlı, ucuz ve yinelenir sonuçlar verir

PLAZMİT PROFİL ANALİZLERİNİN SINIRLILIKLARI

- Epidemik suş plazmit DNA içermeyebilir ya da plazmidi izole etmek güç olabilir
- Salgınla ilişkisi bulunmayan suşlar epidemik bir profile sahip olabilirler
- Bir plazmidin saptanması, onun özgül bir faktörü (toksin, antijen ya da direnç) kodladığının kanıtı değildir
- Birçok plazmit (özellikle R plazmitleri) kolaylık kaybolur ya da edinilebilir
- Plazmitler de yeniden düzenlenmeye uğrayabilirler
- Kromozom dışı elementler olarak plazmitler mikroorganizmanın stabil bir genotipini yansıtmazlar



Salmonella türlerinin plazmit profil analizi

Kolon 1 ve 20, standart plazmit (yukarıdan aşağıya 98, 42, 23.9 ve 4.6 MDa).

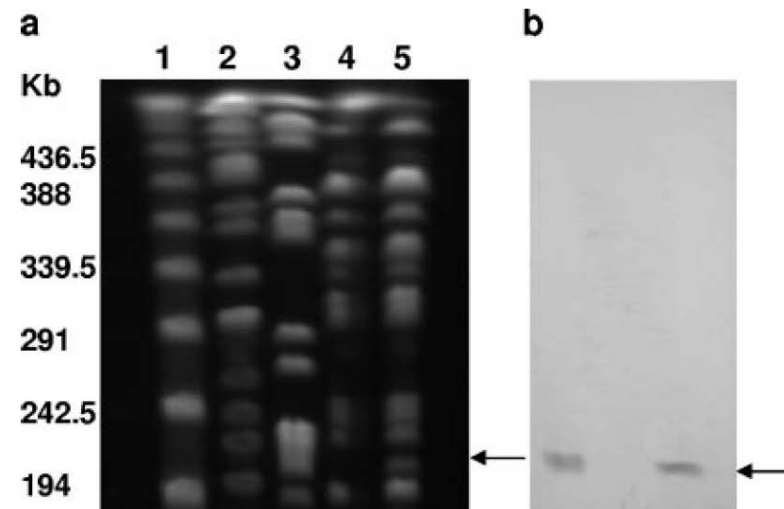
Kolon 2 ve 10 *S. Typhimurium*'un 60-MDa virulans plazmiti ,

Kolon 3,4,8,9,12-16 and 19 *S. enteritidis*'in 38 MDa virulans plazmiti. (Aktaş Z et al: 2007)

First Report of Plasmid-Mediated Resistance to Quinolones and Cefotaxime in an *Enterobacter cloacae* Strain Isolated from an Outpatient in Brazil[▽]

Recently, low-level quinolone resistance has been associated with DNA acquired from transferable plasmids. Several studies showed a worldwide dissemination of QnrA determinants among enterobacterial isolates (1, 5). However, the presence of the *qnr* gene in clinical isolates from outpatients has not been hitherto reported for Brazil. The aim of this study was to determine the occurrence of the *qnr* gene in enterobacterial isolates from outpatients in a private laboratory located in Juiz de Fora, state of Minas Gerais, Brazil, and to analyze the transferability and the structure of plasmid DNA adjacent to the *qnr* gene.

A total of 257 unique nalidixic acid-resistant enterobacterial isolates were collected between January 2000 and May 2005. The presence of the *qnr* gene was investigated by the colony



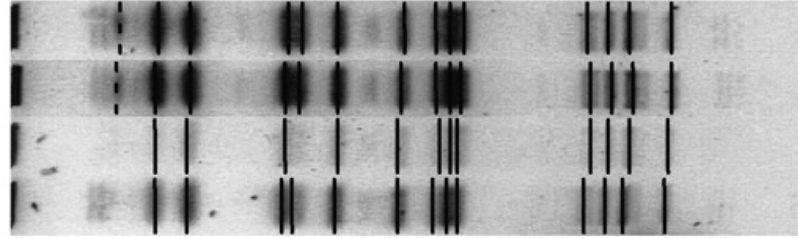
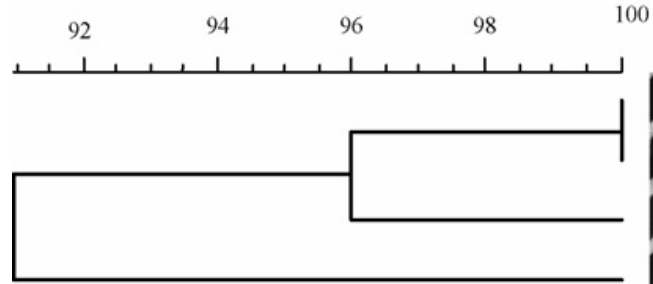
PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE)

- *Restriction fragment length polymorphisms* (RFLPs) yöntemleriyle ayrılan DNA parçaları genellikle konvansiyonel agaroz jel elektroforezinde ayıramayacak kadar büyüktürler (40-50 kb'dan büyük olanların göçü sorunludur)
- PFGE'de elektrik alanının yönü periyodik olarak değiştirilir
- PFGE ile 1000 kbp'den daha büyük DNA parçaları kolaylıkla ayrılabilir

PFGE

- Mikroorganizmanın genetik komponentinin sadece küçük bir bölümü analiz edildiğinden özdeş sonuçları veren izolatlar “özdeş izolatlar” olarak değil “ayrıt edilememiş” olarak bildirilir
- Üç fragmandaki bant kalıbı farklılığı tek bir genetik olayı ifade edebileceğinden, bu durumda olan izolatlar “birbiriyle ilişkili”; üçten fazla bant kalıbı farklılığını içerenler ise “zayıf ilişkili” olarak değerlendirilir

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
zerrinPFGE



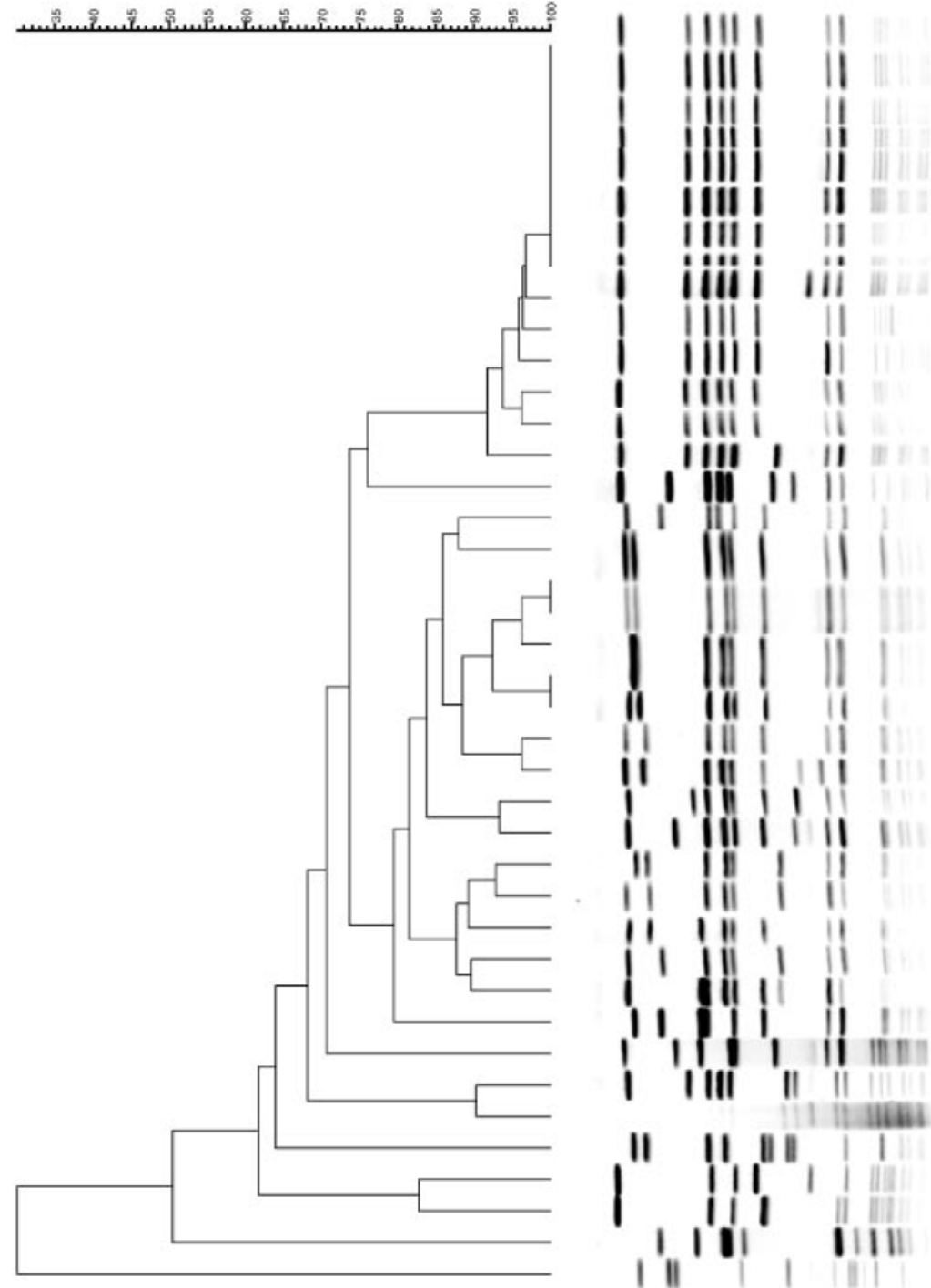
Isolate
Number

.14	S.typhimurium
.18	S.typhimurium
.11	S.typhimurium
.3	S.typhimurium

Çok ilaca dirençli S. Typimurium suşlarından Xbal ile sindirilmiş genomik DNA'nın PFGE analizi

(Aktaş Z et al: 2007)

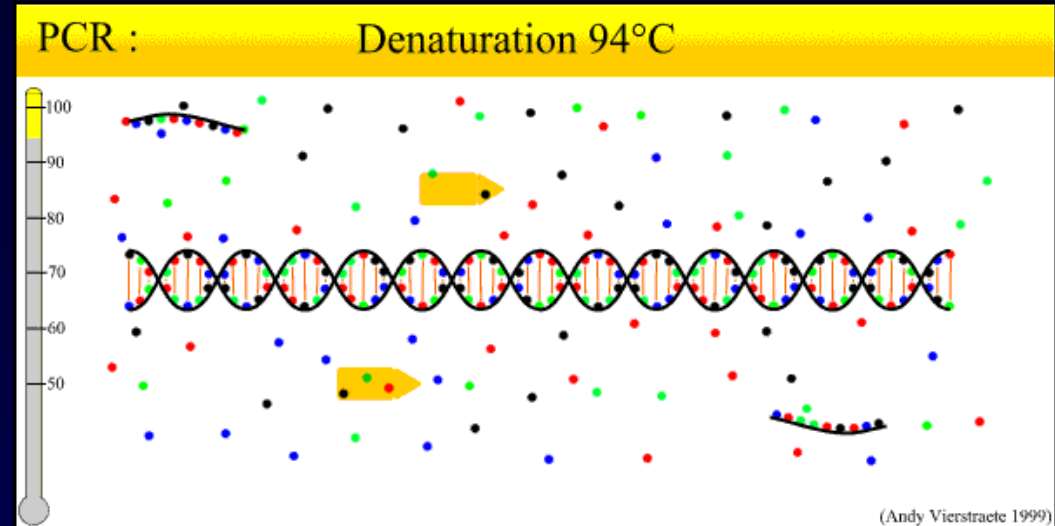
Toplumda edinilmiş MRSA izolatlarının PFGE ile analiz dendrogramı



(Singh A et al: 2006)

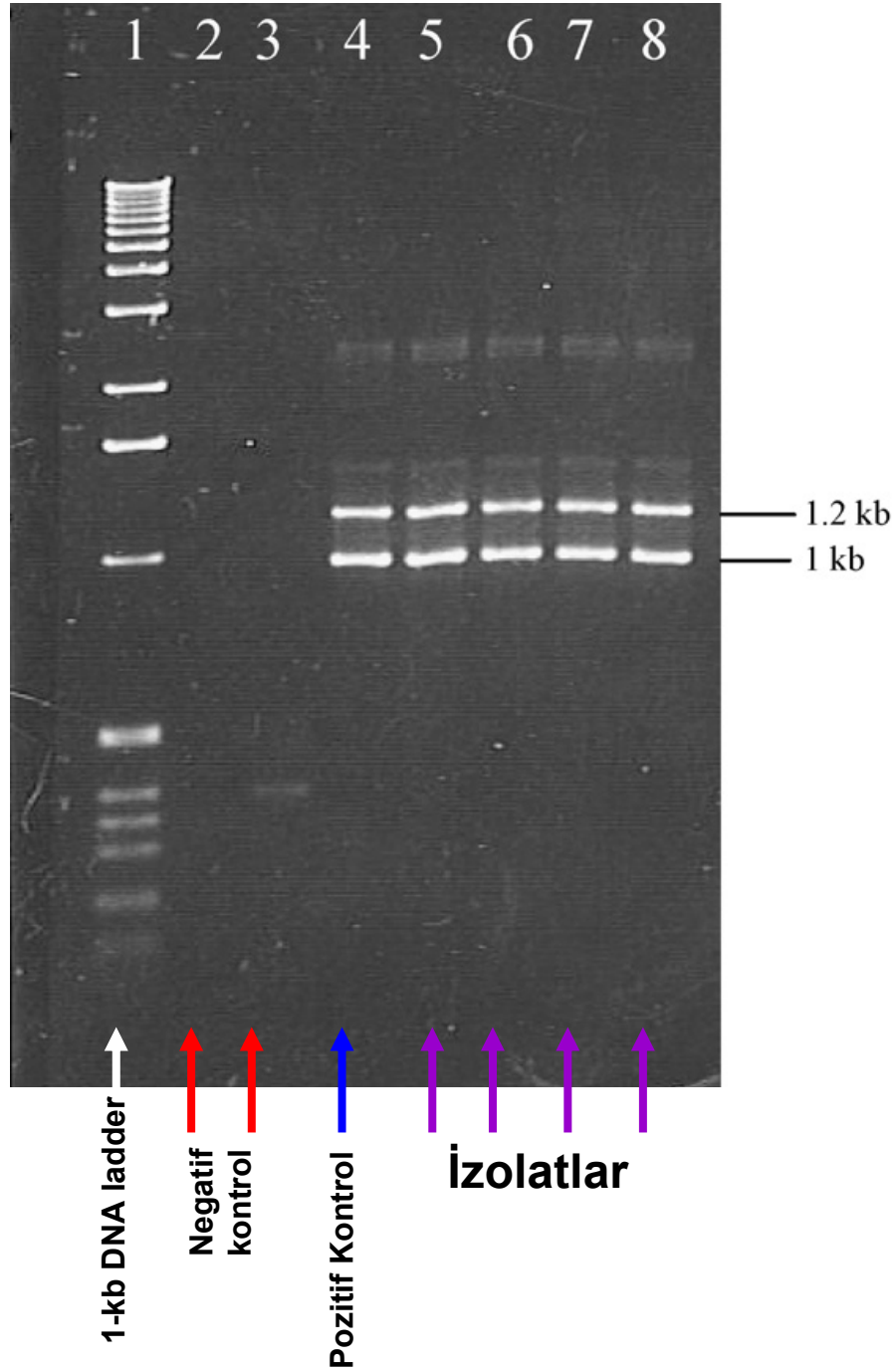
PCR

- *Multiplex PCR*
- *Nested PCR*
- *AP-PCR (Arbitrarily primed PCR)*
- *AFLP (Amplified fragment length polymorphism)*
- *VNTR (variable-number tandem repeat)*
- *Spoligotyping*

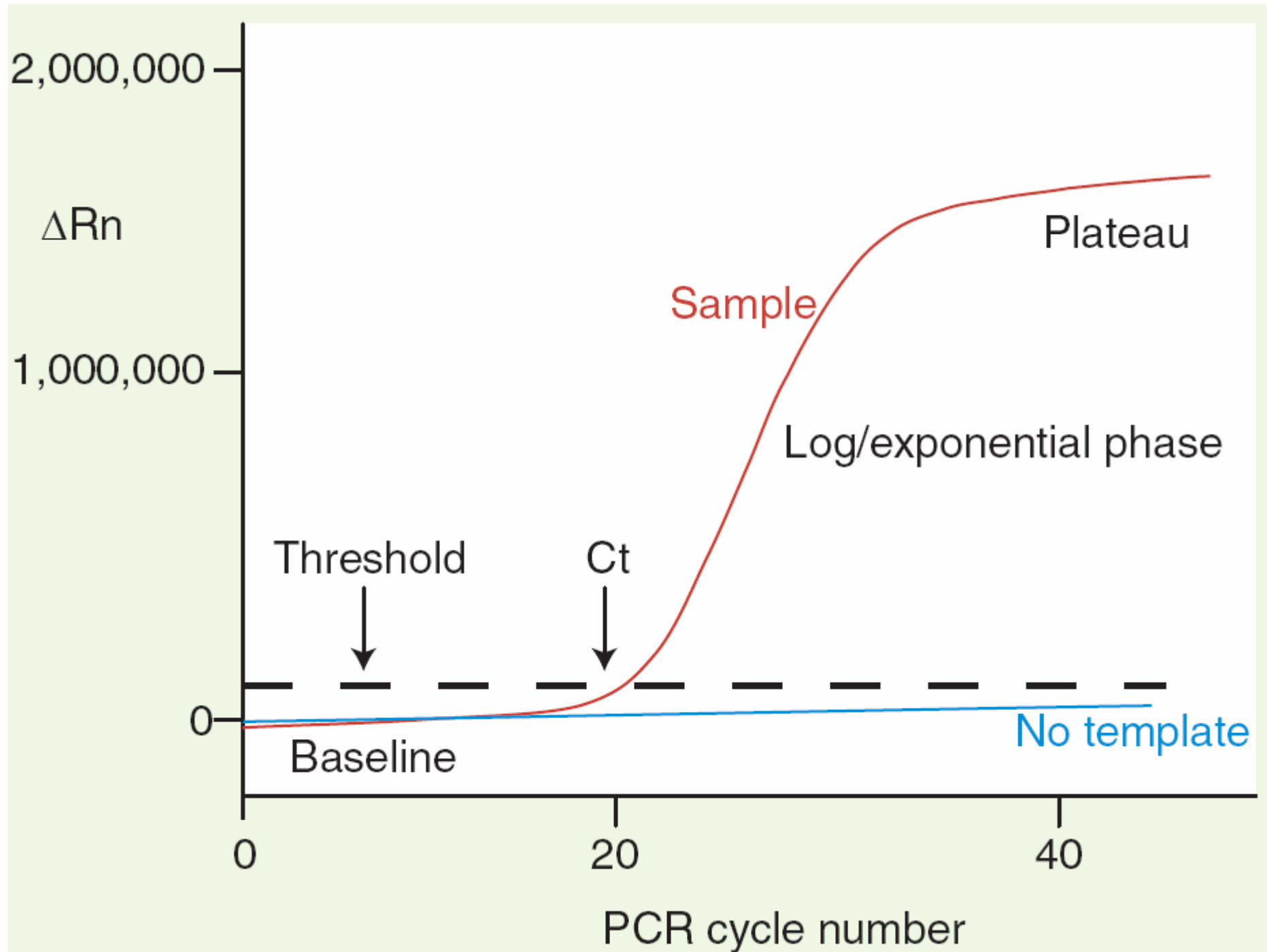


EPİDEMİYOLOJİK İNCELEME VE PCR'ın YARARLARI

- Özgül mikroorganizmaların doğrudan tiplenmesi
- Toksin, virulans faktörü ve antibiyotik direncini kodlayan genlerin saptanması
- Hızlı tanı
- Az sayıdaki mikroorganizmanın gösterilmesi
- In vitro yavaş üreyen ya da hiç üremeyen mikroorganizmaların gösterilmesi
- İnfeksiyon etkenine karşı bir antikor gelişimini gerektirmemesi
- Aktif replikasyonu gerektirmemesi
- İzlenmesi güç patojenlerin bulaşma şekillerinin ve kaynaklarının incelenmesine olanak tanınması
- Vücut sıvılarındaki (BOS, göz sıvısı, fetal kan) mikroorganizmaların saptanması

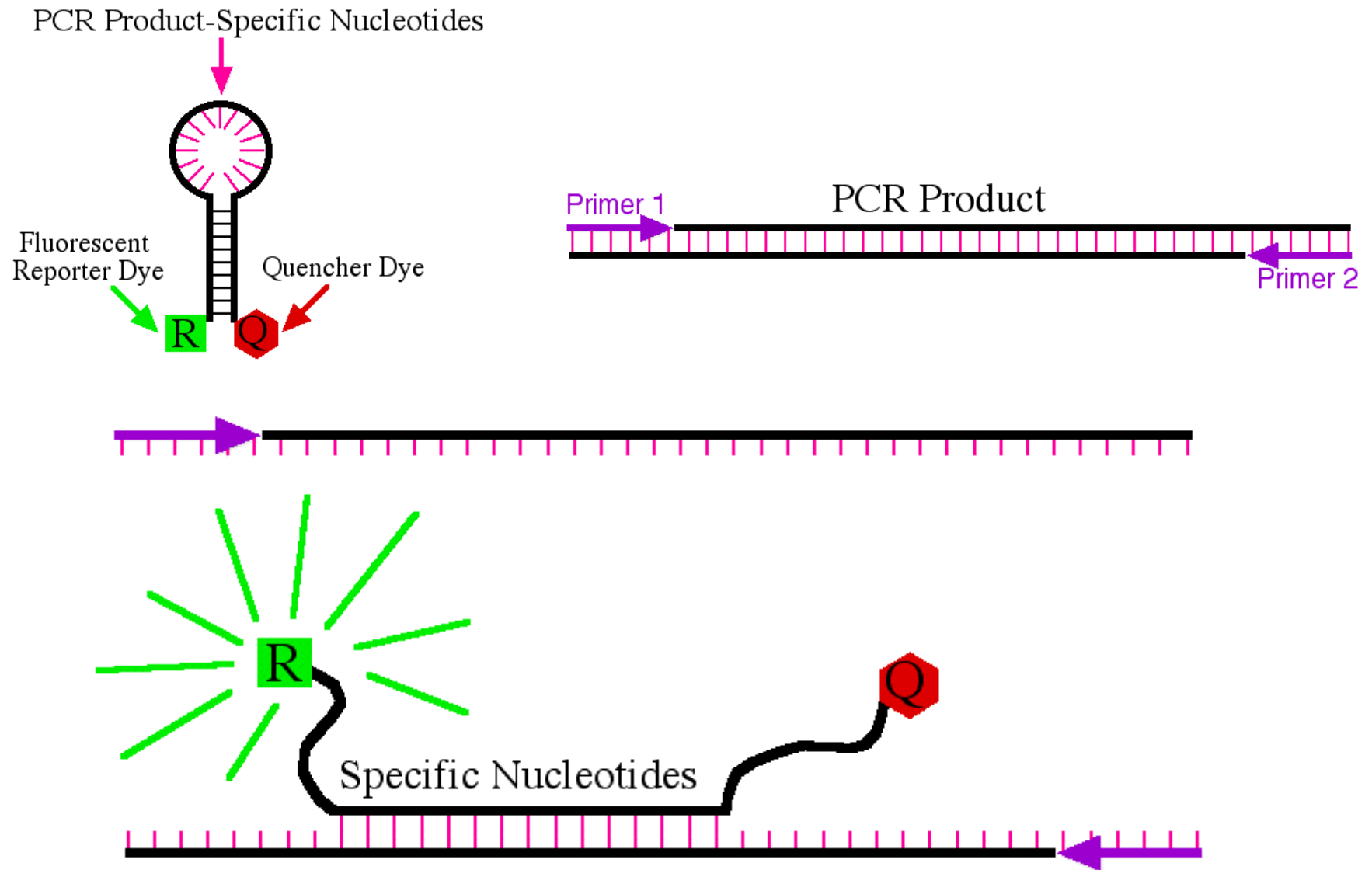


**Dirençli suşlarda Class I
integron'lara uygun
primerlerle
gerçekleştirilen PCR
çoğaltım ürünü**



REAL-TIME PCR

- Bir moleküler *beacon* kendi üzerinde katlanan bir molekülün iç tarafında tanıma sekansı olan tek iplikli bir *prob*'dur. Bir ucunda bir *reporter*, öteki ucunda bir *quencher* bulunur.
- *Prob*, komplementer bir nükleik asit sekansına sahip bir PCR ürünüyle temas geldiğinde açılır, böylece floresans reporter *quencher*'dan ayrılarak floresans bir sinyal verir.
- Biriken floresans sinyaller ölçümlenir.



MOLECULAR BEACONS

REAL-TIME PCR

- Reaksiyon tüplerinin açılmasına gerek yoktur
- çoğaltılmış ürünün saptanması için agarozda yürütülmeye gerek yoktur
- Reaksiyon sürerken değerlendirme yapılır (gerçek zamanlı)

NÜKLEOTİT SEKANSINA DAYALI ANALİZLER

- **SLST** (*single-locus sequence typing*): Aynı tür içindeki farklı suşlardaki özgül bir gen lokusu (virulans, patojenite ya da direnç geni vb) tek nükleotit polimorfizmlerine sahiptir
- **MLST** (*multi-locus sequence typing*): SLST'ye göre genomun daha büyük bir bölümünü temsil eder ve genomu temsil yeteneği daha büyüktür

clade cladistic analysis

tags Clone, Clonal, Clonality

bootstrap analysis discrete typing units

Genetic distance

clonet

ecotype

Biologic species

Phenotypic species

Phylogenetic species

Linkage

disequilibrium

isoenzyme

species, subspecies, strains

KAREN BUSCH: 2004

“... Araştırma laboratuvarlarındaki direnç tanımıyla klinik laboratuvarlardaki direnç tanımını dikkatle ayırmamız gerekir. Klinik laboratuvarlarda hastaya zararlı olmaksızın hekimlere uygun kılavuzluğu sağlamak önemlidir.”

“... Aramızdaki moleküler mikrobiyologlar için cazip olmasına karşın, mutasyonlara ilişkin veriler, büyük olasılıkla, çok sayıda alleli içeren direnç mekanizmaları bakımından tüm öyküyü anlatmayacaktır.”

PIRNAY J-P et al: 2003

- “...Modern tıp ve bilim, sanat ve spora benzer şekilde, bir iş alanı olmuştur: hekimler, hastanedeki klinisyenler, eczacılar, bilim adamları, politik temsilciler ve hastalar tüketimciliğin yolsuzluk güçleriyle karşı karşıyadır.”
- “...Bu yüzden, toplumsal nedenler, büyük olasılıkla, çoğul dirençli bakterilerin ortaya çıkması için gerekli koşulların lehinde katkıda bulunmaktadır.”
- “...‘Süper mikrop’ların ortadan kaldırılmalarının kolay bir yolu olmasa da onları sınırlandırmak ve baskı altına almak, bu modern yaşam sirkinde bile mümkündür: çıkış yolu parazitlerimizle birlikte evrilmeyi öğrenmekten geçmektedir.”

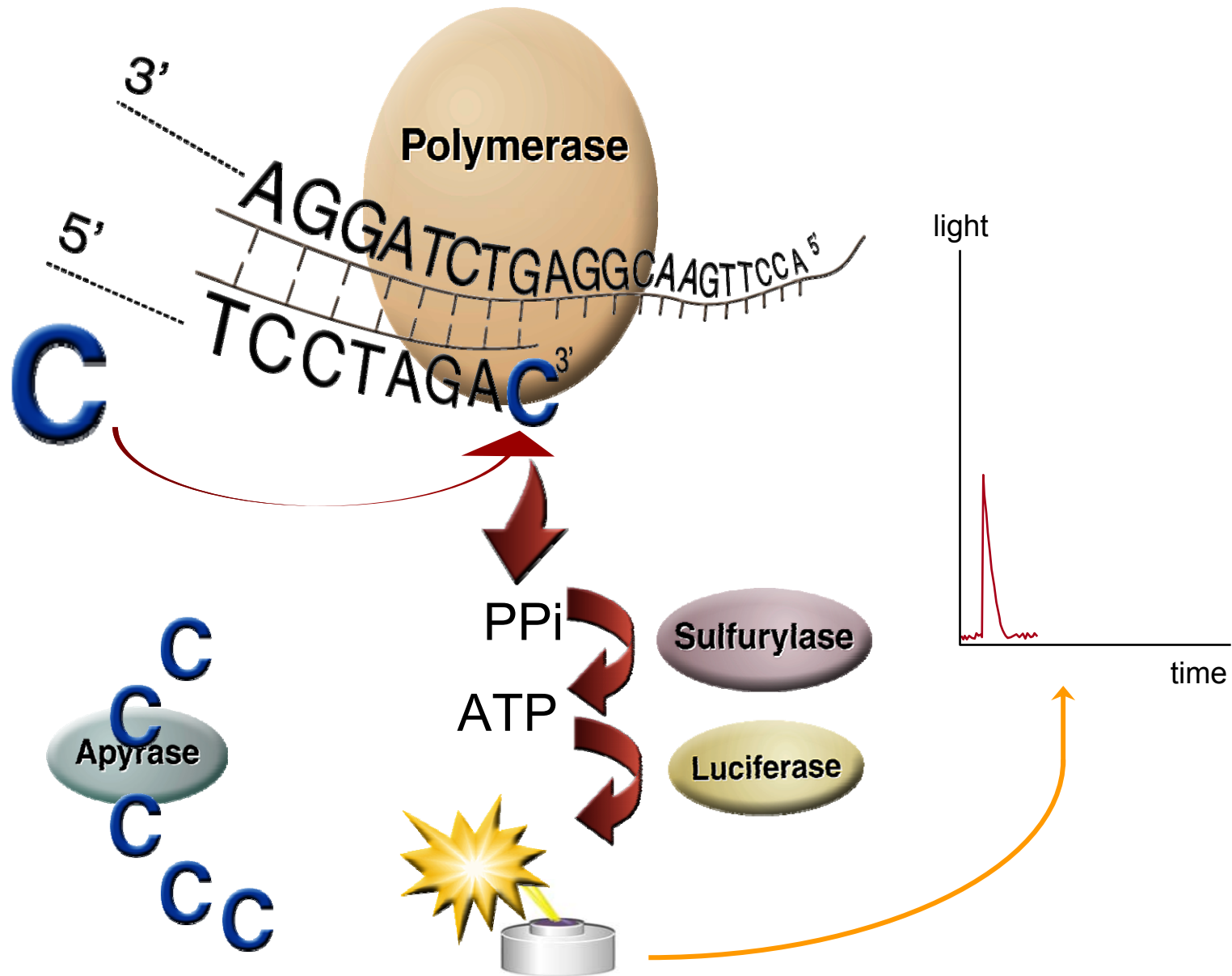
MİKROBİYOLOJİDE PYROSEQUENCING

- Bakteri tür tanısı
- Antimikrobiyal direnç (özellikle tek nükleotid mutasyonlarına bağlı: örneğin, *M. tuberculosis*)
- Mantar tür tanısı
- Virus tanısı, viral yük, direnç

PYROSEQUENCING

- Tek iplikli PCR ürününe nükleotit bir primer eklenerek, DNA polimeraz yardımıyla, DNA sekanslama işlemi başlatılır
- Nükleotid yerleşiminde açığa çıkan inorganik pirofosfat (PPi), ATP sulfürlaz yardımıyla ATP'ye dönüştürülür
- ATP lüfiferaz yardımıyla lüfiferini oksitler ve ışık oluşur
- İnkorpore olmayan nükleotidler, bir sonraki nükleotid eklenmesi işleminden önce, apiraz yardımıyla degrade edilirler

Pyrosequencing™ technology



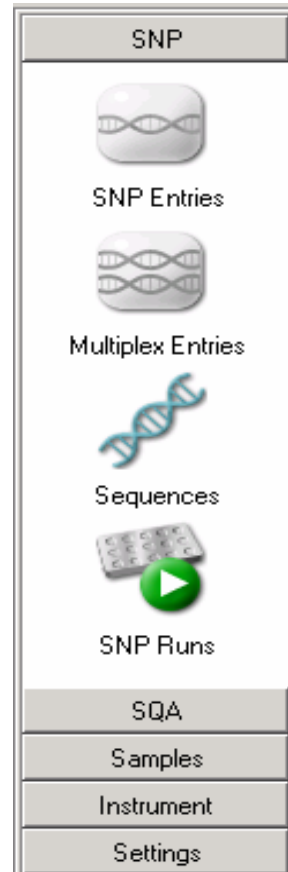
PIROSEKANSLAMA PLATFORMU



Sample Preparation



Reagent Kits



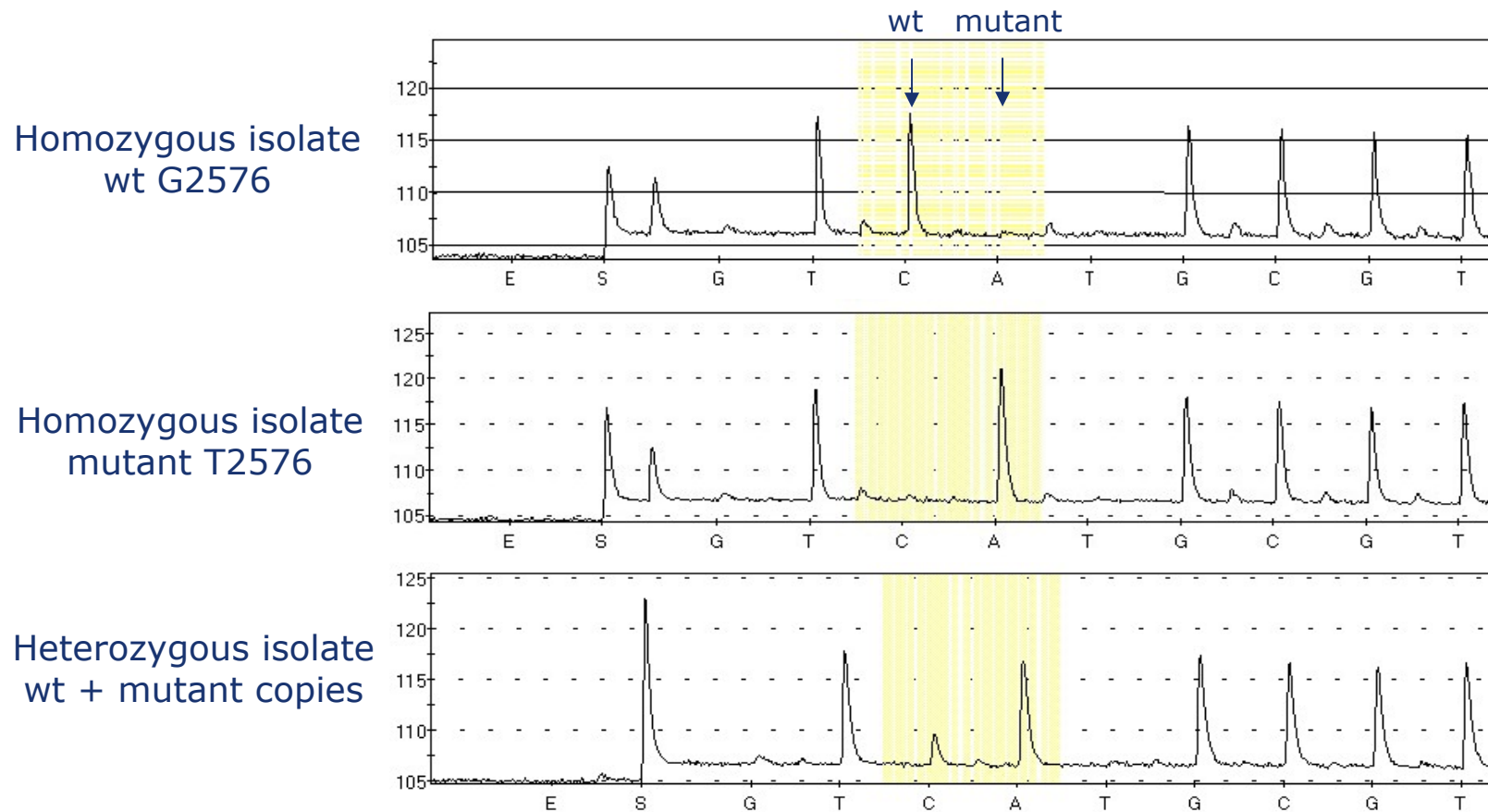
Software



Instrumentation

Specific Resistance Mutation: Linezolid resistance in *Enterococci*

Quantification of mutated alleles using Pyrosequencing



ÇALIŞMA ALANLARI

Genetik Varyasyon

- SNP
 - Üç ve dört alleli SNPler
 - Multipl SNPler
 - *Multiplexing*
- Haplotip
 - *Out-of-phase*
 - Allele özgül PCR

Kantifikasyon

- Allel sıklığının kantifikasyonu (AQ)
- İnsersiyon/delesyon sıklıkları
- Heterozigotluk yitimi
- Trisomi
- CpG-metilasyon
- Poliploid genomlar
- Viral yük

Mutasyon Analizleri

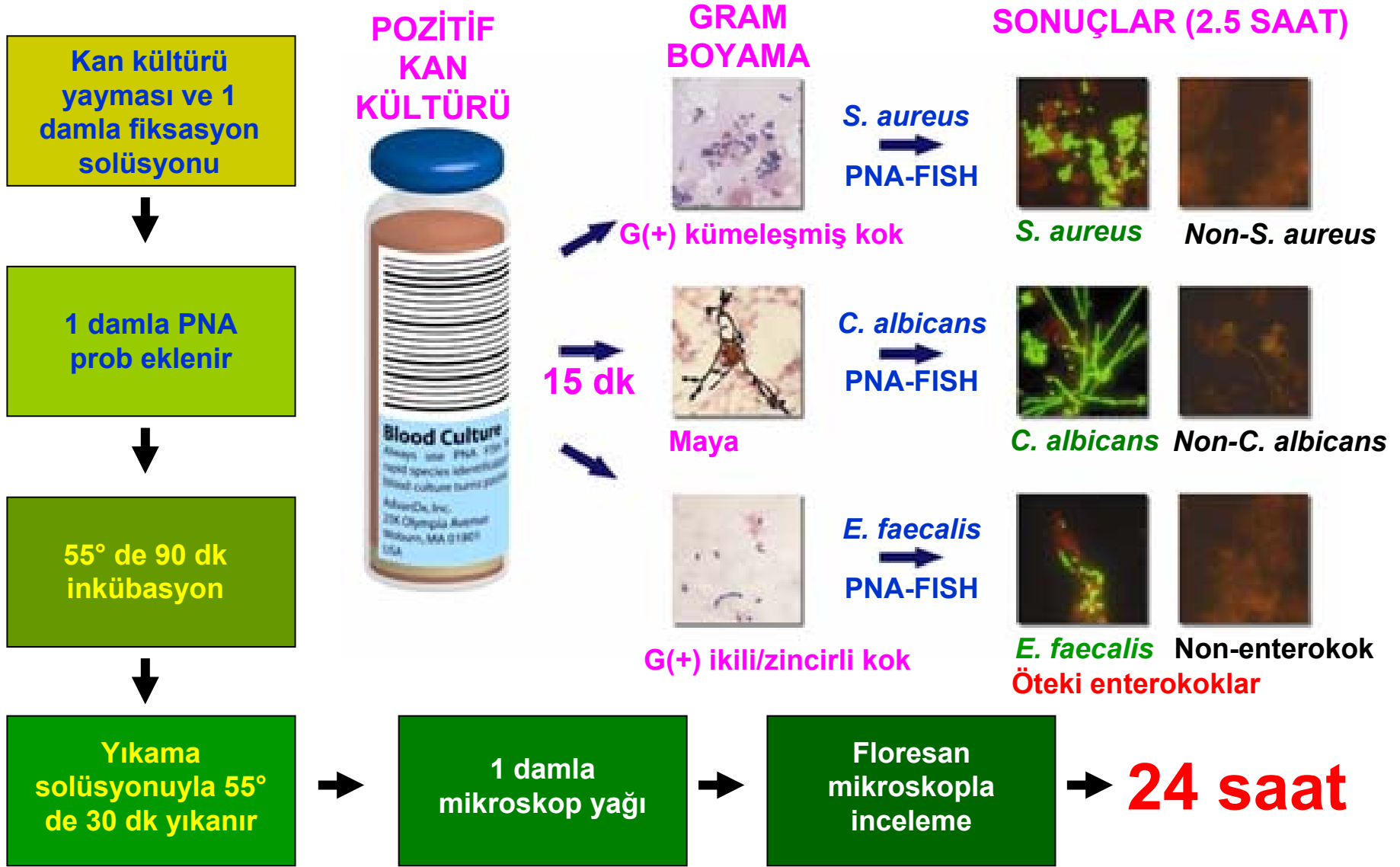
- Bilinen pozisyonlar
- "Hot spot"lar içerisinde bilinmeyen pozisyonlar
- Nokta mutasyonlar
- İnsersiyonlar/delesyonlar
- Çoğul mutasyonlar
- *Multiplexing*

Sekans Analizleri

- Ekspresyon profillemeye
- Viral/bakteriyel/fungal tiplene
 - 16S DNA sekanslama
 - Antibiyotik direnci
- Transgenetik
- Klonlanmış DNA
- mtDNA

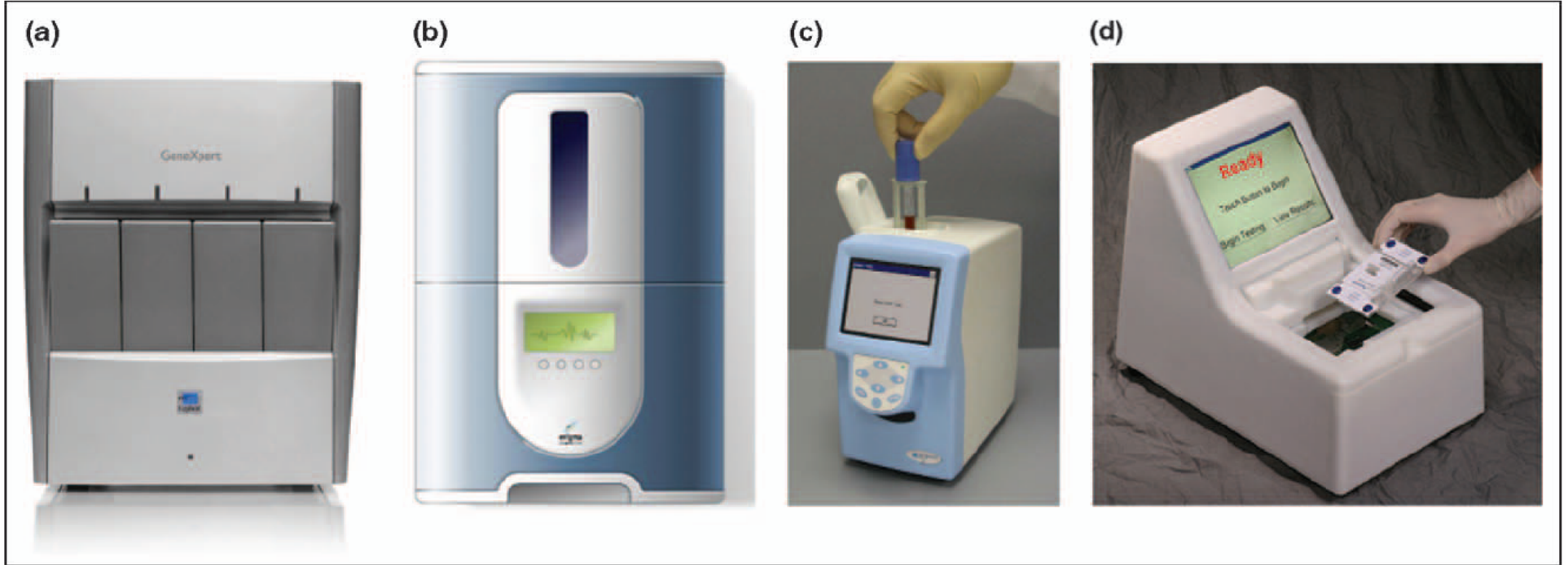
PEPTIDE NUCLEIC ACID FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION (PNA-FISH)

- Peptit nükleik asitler, floresan *reporter* moleküllerle birleştirildiklerinde hızlı, özgül ve güçlü affinite gösteren hibridizasyon kinetiklerine sahiptirler
- PNA proplar DNA proplarının taklitleridir, nötral bir omurgaya sahiptirler, bu nedenle de biyostabildirler
- PNA'nın DNA'ya göre göreceli hidrofobik özelliği, standart yayma preparatlarında hidrofobik hücre duvarını penetre etme yeteneği kazandırır
- Hedef genellikle rRNA'dır



PNA-FISH UYGULAMASI

HASTA BAŐI MOLEKÜLER TANI TEST SİSTEMLERİNE ÖRNEKLER



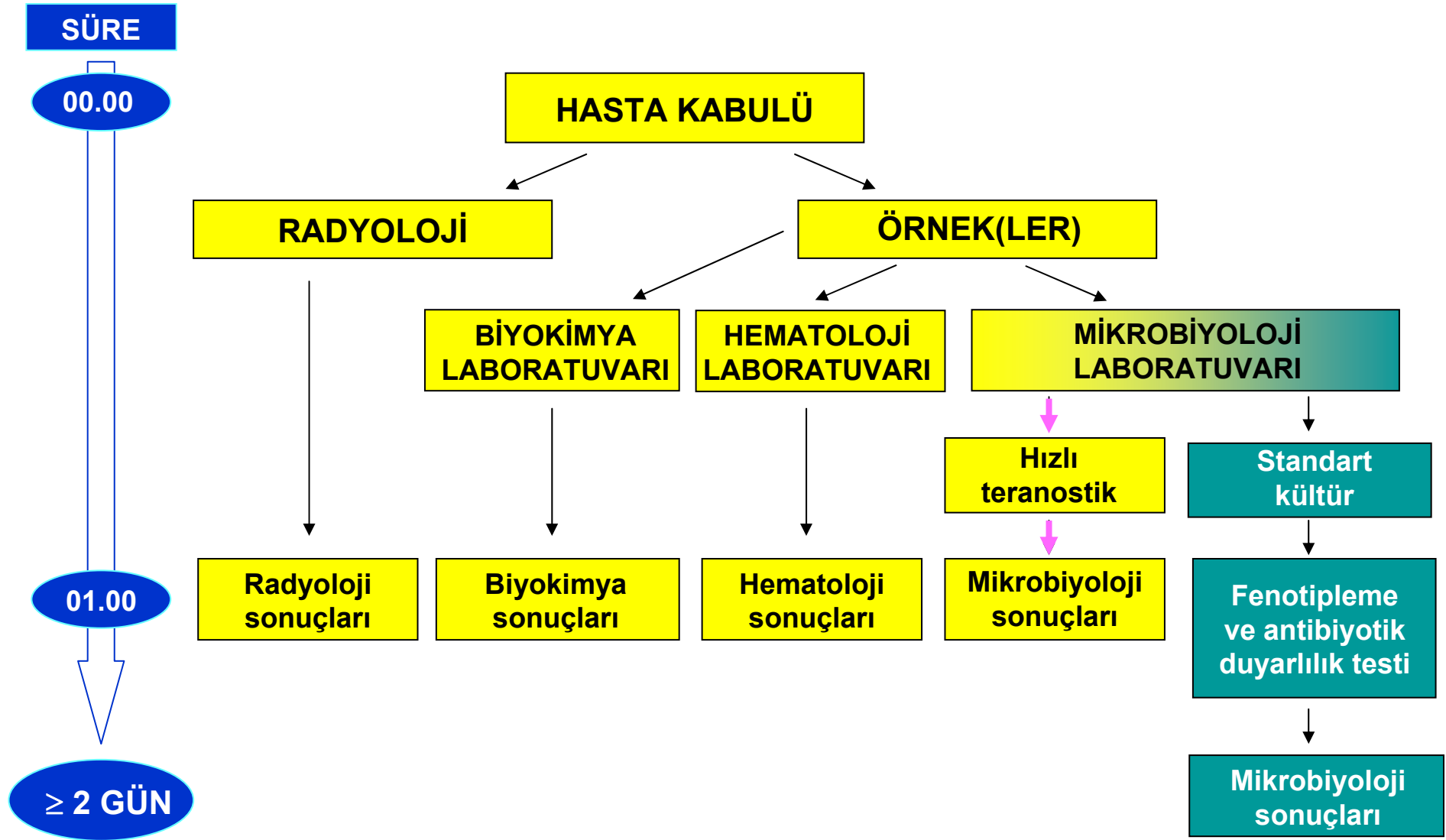
(a) Cepheid, GeneXpert®

(b) Enigma Diagnostic Ltd, PCR-Light®

(c) IQ^{uum} Inc., Liat™ Analyzer

(d) HandyLab™ Inc., portable analyzer

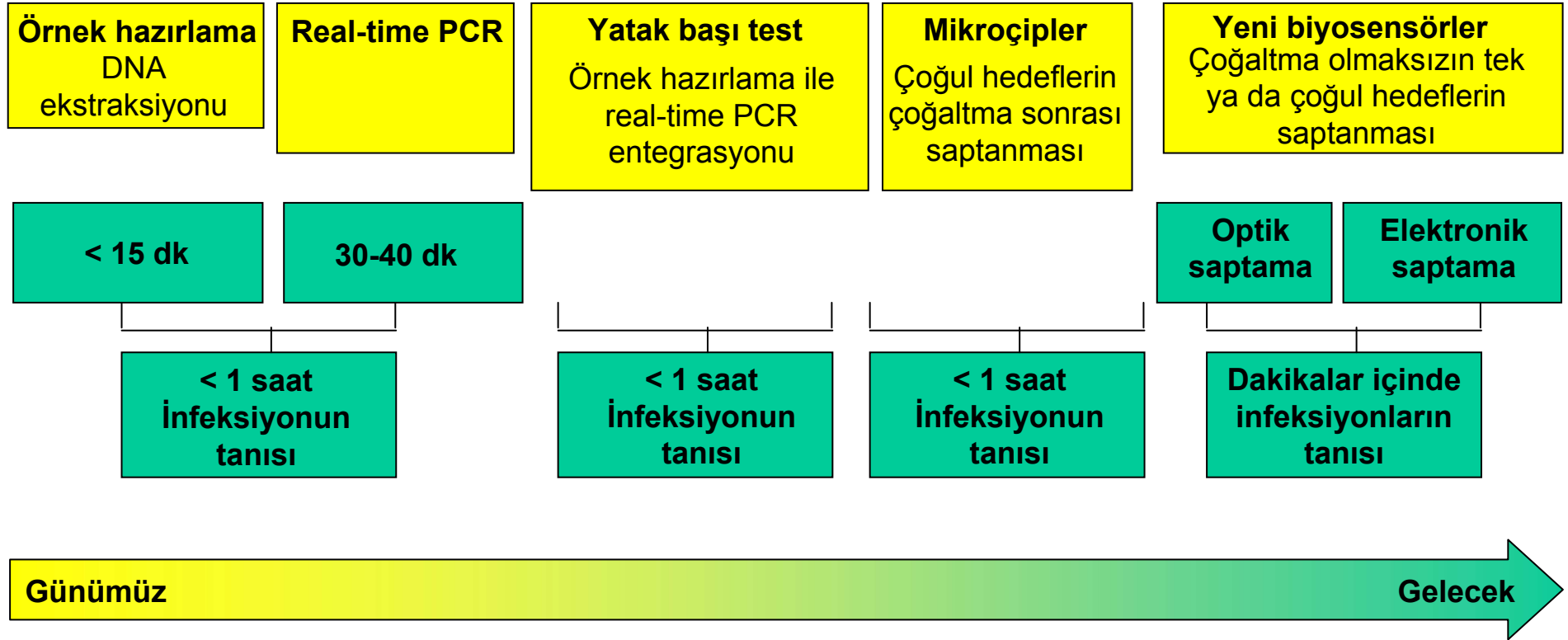
(Holland CA, Kiechle FL: 2005)



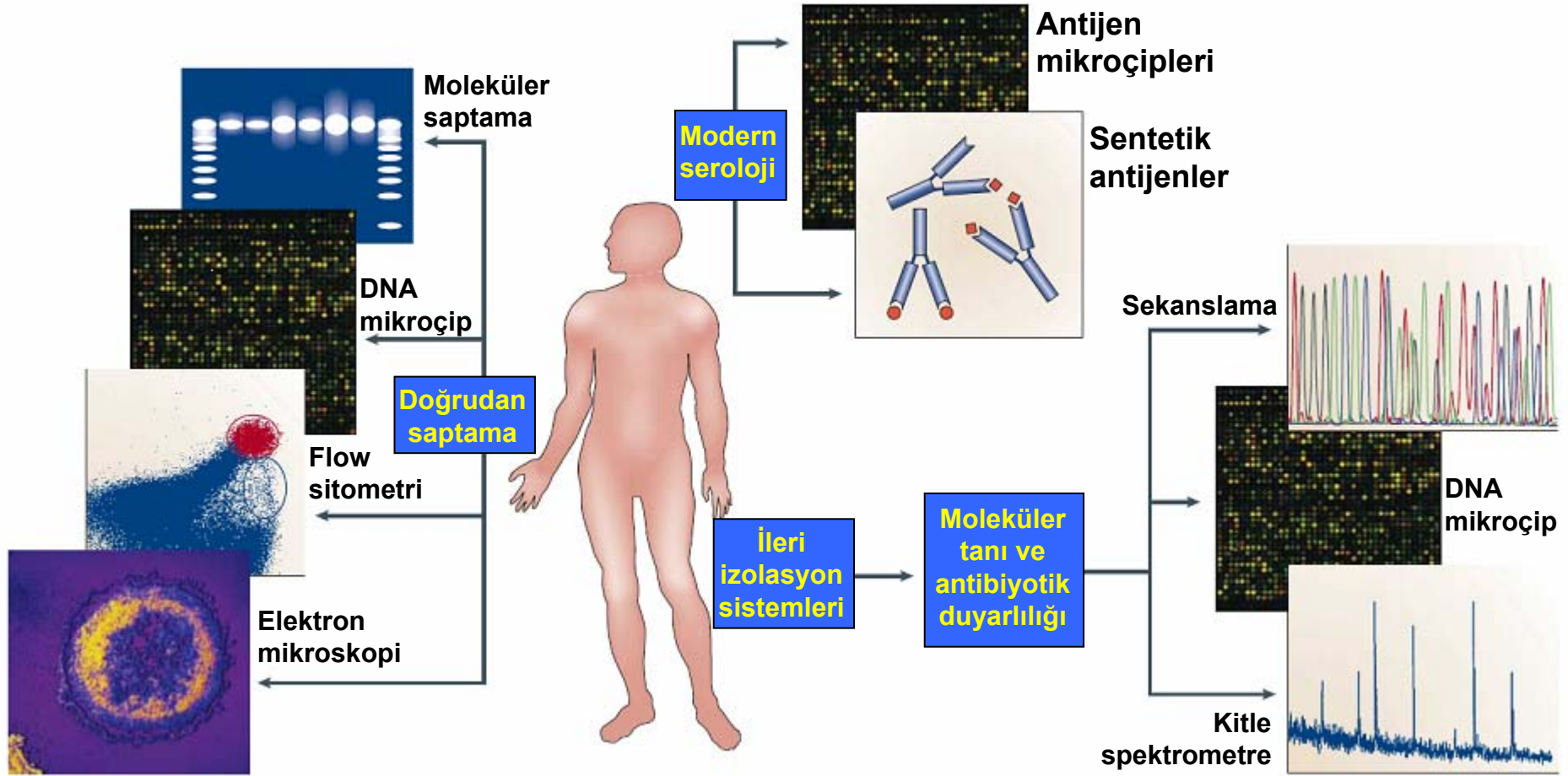
İNFEKSİYON HASTALIKLARINDA HIZLI MOLEKÜLER TERANOSTİK

(Picard FJ, Bergeron MG: 2002)

DNA'YA DAYALI TERANOSTİK TEKNOLOJİLERİN GELECEĞİ

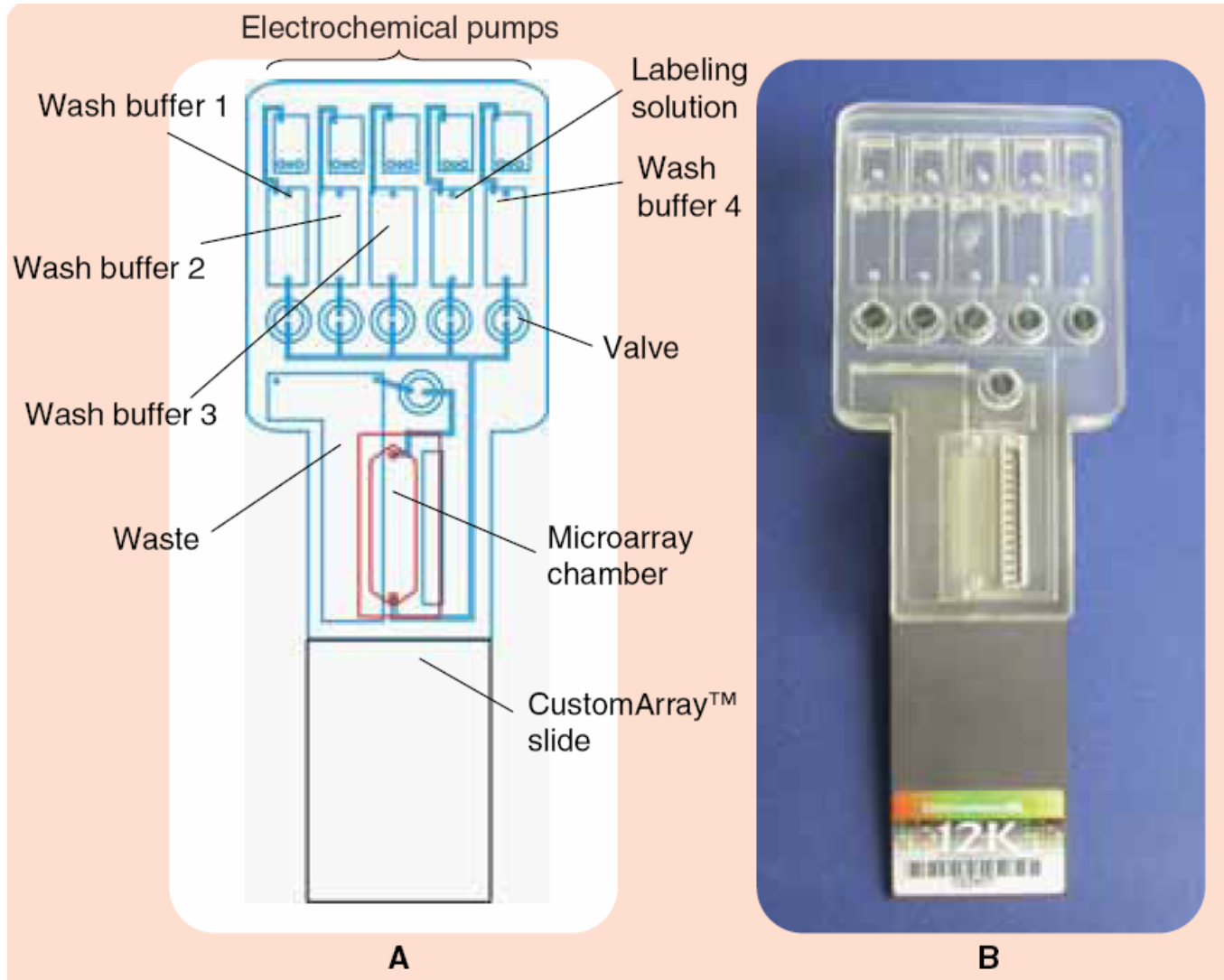


(Picard FJ, Bergeron MG: 2002)



İNFEKSİYON HASTALIKLARININ TANISINDA MODERN YÖNTEMLER

(Raoult D et al: 2004)



MİKROFLUIDİK ÇİP

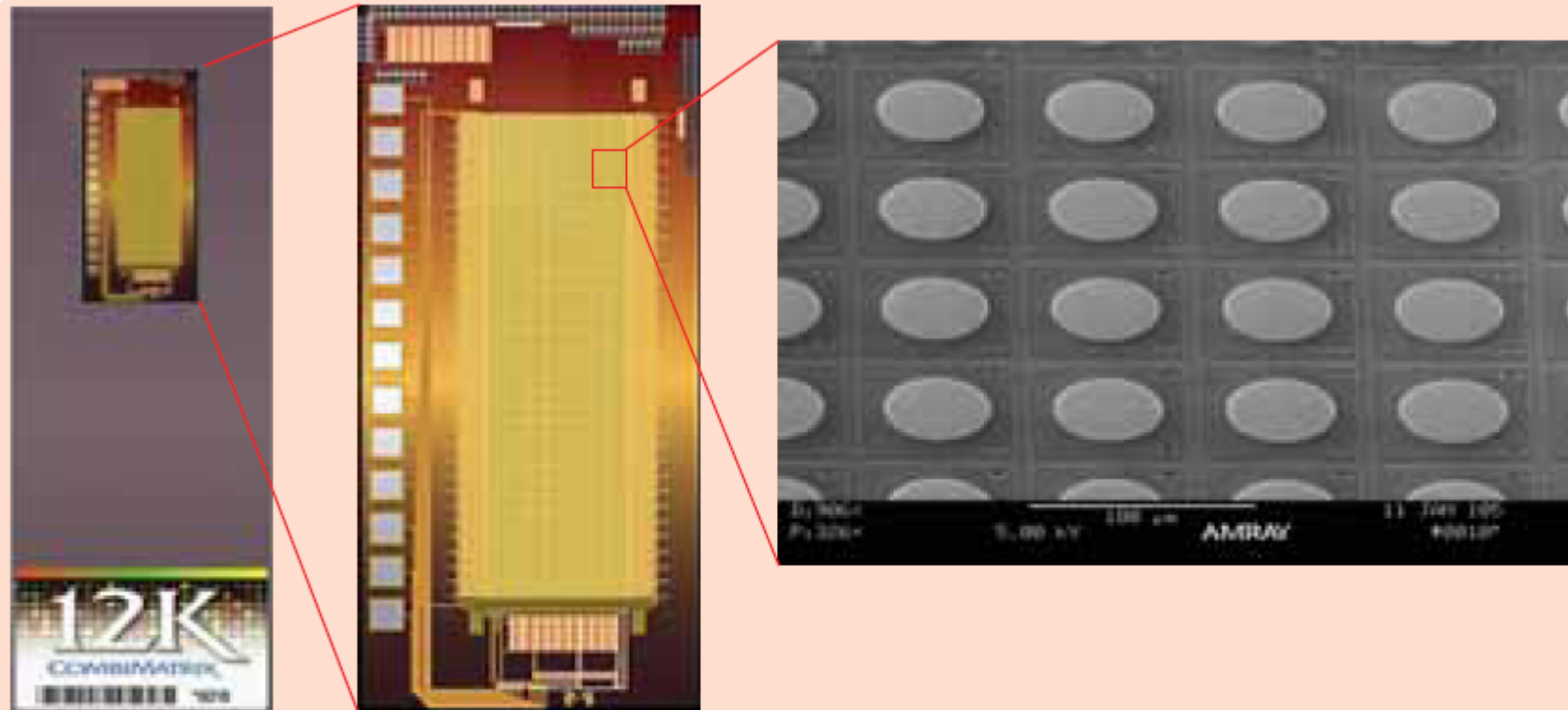
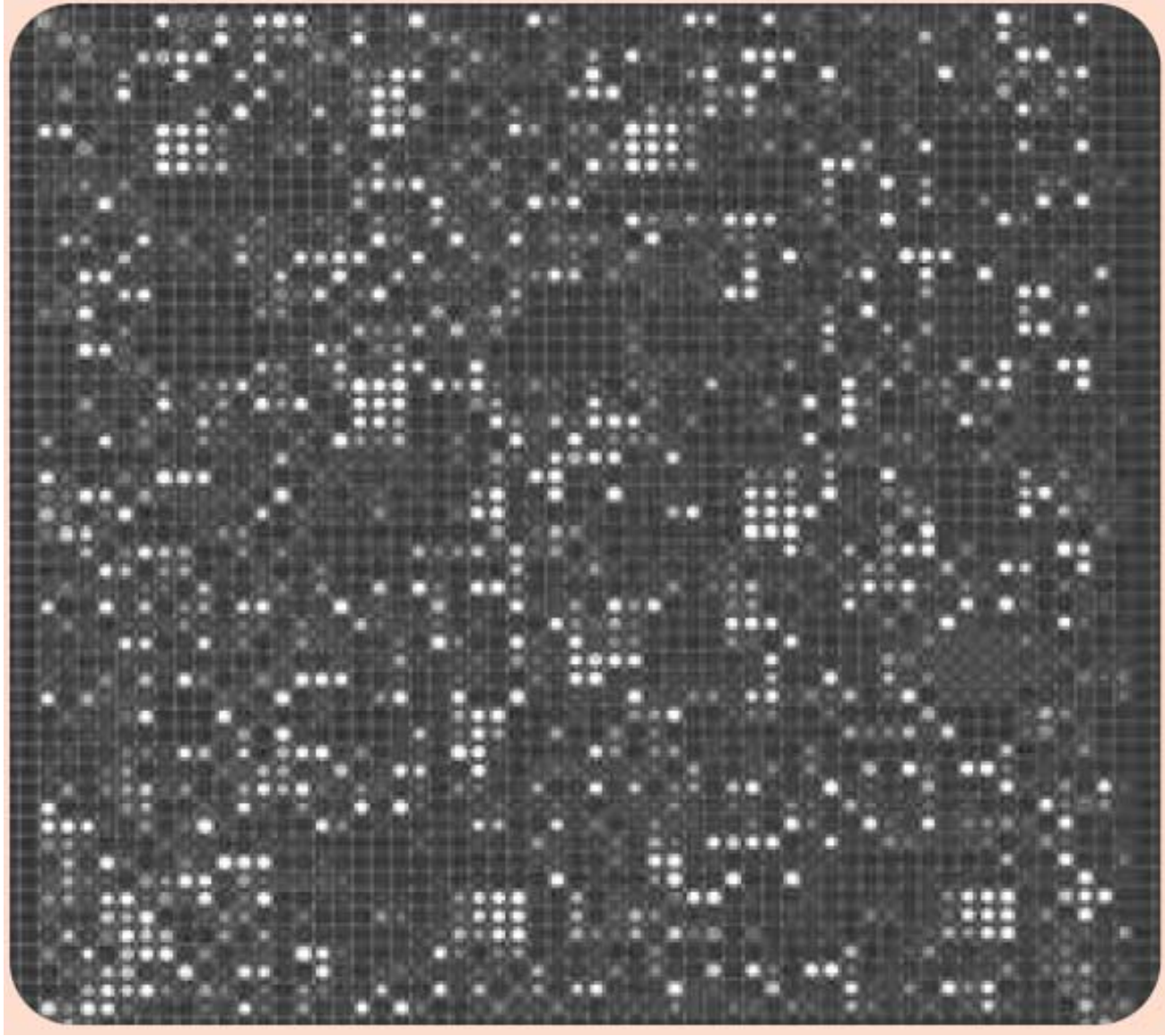
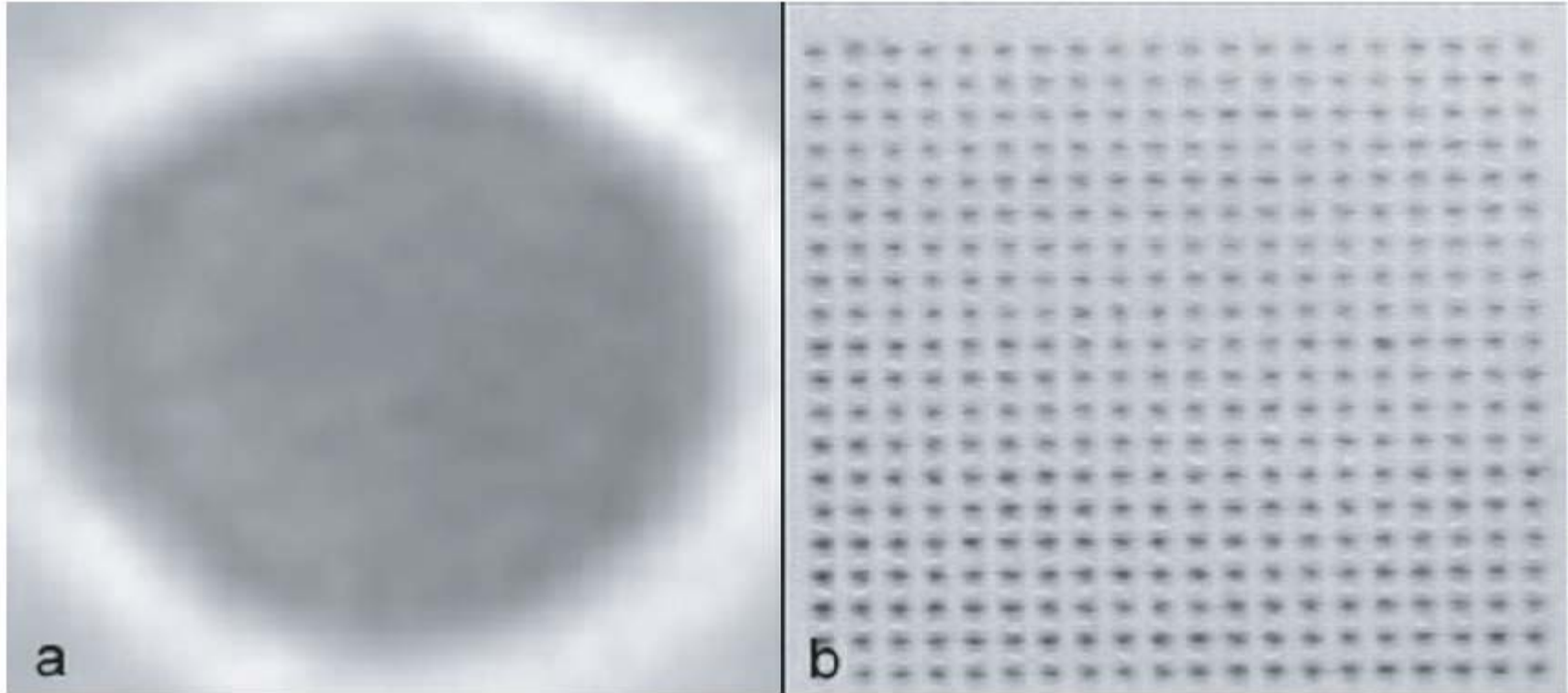


Figure 2. Photographs and scanning electron microscope image showing the commercial 12K CustomArray™ with 12,544 microelectrodes mounted in a 1 × 3 inch slide. Each microelectrode has a size of 44 μm in diameter. The 13 silver pads on the left of the silicon array chip provide electrical connections required for communication with the microelectrode array (large rectangle in the middle of the chip).



Hibridizasyon ve post-hibridizasyon süreçleri sonrasında mukrofluidik çipi gösteren floresan tarama görüntüsü



MİKROÇİPLER - NANOÇİPLER

1

400

HASTA

KLİNİK ÖN TANI

LABORATUVAR TANI

HASTA TEDAVİSİ

Mikroplar ve direnç profili

- Virus, bakteri, maya, fungus, parazit
- Toksin üretiminde genetik kapasite

Antimikrobiyal tedavi

+/-

Antitoksin tedavi

+/-

İmmünogenetik profilin belirlenmesi

HLA, CCR2, CCR5, SLC11A1
allelinin ve/veya IL-12-IFN- γ ekseni
genlerinin genotiplenmesi

Sitokinlerin ya da biyolojik yanıt
değiştiricilerin birlikte verilmesi

+/-

İlaç metabolizma profilinin belirlenmesi

Evre I (*CYP450* ve *FMO*) ve/veya
Evre II (*NAT, UGT, MT* ve *ST*) ilaç
metabolizması gen allellerinin
genotiplenmesi

Yanıt toksik ise ilacın dozunda
değiştirme

Yanıt yoksa ilaç tedavisinde
değiştirme