

22.11.2015

09:50:32

**CENGİZ
ÇAVUŞOĞLU**

Mikobakteriyolojide yeni nesil dizileme ile analiz

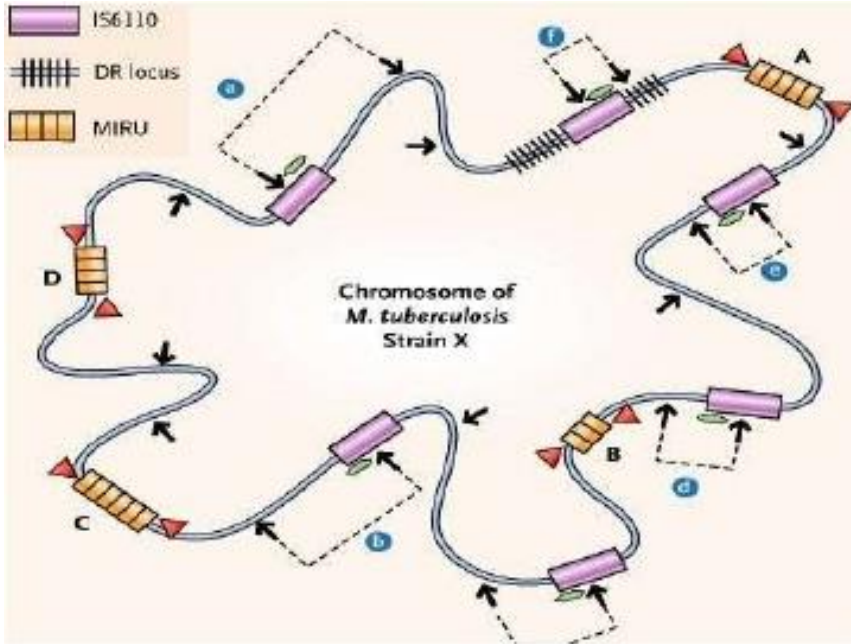
Prof. Dr. Cengiz ÇAVUŞOĞLU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Mikobakteriyolojide kullanım alanları

- Moleküller epidemiyoloji
- *M.tuberculosis* kompleks'in filogenetik incelemeleri
- İlaç direncinin mikroevrimi
- Mutasyon oranlarının saptanması
- Yeni ilaçlar için hedef bölgelerin bulunması

Moleküler epidemiyoloji

- Bulaş yolunun izlenmesinde
- Bir salgında aralarında küçük farklılıklar bulunan izolatların belirlenmesinde yetersiz kalmaktadır.



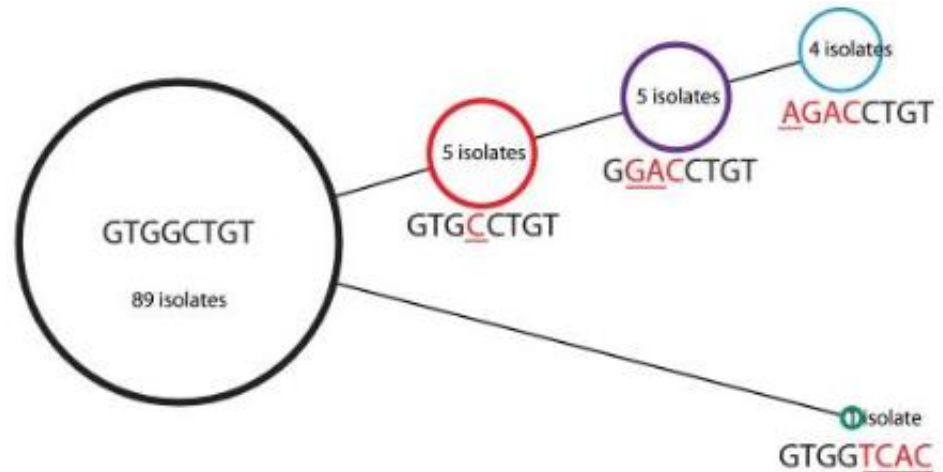
- IS6110 RFLP
- Spoligotiplendirme
- MIRU-VNTR

- İngiltere Halk Sağlığı 2016'dan itibaren tüm *M.tuberculosis* izolatlarında "Tüm genom dizileme" yapmayı planlıyor.

Moleküler epidemiyoloji

- Hollanda'da 1992 -2008 yılları arasında Harlingen şehrinde salgın
- IS6110-RFLP paternleri aynı 104 suş

SNP no.	Coordinate in strain H37Rv	Single nucleotide polymorphism	Polymorphisms first identified between the genome sequences of strains ^a :
1	332,437	G→A	SH1 and SH5
2	2,187,212	T→G	SH1 and SH5
3	3,611,558	G→A	SH1 and SH5
4	4,388,976	G→C	SH1 and SH5
5	1,483,748	C→T	SH1 and SH9
6	2,976,989	T→C	SH1 and SH9
7	3,165,490	G→A	SH1 and SH9
8	3,904,206	T→C	SH1 and SH9



Moleküler epidemiyoloji

- **Tüm genom dizileme;**
- Suşlardaki tek nükleotit polimorfizmleri saptanabilir.
- Nükleotit değişikliklerinin sırası belirlenebilir.
- Suş bulaşmasının izi sürülebilir.

Moleküler epidemiyoloji

- **Tüm genom dizileme;**
- Zahmetli,
- Standardizasyon yeterli değil
- Verilerinin temizlenmesi,
- Filtrelenmesi,
- Analizi,
için farklı biyoinformatik programları ve algoritmaları kullanılıyor
- Farklı laboratuvarlar arasında karşılaştırma yapmak güç

MTBK'in evrimi ve filogenetik incelemeleri

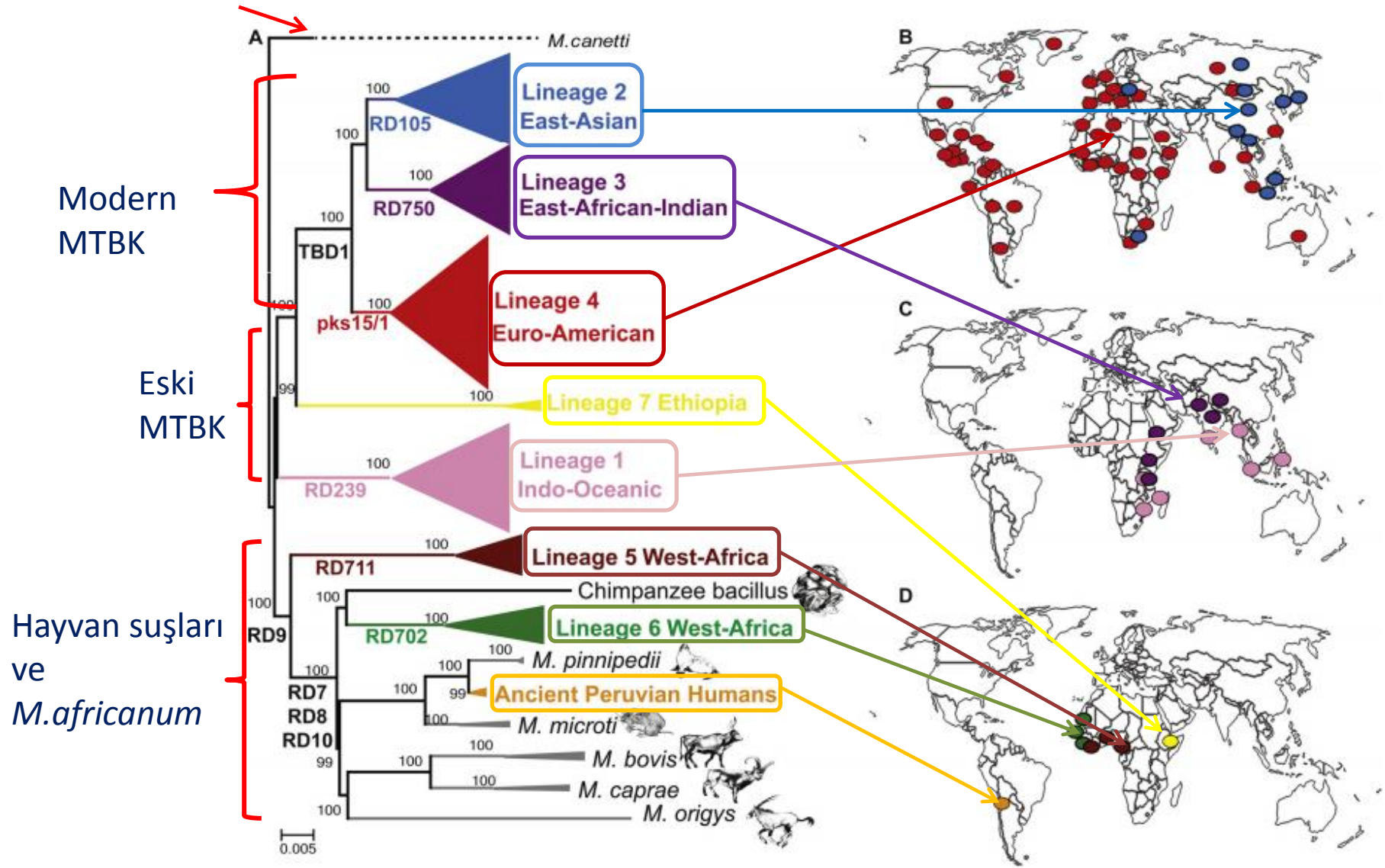
MTBK türleri

- *M.tuberculosis*
- *M.africanum*
- *M.bovis*
- *M.bovis BCG*
- *M.microti*
- *M.caprae*
- *M.pinnipedii*
- *M.canettii*

MTBK türleri

- *M.mungi*
- *M.surricattae*
- *M.orygis*
- Dassiye basili
- Şempanze basili

MTBK'in evrimi ve filogenetik incelemeleri



İlaç direncinin mikroevrimi

- **Amaç**
- Düşük sıklıktaki dizi varyantları için güvenilir bir “*cut-off*” tanımlamak
- Genetik heterojeniteyi ve ilaç direncinin evrimini araştırmak

İlaç direncinin mikroevrimi

- İlaç duyarlılık testleri
- Sanger yöntemiyle dizi analizi
 - *inhA* promoter, *katG* ve *rpoB*
- Genotiplendirme
 - Spoligotiplendirme
 - IS6110 RFLP



Pasaj



3 koloni

13 farklı hastadan izole edilen 13 izolat
RİF mono-rezistan



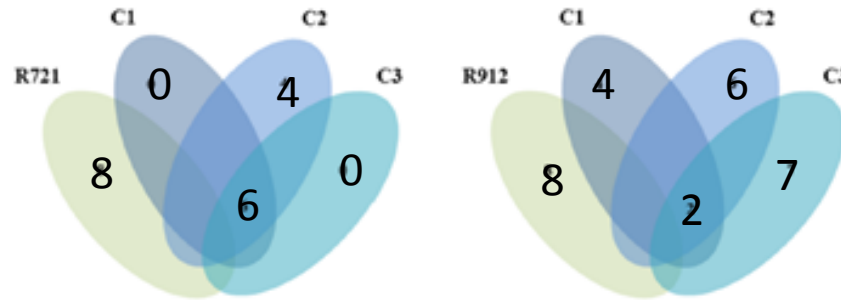
Tedavi sırasında ÇİD gelişen 2 izolat
RİF+INH direnci

Tüm genom sekans

- Illumina MiSeq
- Illumina HiSeq

İlaç direncinin mikroevrimi

- Varyant sıklığı “cut-off” değeri %30
 - Gerçek pozitiflik %79.5, yanlış pozitiflik %14.3



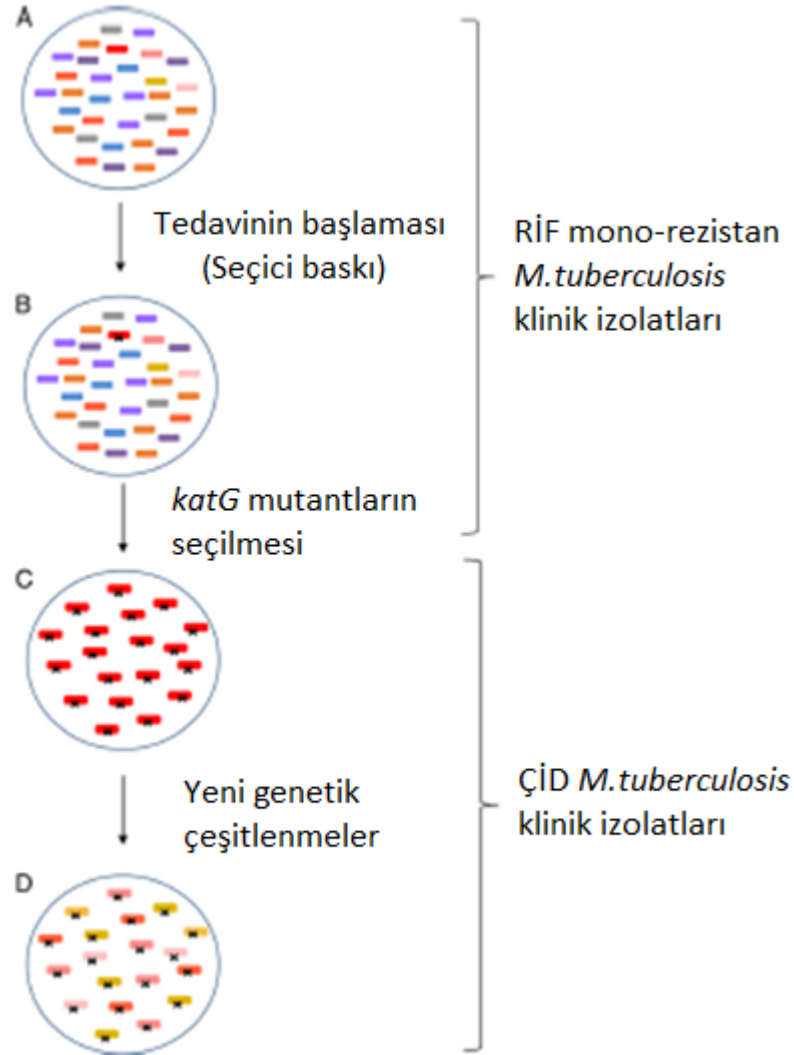
- İlk izolat içinde genetik değişkenlik gözlemlendi.
- Koloniler arasında ve koloni içinde genetik değişkenlik gözlemlendi.

İlaç direncinin mikroevrimi

Patient	Isolate name	Phenotypic resistance	Collection date	rpoB ^c	katG	inhA promoter	Spoligotype classification	Fixed variants ^a	Heterogeneous variants ^b	Total variation
1	R721	Rifampicin mono	22/10/2003	Ser531Leu	-	-	Beijing	1	8	9
7 ay ←	R807	MDR	19/05/2004	Ser531Leu	Gly309Val	-	Beijing	2	0	2
2	R912	Rifampicin mono	15/09/2004	His526Tyr	-	-	East Africa Indian (EAI)	7	0	7
11 ay ←	R1210	MDR	12/08/2005	His526Tyr	-	-15	EAI	1	5	6

- Birinci hasta;
 - INH'ın seçici baskısıyla tüm heterojen mutantlar ortadan kalkmış.
 - Evrimsel darboğaz
- İkinci hasta;
 - INH'ın seçici baskısıyla sabit mutantlar ortadan kalkmış.
 - Evrimsel darboğaz
 - Yeni heterojen varyantlar ortaya çıkmış.
 - Seçici baskı sonrası genetik çeşitlenme

İlaç direncinin mikroevrimi



İlaç direncinin mikroevrimi

- Arjantin'de ilk kez 1992 yılında HIV (+) hastaların izlendiği bir hastanede ÇİD-TB salgını başladı.
- Salgın suşu IS6110-RFLP ile “M” suşu olarak tanımlandı.
- Arjantin'de günümüzde;
- ÇİD-TB olgularının %29'u
- YİD-TB olgularının %40'ı “M” suşu

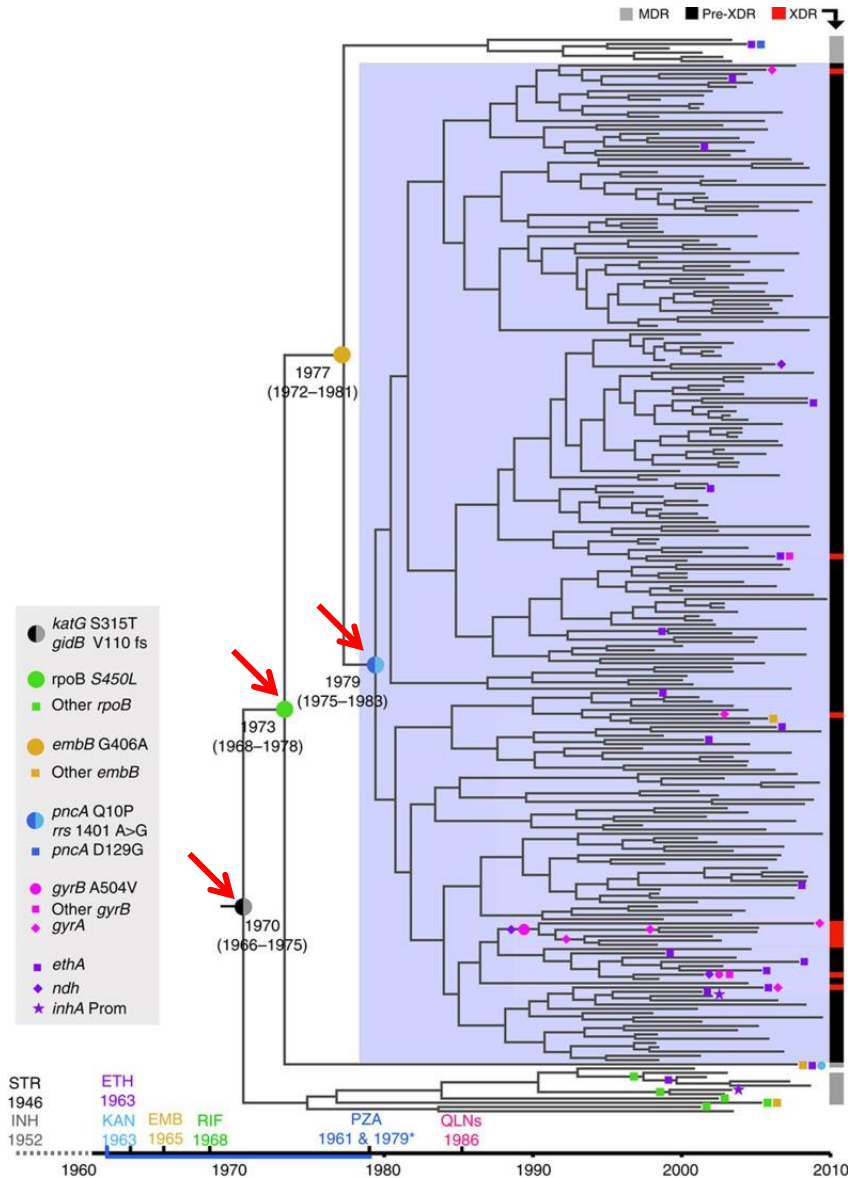
• Amaç

- “M” suşunda direnç gelişiminin zaman çizelgesini oluşturmak

İlaç direncinin mikroevrimi

- 1996 ve 2009 yılları arasında toplanan toplam 252 “M” klinik izolatında tüm genom dizileme yapıldı.
- Toplam 509 SNP saptandı.
- Bayesian filogenetik yaklaşımla süren salgın sırasında direncin evrimini gösteren bir model oluşturuldu.

İlaç direncinin mikroevrimi



- **1970**
- INH(*katG*) ve STR (*gidB* V110) direnci
- **1973**
- RİF direnci (*rpoB* S450L) ve ÇİD-TB
- Bazı suşlarda *rpoC*, *rpoB* ve *rpoA* kompensatuar mutasyonları saptandı.
- **1977**
- EMB direnci (*embB*)
- **1979**
- PZA (*pncA*) ve KAN direnci (*rrs*) ve pre-YİD-TB
- **1993**
- Kinolon direnci ve YİD

Mutasyon oranlarının saptanması

- Mutasyon oranları;
 - Bakteri evrimini
 - Bulaşma yollarını
 - Salgın kümelerini belirlemek için önemli
- Bir yıl içinde genom başına SNP oranı
- *M.tuberculosis* 0.3-0.5
- *S.pneumoniae* 3.5
- *S.aureus* 8.4
- *H.pylori* 30.4

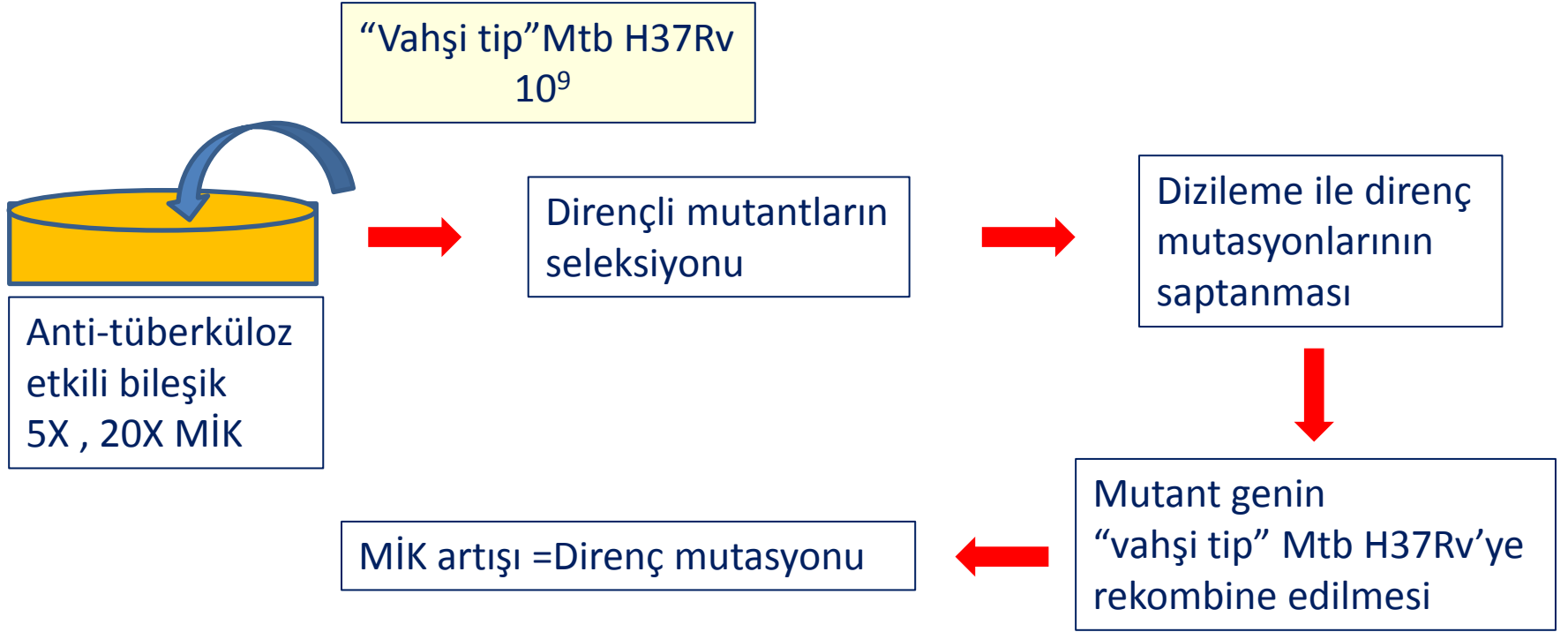
Mutasyon oranlarının saptanması

- Mutasyon oranı ve replikasyon oranı
- Hastalığın latentlik döneminde aktif tüberküloz gelişimi dönemiyle karşılaştırıldığında daha düşük

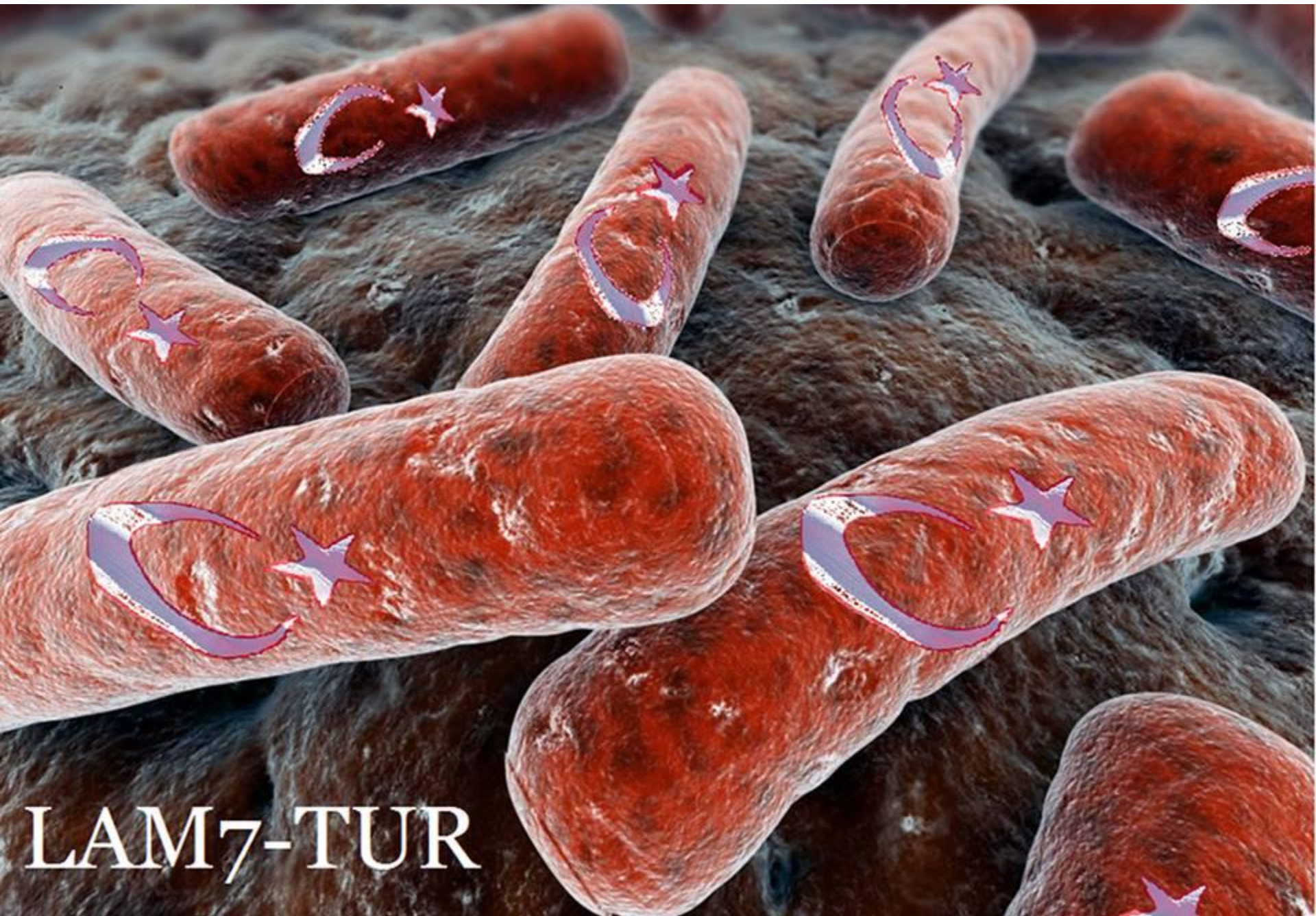


- Hat 2 (Beijing) suşlarında antibiyotik direnci gelişme oranı hat 4 suşlarından 2-35 kat daha fazla
- Hat 2'de virülans kaybına yol açmadan mutasyonları tolare edebilecek genetik altyapı olabilir.

Yeni ilaçlar için hedef bölgelerin bulunması



- Kullanımda olan TB ilaçlarının hedefleri arasında olmayan Pks13, AspS ve EccB3 proteinlerinin aday ilaç hedefleri olduğu saptandı.



LAM7-TUR