

MİKROBİYOLOJİK TANIDA YENİ YÖNTEMLER

Gülşen HASÇELİK

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA
ghasceli@hacettepe.edu.tr

ÖZET

Klinik Mikrobiyolojide patojenlerin tanımlanması geleneksel olarak mikroskopik inceleme, kültür, daha sonra fenotipik testler ve antimikrobiyal duyarlılık testlerine dayanmaktadır. Bunlar rölatif olarak pahalı olmayan, fakat bakteri ve fungal patojenlerin üremesi için birkaç gün gerektiren testlerdir. Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) gelişmesi ile birlikte klinik örneklerden direk bakterinin saptanması, patojenin tanımlanması ve fenotipik direnci kodlayan genlerin belirlenmesi ile tanı ve referans laboratuvarlarında gelişmeler sağlanmıştır. Bu testler birçok laboratuvarlar için zaman alıcı ve pahalı olarak kabul edilmektedir. Son olarak Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılan matris-aracılı lazer desorbsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) yeni bir yaklaşım sağlamıştır. Klinik örneklerin artması ile insan ve finans kaynakların azaltılması için Klinik Bakteriyoloji Laboratuvarlarında otomasyona gereksinim duyulmuştur. Gelen klinik örneklerin işlemi tekrarlayan ve titiz çalıştırma gerektirmektedir. Bu iş için bugün piyasada otomasyona uygun birkaç sistem bulunmaktadır. Bu yazıda mikrobiyolojik tanıda kullanılan yeni yöntemler ve gelecekte kullanılacak olan sistemler özetlenmiştir.

Anahtar sözcükler: kültür, MALDI-TOF, otomasyon, PZR

SUMMARY

New Diagnostic Methods in Microbiological Diagnosis

Clinical Microbiology has traditionally relied on microscopic examination, culture and later phenotypic tests to identify pathogens and determine antimicrobial susceptibility. These are relatively inexpensive but have a turnaround time of several days because of the time taken for bacterial and fungal growth. The development of polymerase chain reaction (PCR) assays that can directly detect bacteria in clinical specimens and can be used to identify the pathogen and detect genes that encode phenotypic resistance represents a major advance for diagnostic and reference laboratories. These tests are too time consuming and expensive for most clinical laboratories. The recent application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) approach for microbial identification has initiated a revolution in the clinical laboratories. With increased activity and reduced financial and human resources, there is a need for automation in Clinical Bacteriology. Initial processing of clinical samples includes repetitive and fastidious steps. These tasks are suitable for automation, and several instruments are now available on the market. This presentation thus summarizes the main parameters that need to be taken into account for new methods in microbiological diagnosis, and systems that will be used in the future.

Keywords: automation, culture, MALDI-TOF, PCR

Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında mikroorganizmaların tanısı boyalı ve boyasız mikroskopik inceleme ve kültür ile konmaktadır. Kültürde üretilen mikroorganizmaların türler arasındaki ayrımı ise, mikroorganizmaların metabolik aktivitelerini gösterdikleri fenotipik testlerle yapılmaktadır. Altın standart olarak kabul edilen kültür yöntemi mikroorganizmaların üremesi için gerekli uygun ortamların sağlanması ve logaritmik üreme dönemlerini tamamlamasıyla gerçekleşmektedir. Bunun için geçen zaman mikroorganizmalar arasında çeşit-

li farklılıklar göstermesine rağmen, 4-6 saatten birkaç haftaya kadar uzayabilmekte, tanımlama için yapılacak olan fenotipik testlerle bu süre 24-48 saat daha ek süreye gereksinim göstermektedir. Günümüzde mikroorganizma tanısında ve antibiyotik duyarlılık testlerinde çeşitli otomatize sistemler kullanılmakta, bu sistemlerde tanımlama kültürde üreme olduktan 24 saat sonra yapılmaktadır. Sepsis gibi acil tanı ve tedavi gerektiren durumlarda, mikroorganizma tanısı için gerekli bu süre önem kazanmakta, tanı için geciken her saat mortalite oranını

% 10-20 oranında arttırmaktadır⁽⁸⁾. Ayrıca bu durum hastanede kalma süresi ve maliyeti önemli ölçüde etkilemektedir⁽¹⁾.

Günümüzde acil tanı ve tedavi gerektiren veya kültürde zor üretilen ve geç üreyen mikroorganizmaların tanımlanmasında klinik örneklerden yeterli miktar mikroorganizma DNA'sı izole edildikten sonra polimeraz zincirleme reaksiyon (PCR) temelli testler kullanılmaya başlamıştır. Bu yöntemler klinik örnekten bakterinin saptanmasında, patojenin tanımlanmasında ve fenotipik direnç kodlayan genlerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. PCR testleri günümüzde hasta tedavisi için önemli olan metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomisin dirençli enterokok (VRE) ve *Clostridium difficile* toksin saptanmasında rutin laboratuvarlarda kullanıma girmiştir. Gerçek zamanlı PCR (real time PCR) testlerinin yanında tüm veya parsiyel genom sekanslama, mikroarray, restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi (RFLP) ve moleküler tiplendirme gibi diğer moleküler testlerde infeksiyon etkenlerinin tanısında ve klonal benzeriklerini saptamada kullanılmaktadır⁽⁷⁾. Daha sonra yapılan çalışmalar, PCR ve 16S ribozomal RNA (rRNA) geninin saptanması ile özellikle kültür negatif örneklerde etkenin saptanması ve tür düzeyinde tanımlanmasına imkan sağlamıştır⁽¹³⁾. Mikrobiyolojide kullanılan DNA sekanslama yönteminde mikroorganizma tanımlamasının uzun zaman alması, pahalı olması ve özellikle fazla sayıda mikroorganizma tanımlanmasının aynı anda yapılmasının zor olması nedeniyle rutin uygulamaya girememiştir. Son yapılan çalışmalarla, diagnostik Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında ileri generasyon (next-generation) ve tüm genom sekanslama yöntemi rutin uygulamaya girmeye başlamıştır. Bu yöntemle pikolitre miktarda bir örnekten bir milyonun üzerinde PCR reaksiyonu ile bir günden daha kısa sürede sonuç alınabileceği gösterilmiştir^(4,6).

Moleküler yöntemler yanında, son yıllarda kültürde mikroorganizma üredikten sonra kısa sürede tanımlama yapabilmek için Matriks Aracılı Lazer Dezorbsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS) kullanı-

maya başlanmıştır. Bu sistem rutin Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarlarına bir yenilik getirirken, aynı zamanda Adli Tıp Laboratuvarlarında, Endüstri ve Çevre Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında da yerini almaya başlamıştır. 1980 yıllarının sonlarına doğru bu sistemde mikrobiyal proteomikleri saptamak mümkün olmuştur. Matriks aracılı lazer dezorbsiyon iyonizasyon tekniğinde moleküller iyonizasyon esnasında intakt olarak kalmaktadır. Proteinler küçük protein fragmanları olarak ölçülmektedir. İyonizasyon sonrası iyonlar ayrılarak kütle ölçümü yapılmaktadır. Bu sistem moleküllerin iyonize olabilme ve kütle spektrometrisinde tanımlanabilmesine bağlıdır. Mikroorganizmaların kendilerine özgü proteomik parmakizi pik kalıplarına dayanarak tiplendirilmeleri sağlanmaktadır^(3,11). MALDI-TOF basit, otomatize, kütle spektrofotometresinde özel deneyim gerektirmeyen, hızlı sonuç veren, yüksek işlem hacimli, ucuz bir sistemdir. Çalışma için tek koloni yeterli olmaktadır. Sistem alındıktan sonra maliyet etkin ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği yüksektir. Bu sistemin Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin cins ve tür düzeyinde tanımlanmasında duyarlılık ve özgüllüğü yüksektir. Mikobakteri ve mayalarla yapılan çalışmalarda güvenilir sonuçlar alınmaktadır. Son yapılan çalışmalarda filamentöz mantarlar ve dermatofitlerde de yüz güldürücü sonuçlar alındığını gösterilmekte, ancak standartizasyon için ek çalışmalar yapılması gerektiği belirtilmektedir^(2,10). Kan ve idrar gibi direk olarak örneklerden bakteri saptanması⁽¹⁴⁾ ve antibiyotiklere karşı direncin hızlı saptanması⁽¹²⁾ ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Bu sistemle ayrıca mikroorganizmaların protein yapıları incelenerek aşı çalışmalarına da yön verilebilmektedir.

MALDI-TOF sisteminin avantajlarının yanında antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılamaması, klinik örneklerden direk tanımlama için yeterli bilgi bulunmaması, *Staphylococcus aureus*'ta metisilin direnci, *Enterobacteriaceae*'da beta-laktam direnci gibi antibiyotik direnç mekanizmaları ile yeterli çalışma olmaması, bazı mikroorganizmalar için test tekrarları ve ek işlem gerektirmesi, birbirine yakın mikroorganizmaları tanımlayamaması ve veri tabanında kısıtlılıklar bulunması gibi dezavantajları bulun-

maktadır^(2,10,14). Sistemin FDA (Food and Drug Administration) onayı bulunmadığı için Amerika'da kullanılmamaktadır⁽¹⁰⁾.

Laboratuvar sayısının her geçen gün artması ve laboratuvarlara gelen örnek sayısının artması nedeniyle mikrobiyolojide de laboratuvar otomasyonuna doğru bir eğilim görülmektedir. Bu kavram otomatik olarak klinik örneklerin hazır besiyerlerine ekimi, etüve kaldırılması, kültürde üreyen kolonilerin digital ortamda üremelerinin gözlenmesi ve bunların MALDI-TOF sistemi ile entegrasyonu sonucu mikroorganizmaların tanısına dayanmaktadır. Mikrobiyolojide laboratuvar otomasyonu ile ilgili olarak WASP (Copan), Previ-Isola (BioMerieux), Innova (Becton-Dickinson) and Inoqula (Kiestra) sistemleri bulunmaktadır^(5,9). Her laboratuvar tanıda kullanılan bu sistemlerin kendine uygun olanını seçerek, daha ekonomik ve doğru tanıya giderek hasta tedavisine katkıda bulunabilir.

KAYNAKLAR

1. Beekman SE, Diekema DJ, Chapin KC, Doern GV. Effects of rapid detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges, *J Clin Microbiol* 2003;41(7):3119-25. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.7.3119-3125.2003> PMid:165359
2. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology, *FEMS Microbiol Rev* 2012;36(2):380-407. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x> PMid:22092265
3. Drake RR, Boggs SR, Drake SK. Pathogen identification using mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory, *J Mass Spectrom* 2011;46(12):1223-32. <http://dx.doi.org/10.1002/jms.2008> PMid:22223412
4. Dunne WM, Westblade LF, Ford B. Next-generation and whole-genome sequencing in the clinical microbiology laboratory, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31(8):1719-26. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-012-1641-7> PMid:22678348
5. Greub G, Prod'hom G. Automation in clinical bacteriology: what system to choose? *Clin Microbiol Infect* 2011;17(5):655-60. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03513.x> PMid:21521409
6. Huentelman MJ. Targeted next generation sequencing: microdroplet PCR approach for variant detection in research and clinical samples, *Expert Rev Mol Diagn* 2011;11(4):347-9. <http://dx.doi.org/10.1586/erm.11.23> PMid:21545251
7. Krishna NK, Cunnion KM. Role of molecular diagnosis in the management of infectious disease emergencies, *Med Clin North Am* 2012;96(6):1067-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcna.2012.08.005> PMid:23102477
8. Kumar A, Roberts D, Wood KE et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock, *Crit Care Med* 2006;34(6):1589-96. <http://dx.doi.org/10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9> PMid:16625125
9. Matthews S, Deutekom J. The future of diagnostic bacteriology, *Clin Microbiol Infect* 2011;17(5):651-4. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03512.x> PMid:21521408
10. Murray PR. What is new in clinical microbiology-microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from 2011 William Beaumont Hospital symposium on molecular Pathology, *J Mol Diagn* 2012;14(5):419-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2012.03.007> PMid:22795961
11. Pasternak J. New methods of microbial identification using MALDI-TOF, *Einstein (Sao Paulo)* 2012;10(1):118-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S1679-45082012000100026>
12. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Functional Assay for Rapid Detection of Resistance against β -Lactam Antibiotics, *J Clin Microbiol* 2012;50(3):927-37. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.05737-11> PMid:22205812 PMid:3295133
13. Török ME, Peacock SJ. Rapid whole-genome sequencing of bacterial pathogens in the clinical microbiology laboratory-pipe dream or reality, *J Antimicrob Chemother* 2012;67(10):2307-8. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks247> PMid:22729921
14. Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. MALDI-TOFMS in microbiological diagnosis-identification of microorganisms and beyond (mini review), *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;93(3):965-74. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3783-4> PMid:22198716