

# **TÜBERKÜLOZ TANISINDA YENİ BELİRTEÇLER**

**Doç.Dr.Alpaslan ALP**

**Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

**24.Mart.2017  
Antalya**

# KLİMİK-2017 Kongresinin Değerli Düzenleme Kurulu Üyeleri ve Katılımcılarına

24 Mart 2017 tarihinde yapmam gereken  
**‘Tüberküloz Tanısında Yeni Belirteçler’** başlıklı  
sunumumu, planlamamın dışında gelişen ve  
sunumumla aynı tarihe denk gelen, sorumlusu  
olduğum hastanemiz Tüberküloz Laboratuvarının  
Sağlık Bakanlığı adına yapılacak olan  
**‘Yetkilendirme ve Ruhsatlandırma Teftiş ve**  
**Ziyareti’** nedeniyle yapamayacağımı üzümlere  
bildirmek istiyorum.  
Özür ve saygılarımla.

Doç.Dr. Alpaslan Alp

# **Artan Laboratuvar Etkinliği**

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

## **Mikrobiyolojik Tanı için; İdeal Test Var mı?**

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



# **Biyobelirteç**

- ❖ **Biyolojik süreçlerde,**
- ❖ **Patolojik durumlarda veya**
- ❖ **Tedaviye yanıtı belirlemede kullanılabilecek,**

**❑ Mikroorganizma veya konağa ait**

**❑ Statik veya dinamik, ölçülebilir**

**objektif özelliklerdir.**

# **Tüberküloz Biyobelirteçleri**

**I. Hastalığın Tanısı**

**II. Aktif TB'da Tedavi yanıtının izlenmesi**

**III. Latent tüberküloz reaktivasyonu**

**IV. Aşı ile gelişen immün yanıtı belirlemede**

**tanımlanmaya çalışılmaktadır**

# TB tanısında kullanılan örnekler

– Balgam, BAL

– Kan

(Serum/Plazma/Periferik Kan Mononükleer Hücreleri)

– idrar

– Nefes

(solunum havasında picomolar düzeyinde bulunabilen buharlaşabilen /uçucu , enfeksiyöz ajana ve/veya enfekte konağa ait organik bileşikleri tanımlama amacıyla)

➤ Kullanılarak çok sayıda çalışma yapılmakta

➤ Biyobelirteçlerin etkinliği tanımlanmaya çalışılmaktadır

# *Mycobacterium tuberculosis*'e ait

## biyobelirteçler

### MtbAg85 kompleks

- En sık araştırılan antijen
- 30-32 kDa ağırlığındaki **Arabinogalaktan** molekülüne özgü üç proteinden (**Ag85a, Ag85b ve Ag85c**) oluşmakta
- mikobakteri hücre duvarında yer alan **trehaloz dimikolatın sentezinde** rol oynar
- **sekrete edildiklerinden, kanda, balgam veya idrarda bulunabilen antijendir.**
- **İzoniiazid, bu kompleksin ekspresyonunu indükler**
  - İzoniazid tedavisi verilen kişilerde, balgamda, 14. gündeki Ag85 kompleks yüksekliği 90. günden sonra görülen persistans ile ilişkilendirilmektedir.



# *Mycobacterium tuberculosis*'e ait biyobelirteçler **Lipoarabinomannan (LAM)**

- İdrarda, serum ve plazmada **LAM** saptayabilen **ticari testler** geliştirilmiştir.
- Duyarlılığı yüksek olmamakla birlikte özellikle HIV ile koenfekte kişilerde hızlı tanıda kullanılabilir

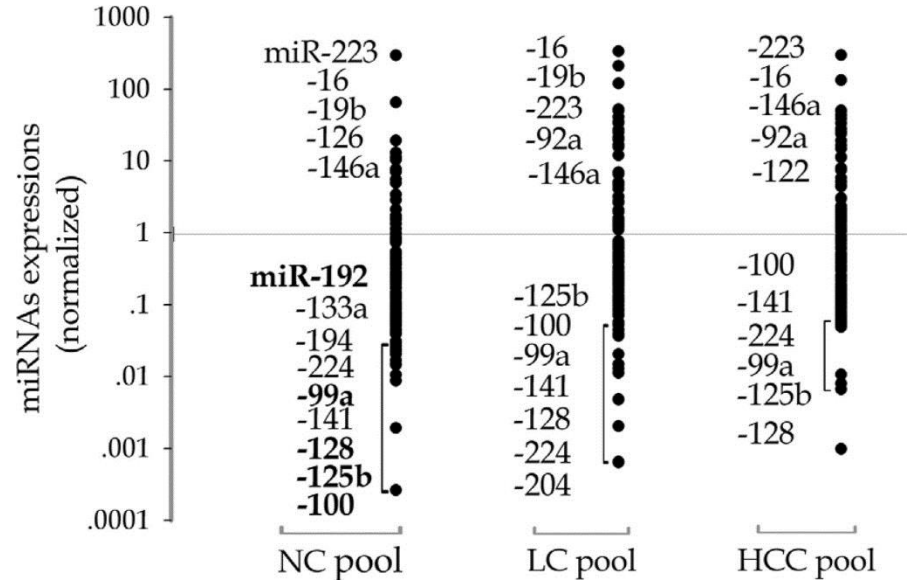


# Konağın immün yanıtında etki gösteren biyobelirteçler

- Özellikle **Aktif ve Latent Tb ayrımında** kullanılabilecek biyobelirteçler;
  - **IP-10 (IFN- $\gamma$  inducible protein)**
    - aktive antijen sunucu hücrelerce eksprese edilen bir **kemokin**'dir
    - IFN- $\gamma$ 'ya alternatif olabilecek en önemli biyobelirteç
    - IFN- $\gamma$ 'dan daha yüksek düzeyde sekrete olduğundan küçük hacimde örnek yeterli
    - Tam kan örneklerinde stabil kalır (**hasta başı test olabilir**)
  - **IL-4 , TNF- $\alpha$  , MCP-1 ve MCP-2, IL-15, IL-17**  
gibi **sitokinler**
  - **Mikro RNA (miRNA)**

# Mikro RNA (miRNA)

- Transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunda görev alan 19-22 nükleotid uzunluğunda **RNA'lardır**,
  - hücre metabolizması,
  - proliferasyonu,
  - farklılaşmayı
  - immün yanıtı düzenlerler.



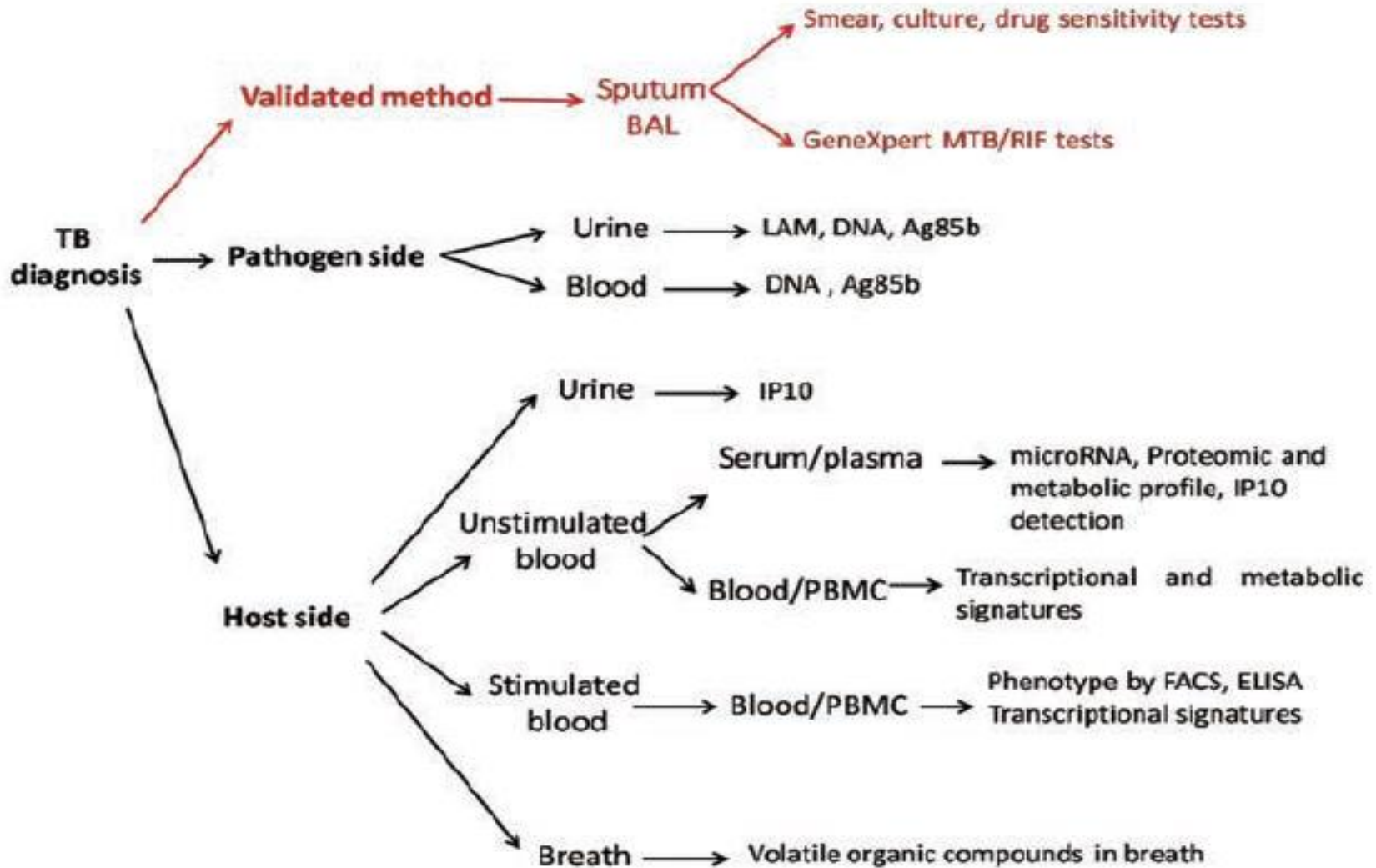
- Hastalarının periferel kan mononükleer hücre (PBMC) örneklerinde aktif tüberkülozlu hastalarda Latent TB olanlara kıyasla **miRNA daha yüksek düzeyde** eksprese olur, **MicroRNA Array** ile saptanır

# Mpt64 antijeni

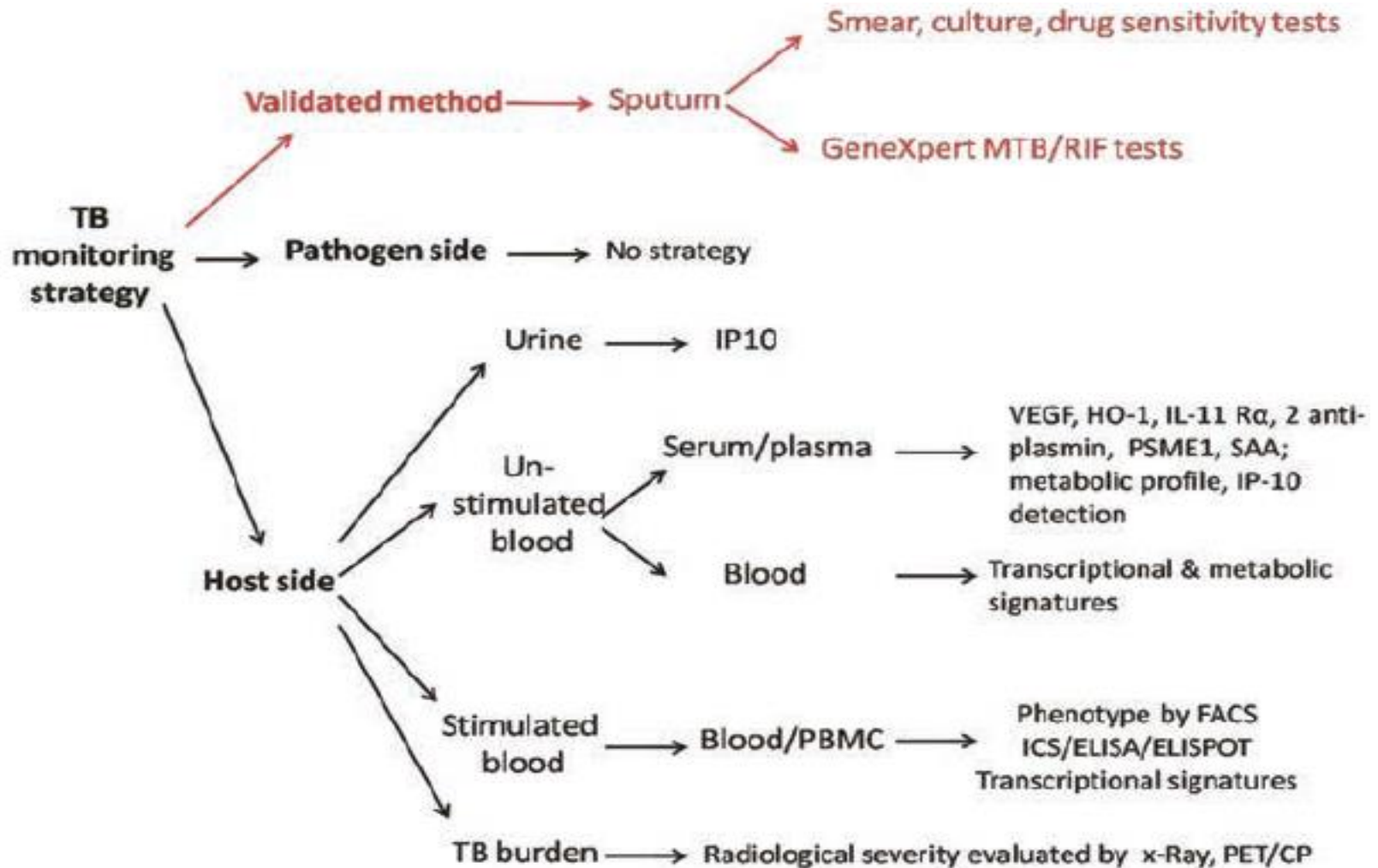
- *M.tuberculosis* komplekse **yüksek özgüllük** gösteren, Yaklaşık 23-24 kDa ağırlığında bir immunojenik bir proteindir
- Enfeksiyonun erken döneminde **T hücre proliferasyonunu** ve **IFN- $\gamma$  salınımını** stimule eder.
- Tüberküloz tanısı için **deri testi** çalışmalarında, **ESAT-6 antijeniyle birlikte** aşı olarak da kullanılmaktadır.
- **Mpt64 antijeni ile** ; immünokromatografik, immünohistokimyasal, ELISA ve kantitatif gerçek zamanlı PCR'a dayalı testleri geliştirilmiş
  - immünokromatografik testler *M.tuberculosis* ile Tüberküloz Dışı Mikobakterileri **ayırmada yaygın kullanım alanı** bulmuştur



# Tüberküloz Tanısında Biyobelirteçler



# Tüberküloz Tedavi Etkinliğinin Belirlenmesinde Biyobelirteçler



# Latent tüberküloz tanısında belirteçler

- Geçerliliği onaylanmış olanlar

- IFN- $\gamma$  salınım Testi (IGRA)

- Tam kan, ELISA ile (Quatiferon TB Gold intube )
- PBMC, ELISPOT ile (T-SPOT.TB)

- Tuberculin Deri Testi (TDT)

- Patojene ait olanlar

- Önerilen bir strateji yok

- Konağa ait olanlar

- Uyarılmamış kan

- Serum/Plazma

(Endotelial growth factor-EGF, IL4, IL6, IP 10 , TLR 4, MCP3, MCP1)

- Uyarılmış Kan

- Mtb Latency antijenler

( FACS /ICS/ ELISA/ ELISPOT ile Fenotipleme)



# Tüberkülozun Tanısında

- ✓ Aktif TB ve Latent TB **ayrımında** yada
- ✓ Latent TB'dan Aktif TB'a **geçiş tanımlamada**
- Birden fazla **biyobelirtecin birlikte kullanımı** yararlı olabilir



# **Tüm Algoritmayı Değiştirebilecek Yeni Strateji**

- ✓ **BİYOBELİRTEÇLERİN ÖTESİNDE**
- ✓ **İLAÇ DİRENCİ SORUNUNU ÇÖZEBİLECEK  
YENİ HEDEFLERE ODAKLI**



## **CRISPR-Cas Sistemi**

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

YOSHIKAZU ISHINO, HIDEO SHINAGAWA, KOZO MAKINO, MITSUKO AMEMURA, AND ATSUKO NAKATA\*

```
TGA AAATGGGAGGGAGTTCTACCGCAGAGGCGGGGGAACCTCAAGTGATATCCATCATCGCATCCAGTGCGCC (1,451)
(1,452) CGGTTTATCCCCGCTGATGCGGGGAACAC CAGCGTCAGGCGTGAAATCTACCGTCGTTGC (1,512)
(1,513) CGGTTTATCCCTGCTGGCGCGGGGGAACCTCTCGGTTCAAGGCGTTGCAAACCTGGCTACCGGG (1,573)
(1,574) CGGTTTATCCCCGCTAACGCGGGGGAACCTCGTAGTCCATCATTCACCTATGTCTGAACTCC (1,634)
(1,635) CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGGAACCTCG (1,664)

consensus: CGGTTTATCCCCGCTGGAACGCGGGGGAACTC
```

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.

# Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats CRISPR

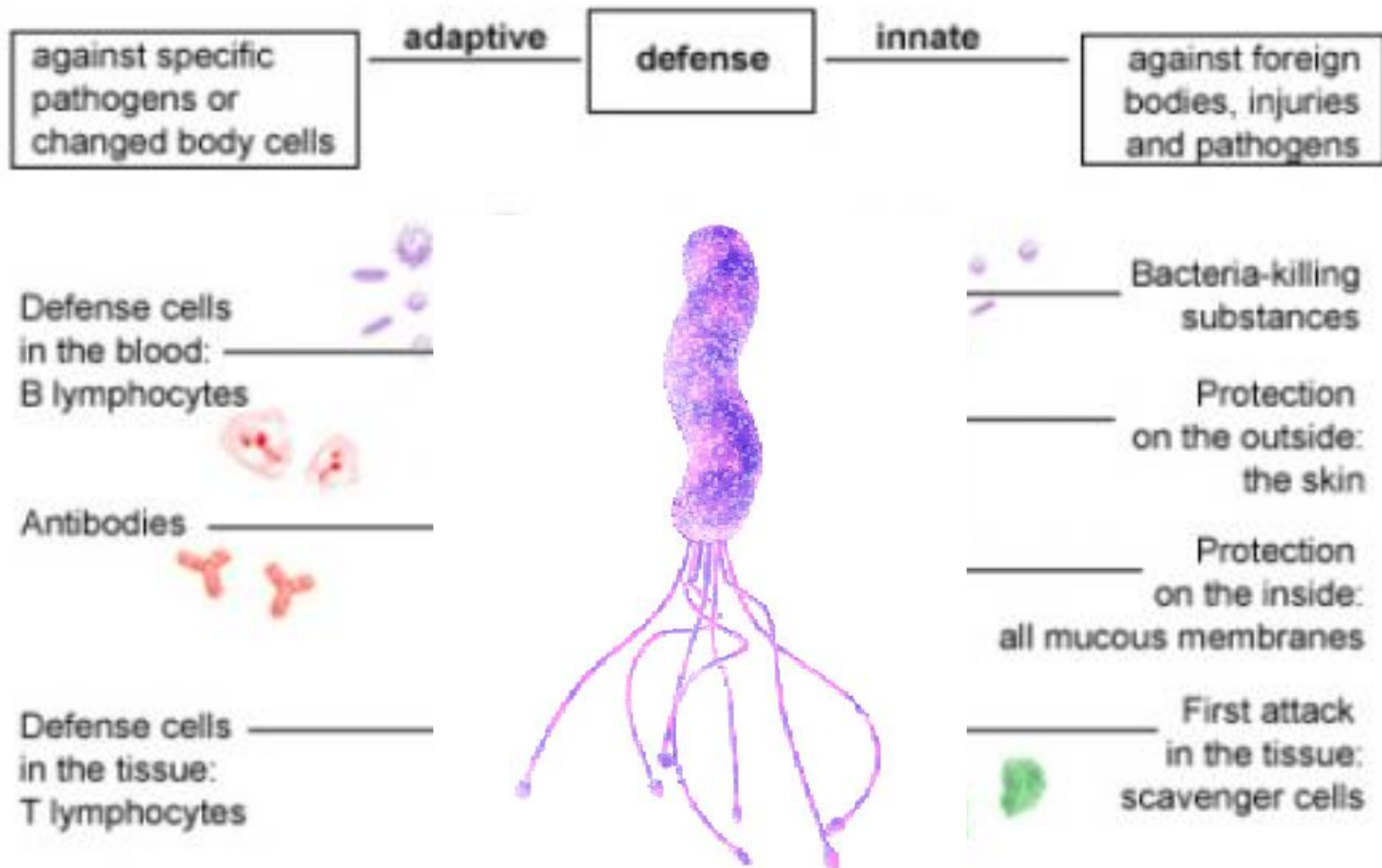
```
TGA AAATGGGAGG SAGTTCTACCCAGAGCCGGGSGAAGTCCAACTGATATCCATCATCCAGTGC (1,451)
(1,452) CGGTTTATCCCCGCTGATGCGGGGAACAC CAGCGTCAGGCGTGAAATCTCACCGTCGTTGC (1,512)
(1,513) CGGTTTATCCCTGCTGGCGCGGGGAACTCGGTTCAGGCGTTGCAAACCTGGCTACCGGG (1,573)
(1,574) CGGTTTATCCCCGCTAACGCGGGGAACTCGTAGTCCATCATTCACCTATGTCTGAACTCC (1,634)
(1,635) CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACTCG (1,664)
```

Bu Diziler Ne ???

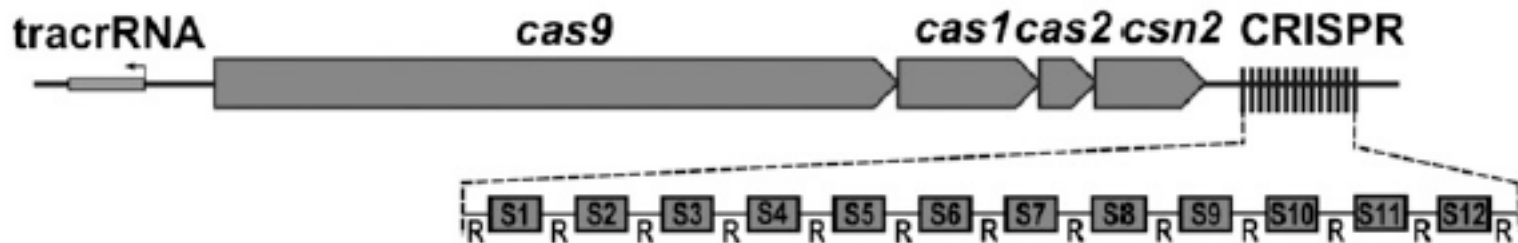
Yabancı plazmid ve bakteriyofaj dizileri !!!



# Doğal-Edinilmiş Bağışıklık

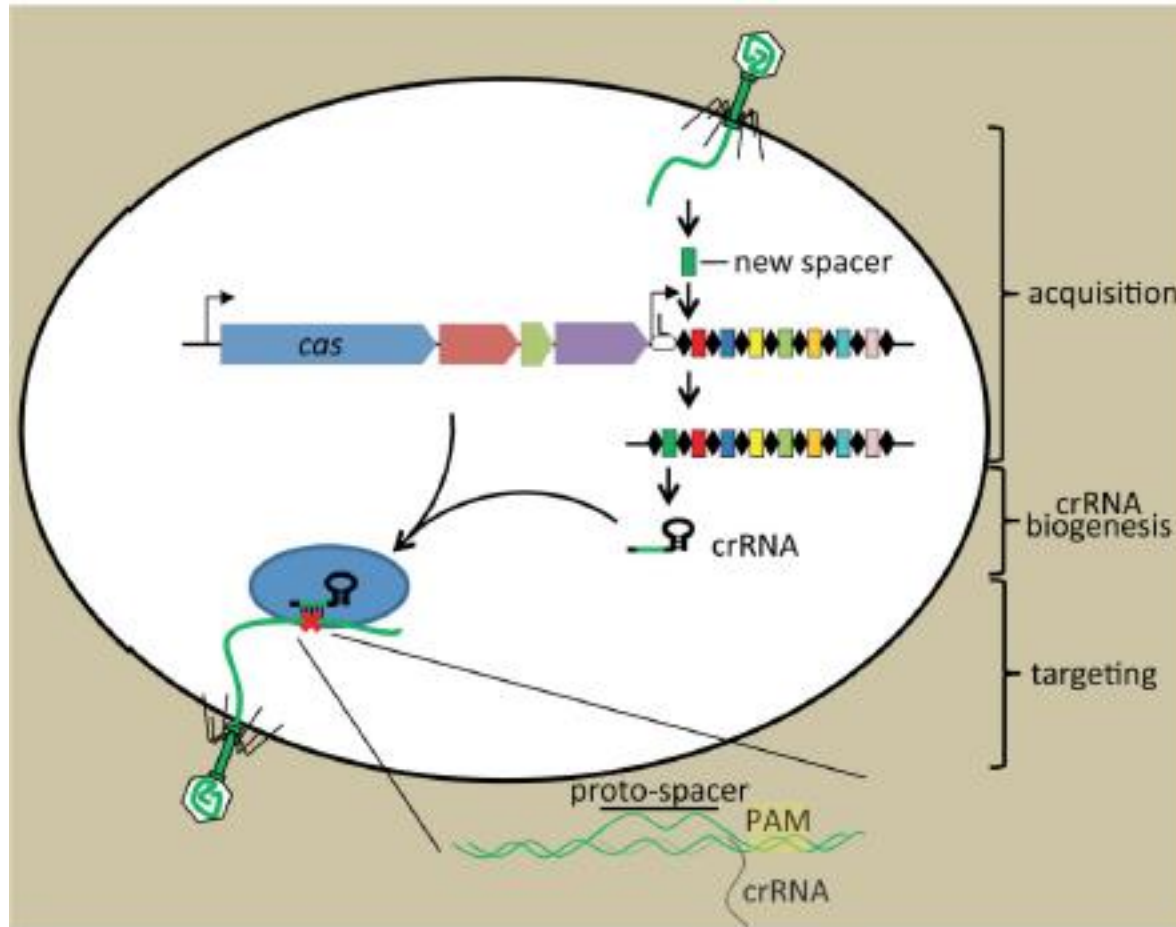


## Bakterilerde Adaptif İmmünite: CRISPR-Cas Sistemleri;

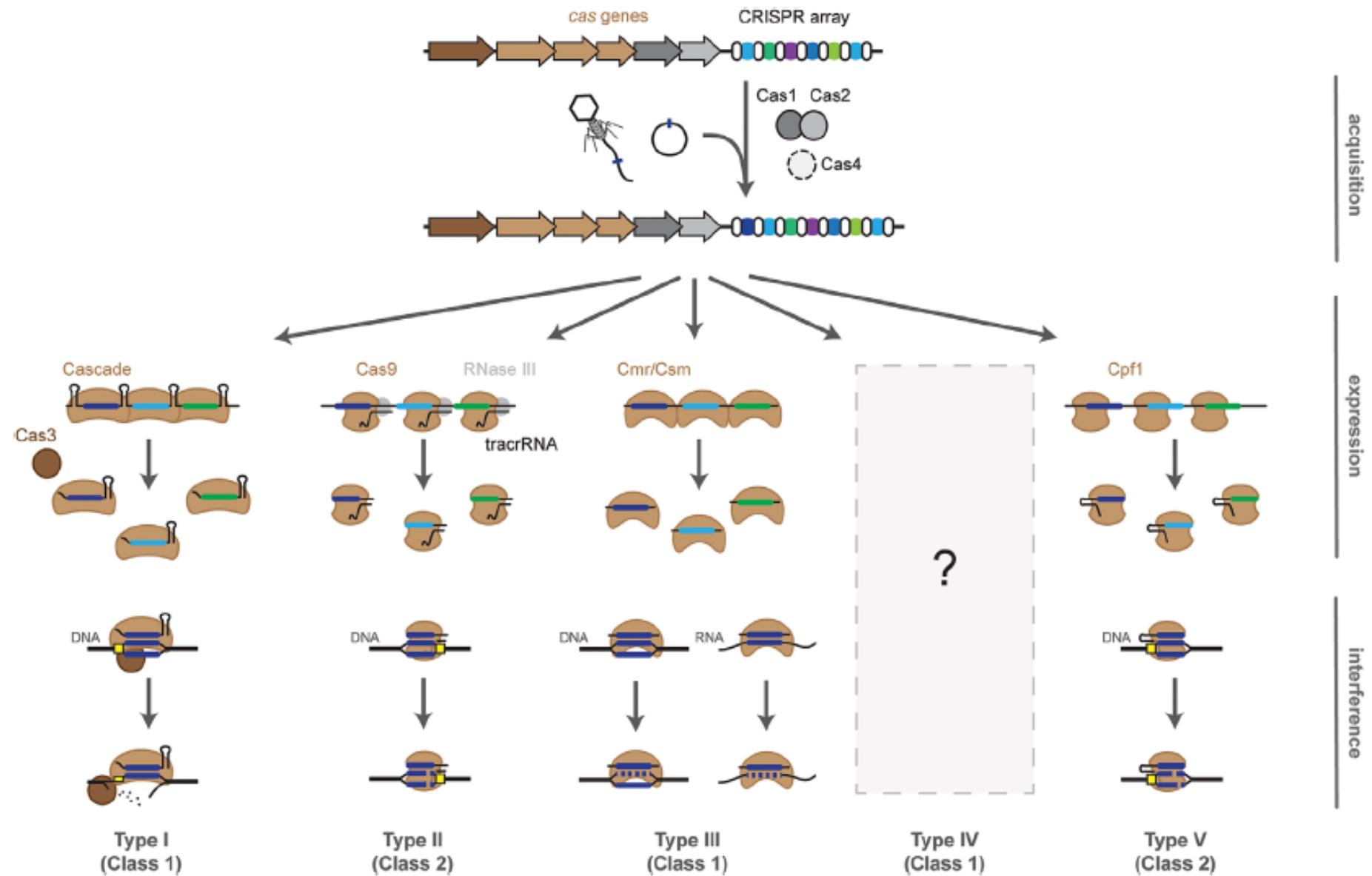


- **CRISPR dizileri: 28-37 nükleotid**
- **Ayırıcı diziler: 32-38 nükleotid**
- **CRISPR lokuslarındaki tekrar sayısı genellikle 50'den az.**

# 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.



| Type | Type hallmarks        | Sub-type | Subtype hallmarks     | crRNA processing*           | Effector complex | Targeted nucleic acid | Exemplary organism                                                                                                      |
|------|-----------------------|----------|-----------------------|-----------------------------|------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I    | Cas3                  | I-A      | Cas8a                 | Cas6 homologues,            | Cascade          | DNA                   | <i>Sulfolobus islandicus</i> (Held <i>et al.</i> , 2013)                                                                |
|      |                       | I-B      | Cas8b                 | Cascade                     |                  |                       | <i>Clostridium difficile</i> (Soutourina <i>et al.</i> , 2013)                                                          |
|      |                       | I-C      | Cas8c, repeat group 3 | Cas5d                       |                  |                       | <i>Xanthomonas oryzae</i> (Semenova <i>et al.</i> , 2009)                                                               |
|      |                       | I-D      | Cas10                 | Cas6 homologues             |                  |                       | <i>Thermofilum pendens</i> (Hrle <i>et al.</i> , 2014)                                                                  |
|      |                       | I-E      | Cse1, repeat group 2  |                             |                  |                       | <i>Escherichia coli</i> (Westra <i>et al.</i> , 2010)                                                                   |
|      |                       | I-F      | Csy1, repeat group 4  |                             |                  |                       | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Bondy-Denomy <i>et al.</i> , 2013)                                                       |
| II   | Cas9, repeat group 10 | II-A     | Csn2                  | RNase III, unknown nuclease | Cas9             |                       | <i>Streptococcus thermophilus</i> (Barrangou <i>et al.</i> , 2007)                                                      |
|      |                       | II-B     | Cas4                  |                             |                  |                       | <i>Francisella novicida</i> (Sampson <i>et al.</i> , 2013)                                                              |
|      |                       | II-C     | lack of Csn2 and Cas4 |                             |                  |                       | <i>Neisseria meningitides</i> (Zhang <i>et al.</i> , 2013)                                                              |
| III  | Cas10                 | III-A    | Csm2                  | Cas6 homologues, Csm        | Csm              | RNA                   | <i>Staphylococcus epidermidis</i> (Marraffini and Sontheimer, 2008)                                                     |
|      |                       | III-B    | Cmr5                  | Cas6 homologues, Cmr        | Cmr              |                       | <i>Thermus thermophilus</i> (Staals <i>et al.</i> , 2013), <i>Sulfolobus solfataricus</i> (Zhang <i>et al.</i> , 2012b) |



# PUBLICATIONS

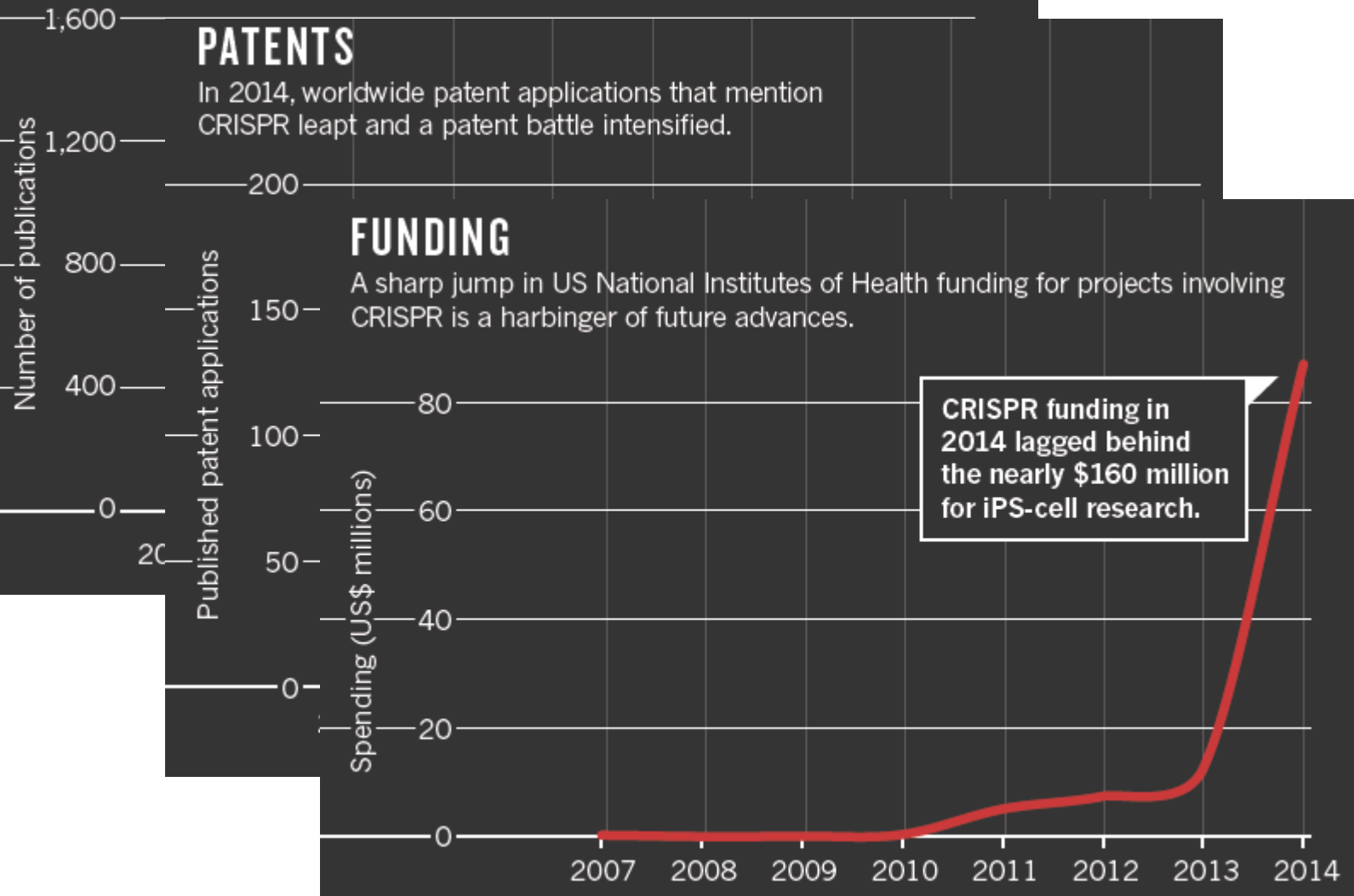
The number of papers about CRISPR has outstripped the numbers mentioning the gene-editing technologies known as TALENs and zinc fingers.

## PATENTS

In 2014, worldwide patent applications that mention CRISPR leapt and a patent battle intensified.

## FUNDING

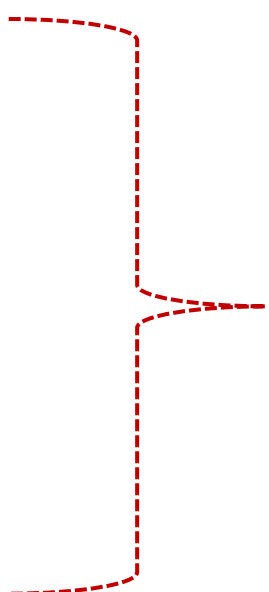
A sharp jump in US National Institutes of Health funding for projects involving CRISPR is a harbinger of future advances.



# Potansiyel Kullanımları

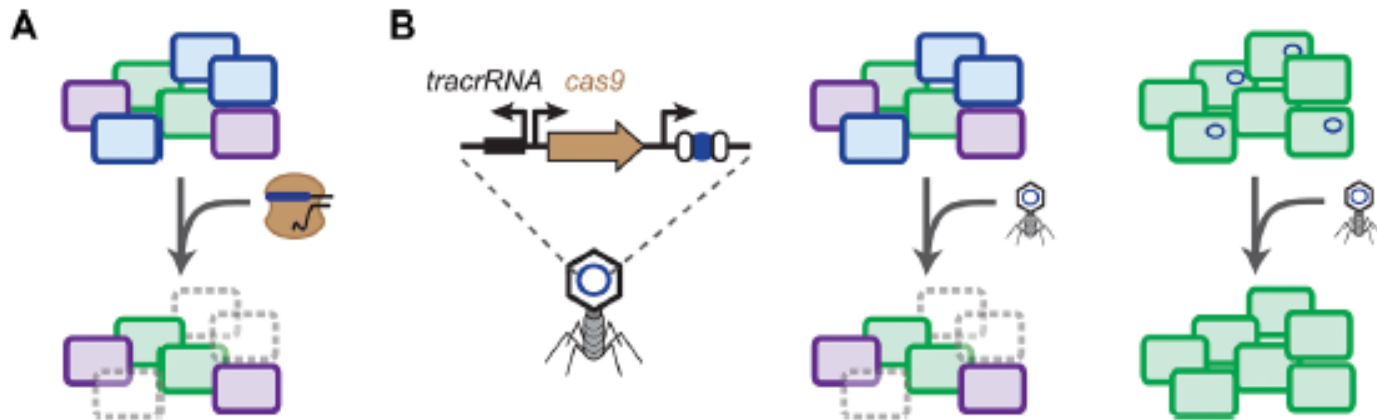
Bakteriyel Genom  
Editing

Bakteriyel Gen  
Regulasyonu



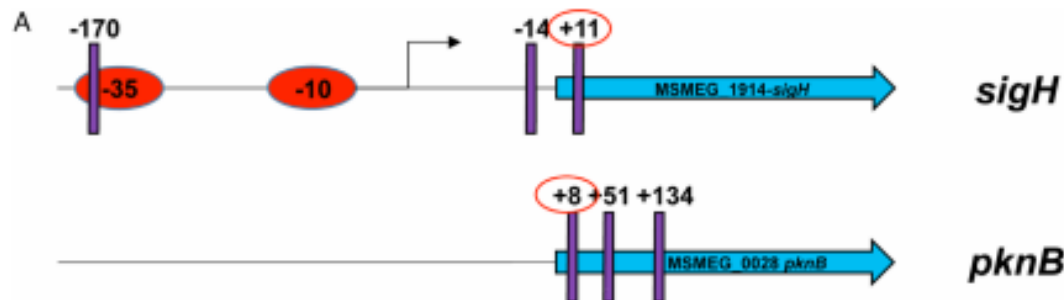
Next-Generation  
Antimikrobiyaller

# CRISPR Temelli Antimikrobiyaller



# Investigating essential gene function in *Mycobacterium tuberculosis* using an efficient CRISPR interference system

Atul K. Singh, Xavier Carette, Lakshmi-Prasad Potluri, Jared D. Sharp, Ranfei Xu, Sladjana Prisic and Robert N. Husson\*



sulted in increased susceptibility to chemical inhibitors, as would be expected from depletion of InhA or Dhfr proteins. Using the MABA (25), we determined that the  $IC_{50}$  of isoniazid for the strains expressing both sgRNAs that decreased *inhA* transcript abundance was 4-fold lower (0.01  $\mu$ g/ml) than the  $IC_{50}$  of isoniazid for wild type (0.04  $\mu$ g/ml) (Figure 3 and Supplementary Figure S5).



Teşekkürler