

SEPSİS TANISINDA YENİLİKLER

Uzm. Dr. Yusuf Emre Özdemir

S.B.Ü. Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi

28.02.2023

SEPSİS

- İnfeksiyon kaynaklı ölümlerin en önemli nedenlerinden biridir.
 - Hastaneye yatırılan hastalardaki prevelansı $\cong$ %6
 - Önümüzdeki 30 yıl içerisinde sepsis insidansı $\cong$ %12 !
 - Hastane içi mortalite $\cong$ %15
 - ABD'de yıllık maliyeti >20 milyar dolar



* Singer M, et al. J Am Med Assoc 2016;315:801–10.

* Rhee C, et al. J Am Med Assoc 2017;318:1241–9.

TANI

- Uzun yıllardır standart kan kültürü teknikleri, altın standart referans yöntemidir.
 - Uzun tanı süresi (6 saat-5 gün, duyarlılık için ek 24-48 saat)
 - Düşük duyarlılık
 - Fazla numune hacmi
 - Sık tekrarlanma ihtiyacı
 - Antibiyoterapi sonrası yalancı negatiflik (%30-60)
 - Pre-analitik değişkenler (anti-septik prosedürlere uyulmaması nedeniyle kontaminasyon riski)
- SIRS, SOFA, qSOFA, NEWS, MEWS gibi skorlama sistemleri ise öncelikle prognozu tahmin etmeye yönelik faydalıdır, erken teşhis üzerine katkısı yetersizdir!!

* Lippi G, et al. Emerg Care J 2017;13:6877.

* Da Rin G, et al. Lab Med 2016;47:73–82.

* Sinha M, et al. Clin Microbiol Rev 2018;31.

TANI

- CRP, prokalsitonin (PCT), presepsin, interlökin-6, lipopolisakkarit bağlayıcı protein (LPB), nötrofil CD64 ve miyeloid hücrelerde eksprese olan çözünür tetikleyici reseptör-1 (sTREM-1) gibi birçok serum sepsis biyobelirteci geliştirilmiştir.
- Ancak; bu biyobelirteçlerin hiçbiri bir sepsis biyobelirtecinin tüm ideal özelliklerini birlikte karşılayamamaktadır.
- Nükleik asit amplifikasyonu ise sepsis teşhisinde en umut verici bakış açılarından biridir.
- Tanı performansı %70-90 arasında olmakla birlikte birçok sınırlılıkları vardır (yüksek maliyet, eğitilmiş personel ihtiyacı, standartizasyon sorunu)

* Lippi G, et al. Emerg Care J 2017;13:6877

* Lazzaro A, et al. Int J Mol Sci . 2022 Jan 12;23(2):803.

İDEAL SEPSİS TANITESTİ ?

- Semptomların başlangıcında saptanabilmeli (hatta daha erken)
- Geniş tabanlı ve hızlı tanımlama yapabilmeli
- Enfeksiyonlara karşı oldukça duyarlı ve spesifik olmalı (non-enfeksiyöz nedenlerden ayırabilmeli)
- Minimal oranda invazif olmalı
- Az miktarda örnek ile tanı koyabilmeli
- İlaç direncini saptayabilmeli
- Prognoz hakkında öngördürücü olmalı
- Terapötik kararlarda yönlendirici olmalı

*Lippi G, Clin Chem Lab Med 2019; 57(9): 1281–1283

*Lazzaro A, et al. Int J Mol Sci . 2022 Jan 12;23(2):803.

GUIDELINE

Open Access

The Japanese Clinical Practice Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2020 (J-SSCG 2020)



CQ2-4-1: What are the positions of C-reactive protein (CRP), procalcitonin (PCT), presepsin (P-SEP), and interleukin 6 (IL-6) as biomarker tests for sepsis diagnosis in general ward and emergency rooms (ER)?

Answer: Sensitivity and specificity in biomarker tests when sepsis was suspected in general ward and ER visits were as follows: CRP, 59, 79%; PCT, 74, 81%; P-SEP, 75, 74%; IL-6, 78, 78%. As such, sepsis diagnosis with biomarkers alone is generally thought to be difficult, and its use should be seen as supplemental to any observations of general conditions (Provision of information for background question).

CQ4-9: Should procalcitonin be used as an indicator for stopping antimicrobial therapy for sepsis?

Answer: We suggest using procalcitonin as an indicator for stopping antimicrobial therapy for sepsis (GRADE 2B, certainty of evidence = “moderate”).

- **CRP ile beraber PCT, P-SEP veya IL-6’nın beraber değerlendirilmesi**
- **IL-6, yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda kullanılmamalı!**

Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021

Laura Evans, Andrew Rhodes, [...], and Mitchell Levy

Recommendation

1. For hospitals and health systems, we **recommend** using a performance improvement program for sepsis, including sepsis screening for acutely ill, high-risk patients and standard operating procedures for treatment.

Strong recommendation, moderate quality of evidence for screening.

Strong recommendation, very low-quality evidence for standard operating procedures.

***Sepsis için bir performans iyileştirme programı !**

***Makine öğrenimi (yapay zeka), tarama araçlarının performansını artırabilir !**

Recommendation

31. For adults with an initial diagnosis of sepsis or septic shock and adequate source control where optimal duration of therapy is unclear, we **suggest** using procalcitonin AND clinical evaluation to decide when to discontinue antimicrobials over clinical evaluation alone.

Weak recommendation, low quality of evidence.

Recommendation

16. For adults with suspected sepsis or septic shock, we **suggest against** using procalcitonin plus clinical evaluation to decide when to start antimicrobials, as compared to clinical evaluation alone.

Weak recommendation, very low quality of evidence.

➤ **Moleküler Testler**

➤ **Biyobelirteçler**

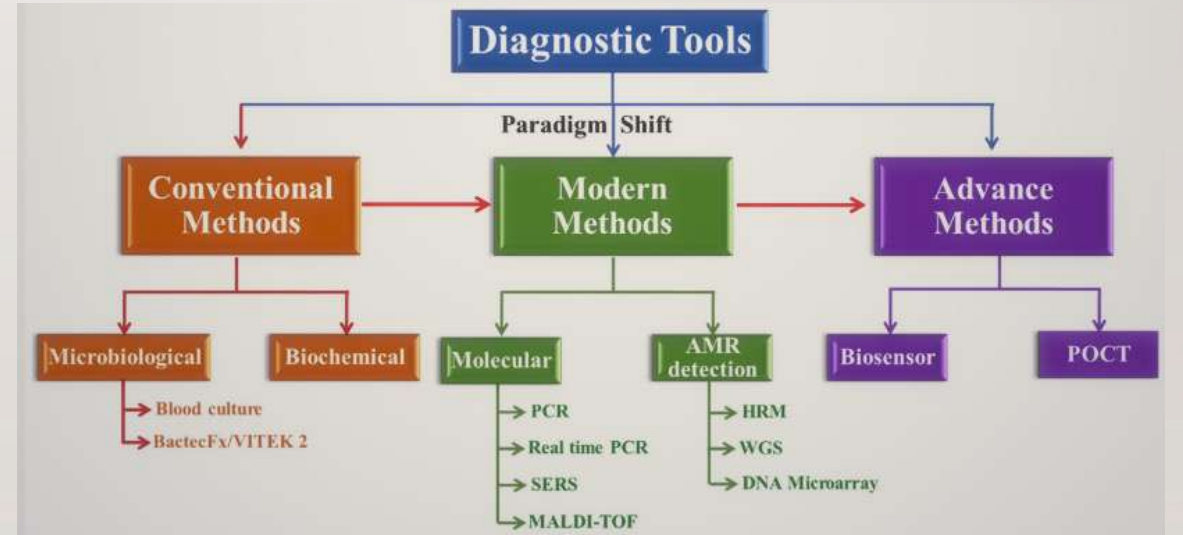
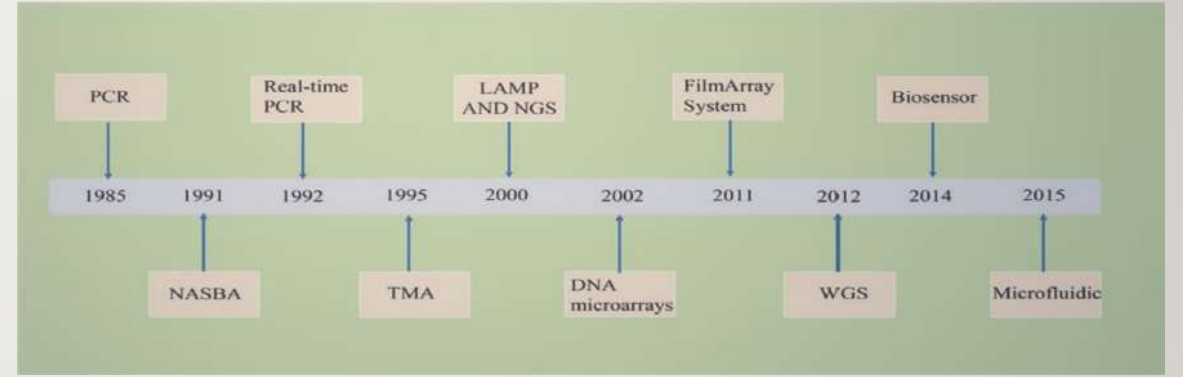
➤ **Hasta Başı /Bakım noktası testler (point of care -POC)**

- **Mikroakışkan Sistemler***

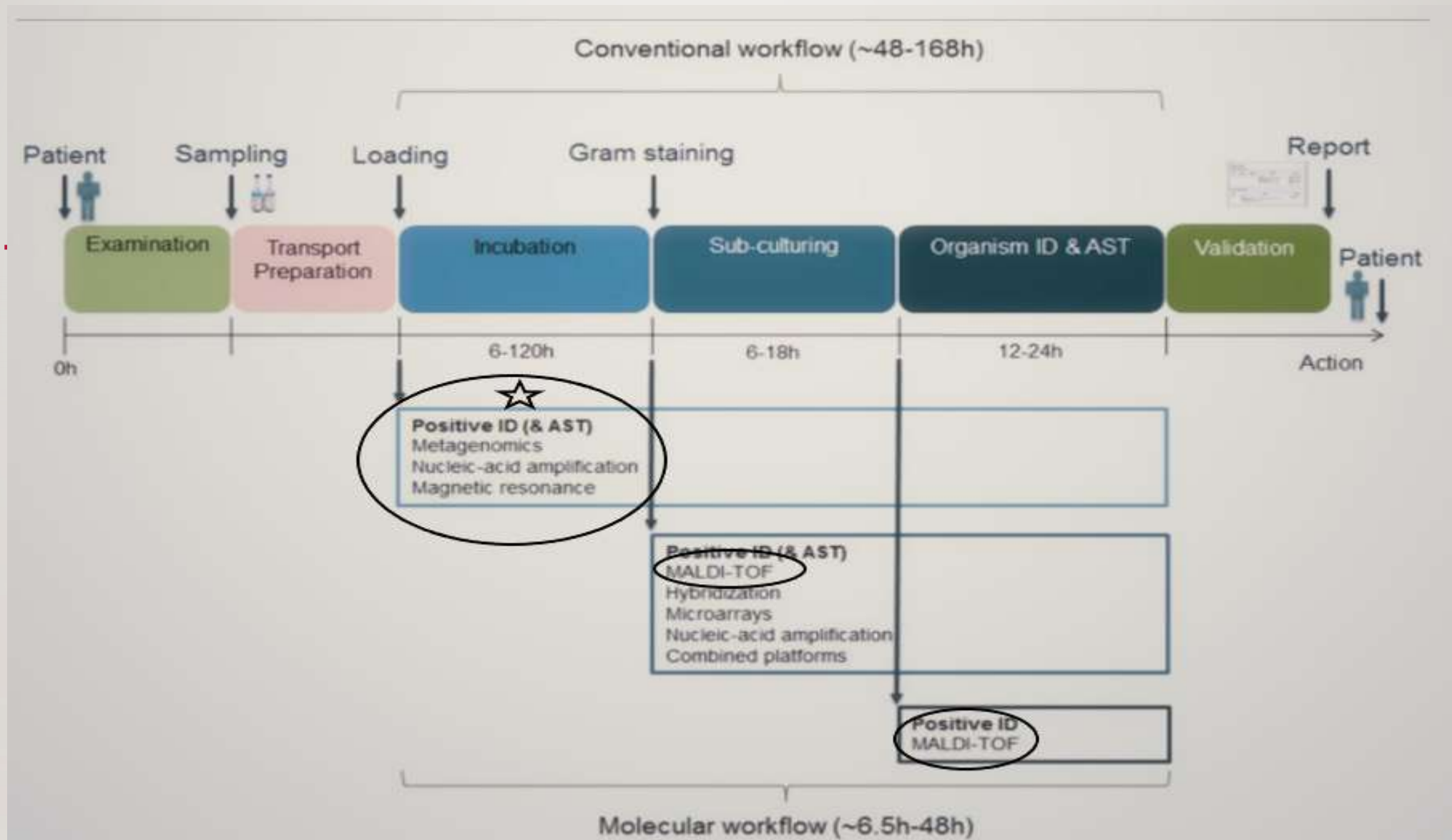
➤ **CRISPR Teknolojileri**

➤ **Biyosensörler**

➤ **Yapay Zeka-Makine Öğrenmesi**



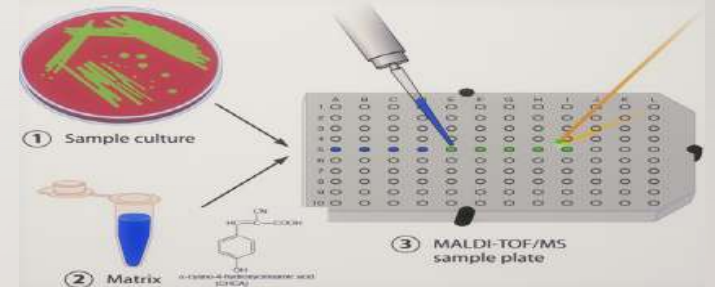
➤ MOLEKÜLER TESTLER



- **MALDI-TOF**
- **PCR**
- **Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (HRM)**
- **Yeni Nesil Sekanslama / Metagenomik Sekanslama**
 - **Explify™, iDTECT® Dx, Karius Plazma, Oxford Nanopore Sekanslama**
- **PCR temelli hızlı testler**
 - **Iridica/Plex ID, SeptiFast, SepsiTst, U-dHRM, IC-3D**
- **Manyetik Rezonans**
 - **T2Dx®**
- **Omic Teknolojileri**
 - **MeMed BV®, Septicyte Lab/Rapid, InSep™ Test, Triverity™**

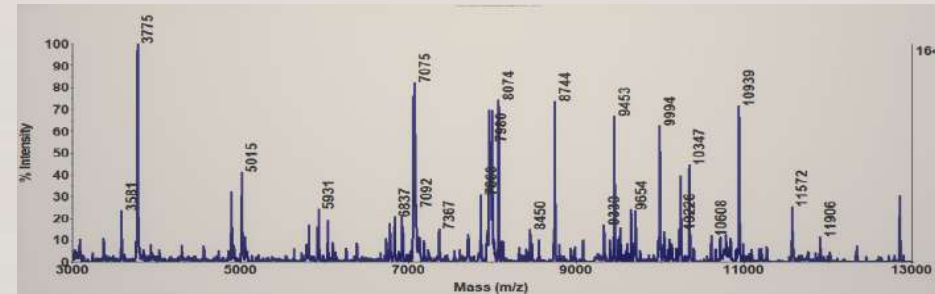
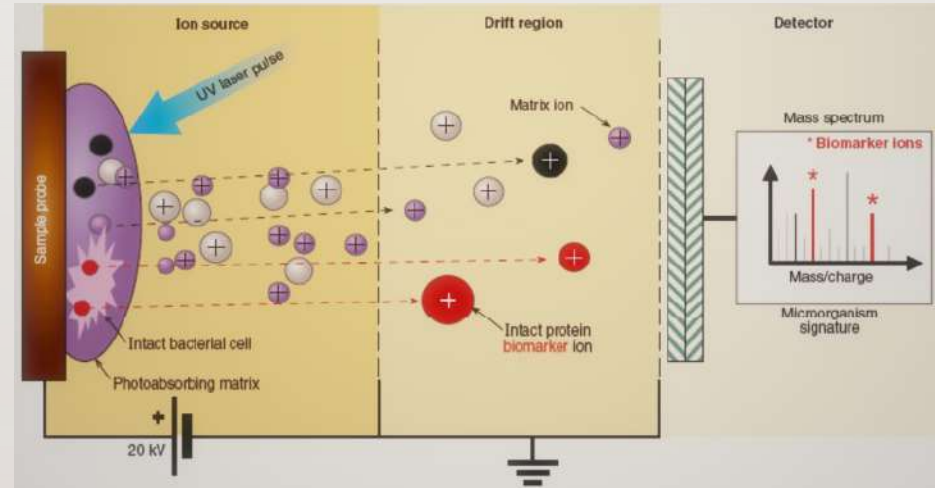
MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight)

- “Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometrisi”
 - **Matriks**: Molekülleri iyonize eden kimyasal madde
 - **Lazer**: Morötesi (Ultraviyole) ışın
 - **Dezorpsiyon**: Moleküllerin lazer ışını ile ısıtılıp buharlaştırılarak yüzeyden ayrılması (havalanması)
 - **İyonizasyon**: Moleküllerin matriks kimyasalından proton alarak yüklü hale gelmesi
 - **Time of Flight**: Örneklerin, saptayıcıya kadar uçuğu sırada geçen süre.



MALDI-TOF

- %95-98 başarı
- Hızlı tanımlama
- Maliyet etkin
- Güçlü biyoinformatik yaklaşımlar
- Geniş uygulanabilirlik alanı (Bakteri, mantar, nokardia ve mikobakteri)



- Başlangıç maliyeti yüksek
- Kültürde üretilme gereksinimi
- Terminoloji güncellenmeli
- *E. coli* ve *Shigella*
- *A. baumannii* ve *A. calcoaceticus* ayrımları zor

MALDI-TOF

➤ **Direkt MALDI-TOF MS:** Pozitif kan kültürü sıvıları üzerinden doğrudan MALDI-TOF ile tanımlama; daha hızlı ancak duyarlılığı düşük (insan hücresel proteinler ve polimikrobiyal enfeksiyon)

→ Konakçı proteinlerini ortadan kaldıran kitler; gram negatiflerde iyi tanımlama (%66-100)

gram pozitif ve mayalarda zayıf (%17-100)

➤ **Kısa inkübasyonlu MALDI-TOF MS (SI-MALDI):** Kolonilerin 3-6 saat içerisinde hızla büyütülüp izole edildiği bir yöntemdir. %73-100'lük tanısal doğruluğa sahiptir. Polimikrobiyal tanımlamada etkisizdir.

* Duncan CF, et al. Curr Infect Dis Rep. 2021;23(12):22.

* Briggs N, et al. Diagn Microbiol Infect Dis. 2021;99(1):115219

MALDI-TOF

- **Kütle spektrometrisi tespitinden önce PCR içeren yeni sistemler (PCR+MS)** ★
bakteri ve maya türlerinin tanı süresini 6-8 saate kadar indirebilir.
 - Kan kültüründe üretilmesi **zor olan mikroorganizmalar tanımlanabilir** (*L. pneumophila*, *M. pneumoniae*, *R. typhi*, *Nocardia spp.*)
 - **Antimikrobiyal tedavi alan kişilerde yüksek saptama oranı** (%83 vs. %42)
- MALDI-TOF ile antimikrobiyal direncin spektral piklerini belirlemeye yönelik araştırmalar devam etmektedir.
 - *Enterobacterales*'te karbapenemaz direncinin genotipik tespiti mükemmel tanısal doğrulukla (1.0'a kadar AUROC) elde edilmiştir.

* Makristathis A, et al. Sci Rep. 2018;8:16024

* Zhong H, et al. J Glob Antimicrob Resist 2019

* Duncan CF, et al. Curr. Infect Dis Rep. 2021;23(12):22.

* Briggs N, et al. Diagn Microbiol Infect Dis. 2021;99(1):115219

PCR

- RNA virüslerinde → basit, ucuz, duyarlı → revers transkriptaz PCR (RT-PCR)
- Amplifikasyon aşaması sırasında flüoresans emisyonunu ölçen → ‘gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu’ (**RT-qPCR**) → **yüksek hassasiyet ve düşük algılama** limiti ile virüs tespitinde **altın standart**.
- Sepsis tanısı için gerekli olan **hassas, özgül ve geniş tabanlı algılama** ihtiyacınının tümü, geleneksel nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) ile karşılanamaz. Bu nedenle **tam kandan patojen izolasyonu** için **bu testler diğer modern tekniklerle entegre edilmiştir**.

Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (HRM)

- HRM'nin çalışma prensibi **DNA dizilerine** ait yüksek çözünürlüklü **erime dereceleri** ve **erime eğrilerinin** analizine dayanmaktadır. Floresan değişikliklerin saptanmasıyla kantitatif bir analiz yapılır.
 - HRM kapalı tüp sisteminde, PCR sonrası uygulanır
 - Kontaminasyon riski az
 - Hızlı, güvenilir ve düşük maliyetli
- DNA dizilerinin sekans, uzunluk, guanin sitozin (GC) içeriğine göre ayrımını yapabilmektedir
- Özellikle mutasyon tespiti, **mikrobiyal tanı** ve metilasyon analizlerinde kullanılmaktadır.

Table 1. Comparison of Methods across Sequencing Generations.

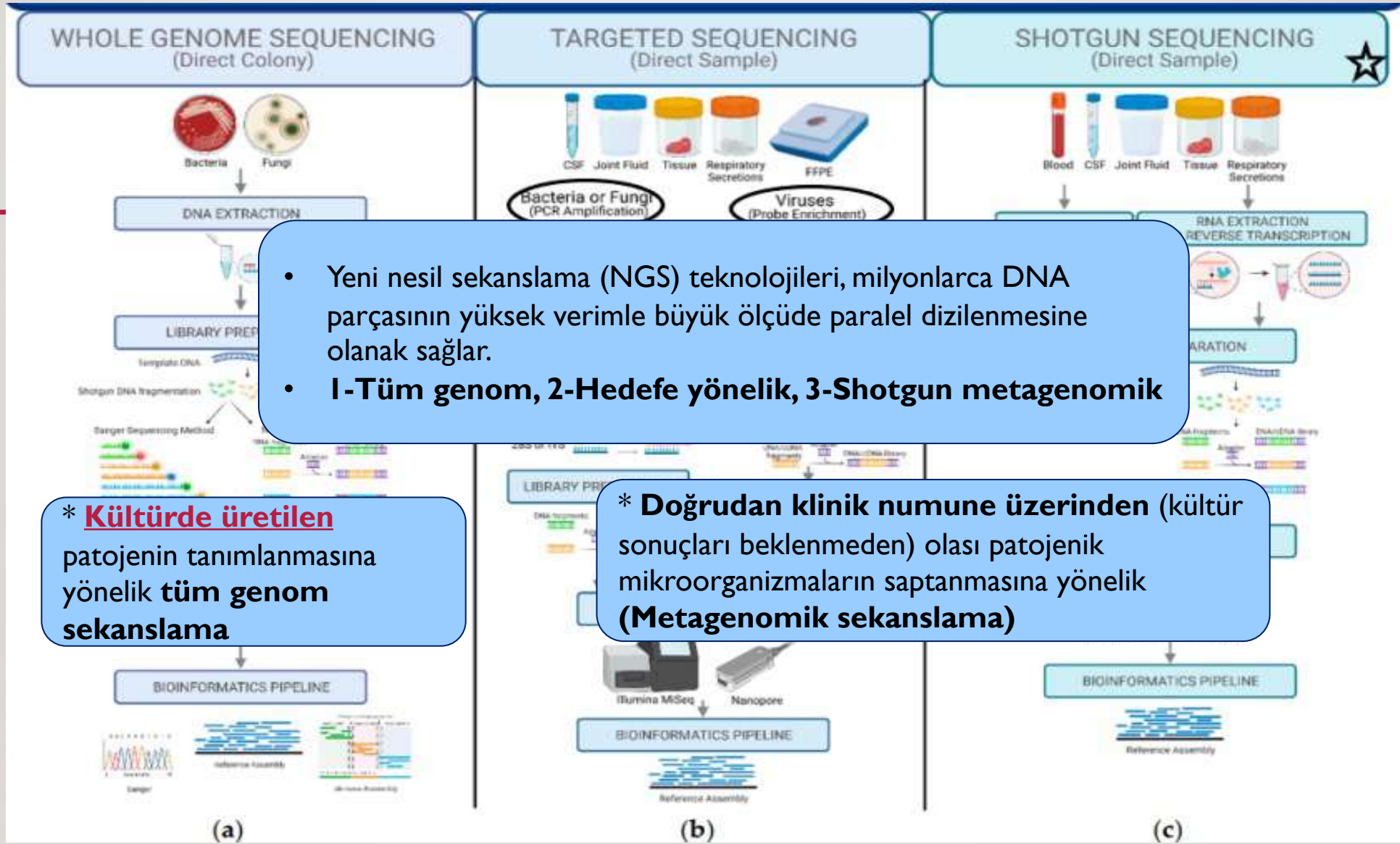
	Method	Technology ^a	Throughput (Low or High)	Complexity (Moderate or High)	Use for Sequencing in Relation to Clinical Microbiology	References
First Generation	Maxam-Gilbert	Chemical fracture of radiolabeled DNA at specific bases	Low	Moderate	N/A	[2]
	Sanger	Chain-termination at specific bases using dideoxynucleotides	Low	Moderate	16S and 28S Identification Whole Genome Sequencing	[2]
Second Generation	Pyrosequencing	Measure of pyrophosphate synthesis with luminescence	High	High	Whole Genome Sequencing	[9-13]
	SOLID	Measure of DNA ligation of oligonucleotide	High	High	Whole Genome Sequencing	[1]
	Ion Torrent	Measurement of pH difference in release of protons during polymerization of DNA	High	High	Whole Genome Sequencing	[1]
	Illumina	Bridge amplification method	High	High	Whole Genome Sequencing Deep Amplicon Sequencing Shotgun Metagenomics	[17]
Third Generation	PacBio	Single-molecule resolution using zero-mode wavelength (ZMW) nanostructures	Moderate	High	Whole Genome Sequencing	[1]
	Nanopore	Single-molecule resolution using biological and solid-state nanopores	Moderate	High	Whole Genome Sequencing Deep Amplicon Sequencing Shotgun Metagenomics	[2]

* Nükleotid dizisini belirlemek için radyo-etiketli veya flüoresan etiketli nükleotidler

* Araştırmacıların nükleotid dizisini belirlemek için lüminesans ile pirofosfat sentezinin ölçülmesiyle ortaya çıkıyor

* En başarılı olanı '**köprü amplifikasyonu**' tekniği ile **illumina yöntemi**

* 3. nesil sekanslama teknolojileri ise, DNA amplifikasyon adımları gerektirmez; bu nedenle, **daha yüksek verim, daha hızlı tanımlama ve daha uzun okuma uzunlukları** elde edilir.



Tüm Genom Sekanslama

- **Kültürde üretilen** mikroorganizmanın tanımlanması
 - **Salgın analizi**
 - **Genotipik direnç profili**
 - Henüz tanımlanmamış **yeni genlerin veya mekanizmaların saptanmasına** da yardımcı olur.
- Salmonella serotiplendirmesinde PFGE kadar başarılı, **yeni A.S**
- Üremesi yavaş ve duyarlılık testinin zor olan mikroorganizmalarda
 - Mikobakteriler, *N. gonorrhoeae*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*
- Fungal patojenlerin tanımlanmasında validasyonu yetersiz
 - ***C. auris*'de başarılı**

* Hilt EE, et al. Genes (Basel). 2022;13(9):1566.

* Chiu CY, et al. Nat. Rev. Genet. 2019, 20, 341–355

Hedefe Yönelik Metagenomik Sekanslama

- **PCR amplifikasyonu** / Prob hibridizasyon
 - **Derin amplikon sekanslama** (16S rRNA / 28S rRNA, ribozomal ITS)
 - Prob hibridizasyonu yönteminin ise henüz mikrobiyolojik tanı için kullanıldığını gösteren yayınlanmış bir çalışma yoktur. Zika virüsü salgınında epidemiyolojik takip amaçlı / SARS-CoV-2'de varyant belirleme
- Belirlenen **patojen ya da patojen grubunun sayısı ve oranını artırma**
 - **Yüksek duyarlılık**
 - Hedef patojen sayısı sınırlı

* Hilt EE, et al. Genes (Basel). 2022;13(9):1566

* Chiu CY, et al. Nat. Rev. Genet. 2019, 20, 341–355

Shotgun Metagenomik Sekanslama

- Bir klinik numuneden çıkarılan tüm DNA veya RNA'nın sekanslanmasıyla potansiyel patojeni belirleme çalışmasının biyoinformatik boru hattında yapıldığı bir yöntemdir
- BOS için validasyonu sağlanmıştır (Sens:%73, Spes: %99,AUC:90)
- İnsan DNA'sının ve mikrobiyomun tespiti !!
- Karius Plazma, iDTECT® Dx, Explify™
- **Explify™: BAL'da >900 patojen** (bakteri, mantar, virüs), **Illumina sekansı**, semikantitatif
→ 32.Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi'nde (2022);
* **Üriner patojenler** >190 (135 bakteri, 35 virüs, 14 mantar, 7 parazit) ve **>2000** antimikrobiyal direnç belirteci

iDTECT[®] Dx Blood

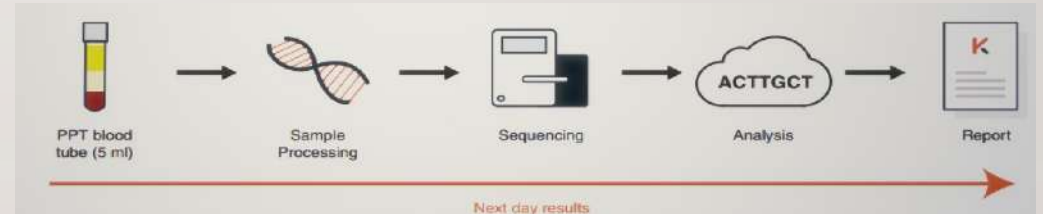
- Mikrobiyal cell-free DNA'nın (mcfDNA) shotgun metagenomik sekanslama (Illumina)
- >1200 patojen (800 bakteri, 400 virüs, fungal yok)
- 5 ml kan, 48 saat içinde sonuç
- Immunsuprese hastalarda yapan bir çalışmada konvansiyonel metodlarla karşılaştırılmış;
 - Klinik tablo ile ilişkili olabilecek virüsler yüksek oranda tanımlanmış (%36 vs. %11)
 - **Negatif prediktif değeri %98**, (lokal örnekler*)

*Vijayvargiya P, et al. PLoS One. 2022;17(6):e0269405.

* Peker N, et al. Clin Microbiol Infect. 2018;24(9):944-955.

Karius Plazma Testi (Non-invazif likit biyopsi)

- mcfDNA'nın shotgun metagenomik sekanslama (**Illumina**) + yapay zeka
- **>1250 patojen** (16S rRNA / 28S rRNA sekansları negatif olsa dahi, **RNA virüsleri hariç !!**)
- 5 ml kan, **polimikrobiyal tanımlama, 24-48 saatte** kantitatif sonuç
- **Sens: %70-93, Spes: %63-88**
- **Sens: %93, Spes: %63** (hk, seroloji, naat, klinik)
 - Sepsis şüphesi olan hastalarda **%97 korelasyon !!!!**
- **Antibiyotik kullanan** hastalarda **tanı ve takipte üstün !!**
 - %48 vs. %20, metastatik odakların erkenden tahmini
- Yüksek maliyeti (>600.000 dolar + 2000 dolar)



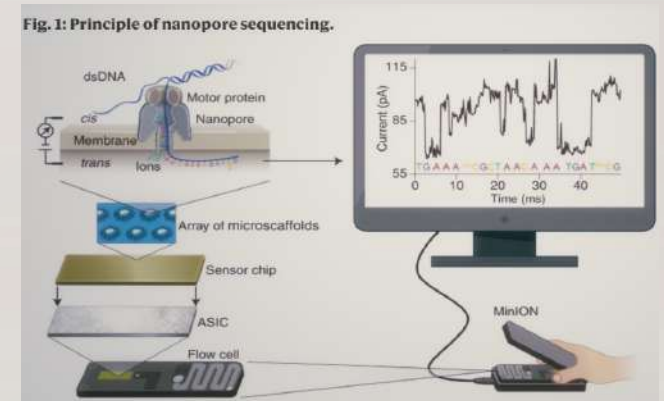
* Eichenberger EM, et al. Clin Infect Dis. 2022;74(11):2020-2027.

* Blauwkamp TA, et al. Nat Microbiol. 2019;4(4):663-674.

* Han D, et al. Theranostics. 2020;10(12):5501-5513

Oxford Nanopore Sekanslama

- DNA, RNA, mikroRNA ve proteinleri tanımlayabilen **3.nesil sekanslama cihazıdır**
- Küçük boyutlu, taşınabilir, hızlı, düşük maliyetli, USB ile çalışır
- I6S hızlı ampikon sekanslama kiti kullanılarak **patojenler 4 saatte** tanımlanır
 - * **Viral patojenler, 40 dk içinde %100 duyarlılık, özgüllük**
 - * Bakteriyel etkenler idrar ✓, dışkı ✓, kan X !!
- Tam kan örnekleri için optimize ve valide edilmelidir



Diagnostic accuracy of metagenomic next-generation sequencing in diagnosing infectious diseases: a meta-analysis

Jian Liu, Q

* Heterojenite fazla !!!
(Deneyisel tasarım ve yaş)

Many common microbiological tests. However, metagenomic next-generation sequencing (mNGS) appears to be a promising alternative. To perform a systematic review and meta-analysis of evidence regarding the diagnostic accuracy of mNGS in patients with infectious diseases. An electronic literature search of Embase, PubMed and Scopus databases was performed. Quality was assessed using the Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies-2 tool. Summary receiver operating characteristics (sROC) and the area under the curve (AUC) were calculated; A random-effects model was used in cases of heterogeneity. A total of 20 papers were eligible for inclusion and synthesis. The sensitivity and specificity of diagnostic mNGS were 75% and 68%, respectively. The AUC from the SROC was 85%, corresponding to excellent performance. mNGS demonstrated satisfactory diagnostic performance for infections and yielded an overall detection rate superior to conventional methods.

Clinical metagenomics

* NGS yöntemlerinin sonuçlarını doğru bir şekilde karşılaştırmak zordur, çünkü birçok durumda NGS yöntemleri mikroorganizma'ları tespit etmede altın standart yöntemden daha üstündür.

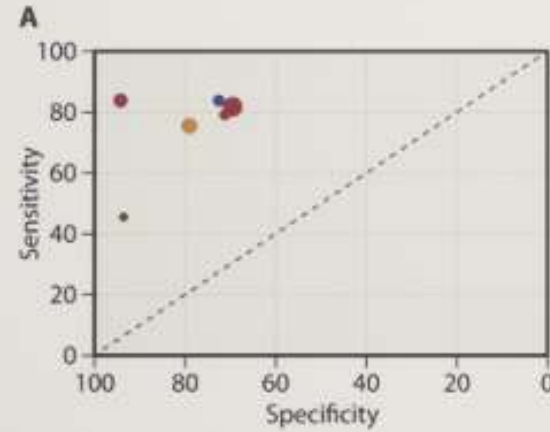
Of areas, including antimicrobial resistance, the microbiome, human host gene expression (transcriptomics) and oncology. Here, we focus on the challenges of implementing mNGS in the clinical laboratory and address potential solutions for maximizing its impact on patient care and public health.

* Liu J, et al. Sci Rep. 2022;12(1):21032

* Chiu CY, et al. Nat. Rev. Genet. 2019, 20, 341–355.

Iridica / Plex ID

- Multipleks broad range PCR + Elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi (ESI-MS)
- **780 bakteri ve *Candida* türü**
- 6 test → 6 saat
- mecA, vanA, vanB ve blaKPC
- **Sens: %45-83, Spes: %69-94**
- **Sens: %77-91, Spes: %87-99***
- Polimikrobiyal tanımlamada yetersiz
- **5 ml kan, pediatrik hastalarda Iridica X**



	>3 mL	1-3 mL	≤1 mL
ICU	Red	Red	Pink
ER	Dark Blue	Blue	Light Blue
Hematology	Dark Green	Green	Light Green
Mixed/other	Dark Orange	Orange	Light Orange

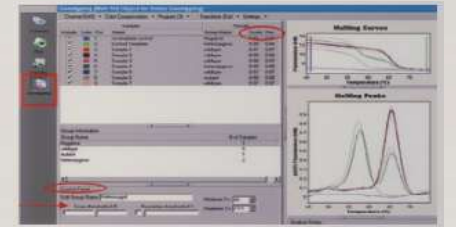
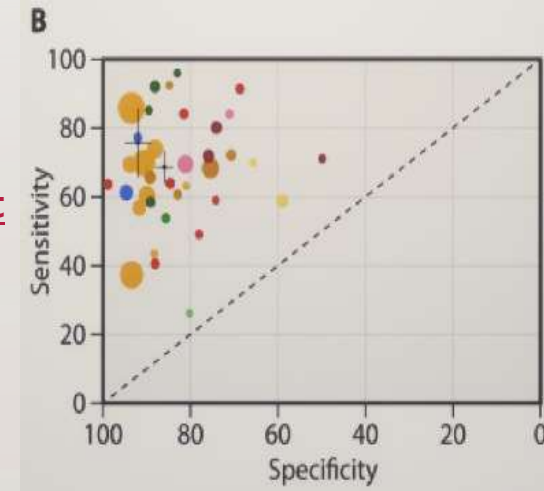
	PLEX-ID	IRIDICA
Volume of whole blood analyzed	1.25 mL	5 mL
Samples per run of nucleic acid extraction	1 - 24 (24-well plate format, manual dispensation of reagents and specimens)	1-6 (ready-to-use individual reagent cartridges)

* Sinha M, et al. Clin Microbiol Rev. 2018;31(2):e00089-17

* Desmet S, et al. J Clin Microbiol. 2016;54(10):2513-2520.

SeptiFast

- Multipleks gerçek zamalı PCR + in-sitü hibridizasyon + HRM
- >16 bakteri, 5 *Candida* türü ve *A. fumigatus*
- 8 test → 6 saat
 - *MagNA Pure otomatikleştirilmiş DNA ekstraksiyonu ile **4 saat**
- mecA (100 dk içinde)
- **Sens: %68-75, Spes: %86-92 (Meta-analizler)**
- Polimikrobiyal tanımlamada iyi performans
- **1,5 ml kan, çocuklarda ✓, yenidoğanlarda X**
 - *Yenidoğan sepsisi ile ilişkili patojenler eksik**



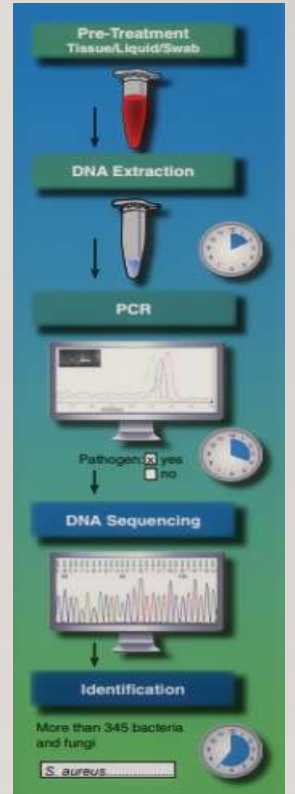
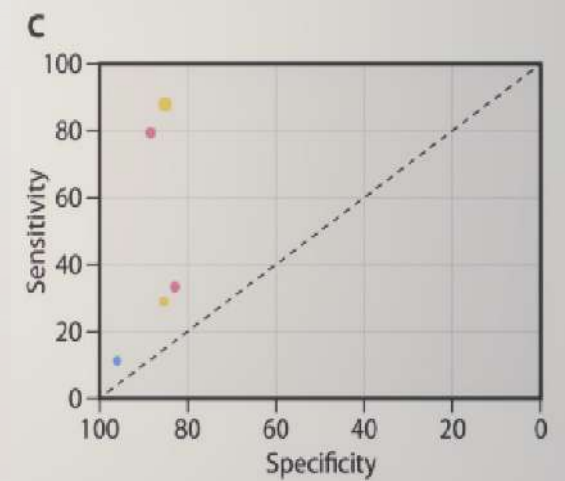
* Dark P, et al. Intensive Care Med 41:21–33.

* Chang S-S, et al. PLoS One 8:e62323.

* Sinha M, et al. Clin Microbiol Rev. 2018;31(2):e00089-17

SepsiTest

- Multipleks broad range PCR + Sanger sekanslama (Hedefe yönelik metagenomik sekanslama)
- **303 bakteri, 40 fungal etken**
- 12 test → 8-10 saat (4 saatte ilk sonuç)
 - *Gelecekte, yeni nesil sekanslama yöntemleri ile saptanabilir (+hızlı)
- Direnç **genlerini saptayamaz**
- **Sens: %11-87, Spes: %85-96**
- **Sens: %38-79, Spes: %87-95***
- **1ml kan, çocuklarda ✓**
- Polimikrobiyal tanımlamada yetersiz

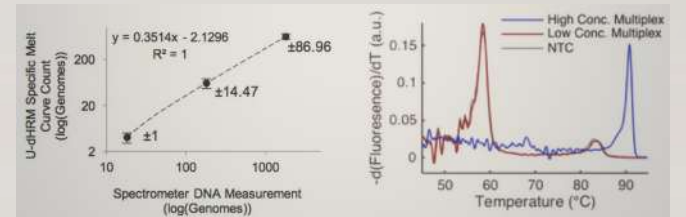
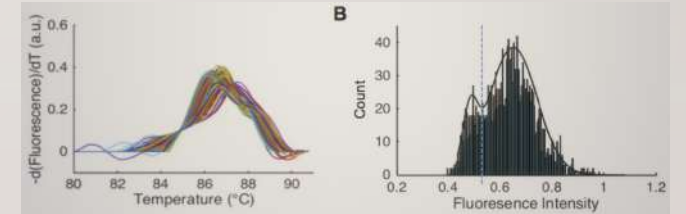
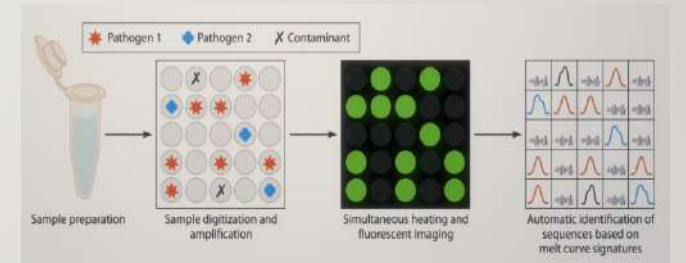


* <https://www.molzym.com/molzym-blog/categories/molecular-diagnostics/166-sepsitest-umd-unbiased-rdna-pcr-pathogen-diagnosis>

* Leitner L, et al. J Microbiol Methods 92:253–255.

U-dHRM

- Universal dijital PCR + HRM (Mikroakışkan chip üzerinde)
- 37 bakteri (**yenidoğan sepsisi ile ilişkili**)
- 1 test → **4 saat, Kantitatif veri !!, ölü-canlı ayırımı yapabilir !!**
- **37 patojen için %99.9 doğruluk** (*daha fazla değerlendirme ihtiyacı)
- Polimikrobiyal etkenleri tanımlamada **gayet başarılı**
- **<1 ml kan, çocuklarda ✓, yenidoğanda ✓**
- Kullanımı kolay, hızlı tanımlama, direnç saptanabilir, yapay zeka ile geniş bilgi bankası → **Gelecekte taşınabilir POCT !!**

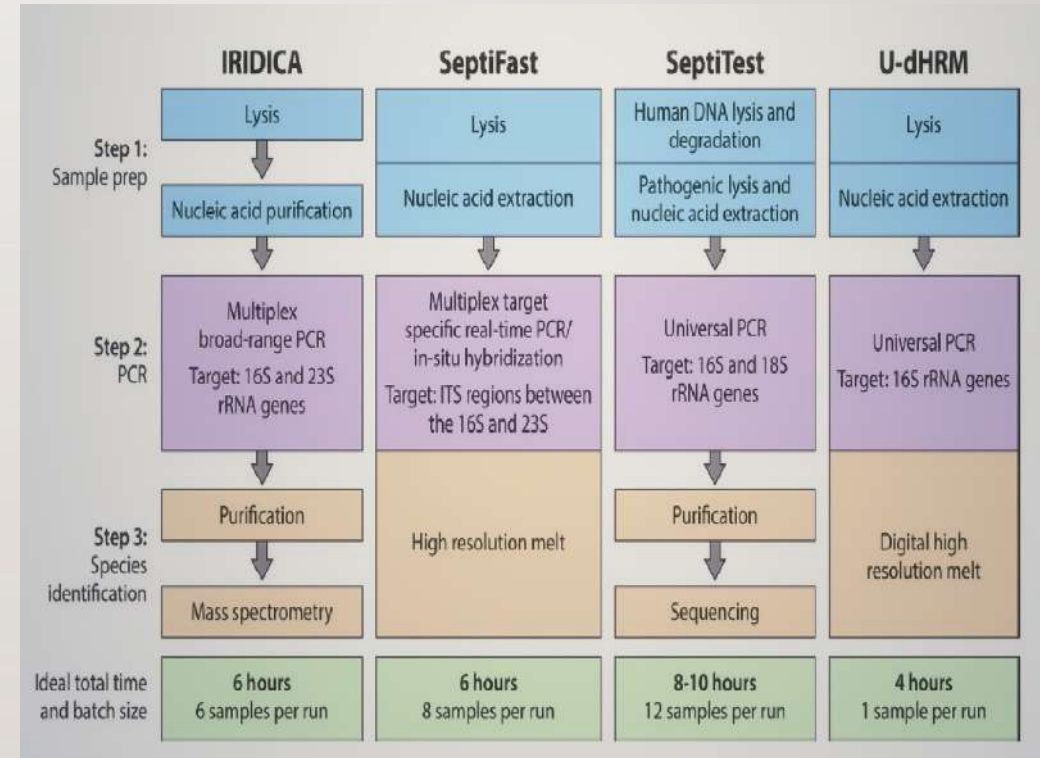


*Velez DO, et al. *Sci Rep*. 2017;7:42326.

*Sinha M, et al. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(2):e00089-17

Iridica – SepsisTest – SeptiFast – U-dHRM

- **Iridica ve SepsisTest** → Daha fazla örnek transfer adımı içerir / Multiplex broad range PCR kullanılır → **Yüksek kontaminasyon riski** → Kontaminasyon riskini azaltmak için **semikantitatif yöntemler** → **Yalancı negatiflik**
- **U-dHRM** → Yalancı negatifliğin en az olduğu yöntem. Polimikrobiyal enfeksiyonların ve kontaminasyonun ayırt edilebilmesini sağlamak için kantitatif veri sunan **tek testtir**.

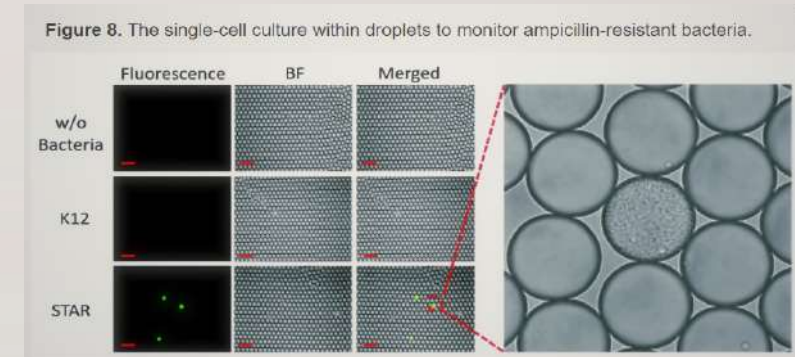
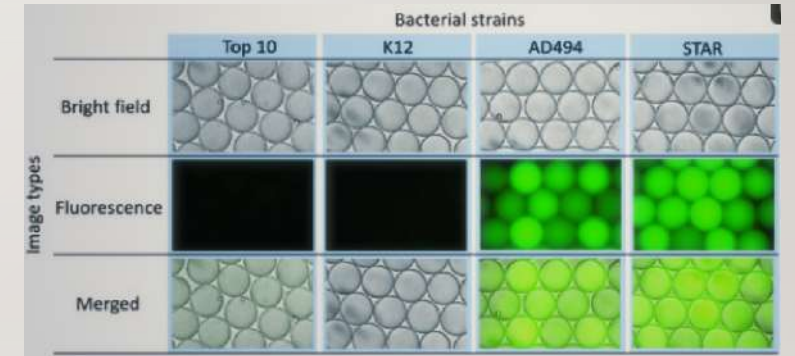


* Reers Y, et al. Diagn Microbiol Infect Dis 85:413– 415

* Sinha M, et al. Clin Microbiol Rev. 2018;31(2):e00089-17

IC-3D (Integrated Comprehensive Droplet Digital Detection)

- Dijital PCR + Yüksek verimli 3D partikül sayma sistemi (Mikroakışkan çip)
- Tek adımlı, **kültür ve amplifikasyon gerektirmeyen** tek hücre hassasiyeti ile **kantitatif veri**
- Örnek hazırlama ve saflaştırma olmaksızın hedef bakterilerin doğrudan saptanmasını mümkün kılar.
- **1-3 saat !!**
- Analiz başına **yalnızca seçilmiş bir bakteri türü !!**
- Çoklu dalga boyu algılama sistemi → Az sayıdaki floresan kanallar nedeniyle sınırlı



* <https://grantome.com/grant/NIH/R01-AI117061-01>

* Abram TJ, et al. *Lab Chip*. 2020;20(3):477-489



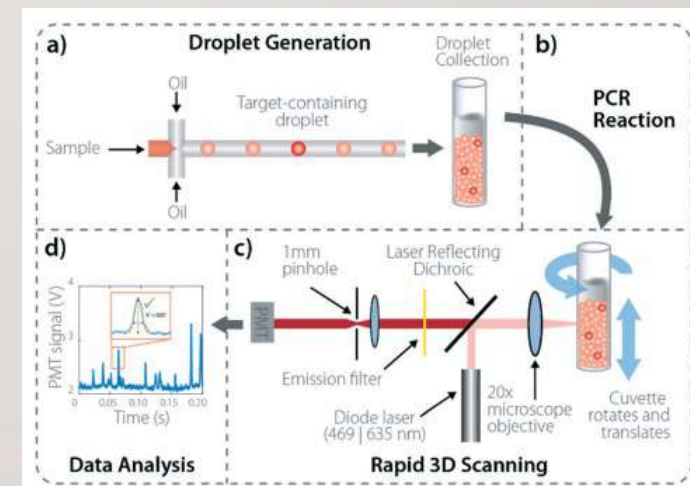
Cite this: DOI: 10.1039/c9lc01212e

Rapid bacterial detection and antibiotic susceptibility testing in whole blood using one-step, high throughput blood digital PCR†

Timothy J. Abram,^{*a} Hemanth Cherukury,^{bc} Chen-Yin Ou,^a Tam Vu,^{bd}
Michael Toledano,^b Yiyan Li,^{be} Jonathan T. Grunwald,^a Melody N. Toosky,^a
Delia F. Tifrea,^f Anatoly Slepentin,^f Jonathan Chong,^b Lingshun Kong,^b
Binghui Ma,^b D. P. Chakraborty,^b K. T. T. Chong,^b Louai Labanieh,^b Jan Zimak,^b
Dhruv Patel,^{dh}

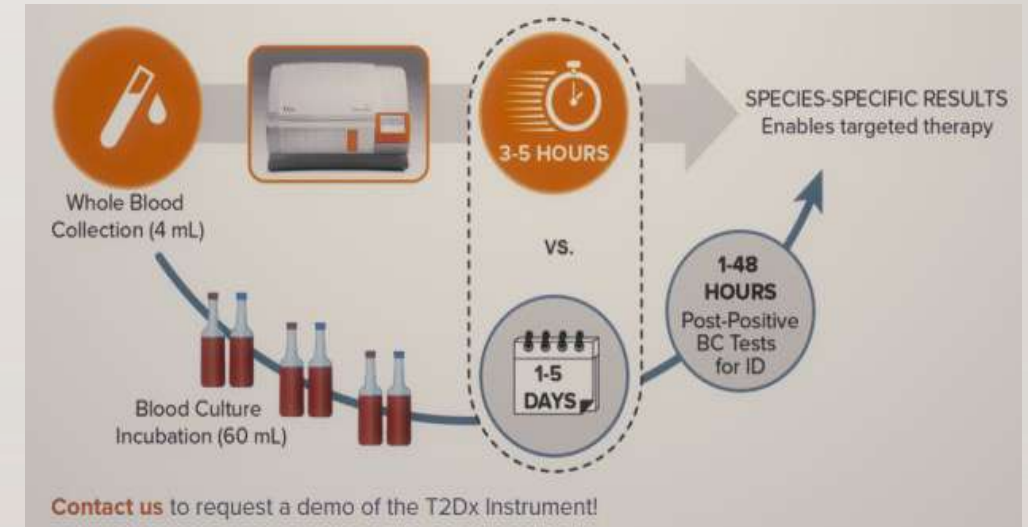
- Dijital PCR'dan düşük saptama limiti
- 1 saat içerisinde sonuç
- %100 duyarlılık ve özgüllük

- 1 saat içerisinde sonuç
- %100 duyarlılık ve özgüllük



T2Dx[®]

- **PCR (+nanopartikül ile hibridizasyon) + minyatür MR**
- Manyetik alan içindeki su moleküllerinin davranışını saptayan minyatür bir manyetik rezonans teknolojisi
- **4 ml kan, 3-5 saat içinde sonuç, FDA izinli**
- → T2Bacteria[®] **duyarlılığı %90, özgüllüğü %98**
 - * *E.faecium* *S.aureus* *K.pneumoniae* *P.aeruginosa* *E.coli*
- → T2Candida[®] **duyarlılığı %91, özgüllüğü %99**
 - * *C.albicans*, *C. tropicalis*, *C.krusei*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*
- → T2 Direnç paneli
 - * KPC, OXA-48, NDM/VIM/IMP, CTX-M, AmpC, VanA/B, MecA/C



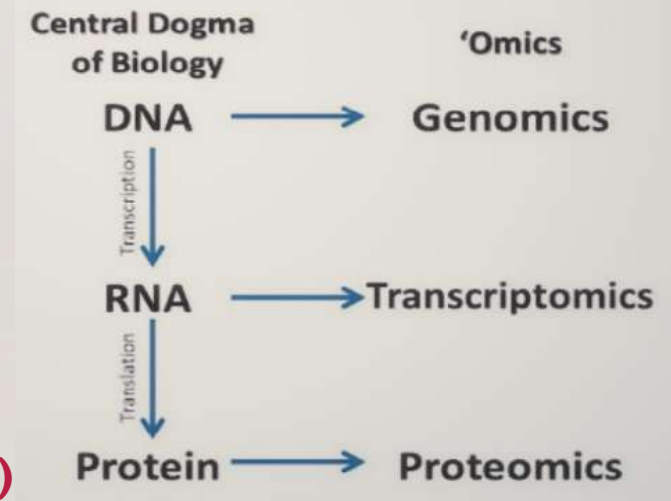
Omic Teknolojileri

- “Birden fazla farklı teknolojilerin bir araya getirilerek moleküller arasındaki ilişkileri, moleküllerin rollerini ve bir organizmayı yapan tüm hücrelerin etkilerini araştırma yaklaşımları”
- **Genomik** çalışmalarda → Konağın genetik profilinin kişinin infeksiyonlara duyarlılığı, tedaviye yanıtı ve klinik sonuçlarıyla ilişkili (Sepsis ilişkili 44 gen, Immünglobülin üretimi)
- Ancak, genomik yaklaşım tarafından sağlanan **statik bilgi**, sepsisin heterojenliği ve **dinamik seyrine** ayak uyduramadığı için, **tanısal iş akışına dahil edilememektedir !!**

→ DNA genotipi → Fenotipe → **Proteomik: MeMed BV®**

→ **Transkriptomik: Septicyte Lab / Rapid**

InSep™ Test (IMX-BVN-2)

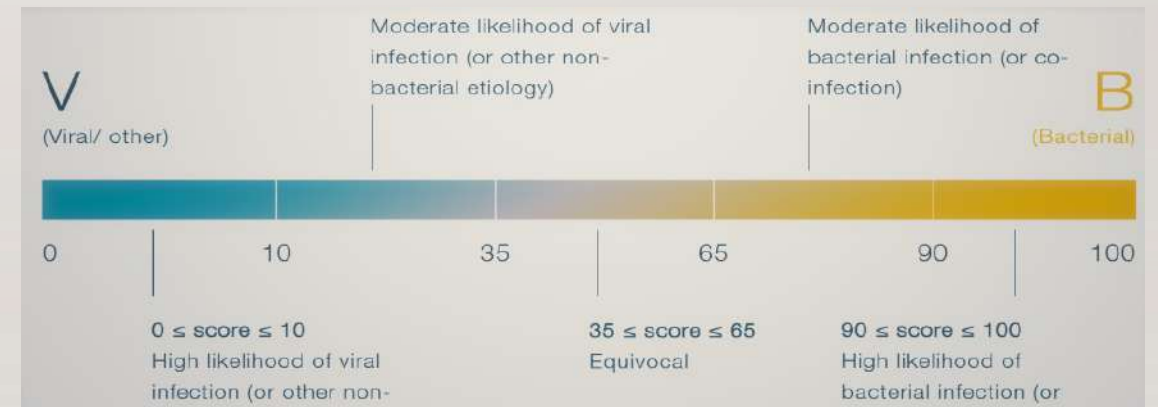


* Mangioni D, et al. J Infect Dis. 2020;221(7):1039-1047.

* Lu H, et al. Crit Care 2019; 23 :26

MeMed BV®

- **İmmunassay** ile 3 konak bağışıklık **proteini** + **yapay zeka**
 - Tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (**TRAIL**)
 - İnterferon gama kaynaklı protein-10 (**IP-10**)
 - **CRP**
- **0,1 ml kan, 15 dk**, FDA izinli
- Sens: %87,3- 93.7, Spes: %93-94.2
- **NPV %98,3**, AUC=0.97



* van Houten CB, et al. Lancet Infect Dis. 2017;17(4):431-440.

* Pagan C, et al. Clin Microbiol Infect. 2022;28(5):723-730.

* Hainrichson M, et al. Clin Biochem. 2022;S0009-9120(22)00115-1.

Septicyte Lab / Rapid

- Ters transkripsiyon kantitatif PCR (RT-qPCR)
- ‘**Sepsis imzası**’, FDA izinli
- Doğal immun yanıtta görevli **4 RNA biyobelirteci**
→ CEACAM4, LAMPI, PLA2G7 ve PLAC8
- **Sepsis ile SIRS ayırımında başarılı (AUC=0.88) !**
- 4-6 saat / **1 saat *** içinde sonuç
- 2,5 ml kan, **0,25 ml kan ****
- Patojen mikroorganizma ve direnç tanımlanmaz



Benefits of Early, Accurate Diagnoses

- ⊕ decreased mortality and morbidity
- 🛏 decreased length of stay
- 💊 decreased antibiotic budget
- 💰 decreased ancillary diagnostic budget
- ☀ reduced antibiotic resistance

* Miller RR 3rd, et al. Am J Respir Crit Care Med. 2018;198(7):903-913.

InSep™ Test (IMX-BVN-2)

Inflammatix Wins AACC's
Disruptive Technology Award
For Its Rapid HostDx™ Tests



- Host Dx™ testinin (IMX-BVN-1) yapay zeka ile geliştirilmesi
- ‘**qRT-LAMP**’, kantitatif ters transkripsiyon döngü aracılı izotermal amplifikasyon
- 29 konakçı **mRNA belirteçleri** ‘Sepsis İmzası’
 - Sepsis-MetaScore (Akut enfeksiyon, 11 mRNA)
 - Bakteriyel - Viral MetaScore (7 mRNA)
 - Stanford Mortalite Skoru (30 günlük mortalite, 11 mRNA)
- 2,5 ml kan, **<30 dk**
- Farklı modellemelerde yüksek başarı (**AUC=0.85-0.95**)
 - **Bakteriyel enf; sens: %98, spes: %94; Viral enf; sens: %96, spes: %93**



* Ducharme J, et al. J Pers Med. 2020;10(4):266.

* Atallah J, et al. Front Med (Lausanne). 2022;9:805107.

* Safarika A, et al. Intensive Care Med Exp. (2020) 8:31

* Bauer W, et al. Crit Care Med. 2021;49(10):1664-1673..



Original Investigation | Critical Care Medicine

Evaluation of a Multivalent Transcriptomic Metric for Diagnosing Surgical Sepsis and Estimating Mortality Among Critically Ill Patients

Scott C. Brakenridge, MD; Uan-I Chen, MS; Tyler Loftus, MD; Ricardo Ungaro, BS; Marvin Dirain, MS; Austin Kerr, BS; Luer Zhong, PhD; Rhonda Bacher, PhD; Petr Starostik, MD; Gabriella Ghita, PhD; Uros Midic, PhD; Dijola Darden, MD; Brittany Fenner, MD; James Wacker, MS; Philip A. Efron, MD; Oliver Liesenfeld, MD; Timothy E. Sweeney, MD, PhD; Lyle L. Moldawer, PhD

RESULTS Among patients with a median age, 62.5 [IQR, 47.5-71.5], the receiver operating characteristic (ROC) curve for IMX-BVN-3 for bacterial infection was significantly better than IL-6 (0.67 [95% CI, 0.58-0.75], $P < .001$). For estimating 30-day mortality, the IMX-BVN-3 score was significantly better than IL-6 levels (0.57 [95% CI, 0.48-0.66], $P = .006$), marginally better than procalcitonin levels (0.65 [95% CI, 0.50-0.79], $P = .06$), and similar to the SOFA score (0.76 [95% CI, 0.62-0.91], $P = .48$).

* **IMX-BVN-3**, bakteriyel enfeksiyonları ayırt etmede **prokalsitonin ile eş değer**, **30 günlük mortalite riskinin tahmininde belirgin üstün.**

* **IMX-BVN-3** skorunda **azalma**, **kllinik iyileşme ile korele**

Indication	Feasibility	Prototype	Development	Regulatory Clearance
Presence, type & severity of infection (whole blood)	TriVerity			
Bacterial, viral, no or co-infection (fingerstick)	BacVerity			
Sepsis therapy response (whole blood)	ENDOTYPES			
Pathogen ID (Flu, RSV & Covid) + viral host response (nasal swab)	Viral Pathogen ID & Host Response			

Using a 29-mRNA Host Response Classifier To Detect Bacterial Coinfections and Predict Outcomes in COVID-19 Patients Presenting to the Emergency Department

Nikhil Ram-Mohan^a, Angela J. Rogers^b, Catherine A. Blish^c, Kari C. Nadeau^b, Elizabeth J. Zudock^a, David Kim^a, James V. Quinn^a, Lixian Sun^d, Oliver Liesenfeld^d, The Stanford COVID-19 Biobank Study Group, Samuel Yang^a

ABSTRACT We developed a 29-mRNA host response classifier (IMX-BVN-3) to detect bacterial coinfections and predict outcomes in COVID-19 patients. The classifier was trained on data from 101 patients with COVID-19 and bacterial coinfections. The classifier was validated on a separate cohort of 101 patients. The classifier accurately identified patients with COVID-19 and bacterial coinfections and predicted patients' risk of death. A point-of-care version of these classifiers, under development, is being used to assess the impact of COVID-19 on the management of patients with bacterial coinfections.

* **IMX-BVN-3'ün COVID-19 tanısındaki duyarlılığı %93.8**

* Yalancı negatif sonuçlanan 10 hastanın ise **kontrol PCR sonuçları sınırda pozitif**

* **Bakteriyel ko-enfeksiyonu tanımlamada duyarlılığı %100, özgüllüğü %99,4**

* Scott C, et al. JAMA Netw Open. 2022;5(7):e2221520

* Ram-Mohan N, et al. Microbiol Spectr. 2022;10(6):e0230522.

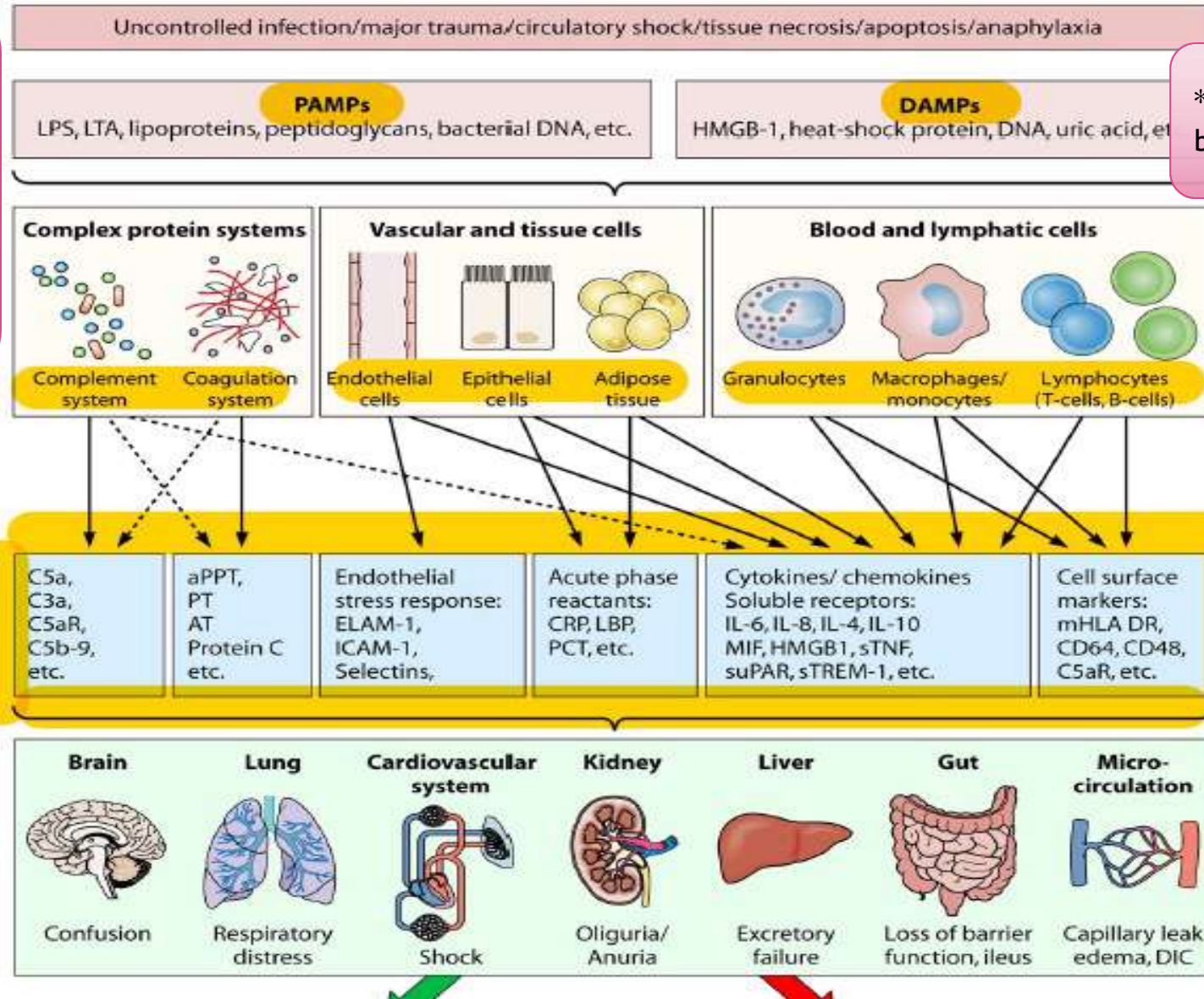


BİYOBELİRTEÇLER



* Mikroorganizmalarda bulunan benzersiz motiflerdir

* **PAMP'ların** **multipleks** **tespitine yönelik** araştırmalar devam etmektedir ve gelecekte **hasta başı teşhisinde (POC)** devrim oluşturabileceği düşünülmektedir.



* Konakta hasar olduğunun bir işaretidir

Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal

Charalampos Pierrakos¹, Dimitrios Velissaris², Max Bisdorff³, John C. Marshall⁴ and Jean-Louis Vincent^{3*} 



Abstract

Introduction: Sepsis is a life-threatening condition. In a previous review, we identified 258 biomarkers. We evaluate the current state of the field.

Methods: Using a systematic search of the literature until September 2019, we identified all studies, clinical and laboratory, that evaluated biomarkers in sepsis.

Results: We reviewed 258 biomarkers, 80 of which were new. The majority of biomarkers have been evaluated in fewer than 5 studies, with 81 (31%) evaluated in 1-5 studies, 17 (6%) in 6-10 studies, and 160 (63%) in more than 10 studies. Forty-four biomarkers have been evaluated for a role in answering a specific clinical question rather than for their general diagnostic or prognostic properties in sepsis.

Conclusions: The number of biomarkers being identified is still increasing although at a slower rate than in the past. Most of the biomarkers have not been well-studied; in particular, the clinical role of these biomarkers needs to be better evaluated.

- 258 biyobelirteç,
- 80'i son 10 yılda tanımlanmış
 - Çoğu genel inflamatuvar reaksiyonlar ile ilişkilidir
 - Sepsis patofizyolojisinde spesifik olarak bir role sahip olan sadece birkaç biyobelirteç (Presepsin, LBP, vb.)
 - En sık **IL-6, presepsin ve CD64**
- Biyobelirteçlerin klinik yararlarına yönelik daha fazla çalışma gereklidir

Kalprotektin

- Kalsiyum bağlayıcı bir proteindir. Bakterilere ve endotoksinlere yanıt olarak saatler içerisinde hızlıca nötrofillerden salınır.
- **Bakteriyel – viral pnömoni ayrımında ve sepsis tanısında prokalsitoninden daha iyi sonuçlar** ★
- Mortalite prediktörü olarak faydalı
- 2022 yılında 820 hastanın değerlendirildiği meta-analizde sepsis tanısındaki **duyarlılığı %75, özgüllüğü %85**

* Gao RY, et al. Front Cell Infect Microbiol. 2022 Nov 28;12:1045636.

* Larsson A, et al. Scand J Clin Lab Invest . 2020 Feb-Apr;80(2):156-161.

İnterlökin-6 (IL-6)

- Klinik bulgular gelişmeden yükselir (PCT'den önce)
- 2016 yılında 2680 hastanın değerlendirildiği meta-analizde sepsisdeki **duyarlılığı %68, özgüllüğü %73** (PCT ile benzer)
- 2019 yılında 4192 hastanın değerlendirildiği sistemik derlemede ise **duyarlılık %66, özgüllük %74**
- Viral enfeksiyonlardaki yeri?

* Ma L, et al. Cytokine. 2016 Dec;88:126-135

* Molano Franco D, et al. Cochrane Database Syst Rev. 2019 Apr 30;4(4):CD011811.

Çözünebilir Ürokinaz Plazminojen Aktivatör Reseptörü (suPAR)

- Kanda ve vücut sıvılarında yaygın olarak bulunan immun sistem aktivitesi ile doğrudan ilişkili bir membran reseptörüdür
- Acil serviste kolayca ve hızlıca ölçülebilir (20 dk içerisinde sonuç, POC)
- 6906 hastanın değerlendirildiği meta-analizde sepsis tanısındaki **duyarlılığı %76, özgüllüğü %78** (PCT ile benzer)
- **Sepsis ile sistemik inflamatuvar yanıt sendromunu ayırt etmede faydalı, mortalite için öngördürücü !** ★

* Huang Q, et al. Shock. 2020 Apr;53(4):416-425.

* Kumar P, et al. J Family Med Prim Care. 2019 Dec 10;8(12):3871-3875.

* Petersen JEV, et al. BMJ Open. 2020 Jul 19;10(7):e036125.

Heparin Bağlayıcı Protein (HBP)

- Nötrofillerin azurofilik granüllerinde depolanır ve T lenfositler ile monositlere karşı kemotaktik etkilere sahiptir.
- 2019 yılında 1884 hastanın değerlendirildiği bir meta-analizde sepsis tanısındaki **duyarlılığı ve özgüllüğü %80** olarak bildirilmiştir.
- 2021 yılında 3868 hastanın değerlendirildiği başka bir meta-analizde ise **duyarlılık %85, özgüllük %91 (CRP ve Prokalsitoninden üstün performans) ★**
- Klinik bulgulardan önce yükselmeye başlar

* Wu YL, et al. Crit Care Med. 2021;49(1):e80-e90.

* Chen M, et al. Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue. 2019;31(10):1224-1230.

Presepsin (P-SEP)

- Monositler ve makrofajlar gibi bağışıklık hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen bir glikoprotein olan CD14'ün 13 kDa çözünür bir parçasıdır.
- Lipopolisakkaridler için bir reseptör görevi görür
- **Prokalsitonin ve IL-6 seviyelerinden daha önce yükselir**
- Acil serviste kolay ve **hızlıca ölçülebilir (20 dk)**
- Sepsis tanısındaki sınır değeri 400–600 pg/mL.
- Tedavi yanıtında kullanılabilir

* Lazzaro A, et al. Int J Mol Sci. 2022;23(2):803

* Piccioni A, et al. Medicina (Kaunas). 2021;57(8):770.

Presepsin (P-SEP)

- 3012 hastanın değerlendirildiği meta-analizde sepsis tanısındaki **duyarlılığı %84, özgüllüğü %73 (PCT ile benzer)**
- **Akut böbrek yetmezliğinde** özgüllüğü %60'lara kadar düşmektedir (**PCT'den düşük**)
- Çocuklardaki sepsis tanısındaki **duyarlılığı %94** (CRP ve prokalsitoninden yüksek), **özgüllüğü %71** (CRP ve prokalsitoninden düşük).
- **Yenidoğan sepsisinin** tanımlanmasında **duyarlılığı %93, özgüllüğü % 91 (PCT'den üstün)** ★

* Yoon SH, et al. BMC Infect Dis. 2019;19(1):760.

* Nakamura Y, et al. Clin Chim Acta. 2019;490:200-206

* Poggi C, et al. JAMA Pediatr. 2022;176(8):750-758.

* Kondo Y, et al. J. Intensive Care 2019, 7, 22.

Nötrofil CD64

- **Bakteriyel enfeksiyon** sırasında salınan sitokinlere yanıt olarak nötrofiller, monositler ve makrofajlar tarafından eksprese edilen IgG bağlayıcı reseptördür.
- 2019 yılındaki 2471 hastanın değerlendirildiği meta-analizde sepsis tanısındaki duyarlılığı %87, özgüllüğü %89 (PCT'den üstün) ★
- 2021 yılındaki 9842 hastanın değerlendirildiği başka bir meta analizde ise duyarlılığı ve özgüllüğü %88 !! ★
- Flow sitometri yöntemi ile saptanabilmesi klinik kullanımda dezavantajı
- Bununla beraber **mikroakışkan biyoçip** teknolojisi ile **hasta başında 50 dk'dan kısa** sürede ölçüm yapabilen teknikler geliştirilmiştir.

* Cong S. et al. BMC Infect. Dis. 2021; 21, 1–17.

* Yeh CF, et al. Ann Intensive Care. 2019;9(1):5.

* Ghonge T, et al. Analyst. 2019;144(13):3925-3935.

Miyeloid Hücrelerde Eksprese Olan Çözünür Tetikleyici Reseptör-1 (sTREM-1)

- Miyeloid hücrelerde eksprese olan çözünür tetikleyici reseptör-1 (sTREM-1), bakteriyel lipopolisakkaridler tarafından uyarılan polimorfonükleer hücrelerin ve olgun monositlerin yüzeyinde bulunur.
- IL-8, TNF alfa ve monosit kemotaktik protein-1 salgılanmasını tetikler.
- 2020 yılında 2418 hastanın değerlendirildiği meta-analizde sepsis tanısındaki **duyarlılığı %82, özgüllüğü %81 (PCT ile benzer)**
- 2021 yılında 2263 hastanın değerlendirildiği meta-analizde ise **duyarlılığı %85, özgüllüğü %79**, mortalite prediktörü !
- Neonatal sepsis tanısındaki **duyarlılığı %94, özgüllüğü %87**

* Chang W, et al. Bmc Immunol. 2020, 21, 2.

* Qin Q, et al. Infect Genet Evol . 2021 Dec;96:105074

* Chang C, et al. Front Pediatr. 2022;10:929665.

Pro-Adrenomedullin (ProADM)

- Vasküler endotel hücreleri ve düz kas hücreleri tarafından üretilen adrenomedullin'den türetilen 48 amino asitli bir peptit
- Acil serviste kolay ve **hızlıca ölçülebilir (30 dk)**
- 2038 hastanın değerlendirildiği meta-analizde sepsis tansındaki sınır değeri 1-1.5 nmol/L, **duyarlılığı %83, özgüllüğü %90** ★
- Ancak **küçük çocuklarda** bakteriyel enfeksiyon tanısında **düşük performans !**
- ProADM, yüksek mortalite riskinin (COVID-19) ve organ disfonksiyonunun (Kalp yetmezliği) erken bir öngördürücüsü ve **klirik progresyon biyobelirtecidir**

* Li P, et al. *Minerva Anesthesiol.* 2021;87(10):1117-1127.

* Piccioni A, et al. *Medicina (Kaunas).* 2021;57(9):920.

* Corr MP, et al. *BMC Pediatr.* 2022;22(1):176.

* Kim H, et al. *Ann Lab Med.* 2019;39(5):454-463.

MikroRNA (miRNA)

- miRNA'lar, konağın enfeksiyonlara karşı doğal ve edinsel immünyanıtında yer alan proteinleri düzenleyerek, sepsis patogeneğinde anahtar bir rol oynarlar.
- **miRNA genlerindeki polimorfizm**, kişilerde **enfeksiyonlara karşı duyarlılığı değiştirdiği** düşünülmektedir.
- 2337 hastanın değerlendirildiği bir meta-analizde, sepsis tanısındaki **duyarlılığı %80, özgüllüğü %85**, (PCT ile benzer) *** **miR-233 ile en iyi sonuçlar!!** ★
- Sepsis dışında hematolojik ve onkolojik kanserlerde, ankilozan spondilit, hepatit B ve C virüs enfeksiyonlarında, iskemik serebrovasküler olaylarda, alkolik olmayan karaciğer yağlanması gibi bir çok durumda tanısal amaçlı kullanılabilmektedir.

* Shen X, et al. J Intensive Care. 2020;8(1):84.

* Huang Y et al. BMC Infect Dis. 2022;22(1):323.

* Zhao J, et al. J Mol Neurosci. 2022;72(8):1572-1585.

* Koopaie M, et al. Cancer Med. 2022;11(13):2644-2661.

Intestinal Mikrobiyota ??



Med Sci Monit. 2018; 24: 8639–8646.

Published online 2018 Nov 29. doi: [10.12659/MSM.911768](https://doi.org/10.12659/MSM.911768)

Gut Microbiota Disruption in Septic Shock Patients: A Pilot Study

You-Dong Wan,^{1,A,B,C,D,E,F,G,*} Rui-Xue Zhu,^{2,A,B,C,D,*} Zi-Qian Wu,^{1,A,B,C,D} Shao-Yan Lyu,^{1,A,B,C,D} Lian-Xing Zhao,^{1,A,B,C,D} Zhong-Jun Du,^{1,A,B,C,D} and Xin-Ting Pan^{1,A,B,C,D,E,F,G}

Results: Significantly lower bacterial diversity was found in septic shock patients compared with healthy subjects ($p < 0.05$). However, there was no difference in bacterial diversity in the presence or absence of probiotics ($p = 0.59$), enteral nutrition ($p = 0.59$), or in-hospital death ($p = 0.93$) in septic shock patients. A high abundance of *Proteobacteria* and *Fusobacteria* was observed in most septic shock patients, whereas low abundance was observed in healthy subjects (mean relative proportion: 23.71% vs. 3.53%, $p < 0.05$; 1.27% vs. 0.12%, $p = 0.59$).

Conclusions: Bacterial diversity was decreased, and 1 or 2 rare bacterial species were overgrown in septic shock patients. Bacterial diversity was not improved by use of probiotics or enteral nutrition. The small sample size of our study limits the interpretation of results.

GUT MICROBES
2020, VOL. 12, NO. 1, e1707610 (16 pages)
<https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1707610>



RESEARCH PAPER/REPORT

OPEN ACCESS Check for updates

Gut microbiota profiles in critically ill patients, potential biomarkers and risk variables for sepsis

Gloria M. Agudelo-Ochoa^{a,*}, Beatriz E. Valdés-Duque^{b,*}, Nubia A. Giraldo-Giraldo^{c,p}, Ana M. Jaillier-Ramírez^c, Adriana Giraldo-Villa^d, Irene Acevedo-Castaño^e, Mónica A. Yepes-Molina^f, Janeth Barbosa-Barbosa^g, and Alfonso Benítez-Paéz^h

^aFood and Human Nutrition Research Group, Universidad de Antioquia (UdeA), Medellín, Colombia; ^bBiosciences Research Group, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Medellín, Colombia; ^cDepartment of Nutrition, Hospital San Vicente Fundación, Rionegro, Colombia; ^dDepartment of Nutrition, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia; ^eDepartment of Nutrition, Hospital General, Medellín, Colombia; ^fDepartment of Nutrition, Hospital San Vicente Fundación, Medellín, Colombia; ^gDepartment of Nutrition, Clínica Las Américas, Medellín, Colombia; ^hMicrobial Ecology, Nutrition and Health Research Unit, Institute of Agrochemistry and Food Technology. Spanish National Research Council (IATA-CSIC), Paterna-Valencia, Spain

ABSTRACT

Critically ill patients are physiologically unstable and recent studies indicate that the intestinal microbiota could be involved in the health decline of such patients during ICU stays. This study aims to assess the intestinal microbiota in critically ill patients with and without sepsis and to determine its impact on outcome variables, such as medical complications, ICU stay time, and mortality. A multi-center study was conducted with a total of 250 peri-rectal swabs obtained from 155 patients upon admission and during ICU stays. Intestinal microbiota was assessed by sequencing the V3-V4 hypervariable regions of the 16S rRNA gene. Linear mixed models were used to integrate microbiota data with more than 40 clinical and demographic variables to detect covariates and minimize the effect of confounding factors. We found that the microbiota of ICU patients with sepsis has an increased abundance of microbes tightly associated with inflammation, such as *Parabacteroides*, *Fusobacterium* and *Bilophila* species. Female sex and aging would represent an increased risk for sepsis possibly because of some of their microbiota features. We also evidenced a remarkable loss of microbial diversity, during the ICU stay. Concomitantly, we detected that the abundance of pathogenic species, such as *Enterococcus* spp., was differentially increased in sepsis patients who died, indicating these species as potential biomarkers for monitoring during ICU stay. We concluded that particular intestinal microbiota signatures could predict sepsis development in ICU patients. We propose potential biomarkers for evaluation in the clinical management of ICU patients.

* Agudelo-Ochoa GM, et al. Gut Microbes. 2020;12(1):1707610.

* Wan YD, et al. Med Sci Monit, 2018; 24: 8639-8646

➤ **HASTA BAŞI TESTLER (POCT)**

Hasta Başı Testler (POCT)

- ‘Hastanın bulunduğu yerde veya yakınında yapılan, hastaya verilecek bakımda değişikliğe neden olabilecek testler’

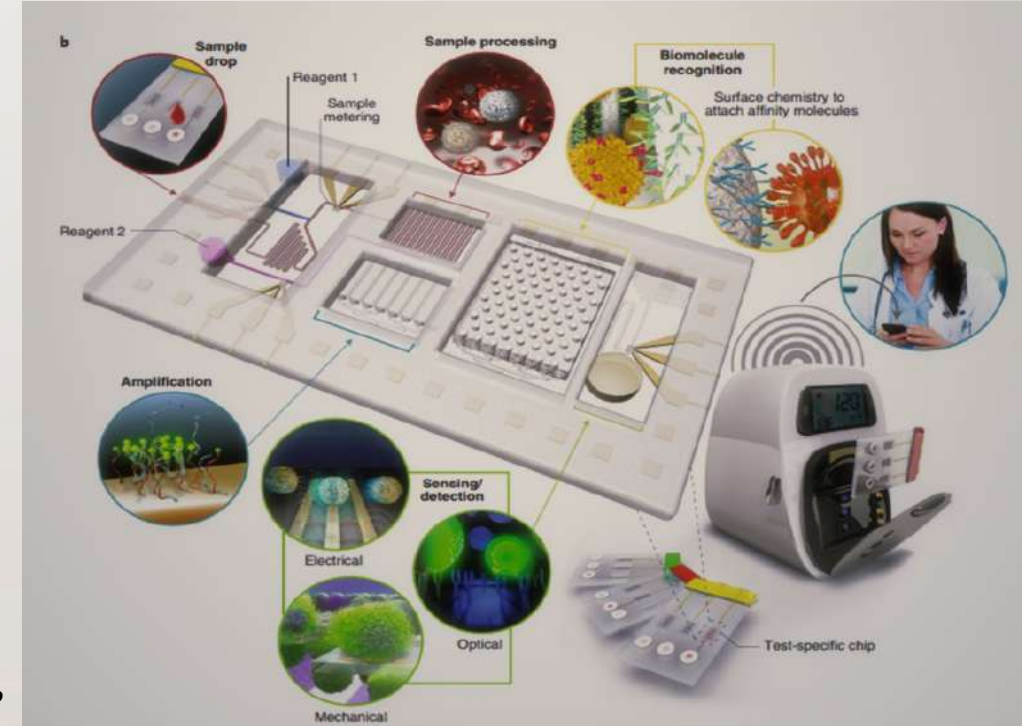
- Hızlı
- Az miktarda numune ihtiyacı
- Kullanımı kolay
- Deneyimli teknisyen ihtiyacı yok



- Pahalı
- Zayıf analitik performans
- Kayıt sorunu
- Sonuçların yorumlanmasında subjektiflik

Hasta Başı Testler (POCT)

- Öncelikle sepsis biyomarkırlarının hızlı tespitinde kullanılmıştır
 - CRP POCT; 2 dk içinde sonuç
 - PCT POCT; 'Brahms PCT Direct', parmak ucu, 'Radiometer AQT90 Flex', 2 ml kan,
 - CRP ve PCT; elektrokimyasal manyetoimmünosensör
 - IL-6; mikro-elektrot sensör, 2,5 dk
 - Lökosit sayısı, CD64, MKP-1, TLR, CTLA-4, CD11b, CD66b, miR-133A, miR-150, vb.



* Teggert A, et al. Micromachines (Basel). 2020;11(3):286.

* Fabri-Faja N, et al. Anal. Chim. Acta 2019, 1077, 232–242

* Russel C, et al. Biosens. Bioelectron. 2019, 126, 806–814

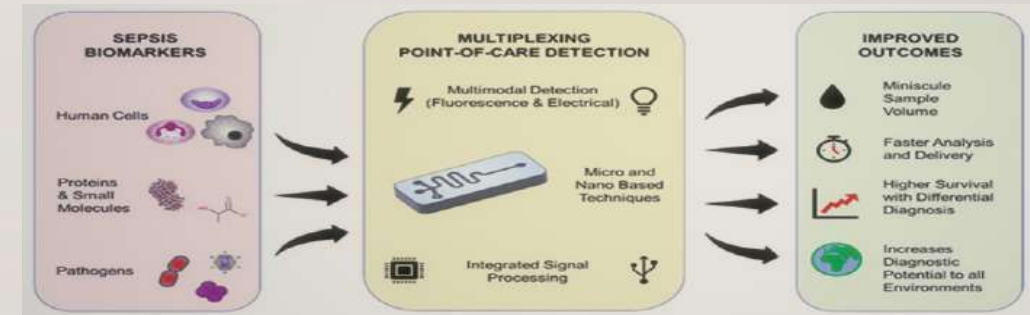
* Reddy B Jr, et al. Nat Biomed Eng. 2018;2(9):640-648.

Hasta Başı Testler (POCT)

- Ticari olarak kullanılan mevcut POCT'ların **çoklu tespit yeteneğine sahip olmaması**, fazla bioakışkan sıvı ihtiyacının (PCR mekanizmalı olanlar) ve yüksek maliyetinin (i-STAT-I Wireless) olması sepsis tanısındaki kısıtlılıklarıdır.
- Bu stratejileri geliştirmek, **birden fazla septik biyobelirteci aynı anda ölçebilmek** için (lab-on-chip “LoC”) **lateral flow assay, microarray ve mikroakışkan sistemler (çok katlı mikro/nano sistemler) kullanılmıştır.**

Notable available POCC products for sepsis biomarker detection

Device	Detection mechanism	Biomarker measuring	Biofluid volume	Assay time
i-STAT 1 Wireless	Electrochemical	Small molecules	17–95 µL	2–10 mins
LABGEO ^{1B10}	Immunoassay	Proteins	500 µL	20 mins
LiDia [®]	PCR	Pathogens	10 mL	3–4 hours
Moxi GO [™] II	Coulter/flow cytometry	Cell receptors/cell counts	60 µL	< 1 min
T2Dx [®]	PCR	Pathogens	4 mL	3–5 hours
Wolf [®] Cell Sorter	Fluorescence activated cell sorting (FACS)	Cell receptors/cell counts	0.15–5 mL	1 hour



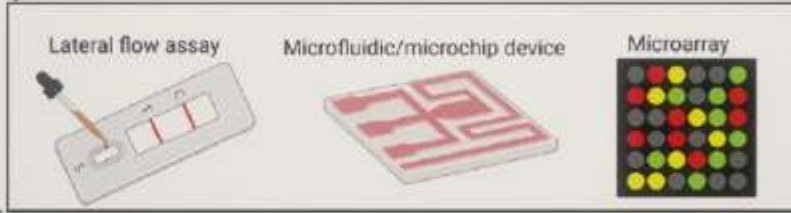
* Reddy B Jr, et al. Nat Biomed Eng. 2018;2(9):640-648.

* Ashley BK, et al. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2021;13(5):e1701.

- İlk basamağı, geleneksel tek biyobelirteç hedefli POCT ile aynıdır
- Protein bazlı biyobelirteç tespiti, yakalama problemleri olarak antikorları kullanan immünolojik tahlil tekniklerine dayanır (immunassay).
- Genetik tabanlı biyobelirteç tespiti, bir ilk amplifikasyon sürecini, ardından hibridizasyon için raportörlerle (örn., floresan) DNA probu konjugasyonunu gerektirir.

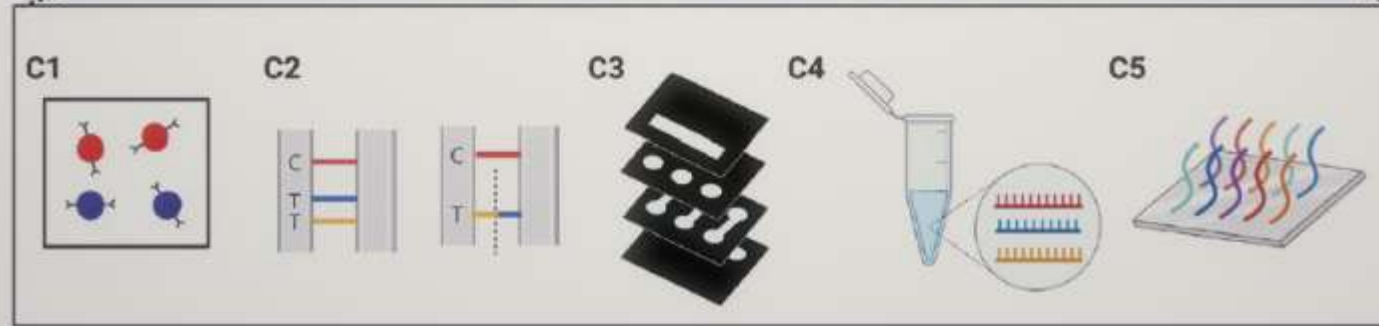


(B)



- Yanal akış deneyleri,
- Mikroakışkan cihazlar
- Mikrodiziler

- C1) Farklı raportörlerle konjuge edilmiş antikor yakalama.
- C2) Çift test hattı veya çift akış yolu
- C3) Dikey akış tasarımı, numuneyi birden çok kuyuya ayırır
- C4) Çoklu primerlerle izotermal nükleik asit amplifikasyonu
- C5) Çoklu sabitlenmiş problemler.



Lateral Flow Immunassay

- Çeşitli protein biyobelirteçleri veya gen ekspresyon imzalarını tespit edebilmek için birkaç farklı yakalama probları kullanır.

➤ FebriDx®

- **CRP ve Miksovirüs direnç proteini A (MxA)***

* interferon alfa/beta tarafından uyarılan bir hücre içi kan proteinidir.

- Akut üst solunum yolu enfeksiyonlarında bakteriyel/viral enfeksiyon ayırımında **sens: %80,**
spes: %95
- **Non-invazif (parmak ucu), 10 dk** içerisinde sonuç



* Shirley M. Mol Diagn Ther 23, 803–809 (2019)

* Guo J, et al. J. Mater. Sci. Technol., 2020, 60, 90–104.

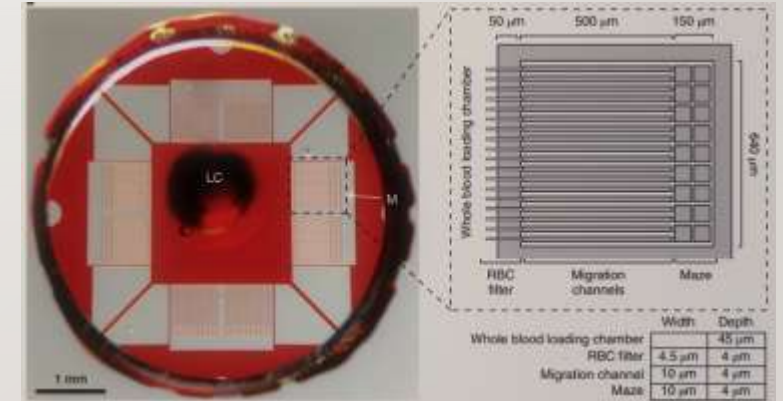
Mikroakışkan Sistemler

- Mikrolitre ve daha küçük hacimlerdeki **akışkanların** mikro ölçekteki (metrenin milyonda biri) kanallar içerisinde **kontrol edilmesini ve hareket ettirilmesini** sağlayan sistemlerdir.
- **Düşük numune ve reaktif tüketimi, kısa analiz süresi, mekansal ve zamansal faktörlerin daha hassas kontrolü** gibi çeşitli avantajlara sahiptir.
- Çok katlı mikro/nano sistemlerde sıvı akışını kontrol ederek farklı tespit bölgeleri oluşturur ve bulaşıcı hastalıkların teşhisi için birçok POCT yöntemi bu teknolojiyi farklı şekillerde uygular.
 - Protein bazlı biyobelirteçler için multipleks mikroakışkanlar; immünoassay metodolojisi ile entegre edilir.
 - Genetik tabanlı biyobelirteç tespiti için; PCR veya döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) teknikleri
 - Nanoparçacıklar, manyeto-nanoparçacıklar, kuantum noktaları, elektriksel olarak ayarlanmış parçacıklar, vb.

Mikro ve Nano POCT Teknolojileri

➤ Fiziksel ölçüm

- **Hücreye özgü yanıtları** ortaya çıkarmak için ince ayarlanmış (geometrilere, gradyanlar, sertlikler) akışkan mikrokanallar aracılığıyla **biyofiziksel özelliklerin** saptanmasına dayanır
 - ➔ **Nötrofil hareketi:** sens: % 96.8, spes: 97.6%, 6,5 saate sonuç!
 - ➔ **Granülositlerdeki deformabilite**
- Etiketsiz algılama avantajı,
- Karmaşık cihaz üretimi ve az gelişmiş ölçüm yöntemleri



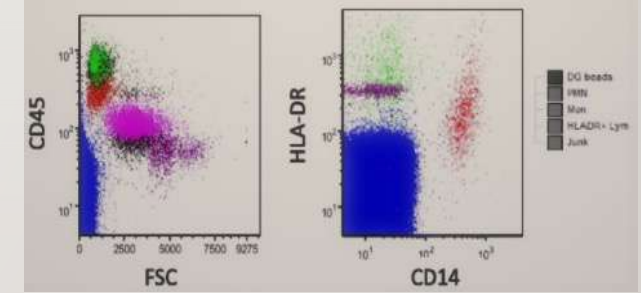
* Ellett F, et al. Nat Biomed Eng. 2018;2(4):207-214

* Hassan U, et al. Nat Biomed Eng. 2018;2(4):197-198.

Mikro ve Nano POCT Teknolojileri

➤ Floresan ölçümü

- Hücreler arasındaki optik farklılıklar, floresan özelliklere sahip moleküller kullanarak tespit edilir.

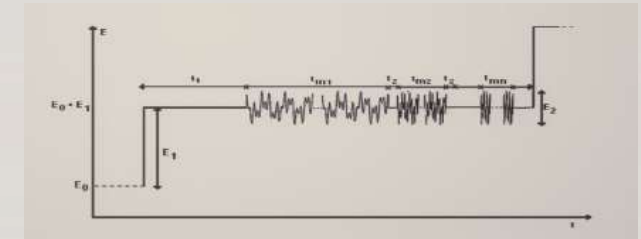


➤ Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS)

- Elektriksel uyarının mikroakışkan sistemde tüm hücrelere uygulanması ve oluşan empedans kaymalarının ölçülmesi prensibiyle çalışır.

→ nCD64; 30 dk'da sonuç, sepsis tanısında **AUC >0.85**,

- Hücresel özellikleri değiştirmeden ölçen oldukça **kantitatif bir yöntemdir** ancak **sonuçların analizi zordur**.



*Tamulyte S, et al. Front Immunol. 2019;10:432.

*Ashley BK, et al. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2021;13(5):e1701.

Mikro ve Nano POCT Teknolojileri

➤ Analitik ölçüm

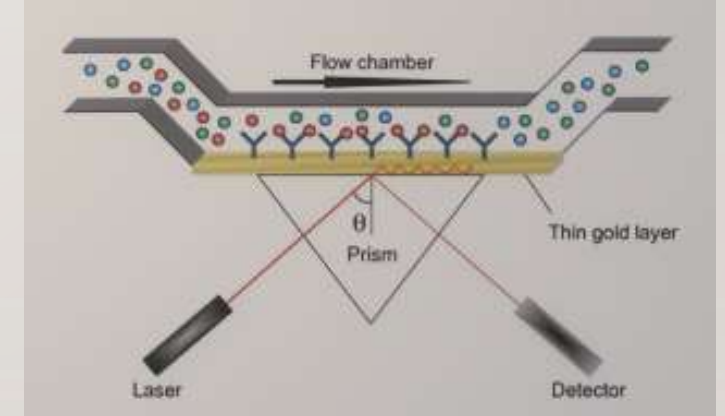
- **Proteinleri ve küçük molekülleri** sayısal olarak tespit etmek için;
 - **Modifiye EIS yöntemleri,**
 - **Enzimatik elektrokimyasal saptama**
 - **Yüzey plazmon rezonansını (SPR)**

gibi çok sayıda yöntem ve **bunların kombinasyonunu** içerir.

- IL-6, IL-10, PCT, LPS, LTA, CRP, vb.

Mikro ve Nano POCT Teknolojileri

- **Enzimatik elektrokimyasal saptamada**, bir protein veya analitin redoks reaksiyonuna katılmasıyla oluşan akım değışikliğı üç elektrotlu bir sistemde kaydedilir. **Elektrokimyasal bağımlılıklar ve zamanla düşük hassasiyet dezavantajlarıdır.**
- **Yüzey plazmon rezonansı (SPR)**, yüzeydeki adsorbe edilmiş materyalleri hassas bir şekilde ölçmek için **altın veya gümüş nanopartiküller** üzerinde, ışık kaynağından gelen elektronların kırılma indeksini değerlendiren elektro-optik bir sistemdir.



Mikro ve Nano POCT Teknolojileri

- **Kuantum noktaları**, yarı iletken nano boyutlu kristallerdir (10-75 atom) ve psödo-floresan özelliktedir
- **Kolorimetrik ve optik yöntemler:** Kolorimetrik etkiler (UV absorpsiyonunun ölçülmesi veya bir belirteç ile reaksiyonu sonucu oluşan bileşiğin radyometrik olarak belirlenmesi) üreten redoks reaksiyonları ile tespit edilir.

Notable micro and nano multiplexing diagnostic systems

Article	Cell Parameter	Technology	Biomarkers	LOD	# of bio-markers	Whole biofluid (Y/N)	Assay time
(Barakat et al., 2017)	Protein quantification	Electrochemical impedance spectroscopy (EIS)	IL-6, IL-10, IL-1 β	0.5 pg/mL	3	N	~3 hours
(Cihalova et al., 2017)	Bacteria loading	Quantum dots (QDs)/ fluorescence	<i>S. aureus</i> , MRSA, <i>K. pneumoniae</i>	10 ² cells/mL	3	N	~2 days
(Crawford et al., 2018)	Granulocyte stiffness	Deformability cytometry	CD45, CD66b, deformability	Δ 1 μ m in diameter	3	N	< 10 min
(Elbetti et al., 2018)	Motility	Optical Tracking	Oscillations, Pausing, Reverse migration, Avg. distance	Δ 1 μ m in position	5	Y (blood)	~6 hours
(Hasan et al., 2017)	Cell counting	EIS	RBCs, Platelets, WBC differential	50 cells/ μ L	3	Y (blood)	~2 hours
(Kao et al., 2011)	Virus loading	Microfluidic PCR	Influenza FluA and H1N1	20 fg/ μ L	2	N	~1 hour
(Koh et al., 2016)	Small molecule/volume quantification	Colorimetric/wearable	Lactate, pH, Cl ⁻ , glucose, Sweat volume	200 μ M	5	Y (sweat)	~1 min
(Lam et al., 2013)	Bacteria loading	EIS	<i>S. saprophyticus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , etc.	10 ³ CFU/mL	20	N	~2 min
(Lehmann et al., 2008)	Bacteria/Fungi loading	DNA sequencing/PCR	<i>E. aerogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>C. glabrata</i> , etc.	10 CFU/mL	25	Y (blood)	> 6 hours
(Loe et al., 2017)	Bacteria loading	Centrifugation/DNA sequencing	<i>M. tuberculosis</i> , <i>A. baumannii</i>	10 ³ CFU/mL	2	Y (blood)	~2 hour
(Mok et al., 2014)	Protein quantification	EIS	IL-6, AbI	50 pM	2	N	~2 hours
(Murdock et al., 2017)	Bacteria/virus loading	Colorimetric	Influenza A/B, HPV, <i>S. pneumoniae</i>	N/A	6	N	~10 hours
(Nguyen et al., 2019)	Bacteria loading	Centrifugation/ absorbance	<i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>	10 ² cells/mL	3+	N	~1 hour
(Panneer Selvam & Prasad, 2017)	Protein/small molecule quantification	Electrical	PCT, LTA, LPS	0.001 to 1 μ g/mL	3	Y	~2 hours
(Sun et al., 2020)	Protein quantification	Surface plasmon resonance (SPR)/QDs	PCT	0.5 ng/mL	6+	Y (blood)	~30 min
(Uddin et al., 2016)	Protein quantification	Opto-magnetic microbeads/ centrifugation	Thrombin	25 pM	8	N	~15 min
(van de Groep et al., 2018)	Bacteria/fungi loading	Real-time PCR	<i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. albicans</i> , etc.	10 CFU/mL	18	Y (blood)	~3 hours
(Volpetti et al., 2015)	Protein quantification	Fluorescence	IL-6, IL-1 β , TNF- α , PSA, GFP, etc.	~10 pM	384+	N	> 3 hours
(Watkins et al., 2013)	Cell counting	EIS	CD4/CD8	2000 cells/ μ L	2	Y (blood)	< 30 min



CRISPR TEKNOLOJİLERİ



CRISPR Teknolojileri

- ‘Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar’ (**CRISPR**) tespiti ile nükleik asit teşhisi son zamanlarda büyük ilgi görmüştür.
 - CRISPR dizileri, **bakterilerin istilacı bakteriyofajlara karşı savunmada kullandığı** bağışıklık sisteminin bir parçasıdır. CRISPR’lar, bakterilerin **daha önceden enfekte olduğu virüslerden kalan genetik kod kalıntılarıdır** (Bakteri DNA’sında tekrar eden diziler).
- CRISPR/CRISPR ile ilişkili protein (Cas) teknikleri **küçük, ucuz, amplifikasyon içermeyen genom tabanlı POCT**
 - Mikroakışkan Biyosensör ile **miRNA tespiti**, 1 saat içinde oldukça hassas ve spesifik sonuçlar
 - CRISPR-Cas12 ve CRISPR-Cas13 → **SARS-CoV-2 için FDA onaylı hızlı tanı kiti**

* Tsao YT, et al. Trends Mol Med. 2020;26(12):1118-1132.

* Broughton JP, et al. Nat Biotechnol. 2020;38(7):870-874.

CRISPR Teknolojileri

- **CRISPR/Cas9 gen düzenleme teknolojisi:** RNA tabanlı bir DNA tanıma sistemidir. **DNA'nın herhangi bir dizisini spesifik olarak tanımlayabilir, etiketleyebilir, değiştirilebilir ve silebilir !!**
- **Basit, ucuz, yüksek etkili, birçok genin eş zamanlı genetik modifikasyonuna izin veren yeni bir teşhis ve tedavi sınıfı → Gelişime açık**
 - Konak **bağışıklığını arttırabilir**
 - Mikroorganizmanın **patojenitesini azaltabilir**
 - **DNA düzenleyici sekanslara etki edemiyor** (Genomun kodladığı proteinlerin **%98'i**)
 - **'NGG'** gen bölgeleriyle karşılaştığında **etkinliği azalıyor**
 - **Hedef dışı bölgede beklenmeyen mutasyonlara sebep olabilir**

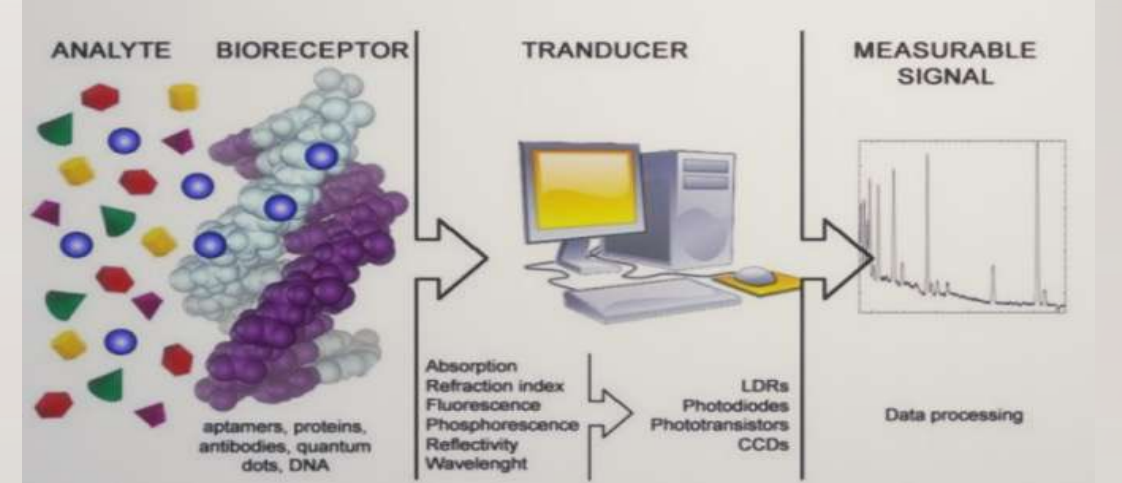
* Gupta E, et al. Diagnostics (Basel). 2023;13(2):277.

* Butiuc-Keul, A, et al. Microb. Physiol. 2022, 32, 2–17

➤ BİYOSENSÖRLER

Biyosensörler

- Biyosensörler; biyolojik, kimyasal veya biyokimyasal sinyali **analitlerin derişimi ile orantılı olarak** ölçülebilir ve işlenebilir elektriksel sinyale dönüştüren biyolojik algılama materyalidir.
 - Az numune hacmi
 - **Oldukça yüksek özgüllük**
 - **Hızlı patojen tanımlama**
 - ilaç duyarlılığı hakkında veri
 - Geniş aralıklı tanımlama için **yetersiz duyarlılık**
- Biyosensörlerin **özgüllüğü ve hızı oldukça iyi olduğundan** kullanımını yaygınlaştırmak için **maliyetleri en aza indirmeye ve duyarlılıklarını artırmaya** yönelik araştırmalar devam etmektedir.



➤ YAPAY ZEKA (MAKİNE ÖĞRENİMİ)

Evolving Applications of Artificial Intelligence and Machine Learning in Infectious Diseases Testing

Nam K

- * Makine öğrenimi;
 - Labaratuvar tanı performanslarının geliştirilmesinde
 - Klinik tanı amaçlı
 - Klinik prognoz hakkında bilgi

- * Yalnızca birden çok veri akışını entegre etmekle kalmayıp aynı zamanda çok büyük miktarlarda **heterojen verileri bilgiye dönüştürmek** için "veri birleştirme" görevi görmektedir

Cont

In the
comm
curre
(d) d
in bo

Sum

The r
techn
super
medi
19, se
tubercu

the future of laboratory testing where multiple data streams are integrated by AI/ML to provide actionable clinical knowledge.

Review

Sepsis prediction, early detection, and identification using clinical text for machine learning: a systematic review

Melissa Y. Yan

- Çalışma metodolojileri oldukça heterojen
- Makine öğrenimi ile hem yapılandırılmış metin (yaş, vital bulgular, lab parametreleri) hem de yapılandırılmamış metin verilerinin kullanılmasıyla başarılı bir sepsis tanımlanması gerçekleştirilmiş ve erken sepsis tanısında faydalı..

ABSTRACT

Objective:

early detec

Materials and methods:

utilizing clin

dict the on

vere sepsis

ques, and e

Results:

The clinical

varying situ

situations. This

methods showed

structured data

alone. No meta

analysis was

performed be

cause of incom

parable measu

rements among

the 9

included stud

ies.

Discussion:

Studies focus

ed on sepsis

identificatio

n or early de

tection before onset; no studies used patient histories beyond the current episode of care to predict sepsis. Sepsis definition affects reporting methods, outcomes, and results. Many methods rely on continuous vital sign measurements in intensive care, making them not easily transferable to general ward units.

Conclusions: Approaches were heterogeneous, but studies showed that utilizing both unstructured text and structured data in ML can improve identification and early detection of sepsis.

* Yan MY, et al. J Am Med Inform Assoc. 2022;29(3):559-575.

* Tran NK, et al. Clin Chem. 2021;68(1):125-133.

Early Prediction of Sepsis in the ICU Using Machine Learning: A Systematic Review

Min

* Sepsis tanısındaki performansı **AUC=0.78-0.99**

* Ancak tekrarlanabilirlik ve karşılaştırılabilirlikleri düşük!

* Dış validasyon yetersiz

Syn Methods: A systematic review was performed according to the PRISMA guidelines. **Mo** However, a quality assessment of all eligible studies was performed. **Results:** Out of 974 identified articles, 10 studies were included in the final analysis. The quality of the studies ranged from "poor" (satisfying $\leq 40\%$ of the quality criteria) to "very good" (satisfying $\geq 90\%$ of the quality criteria). The majority of the studies ($n = 19$, 86.4%) employed an offline training scenario combined with a horizon evaluation, while two studies implemented an online scenario. The heterogeneity in terms of model development, sepsis definition, prediction time windows, and outcomes precluded a meta-analysis. Last, only two studies provided publicly accessible source code and data sources fostering reproducibility. **Limitations:** Articles were only eligible for inclusion when employing machine learning algorithms for the prediction of sepsis onset in the ICU. This restriction led to the exclusion of studies focusing on the prediction of septic shock, sepsis-related mortality, and patient populations outside the ICU. **Conclusions and Key Findings:** A growing number of studies employs machine learning to optimize the early prediction of sepsis through digital biomarker discovery. This review, however, highlights several shortcomings of the current approaches, including low comparability and reproducibility. Finally, we gather recommendations how these challenges can be addressed before deploying these models in prospective analyses. **Systematic Review Registration Number:** CRD42020200133.

REVIEW



Cite this: *Nanoscale Adv.*, 2023, 5, 538

Machine learning-augmented surface-enhanced spectroscopy toward next-generation molecular diagnostics†

Yüzey Güçlendirilmiş Raman Saçılımı (SERS) spektroskopisi ile Yüzey güçlendirilmiş kızılötesi absorpsiyon spektroskopisi (SEIRA) + Makine öğrenimiyle geliştirilmiş karar verme süreci

→ Biyobelirteçler, yüksek afinite, hızlı, karakteristik titreşim parmak izleri, **nano-problarla mütipleks** tanımlama

→ Bakteri tanımlama, **mikroakışkan** sistemlerde,
- **Metal/altın nanoparçacıklarla** etiketli algılama
- Bakteriyel **raman parmak** izleri ile etiketsiz algılama

→ Gelecekte, makine öğrenimi destekli SERS ve SEIRA yöntemleri → **hasta başı testleri !**

* Moor M, et al. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:607952.

* Zhou H, et al. *Nanoscale Adv.* 2022;5(3):538-570.

ÖZET

- **Biyoinformatik** sistemin ve **yeni nesil sekanslama yöntemlerinin** geliştirilmesi,
- **Nanopartiküllerin ve biyosensörlerin** tanısal tetkiklere entegre edilmesi,
- **Mikroakışkan** sıvıların optimizasyonu
- Ve tüm bu gelişmelerin **yapay zeka algoritmaları** ile kombine edilmesiyle;



ÖZET



➤ Sepsis / SIRS ayrımı hızlı (15-60 dk) ve başarılı bir şekilde sağlanabilir, gereksiz antibiyotik kullanımı kısıtlanabilir (**MeMed BV[®], Septicyte Rapid, Triverity[™]**)

➤ Kültürde zor üretilen veya üretilemeyen etkenler tam kandan tanımlanabilir (**Karius Plazma**)

* Rutin tanımlama yöntemi olabilmesi için maliyetlerin azaltılması, duyarlılığın artırılması gerekir

➤ Hızlı genotipik direnç tanımlaması yapılabilir (**IC-3D, T2Dx[®], Direkt-MALDI-TOF**)

➤ **Gelecekte;**

→ Kritik hastalarda tam kandan **hızlı patojen tanımlama** ??? (**U-dHRM, Nanopore Sekanslama**)

→ **Lab on Chip – Biyosensörler – CRISPR teknolojileri** → **Tanınması KOLAY, Tedavisi ZOR !!**

TEŞEKKÜRLER...