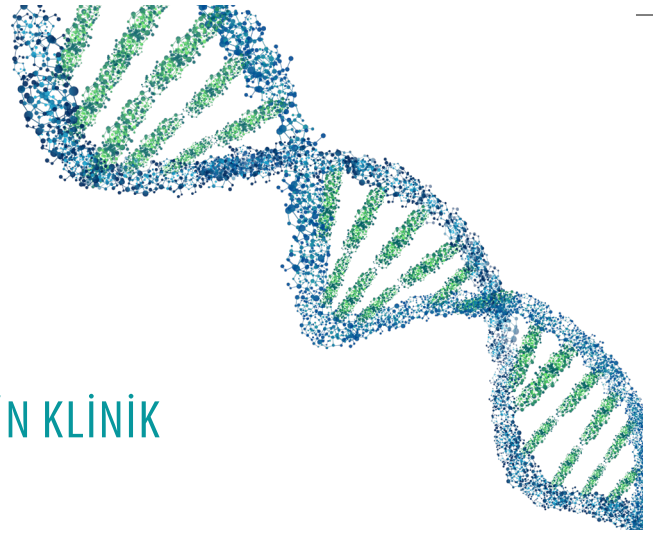


BÖLÜM 18

YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ YÖNTEMLERİNİN KLİNİK MİKROBİYOLOJİDE KULLANIMI



Mert Ahmet KUŞKUCU¹

Giriş

Enfeksiyon hastalıklarında etkenin hızlı ve doğru biçimde belirlenmesi tanı, tedavi ve enfeksiyon hastalığının seyrini izlemede en kritik aşamadır. Geçtiğimiz iki yıllık sürede, yaşadığımız pandemi de göz önüne alındığında, belki de insanlığı en çok etkileyen hastalıklar bu dünyada beraber yaşadığımız mikropların neden olduklarıdır. Göz önünde devamlı bulundurmamız gereken gerçeklerden biri de tüm bilimsel ilerlemelere karşın bulaşıcı hastalıkların dünya çapında önde gelen mortalite ve morbidite nedeni olmaya devam etmeleridir^{1,2}.

Klasik mikrobiyolojik yaklaşım ve enfeksiyon hastalıklarının yönetimi için bakış açımızda temel bazı soruların cevaplarını aramaktayız. Bunlar "Acaba hastalık bir enfeksiyon hastalığı mıdır?", "Enfeksiyona neden olan etken hangisi/hangileri olabilir?", "Enfeksiyon hastalığına neden olan mikroorganizmanın antimikrobiyallere duyarlılık durumu nedir? Hangi antimikrobiyal işe yarar?", "Tedavim işe yarıyor mu?" gibi soruları günlük hayatta sıklıkla cevaplamak durumunda kalmaktayız. Bun-

larla birlikte yine özellikle hastanelerde, bakım merkezlerinde ya da toplu yaşanan ortamlarda herhangi bir enfeksiyon hastalığı ortaya çıktığında neden olan etkenin yayılımı ve buna karşı alınacak önlemleri belirlemek de bugün için günlük rutinlerimiz arasına girmiştir^{3,4}.

Bu konular genel rutin enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyoloji pratiğinde yer almakla birlikte bilim alanında gelişmeleri takip etmek ve bilimsel yeniliklere katkı yapacak çalışmalarını gerçekleştirmek yine alanımızda yürüttüğümüz faaliyetlerdir.

Tüm bu çalışmalarda klasik mikroskopi ile kültüre dayalı yöntemler günlük pratikte en sık kullanılan yöntemlerdir. Bunlar bilimsel çalışmalarda altın standart olarak kabul edilen çalışmalardır. Buna karşın bu yöntemlerin uygulamalarının tüm mikroorganizmalar için yapılamıyor olması ya da sonuca ulaşmak için gerekli sürenin uzunluğu nedeni ile mikrobiyolojide alternatif yöntemlerin arayışı süre gelen bir yaklaşım olmuştur. Örneğin bağışıklık sisteminin yanıtı olan antikorları ya da mikroorganizmaların antijenlerini saptamaya yö-

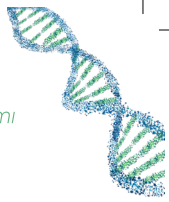
¹ Doç.Dr. IU-C, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., kuskucum@gmail.com, 0000-0001-8735-5725

Sonuç

Yaşadığımız pandemi süreci ve yeni teknolojik gelişmeler beraber yaşadığımız mikroorganizmaları çok daha iyi anlamamız gerektiğini göstermiştir. Yine son geçtiğimiz birkaç yıl içinde Ebola virüs salgını, Zika virüs gibi bir etkenin tanımlanması dünya çapında yeni etkenlerin bulunduğunu, enfeksiyon hastalıklarının epidemiyolojisinde değişiklikler meydana geldiğini, bulaşma ve yayılma hızındaki değişim ile bu hastalıkların tanı ve tedavisinde ciddi zorlukların oluşabileceğini ortaya koymuştur. Tüm bunlara antimikrobiyal direnç de eklenince enfeksiyon hastalıkları, antibiyotik öncesi dönemdeki veba gibi, artık tekrar küresel boyutta tehditler oluşturmaya başlamıştır. YND'ye dayalı yöntemler bilinmeyen tanımlama, patogeneze ve konak ile etkileşim boyutlarını kapsamlı şekilde analize olanak sunmaktadır. Ayrıca, bulaşma ağları gibi epidemiyolojik verilerin daha iyi anlaşılmasını sağlayarak gerekli önlemlerin alabilmesine katkıda bulunmaktadır. Mikrobiyal etkenin genom bilgileri sayesinde daha akılcı ve hedefe yönelik aşılarda üretilebilmesi mümkün olmaktadır. YND teknolojisinin gelişimine paralel biçimde veri tabanları da sürekli iyileşmektedir. Bu sayede salgın hastalıkların tespiti ve ayrıntılı analizleri mümkün hale gelmiştir.

Kaynaklar

1. Kocurk N, Itil BO, Altinisik G, Adiguzel N, Akgun M, Akyildiz L, et al. COVID-19 Pandemic and the Global Perspective of Turkish Thoracic Society. *Turk Thorac J* 2020;21(6): 419-32.
2. Ellwanger JH, Veiga ABG, Kaminski VL, Valverde-Villegas JM, Freitas AWQ, Chies JAB. Control and prevention of infectious diseases from a One Health perspective. *Genet Mol Biol* 2021;44(1 Suppl 1): e20200256.
3. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis* 2018;67(6): e1-e94.
4. Messacar K, Parker SK, Todd JK, Dominguez SR. Implementation of Rapid Molecular Infectious Disease Diagnostics: the Role of Diagnostic and Antimicrobial Stewardship. *J Clin Microbiol* 2017;55(3): 715-23.
5. Boers SA, Jansen R, Hays JP. Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019;38(6): 1059-70.
6. Rappuoli R. From Pasteur to genomics: progress and challenges in infectious diseases. *Nat Med* 2004;10(11): 1177-85.
7. Wang C, Liu M, Wang Z, Li S, Deng Y, He N. Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices. *Nano Today* 2021;37: 101092.
8. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006;19(1): 165-256.
9. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(12): 5463-7.
10. Yu X, Jiang W, Shi Y, Ye H, Lin J. Applications of sequencing technology in clinical microbial infection. *J Cell Mol Med* 2019;23(11): 7143-50.
11. Vilsker M, Moosa Y, Nooij S, Fonseca V, Ghysens Y, Dumon K, et al. Genome Detective: an automated system for virus identification from high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 2019;35(5): 871-3.
12. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 2008;26(10): 1135-45.
13. Check Hayden E. Genome sequencing: the third generation. *Nature* 2009;457(7231): 768-9.
14. Gomez CA, Pinsky BA, Liu A, Banaei N. Delayed Diagnosis of Tuberculous Meningitis Misdiagnosed as Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis With the FilmArray Syndromic Polymerase Chain Reaction Panel. *Open Forum Infect Dis* 2017;4(1): ofw245.
15. Xu Z, Jiang W, Huang W, Lin Y, Chan FKL, Ng SC. Gut microbiota in patients with obesity and metabolic disorders - a systematic review. *Genes Nutr* 2022;17(1): 2.
16. Tuniyazi M, Li S, Hu X, Fu Y, Zhang N. The Role of Early Life Microbiota Composition in the Development of Allergic Diseases. *Microorganisms* 2022;10(6).
17. Pleguezuelos-Manzano C, Puschhof J, Clevers H. Gut Microbiota in Colorectal Cancer: Associations, Mechanisms, and Clinical Approaches. *Annu Rev Canc Biol* 2022;6: 65-84.
18. Kim CS, Shin GE, Cheong Y, Shin JH, Shin DM, Chun WY. Experiencing social exclusion changes gut microbiota composition. *Transl Psychiatry* 2022;12(1): 254.
19. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* 2013;79(17): 5112-20.
20. Consortium O, Gabaldon T. Recent trends in molecular diagnostics of yeast infections: from PCR to NGS. *FEMS Microbiol Rev* 2019;43(5): 517-47.
21. Van de Peer Y, Chapelle S, De Wachter R. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res* 1996;24(17): 3381-91.
22. Jones MD, Forn I, Gadelha C, Egan MJ, Bass D, Massana R, et al. Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. *Nature* 2011;474(7350): 200-3.
23. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for



- Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(16): 6241-6.
24. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 2012;367(19): 1814-20.
 25. Santos LLD, Custodio IDD, Silva ATF, Ferreira ICC, Marinho EC, Caixeta DC, et al. Overweight Women with Breast Cancer on Chemotherapy Have More Unfavorable Inflammatory and Oxidative Stress Profiles. *Nutrients* 2020;12(11).
 26. Smit E. Antiviral resistance testing. *Curr Opin Infect Dis* 2014;27(6): 566-72.
 27. Quer J, Colomer-Castell S, Campos C, Andres C, Pinana M, Cortese MF, et al. Next-Generation Sequencing for Confronting Virus Pandemics. *Viruses* 2022;14(3).
 28. Jacob JJ, Veeraraghavan B, Vasudevan K. Metagenomic next-generation sequencing in clinical microbiology. *Indian J Med Microbiol* 2019;37(2): 133-40.
 29. Stratton CW, Schutzbank TE, Tang YW. Use of Metagenomic Next-Generation Sequencing in the Clinical Microbiology Laboratory: A Step Forward, but Not an End-All. *J Mol Diagn* 2021;23(11): 1415-21.
 30. Han D, Li Z, Li R, Tan P, Zhang R, Li J. mNGS in clinical microbiology laboratories: on the road to maturity. *Crit Rev Microbiol* 2019;45(5-6): 668-85.
 31. Palacios G, Druce J, Du L, Tran T, Birch C, Briese T, et al. A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases. *N Engl J Med* 2008;358(10): 991-8.
 32. Wollants E, Smolders D, Naesens R, Bruynseels P, Lagrou K, Matthijssens J, et al. Use of Next-Generation Sequencing for Diagnosis of West Nile Virus Infection in Patient Returning to Belgium from Hungary. *Emerg Infect Dis* 2018;24(12): 2380-2.
 33. Mai NTH, Phu NH, Nhu LNT, Hong NTT, Hanh NHH, Nguyet LA, et al. Central Nervous System Infection Diagnosis by Next-Generation Sequencing: A Glimpse Into the Future? *Open Forum Infect Dis* 2017;4(2): ofx046.
 34. Fung M, Zompi S, Seng H, Hollemon D, Parham A, Hong DK, et al. Plasma Cell-Free DNA Next-Generation Sequencing to Diagnose and Monitor Infections in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Patients. *Open Forum Infect Dis* 2018;5(12): ofy301.
 35. Wang Q, Li J, Ji J, Yang L, Chen L, Zhou R, et al. A case of *Naegleria fowleri* related primary amoebic meningoencephalitis in China diagnosed by next-generation sequencing. *BMC Infect Dis* 2018;18(1): 349.
 36. Shishido AA, Noe M, Saharia K, Luethy P. Clinical impact of a metagenomic microbial plasma cell-free DNA next-generation sequencing assay on treatment decisions: a single-center retrospective study. *BMC Infect Dis* 2022;22(1): 372.
 37. Benamu E, Gajurel K, Anderson JN, Lieb T, Gomez CA, Seng H, et al. Plasma Microbial Cell-free DNA Next-generation Sequencing in the Diagnosis and Management of Febrile Neutropenia. *Clin Infect Dis* 2022;74(9): 1659-68.
 38. WHO. The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex: technical guide <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-CDS-TB-2018.19>2020.
 39. WHO. WHO Public Health Laboratories knowledge sharing webinars - Genomic surveillance and building up Next Generation Sequencing capacity <https://www.who.int/news-room/events/detail/2022/04/20/default-calendar/who-public-health-laboratories-knowledge-sharing-webinars---from-sars-cov-2-sequences-to-actionable-public-health-data2022>.
 40. Lanza VF, Baquero F, Martinez JL, Ramos-Ruiz R, Gonzalez-Zorn B, Andreumont A, et al. In-depth resistome analysis by targeted metagenomics. *Microbiome* 2018;6(1): 11.
 41. Caselli E, Fabbri C, D'Accolti M, Soffritti I, Bassi C, Mazzacane S, et al. Defining the oral microbiome by whole-genome sequencing and resistome analysis: the complexity of the healthy picture. *BMC Microbiol* 2020;20(1): 120.
 42. Zago V, Veschetti L, Patuzzo C, Malerba G, Lleo MM. Resistome, Mobilome and Virulome Analysis of *Shewanella* algae and *Vibrio* spp. Strains Isolated in Italian Aquaculture Centers. *Microorganisms* 2020;8(4).
 43. Andargie TE, Tsuji N, Seifuddin F, Jang MK, Yuen PS, Kong H, et al. Cell-free DNA maps COVID-19 tissue injury and risk of death and can cause tissue injury. *JCI Insight* 2021;6(7).
 44. Vincent AT, Derome N, Boyle B, Culley AI, Charette SJ. Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. *J Microbiol Methods* 2017;138: 60-71.
 45. Hernandez M, Quijada NM, Rodriguez-Lazaro D, Eiros JM. [Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis]. *Rev Argent Microbiol* 2020;52(2): 150-61.
 46. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, team U. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 2012;28(8): 1166-7.
 47. Menzel P, Ng KL, Krogh A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nat Commun* 2016;7: 11257.
 48. Doring M, Buch J, Friedrich G, Pironti A, Kalaghatgi P, Knops E, et al. geno2pheno[ngs-freq]: a genotypic interpretation system for identifying viral drug resistance using next-generation sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2018;46(W1): W271-W7.
 49. Thomsen MC, Ahrenfeldt J, Cisneros JL, Jurtz V, Larsen MV, Hasman H, et al. A Bacterial Analysis Platform: An Integrated System for Analysing Bacterial Whole Genome Sequencing Data for Clinical Diagnostics and Surveillance. *PLoS One* 2016;11(6): e0157718.
 50. Hadfield J, Megill C, Bell SM, Huddleston J, Potter B, Callender C, et al. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics* 2018;34(23): 4121-3.
 51. Khare S, Gurry C, Freitas L, Schultz MB, Bach G, Diallo A, et al. GISAIID's Role in Pandemic Response. *China CDC Wkly* 2021;3(49): 1049-51.
 52. Chevillotte M, von Einem J, Meier BM, Lin FM, Kestler HA, Mertens T. A new tool linking human cytomegalovirus drug resistance mutations to resistance phenotypes. *Antiviral Res* 2010;85(2): 318-27.
 53. Liu TF, Shafer RW. Web resources for HIV type 1 genotypic-resistance test interpretation. *Clin Infect Dis* 2006;42(11): 1608-18.