

ETKEN BELİRLEMEDE KLASİK YÖNTEMLER, MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Doç. Dr. Gönül ŞENGÖZ

9 Mayıs 2014

DM ve diyabetik ayak

«1960 yılından sonra doğan her iki kadından biri 100 yaşını görecektir.»

Age and Ageing

Toplumda yaşlı insan sayısı giderek artmaktadır.

Toplumda diyabetik hasta sayısı giderek artmaktadır.

Diyabetik ayak olgusu her DM'lu hastada değerlendirilmeli, bilgilendirilmeli, farkındalık oluşturulmalı, koruyucu tıp uygulamaları öncelenmelidir.

Diyabetik ayak infeksiyonları

Diyabetik kişilerde ayak yaraları sık görülür ve sık infekte olur. Bu infeksiyonlar, önemli ölçüde morbiditeye yol açarlar ve alt ekstremitte amputasyonunun da en sık nedenidir.

Diyabetik ayak infeksiyonlarının yönetimi için klinisyenlere yardımcı olmak üzere yayımlanmış kılavuzlar vardır.

Sofistike yöntemler infeksiyonun daha hızlı ve daha duyarlı tanısı için umut vermektedir.

Diyabetik ayak infeksiyonlarının tanı ve tedavisinin maliyet etkin olarak nasıl yapılacağına ilişkin çalışmalar sürmektedir.

DAİ yönetiminde Mikrobiyoloji

Yüzyılı aşkın süredir etken mikroorganizmayı belirleme yöntemi aynı kalmıştır-yara yeri kültürü.

Klinisyen için en önemli parametre etken bakterinin ve duyarlılığının bilinmesidir ama kültür sonuçları vakit alıcı olduğundan tedavi ampiriktir ve geniş spektrumludur.

Geniş spektrumlu ampirik tedavi; dirence, maliyete ve yan etkiye neden olduğu gibi **klinisyende kültür alma gerekliliği konusunda şüphe oluşturmıştır.**

DA ülserlerinde değerlendirme

Diyabetik bir hastada

- iki haftada iyileşmeyen cilt lezyonu
- iskemik mi yoksa nöropatik bir nedene mi bağlı
- yaranın süresi, genişliği, derinliği, kokusu, osteomiyelit varlığı ve aldığı tedaviler
- yaranın temizlenmesi, nekrotik veya gangrenöz materyalin debridmanı ve kör uçlu steril bir prop kullanılarak kemik ile temasın araştırılması
- kültür için derin doku örneği ya da poş varlığında aspirasyon
- Yüzeysel sürüntü kültürleri kolonizasyonu yansıtmaması nedeniyle önerilmez.



Bakteriyel infeksiyonların yönetimi

Bakteriyel infeksiyonların etkin yönetimi, etken mikroorganizmanın doğru ve hızlı bir şekilde tanımlanmasına bağlıdır.

Bakteriyel infeksiyonların hızlı ve doğru tanısı, hastalığın uygun yönetimini sağlarken, tanıya yönelik gereksiz ek testleri, gereksiz antimikrobiyal kullanımını, bunun sonucunda antimikrobiyal direnç gelişimini önlemekte ve gereksiz hastane yatışlarını azaltmaktadır.

Doğru ve hızlı tanı, gereksiz inceleme ve gereksiz tedaviyi önlemesi ile maliyet üzerinde etkilidir.

Bakteriyel infeksiyonların yönetiminde Mikrobiyoloji Laboratuvarının rolü

Bakteriyel infeksiyonların kontrolü klinik mikrobiyoloji laboratuvarında etyolojik ajanın saptanma yeteneğine bağlıdır.

Bakteriyel infeksiyonlarda uygun tedavi kararının verilmesi, bakteriyel patojenin saptanması, tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılmasına bağlıdır.

Ancak, tüm bu yöntemler zaman alıcı olmaları ve yüksek oranda manuel işlem gerektirmeleri nedeniyle patojen temeline dayalı hasta yönetimini geciktirmektedir.

Klasik yöntemler

Mikrobiyolojide birinci basamak; etken mikroorganizmanın

- Muayne maddesinde gösterilmesi
- Kültürünün yapılması
- İdentifiye edilmesi
- Antimikrobiyal duyarlılığın araştırılmasıdır.

DAİ-Klasik yöntemler

Hastanın önceki hastaneye yatışı

- önceki kültür sonuçları
- önceki tedavileri

Alınan örneğin Gram boyama yaymaları

Aerobik ve anaerobik kültür yöntemleri

Kromojenik agar besiyerleri

Otomatize tanı sistemleri

DAİ-Klasik yöntemler

DAİ, uzun süreli kronik ülserler zemininde gelişir.

Birden fazla sayıda mikroorganizma izole edilebilir.

İzole edilen mikroorganizma her zaman hastalık etkeni olmayabilir.



Moleküler yöntemler

European Journal of Microbiology and Immunology 4 (2014) 1, pp. 1–25

DOI: 10.1556/EuJMI.4.2014.1.1

MOLECULAR DIAGNOSIS OF SEPSIS: NEW ASPECTS AND RECENT DEVELOPMENTS

O. Liesenfeld^{1,*}, L. Lehman², K.-P. Hunfeld³ and G. Kost⁴

FISH
Arrays
Probe hybridization

PCR
Multiplex PCR
Broad-range PCR

PCR + hybridization
PCR + sequencing
PCR + MALDI-TOFF
MS

Proteomics
Spectrometry
Phage assays

Polimeraz zincir reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) nükleik asit tanısında en sık kullanılan yöntemlerden biridir.

PCR, DNA varlığını saptamaya yönelik bir yöntem olması nedeniyle hem canlı hem ölü hücreden kaynaklanan pozitif test sonucu verebilmektedir.

Nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinde nükleik asit kalitesinin yeterli olmaması özgül olmayan primer birleşmesine neden olarak sonucun yanlış değerlendirilmesine yol açabilmektedir.

Bu nedenle, yeni amplifikasyon temelli yöntemler çoğaltılacak hedef molekülü özgül olarak saptamak ve tanımlamak amacıyla özgül hibridizasyon problemlerini kullanmaktadır.

Amplifikasyona dayalı olmayan nükleik asit temelli yöntemler

Kültür pozitifliği sonrasında, bakterinin konvansiyonel fenotipik testlerden daha hızlı bir şekilde tanımlanmasını sağlayacak moleküler yöntemlerden biri de peptit ve/veya nükleik asit problemleri ile tanısının konulmasıdır.

“Fluorescent-labeled peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization (PNA-FISH)” (AdvanDx, ABD), DNA’yı taklit eden floresan ile işaretli peptit nükleik asit moleküllerinin kullanılması ile bakterilerin rRNA genlerini hedefleyen problemlerden oluşmaktadır.

Floresan in situ hibridizasyon temelli yöntem, 3 saat gibi kısa sürede test sonucu verebilmektedir.

Proteomik temelli teknolojiler

“Matrix associated laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)”, bakterileri proteomik profillerini belirleyerek tanımlamaktadır.

Bakteri virulans faktörleri veya antibiyotik direncini de tanımlayabilme özelliğine sahiptir. Birkaç dakika içinde izole edilen mikroorganizmanın tanımlanması veya tiplendirmesi gerçekleştirilmektedir.

Kültür sonrası bakteri tanımlanmasında %95.4 oranında duyarlılık göstermektedir.

Kısıtlayıcı özelliği doğrudan klinik örneklerle uygulanamaması ve analiz için bakterinin kültürüne ihtiyaç duyulmasıdır.

“Microarray” yöntemleri

Özgöl hibridizasyon problemlerinin katı bir faza tutturularak işaretli hedef molekülleri saptamaya yönelik olan katı faz hibridizasyon yöntemi, ilk kullanıldıklarında mikrolak çukurlarında immobilize edilen özgöl problemlerin tek bir parametreyi saptama ve tanımlamasına yönelik olarak geliştirilmiştir.

Daha sonra çoklu problemlerin nitrocelülöz veya naylon membranlara tutturulması ile “macroarray” yöntemleri ortaya çıkmıştır.

Microarraylerin 200-300 μm çapından daha küçük noktalar halinde hazırlanması ile bakteriyel menenjit, solunum sistemi enfeksiyonu ve endokardit gibi hastalıkların tanısında hızlı, duyarlı ve özgöl tanı imkanı doğmuştur.

Multipleks ve real-time PCR temelli yöntemler

Çok parametreye dayalı PCR yöntemleri, ilk defa kan dolaşımı enfeksiyonlarının tanısında ortaya çıkmış, 40 farklı bakteri ve mantar patojeninin doğrudan kan örneğinden tanımlanmasını sağlamıştır.

Böylece, tanısal olarak düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahip kan kültürü yönteminin yerini alarak daha duyarlı, daha özgül ve daha kısa sürede örnekten doğrudan mikrobiyal patojenin tanısına olanak doğmuştur.

Çoklu dirençli mikroorganizmalarda hızlı tanı

Çoklu dirençli bakteriler, özellikle metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, vanomisine dirençli enterokoklar ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten Enterobacteriaceae üyeleri, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli infeksiyon etkenleridir.

Son yıllarda, bu mikroorganizmalarla kolonize hastaların hızla saptanması için çeşitli fenotipik ve genotipik yöntemler geliştirilmiştir.

Bakterinin virölans faktörleri

Bakterinin direnç genleri

Konağın infeksiyon ya da inflamasyon belirteçleri aranabilir.



Miniaturized Oligonucleotide Arrays

A new tool for discriminating colonization from infection due to *Staphylococcus aureus* in diabetic foot ulcers

ALBERT SOTTO, MD, PHD¹
JEAN-LOUIS RICHARD, MD²
NATHALIE JOURDAN, MD³
CHRISTOPHE COMBESURE, PHD⁴
NICOLE BOUZIGES, MD^{1,5}

JEAN-PHILIPPE LAVIGNE, MD, PHD^{1,5}
ON BEHALF OF THE NÎMES UNIVERSITY
HOSPITAL WORKING GROUP ON THE
DIABETIC FOOT (GP30)

International Working Group on the Diabetic Foot, one of the major concerns in diabetic foot pathology is how to differentiate infection from colonization and, thus, grade 2 (or higher) from grade 1 ulcers according to the IDSA classification system (4,5). As microor-

OBJECTIVE	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Total	G1 vs. G2	G1 vs. G2-4*
Number of strains	24 (28.2)	23 (27.1)	28 (32.9)	10 (11.8)	85 (100)	—	—
Resistance genes <i>mecA</i>	7 (29.2)	9 (39.1)	14 (50.0)	7 (70.0)	37 (43.5)	—	—
<i>blaZ</i>	22 (91.7)	22 (95.7)	28 (100)	10 (100)	82 (96.5)	—	—
<i>ermA</i>	3 (12.5)	7 (29.2)	9 (32.1)	4 (40.0)	23 (27.1)	—	—
<i>ermC</i>	6 (25.0)	7 (29.2)	10 (35.7)	5 (50.0)	28 (32.9)	—	—
<i>aadD</i>	2 (8.3)	3 (13.0)	14 (50.0)	1 (10.0)	20 (23.5)	—	0.04
<i>vanA</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>vanB</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>vanZ</i>	—	—	—	—	—	—	—
Virulence genes							
<i>lukS</i>	2 (8.3)	18 (78.3)	24 (85.7)	10 (100)	54 (63.5)	<0.001	<0.001
<i>lukF</i>	2 (8.3)	20 (88.0)	26 (92.9)	10 (100)	58 (68.2)	<0.001	<0.001
<i>lukS-PV</i> and <i>lukF-PV</i>	—	—	—	1 (10.0)	1 (1.2)	—	—
<i>sea</i>	2 (8.3)	8 (34.8)	19 (67.9)	8 (80.0)	37 (43.5)	<0.001	<0.001
<i>sek</i>	—	4 (17.4)	—	4 (40.0)	8 (9.4)	0.04	—
none	22 (91.7)	1 (4.3)	—	—	23 (27.1)	<0.001	<0.001

Diabetic Foot Infections: Microbiology Made Modern?

Array of hope

However, better microbiology detection methods will be of no value unless clinicians send laboratories optimally obtained specimens, i.e., tissue samples collected after wound cleansing and debridement. Applying what we already know about sending a good specimen to get a good result should improve our antibiotic prescribing now while we wait for the exciting innovations in clinical microbiology that appear to be coming in the near future.

BENJAMIN A. LIPSKY, MD, FACP, FIDSA

Research article

Open Access

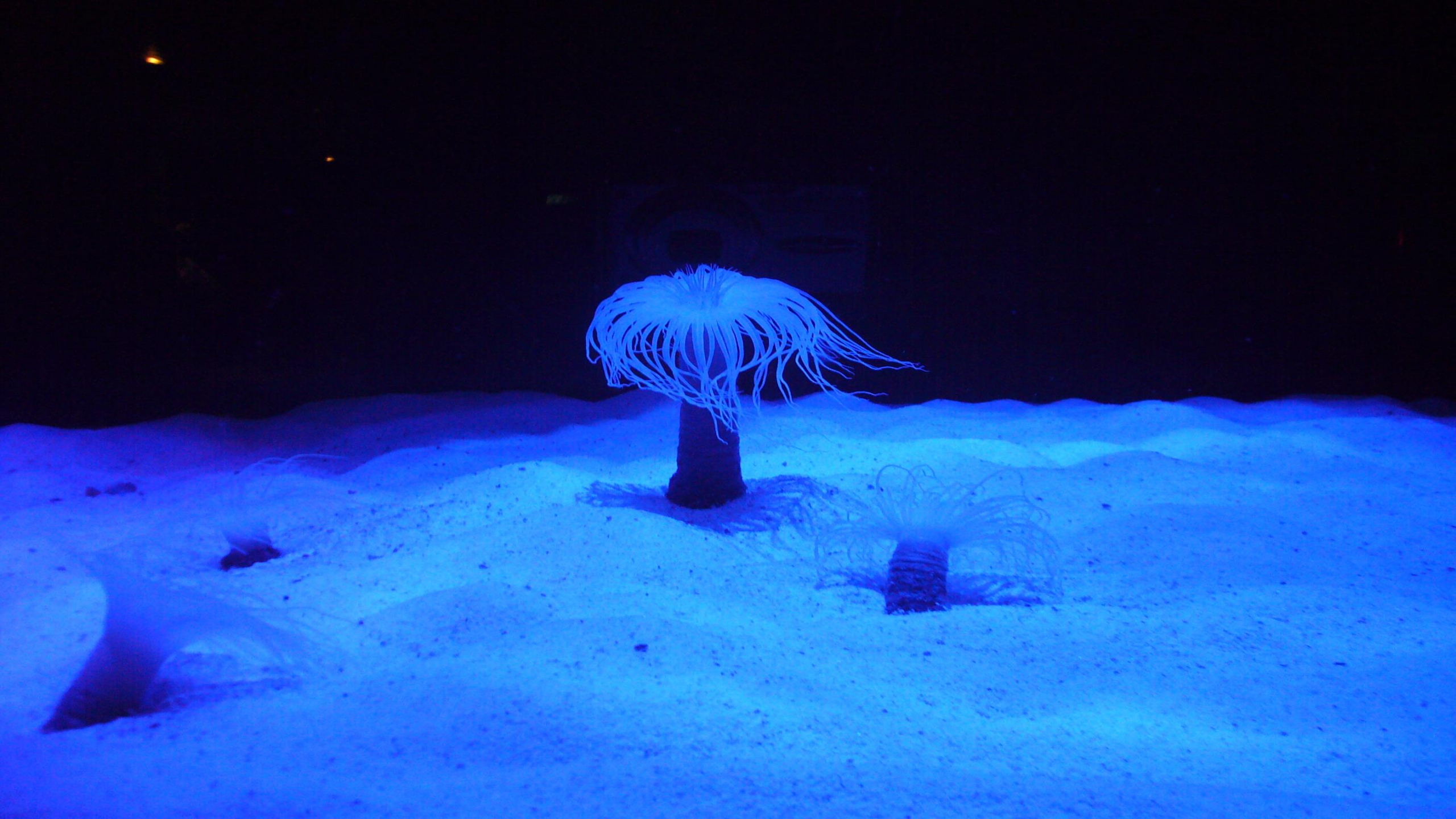
Survey of bacterial diversity in chronic wounds using Pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing

Scot E Dowd^{*1}, Yan Sun², Patrick R Secor³, Daniel D Rhoads², Benjamin M Wolcott², Garth A James³ and Randall D Wolcott²

Abstract

Background: Chronic wound pathogenic biofilms are host-pathogen environments that colonize and exist as a cohabitation of many bacterial species. These bacterial populations cooperate to promote their own survival and the chronic nature of the infection. Few studies have performed extensive surveys of the bacterial populations that occur within different types of chronic wound biofilms. The use of 3 separate 16S-based molecular amplifications followed by pyrosequencing, shotgun Sanger sequencing, and denaturing gradient gel electrophoresis were utilized to survey the major populations of bacteria that occur in the pathogenic biofilms of three types of chronic wound types: diabetic foot ulcers (D), venous leg ulcers (V), and pressure ulcers (P).

Results: There are specific major populations of bacteria that were evident in the biofilms of all chronic wound types, including *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Peptoniphilus*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Finnegoldia*, and *Serratia* spp. Each of the wound types reveals marked differences in bacterial populations, such as pressure ulcers in which 62% of the populations were identified as obligate anaerobes. There were also populations of bacteria that were identified but not recognized as wound pathogens, such as *Abiotrophia para-adiacens* and *Rhodopseudomonas* spp. Results of molecular analyses were also compared to those obtained using traditional culture-based diagnostics. Only in one wound type did culture methods correctly identify the primary bacterial population indicating the need for improved diagnostic methods.

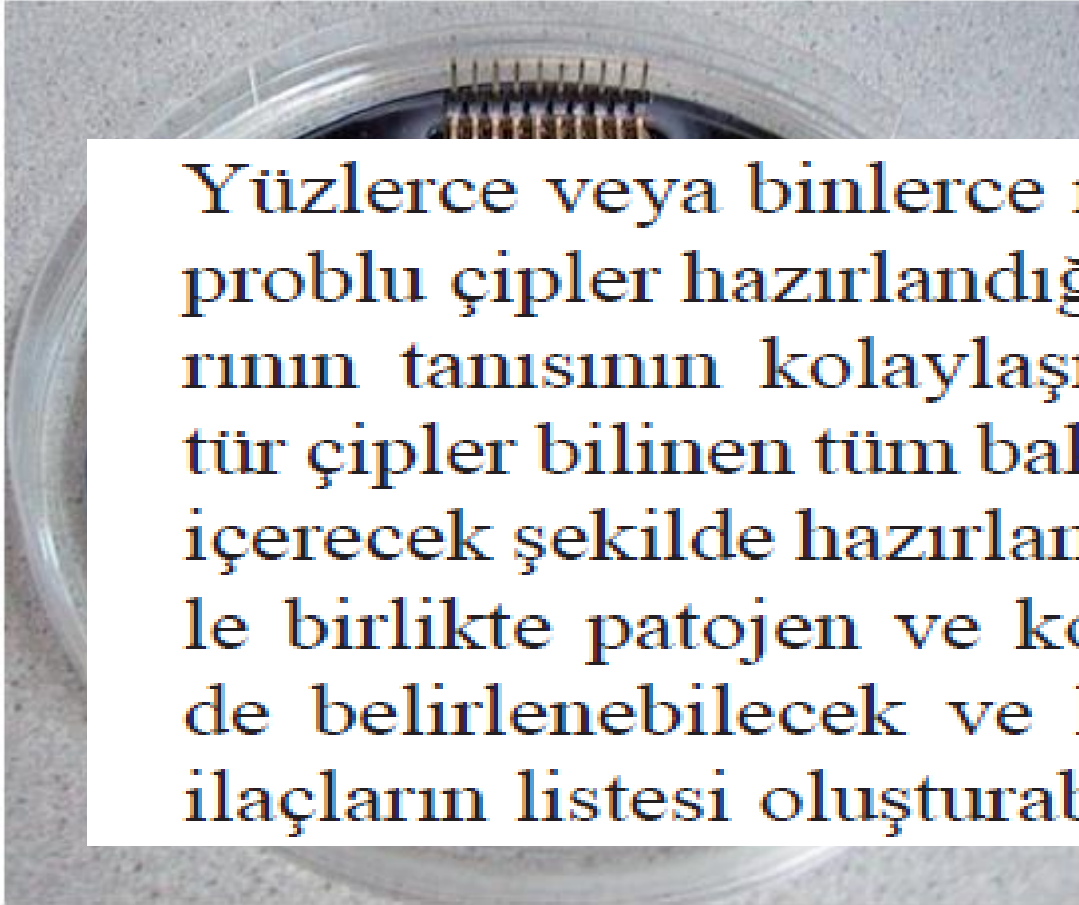


Nanoteknoloji

Nano boyutlarda işlenmiş alet ve cihazları kullanarak insan biyolojisi ve sağlığının moleküler düzeyde incelenmesi, tedavisi, yeniden yapılanması ve kontrolü olarak tanımlanabilir.

Mikrodizilim teknolojisi, enfeksiyöz hastalıklarda genlerin rollerini aydınlatmada, araştırmaların geleneksel yöntemlerden entegre yaklaşımlara kaymasına yol açan devrimci bir araçtır.

Nanoteknoloji



Şekil 1. Mikro Total Analiz Sistemi (μTAS)²⁰



Yüzlerce veya binlerce mikrobiyal hedef için DNA problu çipler hazırlandığında enfeksiyon hastalıklarının tanısının kolaylaşması hedeflenmektedir. Bu tür çipler bilinen tüm bakteriyel ilaç direnç genlerini içerecek şekilde hazırlanabilecek, bakteriyel genlerle birlikte patojen ve konak kromozomal faktörler de belirlenebilecek ve hasta ile uyumlu optimum ilaçların listesi oluşturabilecektir. Ek olarak tedavi-

Şekil 2. Mikroçip (oligonükleotitçip) siklusu (21 nolu kaynaktan değiştirilerek uyarlanmıştır.)



Sonsöz

İyi alınmış örnek

İyi değerlendirilmiş klinik tablo

İyi değerlendirilmiş Gram ve kültür sonucu

Hızlı besiyerleri, otomatize sistemler

Moleküler testler

Nanoteknoloji

AMAÇ: Doğru tanı, erken ve uygun tedavi

SON HEDEF: Amputasyonun önlenmesi



Teşekkür ederim