



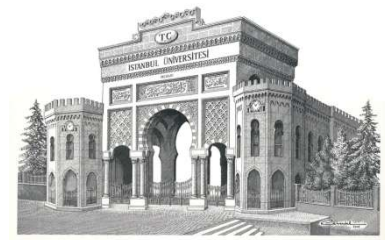
3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi-2015



18-22 Kasım 2015
Titanic Kongre Merkezi
Belek, Antalya

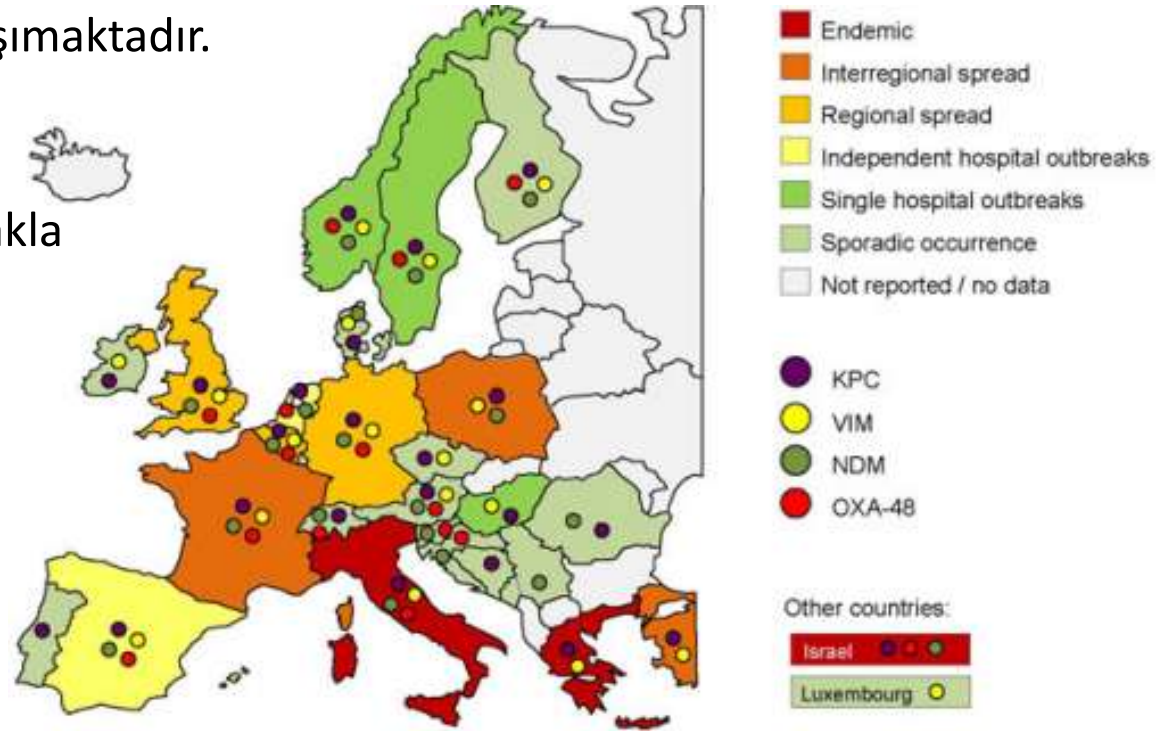
OXA-48'in Saptanmasına Yönelik İzotermal Rekombinaz Polimeraz Amplifikasyon Yöntemine Dayalı Bir Hızlı Moleküler Test Formatının Geliştirilmesi

Mert Ahmet Kuşkucu, Gökhan Aygün, Asiye Karakullukçu, Nergiz İmamova, Ömer
Küçükbasmacı, Kenan Midilli
İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



Giriş Amaç

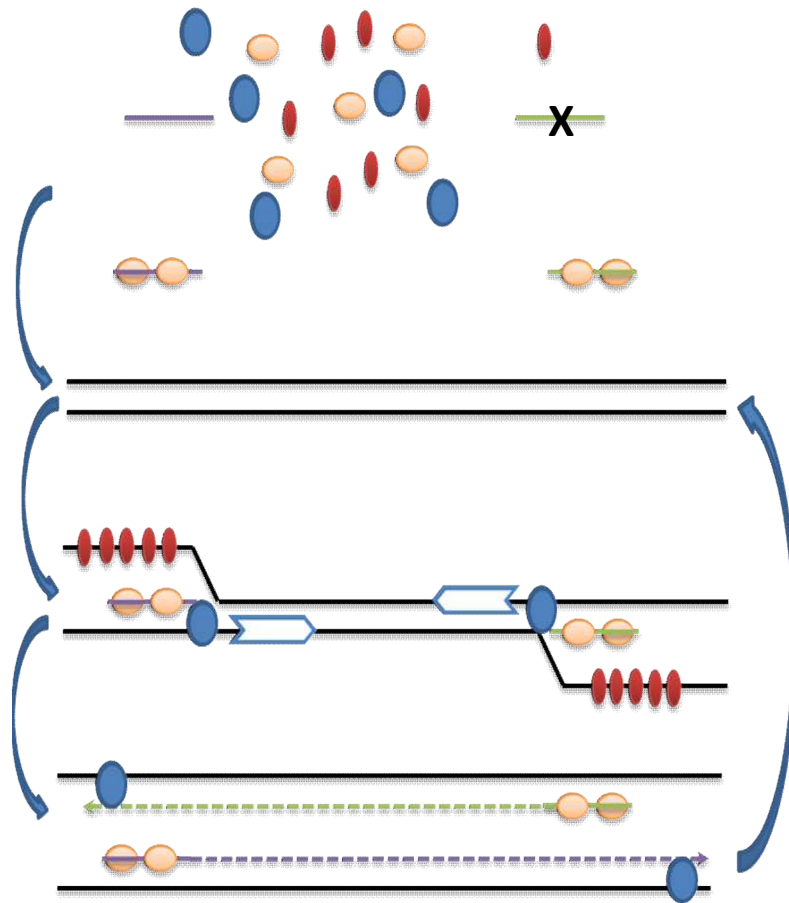
- Karbapenemleri yıkan enzimler (karbapenemazlar) farklı gruplarda yer almakta, plazmidler ve/ya da transpozonlar üzerinde taşınarak hastane içi ve hastaneler arasında hızla yayılabilmektedirler.
- Enzimlerin belirlenmesi direncin yayılımının anlaşılması, önlenmesi ve tedavi kararları açısından önem taşımaktadır.
- Ülkemizde bu enzimlerden KPC, VIM, IMP, NDM saptanmakla birlikte karbapenem dirençli bakterilerde en sık **OXA-48** saptanmaktadır.



Giriş Amaç

Bu çalışmada OXA-48'in Rekombinaz Polimeraz Amplifikasyon (RPA) yöntemi ile hızlı, duyarlı ve özgün şekilde, özel cihaz gereksinimi olmadan izotermal amplifikasyon ve lateral flow saptama metodlarını kullanarak saptanmasını sağlayacak bir test formatının geliştirilmesini amaçladık.

Klasik RPA



Forward Primer

Reverse Primer

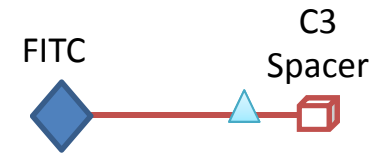
Rekombinaz

Single Strand Binding Protein (SSBP)

Polimeraz



Digoxigenin



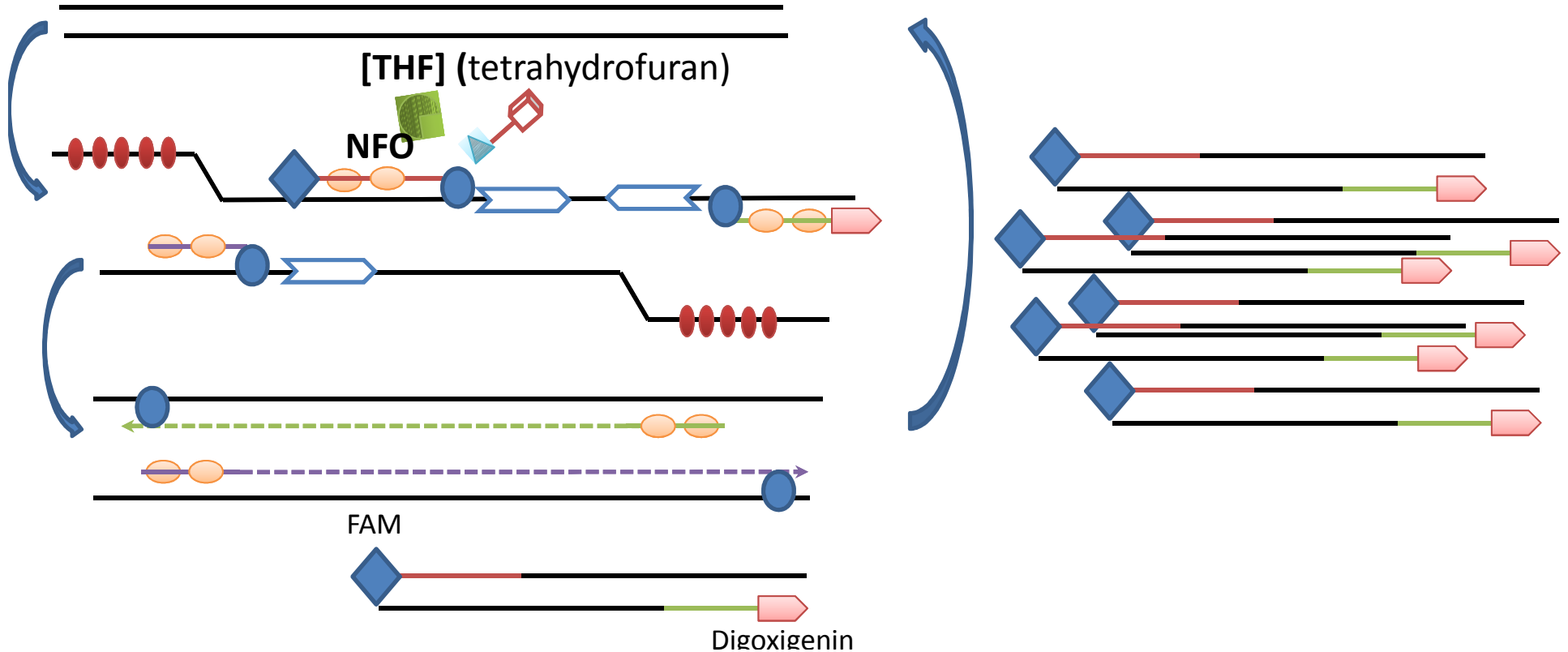
[THF] (tetrahydrofuran)



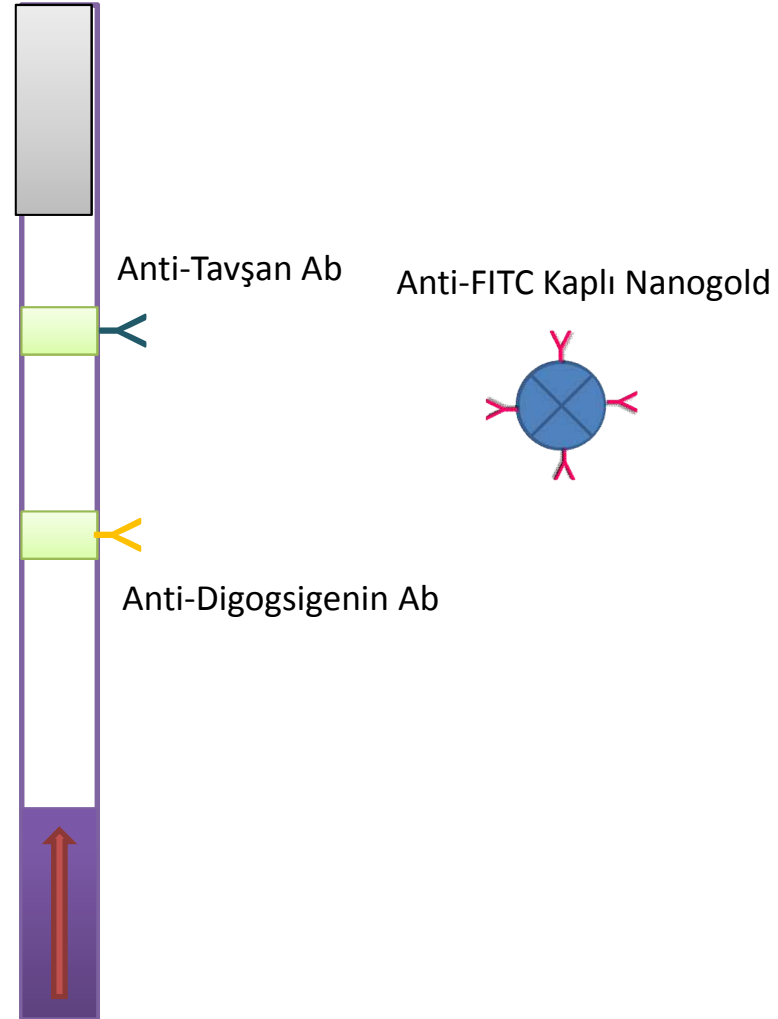
NFO

Çalışma İçin Tasarlanan RPA Primerleri ve Prob

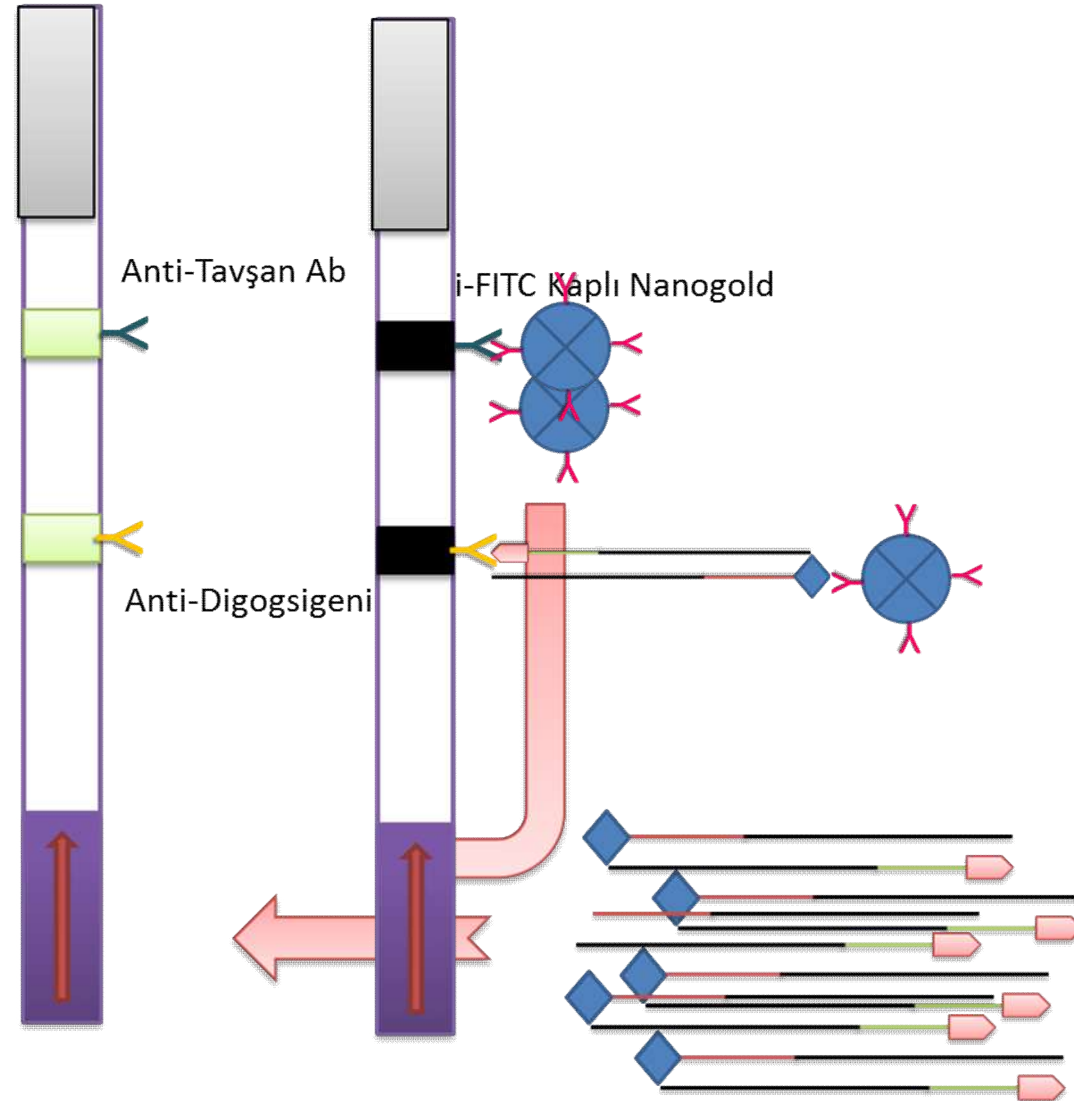
Sequence Name	Sequence (5' to 3')	5' Yakalama Grubu	3' Bloklama Grubu
OXA-48_RPA_F_Primer	ggtggcatcgattatcggaatgcctgcggtagc	Yok	Yok
OXA-48_RPA_R_Primer	tagattatgatcgcgattccaagtggcgatatcg	Digoxigenin	Yok
OXA-48_RPA_Probe	cagggcgtagttgtgctctggaatgagaataagc[THF]gcaaggatttac	FITC	C3-spacer



Lateral Flow ile Saptama

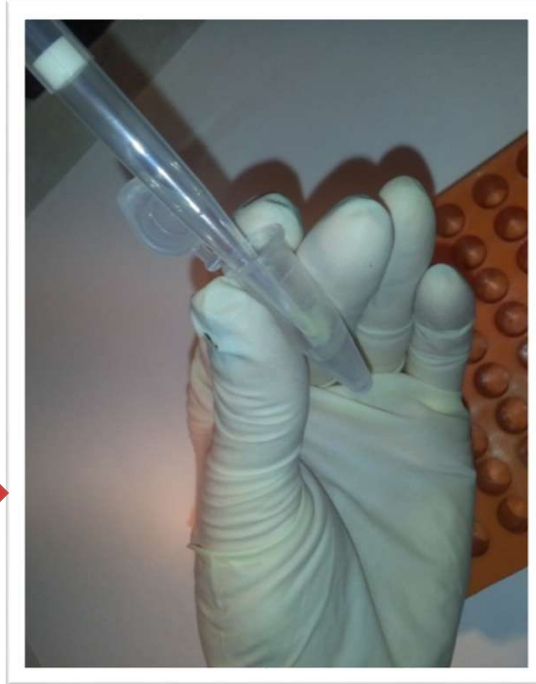
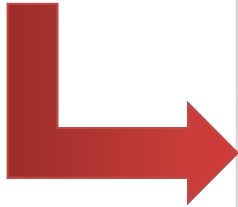


Lateral Flow ile Saptama

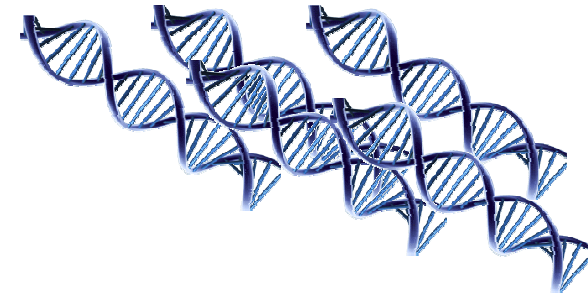
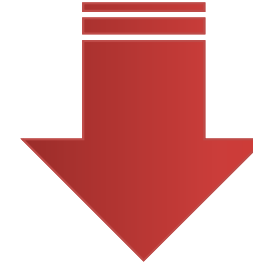


Test Formatının Uygulanması

Bakteri Kökenlerinin Hazırlanması ve Nükleik Asit Eldesi

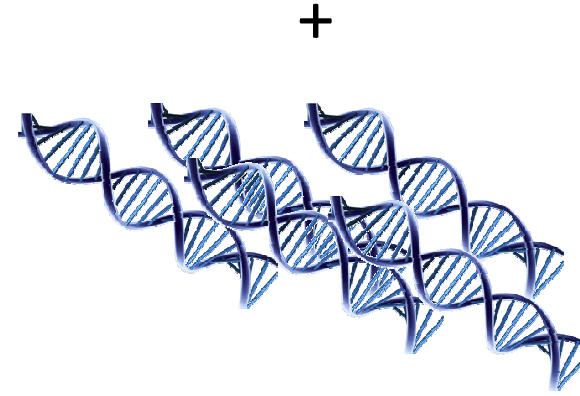


Kaynar Suda 10
Dakika İnkübasyon



RPA Karışımı ve Amplifikasyon

Bileşen	Miktar
Rehidratasyon buffer	29,5 μ l
Forward primer (10 pM)	2,1 μ l
Reverse primer (10 pM)	2,1 μ l
Prob (10 pM)	0,6 μ l
DNase, RNase free moleküler biyoloji grade su	3,2 μ l



Hedef 10 μ l

+

Magnezyum Asetat 2,5 μ l

38°C'de 4 Dakika == Karıştır == 38°C'de 20 Dakika

Bulgular

RPA Ürünü PBS'te 1/50
Sulandırıldı;

20 μ l dile ürün 80 μ l analit-özgün
solüsyon (nanogold) ile
karıştırıldı;

5 Dakika oda ısısında
inkübasyondan sonra strip
(Milenia[®] HybriDetect strip) tüpe
batırıldı

5 dakika sonra sonuç okundu



Bulgular



**OXA-48
Pozitif**

**IMP
Pozitif**

**VIM
Pozitif**

**KPC
Pozitif**

**NDM
Pozitif**

**Karbapenem
Duyarlı
Köken**

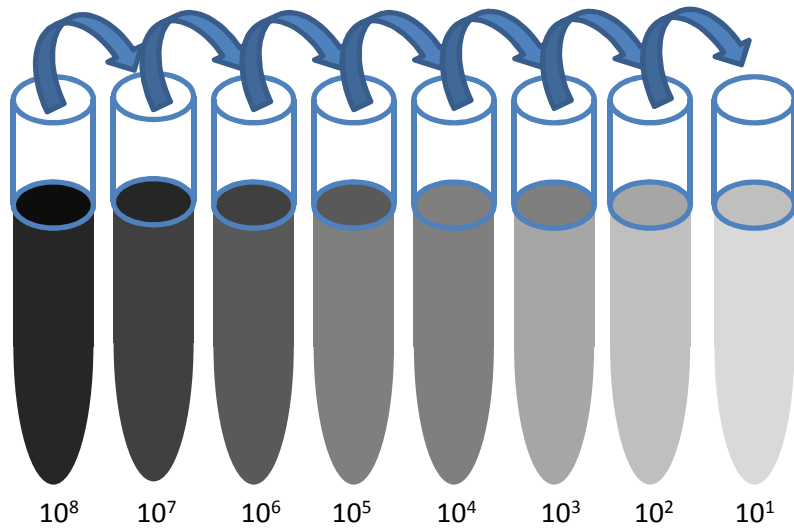
**OXA-48
Pozitif**

Bulgular



	RPA	PCR
OXA-48 Pozitif	14	14
OXA-48 Negatif	9	9

Bulgular Saptama Sınırı



Tartışma

- Özellikle son yıllarda geri ödeme politikalarında meydana gelen değişiklikler ile birlikte nazokomiyal infeksiyonlar sağlık bakım kuruluşları üzerinde ciddi finansal baskıya yol açmaktadırlar. Bu baskının Türkiye’de yıllık 2 milyar lirayı aştığı tahmin edilmektedir.
- Direncin doğru ve hızlı saptanabilmesi ile alınacak önlemler
 - Bu kökenlerin neden olduğu infeksiyonları azaltmada
 - Ampirik antibiyotik tedavilerinin seçiminde
 - Direnç gelişiminin engellenmesinde
 - Hasta bakım maliyetlerinin düşürülmesinde olumlu katkılarda bulunur

Tartışma

Kültür	Moleküler
Avantajları	
Yüksek özgünlük	Yüksek duyarlılık
Antibiyotik duyarlılıkları test edilebilir	Yüksek özgünlük
Fenotipik özellikler belirlenebilir.	Hızlı sonuç alma
Ucuz	Cansız bakterileri saptama
Özel çalışma planı gerektirmez.	Bakteriyel izolatların yüksek derecede ayırımını sağlar
Minimum donanım ile yapılabilir.	Bakteri olmaksızın direnç paternlerinin belirlenmesine olanak verir
Koloni morfolojisi gözlemlenebilir	Biyogüvenlik sorunları daha az
Dezavantajları	
Düşük duyarlılık	Yalancı pozitiflik
Cansız bakterileri saptayamaz	Yalancı negatiflik
Fenotipik uyumsuzluklar	Özel donanım gerektiriyor
Sonuç alma süresi uzun	Eğitimli personel gereksinimi
Biyogüvenlik sorunları	Standardize ticari kitlerin her zaman bulunmaması

Tartışma

TABLE 2 Overview of clinical studies evaluating chromogenic media for detection of ESBL producers and CRE^a

Chromogenic medium/use	Sample(s) (<i>n</i>)	Proportion of samples harboring ESBL producers/carbapenem resistant strains in total tested samples (%)	Incubation time (h)	Comparator(s)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Reference
CRE detection CHROMagar KPC/ Colorex KPC	Rectal swab (139)	33/139 (24)	24	MAC + IPM (1 µg/ml), MAC + IPM, MEM and ERT disks (10 µg)	84.9	88.7	70	95	1
	Rectal swab (126)	46/126 (36.5)	24 and 48	MAC+ IPM (1 µg/ml)	97.8	100	100	98.8	17
	Stool (200)	37/200 (18.5)	20	ID Carba	97	96	71.9	25.8	19
	Rectal swab (122)	41/122 (33.6)	24	MAC + IPM, MEM and ERT disks (10 µg)	100	98.4	ND	ND	24
ID Carba	Stool (200)	37/200 (18.5)	20	Colorex KPC	100	93	78.8	52.9	19

Tartışma

- Günümüzde çeşitli kısıtlılıklar barındıran fenotipik testlerin yerini giderek hızlı ve sahada uygulanabilen moleküler test formatları almaktadır. Bu bağlamda çok farklı test formatları/cihazları geliştirilmektedir.
- Bu çalışmada RPA'ya dayalı çoğaltma ve lateral flow ile saptama sayesinde komplike laboratuvar ekipmanlarına gerek duymadan OXA-48'i özgün ve hızlı bir şekilde saptayabilen bir sistem geliştirdik.



Teşekkürler...