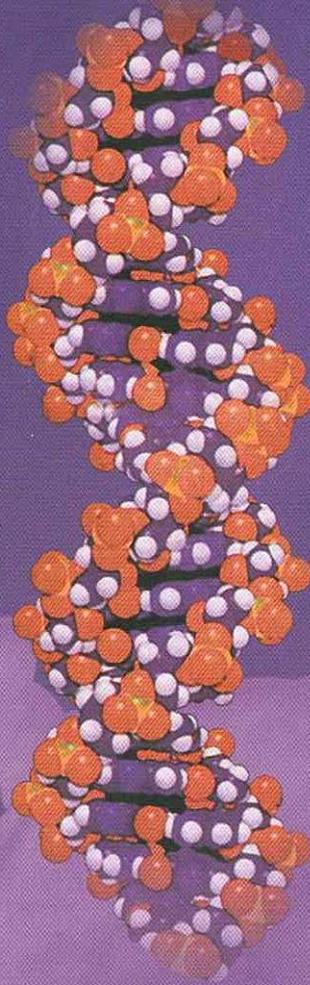


**3. ULUSAL
MOLEKÜLER VE
TANISAL MİKROBİYOLOJİ
KONGRESİ**
(Uluslararası Katılımlı)



PROGRAM VE BİLDİRİ ÖZET KİTABI

28 Haziran-1 Temmuz, 2004
Bilkent Otel - ANKARA



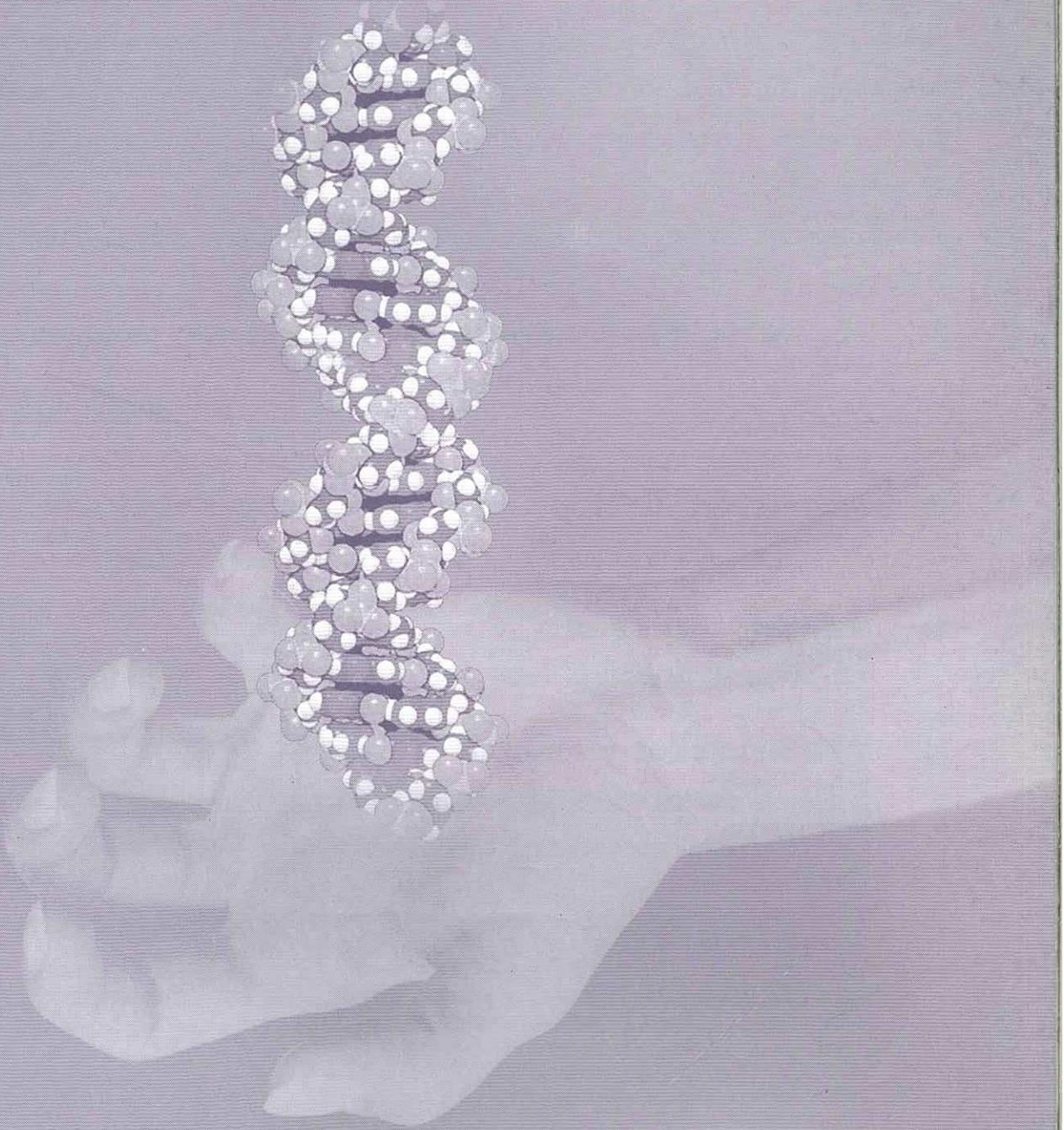
Ankara Mikrobiyoloji Derneği ve



HACETTEPE
ÜNİVERSİTESİ

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**3. ULUSAL
MOLEKÜLER VE
TANISAL MİKROBİYOLOJİ
KONGRESİ**
(Uluslararası Katılımlı)



**28 Haziran-1 Temmuz, 2004
Bilkent Otel - ANKARA**



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Kurullar

11

Genel Bilgiler

12

Kongre Programı

13-14

28. Haziran. 2004

29. Haziran. 2004

30. Haziran. 2004

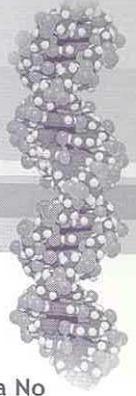
1. Temmuz. 2004

Konferanslar

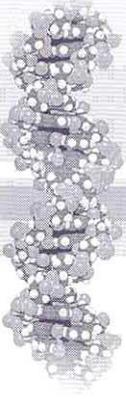
- K2 REAL-TIME PCR AND NEW DEVELOPMENTS IN MOLECULAR DIAGNOSTIC TECHNIQUES
Harald H. KESSLER 18
- K3 MOLECULAR MECHANISMS OF RESISTANCE TO β -LACTAMS IN THE GRAM NEGATIVE RODS
PSEUDOMONAS AERUGINOSA AND ACINETOBACTER BAUMANNII
Patrice NORDMANN 19
- K4 UTILITY OF MOLECULAR METHODS IN DIAGNOSIS OF INVASIVE FUNGAL INFECTIONS
Lena KLINGSPOR 20

Paneller

- P1 HIV: MOLEKÜLER ÖZELLİKLERİ
Ali AĞAÇFIDAN 22
HIV: MOLEKÜLER PATOGENEZİ
Selim BADUR
- P2 TÜRKİYEDE MOLEKÜLER TESTLERİN GÜNCEL DURUMU
Gülşen HASÇELİK 31
MOLEKÜLER GENETİK LABORATUVARLARININ STANDARDİZASYONU
Engin YILMAZ
QUALITY CONTROL FOR MOLECULAR DIAGNOSTICS
Paul WALLACE
- P3 GRAM POZİTİF VE GRAM NEGATİF BAKTERİLERDE ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE SAPTANMASI 36
Deniz GÜR
HELICOBACTER PYLORI'DE ANTİMİKROBİYAL AJANLARA KARŞI DİRENÇ OLUŞTURAN
MEKANİZMALAR VE MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİ
Yakut Akyön YILMAZ
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS'TE ANTİTUBERKULOZ İLAÇLARA DİRENÇ OLUŞTURAN
MEKANİZMALAR VE MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİ
Ahmet SANIÇ
- P4 MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİ NEDEN GEREKLİ, BAŞLARKEN NELERE DİKKAT EDİLMELİDİR? 52
Rıza DURMAZ
MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİDE TEMEL YÖNTEMLER
Salih HOŞOĞLU
BAKTERİLERE YÖNELİK MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİK ÇALIŞMALAR
Burçin ŞENER
MANTARLARA YÖNELİK MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİK ÇALIŞMALAR
Cafer EROĞLU
MANTARLARA YÖNELİK MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİK ÇALIŞMALAR
M.Ali SARAÇLI



| | Sayfa No |
|---|----------|
| P5 PRİMER PROP DİZAYNININ ÖNEMİ Ayhan KUBAR PRİMER VE PROB DİZAYNININ ÖNEMLİ OLDUĞU YÖNTEMLERE KISA BAKIŞ Çakır GÜNEY PRİMER-PROB DİZAYNI VE BİYOİNFORMATİK ANALİZLERİNDE KULLANILAN BİLGİSAYAR PROGRAMLARININ DEĞERLENDİRİLMELERİ Mehmet YAPAR | 83 |
| P6 BAKTERİYOLOJİDE MOLEKÜLER TANI NİYE GEREKLİ? Murat ÖZSAN ANAEROP BAKTERİLERİN MOLEKÜLER TANISI Bengül DURMAZ MİKOBAKTERİLERİN TANI VE İDENTİFİKASYONUNDA MOLEKÜLER YÖNTEMLER Alpaslan ALP HELICOBACTER PYLORI TANISINDA KULLANILAN MOLEKÜLER YÖNTEMLER Fatih KÖKSAL | 90 |
| P7 AMEBİASİSDE MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN YERİ Mehmet TANYÜKSEL LEISHMANIASİSDE MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN YERİ Seray ÖZENSOY TÖZ SITMA TANISINDA MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN YERİ Dilek TURGUT-BALIK HELMİNT HASTALIKLARININ TANISINDA MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN YERİ Metin KORKMAZ | 117 |
| Yuvarlak Masa | |
| TANISAL MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARINDA KARŞILAŞILAN SORUNLAR Selda ERENŞOY | 134 |
| NÜKLEİK ASİT TESTLERİNİN UYGULAMASINDA KARŞILAŞILAN SORUNLAR Arzu SAYINER | 136 |
| LABORATUVARDA BİYOİNFORMATİK KULLANIMI Salih TÜRKÖĞLU | 139 |
| Sözeller | |
| S1 HELICOBACTER PYLORI'DE MAKROLİD DİRENCİNDEN SORUMLU 23S rDNA MUTASYONLARININ MOLEKÜLER "BEACON" İLE SAPTANMASI Doruk ENGİN, Meltem Yalınay ÇIRAK, Sevgi TÜRET, Selahattin ÜNAL, Şükrü DUMLU | 142 |
| S2 MAKROLİDLERE DİRENÇLİ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE İZOLATLARININ ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI VE DİRENÇ MEKANİZMALARI Duygu EŞEL, Bülent BOZDOĞAN, Bülent SÜMERKAN, Peter C. APPELBAUM | 143 |
| S3 FUNGAL SEPSİS İLE KAYBEDİLEN FEBRİL NÖTROPENİK HASTALARDA MAYA ETKENLERİNİN EPİDEMİYOLOJİK AMAÇLI MOLEKÜLER İNCELEMESİ Handan AĞIRBAŞLI, Barış OTLU, Rıza DURMAZ, Gündüz GEDİKOĞLU | 144 |
| S4 NONTÜBERKÜLOZ MİKOBAKTERİ İZOLATLARININ TANIMLANMASI Cengiz ÇAVUŞOĞLU, Yeşer KARACA-DERİCİ, Yusuf Engin YAYGIN, Altınay BİLGİÇ | 145 |



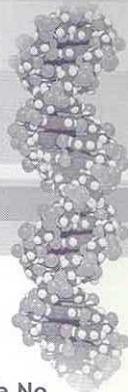
| | | Sayfa No |
|------------------|---|----------|
| S5 | PRİMER ANTİ-TÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DİRENÇLİ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SUŞLARINDA MOLEKÜLER YÖNTEMLE MUTASYONLARIN ARAŞTIRILMASI C. Elif ÖZTÜRK, Ahmet SANIÇ, Demet KAYA, İsmail CEYHAN | 146 |
| S6 | MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KLİNİK İZOLATLARINDA rpoB MUTASYONLARI VE RİFAMİSİN ÇAPRAZ DİRENCİNİN TANIMLANMASI Zeynep SARIBAŞ, Alpaslan ALP, Ahmet SANIÇ, Melike ATASEVER, Şemsettin USTAÇELEBİ | 147 |
| S7 | TÜRK HASTALARDAN SOYUTLANAN GENOTİP I HEPATİT DELTA VİRUS (HDV) KÖKENLERİNDE GENETİK ÇEŞİTLİLİK Sibel ÖZSU CAYMAZ, Y. Hakan ABACIOĞLU, A. Arzu SAYINER | 148 |
| S8 | ALT SOLUNUM YOLU İNFEKSİYONU YAKINMASI OLAN ÇOCUKLARDAN İZOLE EDİLEN SOLUNUM SİNSİTYAL VİRUSLARININ MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİK İNCELENMESİ Kenan MİDİLLİ, Gülden YILMAZ, Salih TÜRKOĞLU, Ahmet Mert KUŞKUCU, Barnisa İSKONOVA, Işık YALÇIN, Kemal ALTAŞ | 149 |
| S9 | ELEKTROKİMYASAL DNA BİYOSENSÖRLERİYLE HERPES SİMPLEX (HSV) TİP 1 ve TİP 2 VİRÜSLERİNİN TAYİNİ VE BİRBİRİNDEN AYIRIMI M. ÖZSÖZ, A. ZEYTİNOĞLU, A. ERDEM, P. KARA, D. ÖZKAN, H. KARADENİZ, B. KARASHAHİN | 150 |
| Posterler | | |
| P1 | ENTEROKOKLARIN FEKAL KOLONİZASYONU, AMPİSİLİN, VANKOMİSİN VE YÜKSEK DÜZEY AMİNOGLİKOZİDLERE DİRENCİ VE SUŞLAR ARASINDAKİ KLONAL İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI Çiğdem KUZUCU, Zeynep ÇİZMECİ, Rıza DURMAZ, Bengül DURMAZ, İ.Halil ÖZEROL | 154 |
| P2 | HAYVAN KÖKENLİ ENTEROKOKLARDA VANKOMİSİN DİRENÇ GENOTİPLERİ Serap SAVAŞAN, Alper ÇİFTÇİ, K. Serdar DİKER | 155 |
| P3 | BİR ÇOCUK HASTANESİNDE VanA GENİ İÇEREN ENTEROCOCCUS FAECIUM SALGINININ DEĞERLENDİRİLMESİ Abdullah KILIÇ, Tayfur DEMİRAY, M. Ali SARAÇLI, Gül BAHAR, Hakan AYDOĞAN, Mehmet BAYSALLAR, Levent DOĞANCI | 156 |
| P4 | ENTEROKOK İZOLATLARINDA GLİKOPEPTİD DİRENCİ VE SUŞLAR ARASINDAKİ KLONAL İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ Yasemin ERSOY, Zeynep ÇİZMECİ, Mehmet FIRAT, Rıza DURMAZ | 157 |
| P5 | STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARINDA POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE METİSİLİN DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI Seyhan ULUSOY, Gülgün TINAZ, Abbas TANER, Fatma Filiz COŞKUN-ARI | 158 |
| P6 | KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN METİSİLİNE DİRENÇLİ STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARI ARASINDAKİ KLONAL İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI Bengül DURMAZ, Gülay YETKİN, Çiğdem KUZUCU, Latife İŞERİ, Zeynep ÇİZMECİ, Rıza DURMAZ | 159 |
| P7 | STAFİLOKOKAL HASTANE İZOLATLARINDA METİSİLİN DİRENÇ VE AMİNOGLİKOZİD MODİFİYE EDİCİ ENZİM GENLERİNİN MULTİPLEX-PCR İLE ARAŞTIRILMASI Mustafa ÖZYURT, Barış SAREYYÜPOĞLU, Nurittin ARDIÇ, Uğur İLGA, Ali ERDEMOĞLU, Tunçer HAZNEDAROĞLU | 160 |



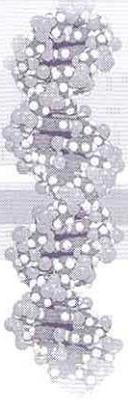
| | Sayfa No |
|---|----------|
| P8 ÇOCUKLUK ÇAĞI PARAPNÖMONİK PLEVRAL EFÜZYONLARDA PCR İLE STAPHYLOCOCCUS AUREUS, STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE VE HAEMOPHILUS INFLUENZAE ARAŞTIRILMASI Ahmet PINAR, Dilek MENEMENLİOĞLU, G.Eda UTİNE, Burçin ŞENER, Uğur ÖZÇELİK, Ebru Güneş YALÇIN, Deniz DOĞRU, Deniz GÜR, Ayşe ASLAN, Nural KİPER | 161 |
| P9 ARŞİV DOKU YAYMALARINDA POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE BRUCELLA TANISI K. Serdar DİKER, Alper ÇİFTÇİ, Tuba İÇA, Serap SAVAŞAN | 162 |
| P10 BALGAM ÖRNEKLERİNDEN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE BURKHOLDERIA CEPACIA İZOLASYONU Güven URAZ, Nejat AKAR, D.Hande BİNNET | 163 |
| P11 REAL TIME POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE BRUSELLOZ TANISI Feryal ÖZTÜRK, Cemal ÇİFTÇİ, Dilara ÖĞÜNÇ, Gözde ÖNGÜT, Latife MAMIKOĞLU, Serdar TUNCER, Meral GÜLTEKİN, | 164 |
| P12 YOĞUN BAKIM ÜNİTESİNDEN İZOLE EDİLEN PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARINDA "N-ACYL HOMOSERINE LACTONE" (AHL) ÜRETİMİ Gülgün TINAZ, Seyhan ULUSOY, Buket ARIDOĞAN, Füsun EROĞLU, Selçuk KAYA, | 165 |
| P13 SAĞLIKLI İLKOKUL ÖĞRENCİLERİNİN NAZOFARENKSLERİNDEN İZOLE EDİLEN STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE İZOLATLARI ARASINDAKİ EPİDEMİYOLOJİK İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI Rıza DURMAZ, Zeynep ÇİZMECİ, Elif AKTAŞ, Mehmet Refik BAYRAKTAR, Bengül DURMAZ, Mahmut Tayyar KALCIOĞLU, | 166 |
| P14 GRUP C ve G STREPTOKOKLARDA MLS DİRENÇ GENOTİPLERİ Şule ÇOLAKOĞLU, Serpil ERCİS, Alper ERGİN, Gülşen HAŞÇELİK, | 167 |
| P15 HASTANE İNFEKSİYONLARINDAN İZOLE EDİLEN GRAM NEGATİF BAKTERİLERİN ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİKLERE DUYARLILIKLARININ VE BETA-LAKTAMAZ ÜRETİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI A. Yasemin ÖZTOP, Sesin KOCAGÖZ, Mehmet BAKIR, M. Zahir BAKICI | 168 |
| P16 BİR EĞİTİM HASTANESİNİN YOĞUN BAKIM ÜNİTESİNDE TEK KLON ACINETOBACTER BAUMANII'NİN YAYILIMI Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU, Görkem YAMAN, Rıza DURMAZ, Zeynep ÇİZMECİ, Mustafa BERKTAŞ | 169 |
| P17 ERİŞKİN VE ÇOCUK İSHALLERİNDE ENTEROTOKSİJENİK BACTEROIDES FRAGILIS'İN ÖNEMİ Mehmet DALGALAR, Bengül DURMAZ | 170 |
| P18 CHRYSEOBACTERIUM INDOLOGENES SEPSİSİ OLAN BİR VAKADA KAYNAĞIN MOLEKÜLER YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI Mehmet Refik BAYRAKTAR, Elif AKTAŞ, Yasemin ERSOY, Rıza DURMAZ, Ayşegül ÇİÇEK | 171 |
| P19 EFÜZYONLU OTİTİS MEDIA'LI ÇOCUKLARDA BAZI HERPESVİRUSLAR ve BAKTERİYEL ETKENLERİN VARLIĞI Yasemin BULUT, Turgut KARLIDAĞ, Aykut ÖZDARENDELİ, Zülal Aşçı TORAMAN, Erol KELEŞ | 172 |
| P20 AORTA-İLİAK TIKAYICI DAMAR HASTALIĞI OLAN BİREYLERDEN ELDE EDİLEN ATEROSKLEROTİK PLAKLARDA CHLAMYDIA PNEUMONIAE VE HELICOBACTER PYLORI VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI İslam KAKLIKKAYA, Faruk AYDIN, Neşe KAKLIKKAYA, Kurtuluş BURUK, İlknur TOSUN, Metin SANCAKTAR, Didem TİĞDAŞ, Uğur DİNÇ, | 173 |



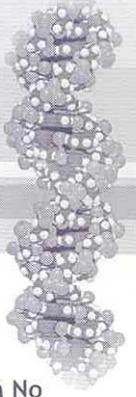
| | | Sayfa No |
|------|---|----------|
| P21 | NOZOKOMİYAL ENTEROBACTER SUŞLARININ PLAZMİD VE ERIC-PCR PATERNLERİNİN ARAŞTIRILMASI Osman Birol ÖZGÜMÜŞ, Metin SANCAKTAR, Kurtuluş BURUK, Neşe KAKLIKKAYA, İlknur TOSUN, Faruk AYDIN, Yelda YAZICI, Kemalettin AYDIN | 174 |
| P 22 | DNA DİZİ ANALİZİ İLE KLİNİK ENTEROBACTERIACEAE İZOLATLARINDA GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU SHV-2, SHV-5 VE SHV-12 BETA LAKTAMAZLARININ GÖSTERİLMESİ Hüseyin TAŞLI, İ. Hakkı BAHAR | 175 |
| P23 | POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU YÖNTEMİYLE SAPTANAN BORDETELLA PERTUSSIS İNFEKSİYONU OLGULARI Kenan MİDİLLİ, Yücel TAŞTAN, Melda ÖZDAMAR, Gökhan AYGÜN, Kemal ALTAŞ | 176 |
| P24 | ARTRİTLİ HASTALARIN EKLEM SIVILARINDA MYCOPLASMA FERMENTANS SIKLIĞININ NESTED PCR YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI Ali ALBAY, Abdullah KILIÇ, Ahmet ÖZGÜL, Özgül KISA | 177 |
| P25 | MİDE BİYOPSİ ÖRNEKLERİNDE HELICOBACTER PYLORI KLARİTROMİSİN DİRENCİNİN MOLEKÜLER "BEACON" İLE SAPTANMASI Meltem Yalınay ÇIRAK, Doruk ENGİN, Özgür DOĞAN, Tarkan KARAKAN, Selahattin ÜNAL, Sevgi TÜRET, Şükrü DUMLU | 178 |
| P26 | ÇOCUK HASTALARDA HELICOBACTER PYLORI KLARİTROMİSİN DİRENCİNİN SAPTANMASI Yakut AKYÖN YILMAZ, Serdar TUNCER, Hülya DEMİR, Müge MISIRLIOĞLU, Yusuf USTA | 179 |
| P27 | KORONER ARTER HASTALARININ ATEROSKLEROTİK PLAKLARINDA VE MONONÜKLEER KAN HÜCRELERİNDE CHLAMYDIA PNEUMONIAE DNA'SININ NESTED PCR İLE GÖSTERİLMESİ Meltem Yalınay ÇIRAK, Erkan İRİZ, Özgür DOĞAN, Doruk ENGİN, Hakan ZOR, Sevgi TÜRET | 180 |
| P28 | LABORATUVARIMIZDAKİ ÇAPRAZ KONTAMİNASYONA BAĞLI YALANCI KÜLTÜR POZİTİFLİKLERİNİN OUT-PCR YÖNTEMİ İLE DOĞRULANMASI Gülnur TARHAN, İsmail CEYHAN, Fatih OCAK | 181 |
| P29 | SALMONELLA TYPHIMURIUM SUŞLARININ ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK TESTLERİ VE MOLEKÜLER METOTLAR İLE DEĞERLENDİRİLMESİ Belkıs LEVENT, Fügen DURLU ÖZKAYA, Revasiye KAYALI, Eşe Aslan BAŞBULUT, Berrin ESEN | 182 |
| P30 | FARKLI BAKTERİ VE MANTAR TÜRLERİNİN ALT TIPLENDİRİLMESİ İÇİN ORTAK BİR "ARBITRARILY PRIMED" POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU PROTOKÖLÜ Bariş OTLU, Rıza DURMAZ, Elif AKTAŞ, Zeynep ÇİZMECİ | 183 |
| P31 | İÇME SULARINDAN İZOLE EDİLEN AEROMONAS SUŞLARININ "ARBITRARILY PRIMED" POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE DEĞERLENDİRİLMESİ G. EMEKDAŞ, G. ASLAN, S. TEZCAN, Ç. YILDIZ, H. ÖZTURHAN, R. DURMAZ | 184 |
| P32 | MORAXELLA CATARRHALIS TAŞIYICISI OLAN ÇOCUKLARDA BRO BETA LAKTAMAZLARIN MOLEKÜLER TIPLENDİRİLMESİ Özgen KÖSEOĞLU, Alper ERGİN, N.Gürkan AYDIN, Gülşen HASÇELİK | 185 |
| P33 | MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SUŞLARINDA RİFAMPİN DİRENÇ MUTASYONLARININ DNA DİZİ ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ ESNASINDA KARŞILAŞILAN HETEROREZİSTANSA BAĞLI BİR PROBLEMİN ENZİMLE KESİM YÖNTEMİ İLE ÇÖZÜMÜ Zeynep Ceren KARAHAN, Nejat AKAR | 186 |



| | Sayfa No |
|--|----------|
| P34 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KLİNİK SUŞLARINDAKİ İZONIAZİD VE RİFAMPİN DİRENCİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE SAPTANMASI Elif AKTAŞ, Rıza DURMAZ, Dong YANG, Zhenhua YANG | 187 |
| P35 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS İZOLATLARINDA FOSFOLİPAZ C GEN BÖLGELERİNDEKİ GENETİK DEĞİŞİMİN ARAŞTIRILMASI Sarah E. TALARICO, Rıza DURMAZ, Zhenhua YANG | 188 |
| P36 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON SİSTEMİNİN (ROCHE AMPLICOR) TÜBERKÜLOZUN TANISINDAKİ YERİ Elif AKTAŞ, Şahin DİRKEL, Selami GÜNAL, Rıza DURMAZ | 189 |
| P37 MARMARA BÖLGESİNDE YAŞAYAN HASTALARDAN İZOLE EDİLEN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX İZOLATLARINDA rpoB ve katG MUTASYONLARI Ahmet SANIÇ, Engin SEBER, Adil KARADAĞ, Özlem TANSEL, Murat GÜNAYDIN, İlker URUK, Birsen DURMAZ, Elif ÖZTÜRK, Erol GÜNDÜZ, Hakan LEBLEBİCİOĞLU | 190 |
| P38 MİKOBAKTERİ TÜRLERİNİN PCR-RESTRİKSİYON ENZİM ANALİZİ İLE TANIMLANMASINDA MYCOTYPE-ALL KİTİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ Alpaslan ALP, Dolunay GÜLMEZ, Şule ÇOLAKOĞLU, Zeynep SARIBAŞ, Gülşen HASÇELİK | 191 |
| P39 KLİNİK ÖRNEKLERDEN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SAPTANMASINDA COBAS AMPLICOR SİSTEMİ VE MİKROSKOBİK İNCELEME YÖNTEMLERİNİN, BACTEC RADYOMETRİK YÖNTEMİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI Alpaslan ALP, Ahmet PINAR, Gülşen HASÇELİK | 192 |
| P40 AKCİĞER VE AKCİĞER DIŞI KLİNİK ÖRNEKLERDE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKSİNİN HIZLI TANISINDA COBAS AMPLICOR M.TUBERCULOSIS (MTB) TESTİNİN RETROSPEKTİF DEĞERLENDİRİLMESİ Gülnur TARHAN, Mehmet Bakır SAYGAN, Salih CESUR, Fatih OCAK, İsmail CEYHAN | 193 |
| P41 DEĞİŞİK KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN MYCOBACTERIUM BOVIS SUŞLARININ MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ İsmail CEYHAN, Hakan YARDIMCI, Gülnur TARHAN | 194 |
| P42 LASER IN-SITU KERATOMİLEUSIS (LASİK) SÖNRASI MİKOBAKTERİ KERATİTİ ŞÜPHESİ OLAN BİR OLGUNUN INNO-LIPA YÖNTEMİ İLE HIZLI TANISI VE TİPLENDİRİLMESİ İsmail CEYHAN, Gülnur TARHAN, Salih CESUR, Feyzullah GÜMÜŞLÜ | 195 |
| P43 ÜLKEMİZDE ÇOK İLACA DİRENÇLİ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS İZOLATLARININ MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ: ÖN RAPOR Rıza DURMAZ, Ahmet SANIÇ, Selami GÜNAL, Engin SEBER, Vildan Avkan OĞUZ, Akgün YAMAN | 196 |
| P44 SOLUNUM YOLU ÖRNEKLERİNDEN KLASİK YÖNTEMLERLE SAPTANAN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS İZOLATLARININ OTOMATİZE PCR YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI Ayşen BAYRAM, Canan KORKMAZ, Tekin KARSLIĞIL, İctal BALCI | 197 |
| P45 CANDIDA TÜRLERİNİN GENOTİPLENDİRİLMESİNDE M13 PRİMERLERİ İLE UYGULANAN "ARBITRARILY PRIMED" POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU YÖNTEMİNİN ETKİNLİĞİ VE HIZLI BİR EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ Barış OTLU, Rıza DURMAZ | 198 |
| P46 NÖTROPENİK HASTALARDAN İZOLE EDİLEN CANDIDA ALBICANS SUŞLARININ MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ Barış OTLU, Semra KUŞTİMUR, Esin ŞENOL, Rıza DURMAZ, Ayşe KALKANCI, Özlem GÜZEL | 199 |



| | Sayfa No |
|--|----------|
| P47 YOĞUN BAKIM HASTALARINDAN İZOLE EDİLEN CANDIDA ALBICANS SUŞLARININ MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ Barış OTLU, Semra KUŞTİMUR, Rıza DURMAZ, Ayşe KALKANCI | 200 |
| P48 RASTLANTISAL cDNA KLONLAMASINDAN YARARLANILARAK ASPERGILLUS FUMIGATUS İÇİN ÖZGÜL TANI YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ Alper SÖYLER, Zümrüt B. ÖGEL, Ufuk BAKIR, Ceyda PEMBEÇİ | 201 |
| P49 KANDAN MANTAR DNA İZOLASYONU İÇİN ÖNERİLEN HIZLI BİR TİCARİ YÖNTEMİN DEĞERLENDİRİLMESİ Sibel AYDOĞAN, Ayşe EREN, Ayşe KALKANCI, Doruk ENGİN, Semra KUŞTİMUR | 202 |
| P50 VİSERAL LEISHMANIA TANISINDA KEMİK İLİĞİ KÜLTÜRÜ VE RK39 DİPSTİK TESTİNİN SENSİTİVİTESİ Gülnaz ÇULHA, Soner UZUN, Yeşim TAŞOVA, Kadri ÖZCAN, K.P. CHANG | 203 |
| P51 ÇEVRE ÖRNEKLERİNDE T2, T3, T4 VE T7 GENOTİPLERİNE AİT ACANTHAMOEBA İZOLASYONU Abdullah KILIÇ, Mehmet TANYÜKSEL, Engin ARAZ, James SISSONS, Samantha JAYASEKERA, Naveed Ahmed KHAN, Levent DOĞANCI | 204 |
| P52 HEPATİT B VİRUSU (HBV) SEROLOJİK GÖSTERGELERİ İLE HBV DNA ARASINDAKİ İLİŞKİ Aslı Gamze ŞENER, Zafer BUYRAÇ, Serdar GÜNGÖR, Metin TÜRKER, Belkıs ÜNSAL | 205 |
| P53 HEPATİT C VİRUSU (HCV) İNFEKSİYONUNUN TANISINDA HCV RNA SAPTANMASININ ÖNEMİ Aslı Gamze ŞENER, Serdar GÜNGÖR, Zafer BUYRAÇ, Meral TÜRK, Belkıs ÜNSAL, Metin TÜRKER | 206 |
| P54 HEPATİT C VİRUS İNFEKSİYONU TANISINDA ENZİM İMMÜN YÖNTEMİ İLE POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONUNUN KARŞILAŞTIRILMASI Tuncer ÖZEKİNCİ, Selahattin ATMACA, Nezahat AKPOLAT, Hakan TEMİZ, Eralp ARIKAN | 207 |
| P55 HEPATİT D VİRUS (HDV) IgG ve IgM ANTİKORLARININ HDV RNA İLE KORELASYONU Tuncer ÖZEKİNCİ, Selahattin ATMACA, Nezahat AKPOLAT, Hakan TEMİZ, Eralp ARIKAN | 208 |
| P56 HEMODİYALİZ HASTALARINDA TT VİRUS PREVALANSI Sinem AKÇALI, Tamer ŞANLIDAĞ, Beril ÖZBAKKALOĞLU | 209 |
| P57 FARKLI GRUPLARDA HEPATİT G VİRUS PREVALANSI Sinem AKÇALI, Tamer ŞANLIDAĞ, Beril ÖZBAKKALOĞLU, | 210 |
| P58 ISPARTA KAN DONÖRLERİNDE HEPATİT G VİRUS PREVALANSI Selçuk KAYA, Buket Cicioğlu ARIDOĞAN, Mustafa DEMİRCİ | 211 |
| P59 HEPATİT B VİRUS DNA'SININ SAPTANMASINDA SIVI HİBRİDİZASYON VE REAL-TIME PCR YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI Sinem AKÇALI, Tamer ŞANLIDAĞ, Beril ÖZBAKKALOĞLU | 212 |
| P60 SAĞLIKLI ÇOCUKLARDA TTV, SIMIAN TTV ve SEN VİRUSLARIN PREVALANSI ve ÖNEMLİ GEN KISIMLARININ KLONLANMASI Yasemin BULUT, Aykut ÖZDARENDELİ, Ahmet KALKAN, Mehmet KILIÇ, Zülal Aşçı TORAMAN | 213 |
| P61 SİTOMEGALOVİRUS (CMV) SEROPOZİTİF SAĞLIKLI KİŞİLERİN PERİFERİK KAN LÖKOSİTLERİ VE PLAZMASINDA CMV DNA'SININ ARAŞTIRILMASI Kenan MİDİLLİ, Sevgi ERGİN, Melda ÖZDAMAR, Mert KUŞKUCU, Kemal ALTAŞ | 214 |



| | Sayfa No |
|--|----------|
| P62 LNFOSİTOZİSLİ HAYVANLARDA BOVINE LEUKEMIA VİRUS VARLIĞININ PCR İLE ARAŞTIRILMASI İrem GÜLAÇTI, Şükrü TONBAK, Hakan BULUT, Yusuf BOLAT | 215 |
| P63 HEMODİYALİZ HASTALARINDA SEN-D ve SEN-H VİRUS PREVALANSI Zülal Aşçı TORAMAN, Yasemin BULUT, Aziz AKSOY, Aykut ÖZDARENDELİ, Adnan SEYREK | 216 |
| P64 HEPATİT B VİRUS (HBV) DNA KANTİTASYONUNDA DIGENE HİBRİD YAKALAMA YÖNTEMİ İLE ROBOGENE HBV REAL-TIME PCR KANTİTASYON KİTİ SONUÇLARININ UYGUNLUĞUNUN ARAŞTIRILMASI Rüçhan YAZAN SERTÖZ, Ayşın ZEYTİNOĞLU, Tijen ÖZACAR, Selda ERENŞOY | 217 |
| P65 NORMAL POPÜLASYONDA İNSAN HERPES VİRUS 6 ve 7 DNA SIKLIĞI Metin SANCAKTAR, Cavit BOZ, Neşe KAKLIKKAYA, İlknur TOSUN, Kurtuluş BURUK, Yelda YAZICI, Faruk AYDIN | 218 |
| P66 HEPATİT B VİRUS DNA KANTİTASYONUNDA ABI PRISM 7000 VE 7700 SEKANS SAPTAMA CİHAZLARI İLE ALINAN SONUÇLARIN UYGUNLUĞUNUN ARAŞTIRILMASI Selda ERENŞOY, Rüçhan YAZAN SERTÖZ, Suzan PAS, Hubert NİESTERS | 219 |
| P67 HERPESVİRUSLARIN TESPİTİ VE TÜR TANIMLAMASI İÇİN "IN-HOUSE" POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONUNUN KULLANIMI Elif AKTAŞ, Rıza DURMAZ, Yaşar BAYINDIR, Atilla ÖZCAN, Hülya SAĞLAM | 220 |
| P68 ÜST SOLUNUM YOLU KANSERLERİ İLE HERPES SIMPLEX VİRUS İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI Ayla ÖZCAN, Fırat DEMİRTAŞOĞLU, İ. Mehmet Ali ÖKTEM, Semih ÖNCEL | 221 |
| P69 İNFLUENZA SALGIN DÖNEMİNDE PCR İLE ELDE EDİLEN SONUÇLAR Gülden YILMAZ, Kenan MİDİLLİ, Ayşe İSTANBULLU, Salih TÜRKOĞLU, Kemal ALTAŞ | 222 |
| P70 İSTANBUL'DA SAPTANAN HIV-1 ALT TİPLERİ Emine ÖZKAN, Zübeyir BAYRAKTAROĞLU, Ahmet Mert KUŞKUCU, Salih TÜRKOĞLU, Kenan MİDİLLİ, Gülden YILMAZ, Leman ATASEVER, Semra ÇALANGU, Kemal ALTAŞ | 223 |
| P71 AKUT LENFLOBLASTİK LÖSEMİLİ DÖRT ÇOCUK HASTADA PARVOVİRUS B19 VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI Orhan Cem AKTEPE, Sevgi YETKİN, Namık ÖZBEK, Lale OLCAY | 224 |
| P72 PEDIATRİK YAŞ GRUBUNDA REAL TIME PCR İLE SİTOMEGALOVİRUS DNA'SININ SAPTANMASI Seyyal ROTA, Gülenam BOZDAYI, Aytül DEMİR AĞ, Bora DOĞAN, Bedia DİNÇ | 225 |
| P73 TRANSPLANTASYON HASTALARINDA REAL TIME PCR İLE SİTOMEGALOVİRUS DNA'SININ SAPTANMASI Seyyal ROTA, Gülenam BOZDAYI, Aytül DEMİR AĞ, Bedia DİNÇ, Bora DOĞAN | 226 |
| P74 KLİNİK ÖRNEKLERDEN KANTİTATİF OLARAK HCV RNA SAPTANMASINDA COBAS AMPLICOR VE COBAS TAQMAN SİSTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI Alpaslan ALP, Gülşen HAŞÇELİK | 227 |
| P75 BATI NİL VİRUSU'NUN REAL TIME PCR YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI Koray ERGÜNAY, Şemsettin USTAÇELEBİ, Nurdan ÖZER, Müge MISIRLIOĞLU | 228 |



| | | Sayfa No |
|-----|--|----------|
| P76 | ÜÇÜNCÜ VE DÖRDÜNCÜ JENERASYON İKİ ANTİ HCV ELISA KİTİNİN PERFORMANSININ HCV RNA SONUÇLARI İLE DEĞERLENDİRİLMESİ İbrahim Hakkı ÖZEROL, Rıza DURMAZ, Şahin DİREKEL | 229 |
| P77 | VİRAL MENİNGOENSEFALİT ŞÜPHELİ VAKALARIN BEYİN OMURİLİK SIVISI ÖRNEKLERİNDE HERPES SİMPEKS VİRUS ARAŞTIRILMASI A. AKÇALI, E. ÖZKAYA, D.YILMAZ | 230 |
| P78 | VİRAL KONJUNKTİVİT ETKENİ OLARAK ADENOVİRUS VE HERPES SİMPEKS VİRUS ARAŞTIRILMASI VE ADENOVİRUSLARIN MOLEKÜLER TİP TAYİNİ E. ÖZKAYA, H. ISHIKO, R. YAĞCI, H. KARADEMİRTOK, A.AKÇALI | 231 |
| P79 | REANİMASYON İZOLATI PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARININ ARBITRARILY PRIMED POLİMERAZ ZİNCİRLEME REAKSİYON YÖNTEMİYLE DEĞERLENDİRİLMESİ G. ASLAN, N. DELİALİOĞLU, Ç. YILDIZ, S. TEZCAN, G. EMEKDAŞ, R. DURMAZ, U. ORAL | 232 |
| P80 | TOXOPLASMA GONDII TANISINDA REAL- TIME PCR YÖNTEMİYLE 1.5 YILLIK DENEYİMLERİMİZ Sibel AYDOĞAN, Funda DOĞRUMAN AL, Ayşe EREN, Ayşe KALKANCI, Semra KUŞTİMUR | 233 |

KURULLAR



KONGRE YÜRÜTME KURULU

Başkan
Ayfer Günalp

Başkan Yardımcıları
Selim Badur
Rıza Durmaz

Genel Sekreter
Gülşen Haşçelik

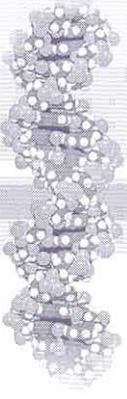
Bilimsel Sekreter
Burçin Şener

DÜZENLEME KURULU

Hakan Abacıoğlu
Alpaslan Alp
Sevtaç Arıkan
Koray Ergünay
Ahmet Pınar
Dürdal Us
Şemsettin Ustaçelebi
Yakut Akyön Yılmaz

BİLİMSEL KURUL

Yurdanur Akgün
Hande Arslan
Bülent Baysal
Levent Doğanç
Selda Erensoy
Meral Gültekin
Murat Günaydın
Tanıl Kocagöz
Fatih Köksal
İftihar Köksal
Ayhan Kubar
Ethem Özkaya
Murat Özsan
Seyyal Rota
Güner Söyletir
Bülent Sümerkan
Okan Töre
Emel Tümbay
Salih Türkoğlu



GENEL BİLGİLER

ÖNEMLİ TARİHLER

Kongre Tarihi

28 Haziran-1 Temmuz 2004

Kongre Merkezi

Bilkent Otel-Ankara

Kongre Dili

Kongre resmi dili Türkçe'dir.

Kongrenin Web Adresi

www.molekulermikro2004.org

İzinler

Kongre katılımı için kurumlara verilmek üzere talep edilecek izin yazıları, Kongre Yürütme Kurulu aracılığı ile isteyen katılımcılara gönderilecektir.

İptaller

Kayıt ve konaklama ücretlerinde, 15 Nisan 2004 tarihine kadar yapılacak iptallerde %50'si iade edilir. Bu tarihten sonra yapılacak iptallerde iade yapılmayacaktır. Tüm iadeler kongre bitiminden sonra yapılacaktır.

Kongre Danışma ve Kayıt Masası Çalışma Saatleri

28 Haziran -1 Temmuz 2004 tarihleri arasında:

Saat 08:30-18:30

Yaka Kartları

Tüm katılımcı ve refakatçilere yaka kartı dağıtılacaktır. Yaka kartı olmayan misafirler kongre aktivitelerine kesinlikle katılamayacaklardır.

Kredilendirme

Toplantılar Türk Tabipler Birliği tarafından kredilendirilecektir.

Katılım Sertifikası

Tüm katılımcılara katılım sertifikaları 30 Haziran 2004 tarihinde dağıtılacaktır. Bu tarihten önce ayrılacakları, adreslerini mutlaka danışma masalarına bildirmeleri veya bir başkasının alabilmesi için yazılı yetki vermeleri rica olunur.

Ulaşım

Kongre Merkezine ulaşım saatlerini www.molekulermikro2004.org adresinden veya Flap Tour Kayıt Deski'nden öğrenebilirsiniz.

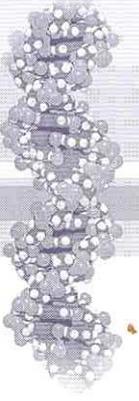


28 Haziran 2004 Pazartesi

- 09:00 -16:00 Kayıt
- 16:00- 16:30 Açılış Konuşması; Ayfer Günalp - Gülşen Hasçelik
- 16:30 - 17:30 **Konferans 1 - Tümör Supressör Genler ve Onkogenez**
Oturum Başkanı : Şemsettin Ustaçelebi
Konuşmacı : Mehmet Öztürk
- 18:00- 20:00 Kokteyl - (Becton Dickinson)
- 20:30 **Tele Konferans** : Polymerase Chain Reaction in Diagnostic Microbiology
Oturum Başkanları : Hakan Abacıoğlu, Yakut Akyön Yılmaz
Konuşmacı : Kerry Mullis

29 Haziran 2004 Salı

- 09:00 - 10:00 **Panel 1: HIV Moleküler Patogenezi**
Oturum Başkanı : Okan Töre
• HIV Moleküler Yapısı (Ali Ağaçfidan)
• HIV Moleküler Patogenezi (Selim Badur)
- 10:00 - 10:30 Kahve Arası (Tayanç Medikal)
- 10:30 - 11:30 **Konferans 2: Real Time PCR and New Developments in Molecular Diagnostic Techniques**
Oturum Başkanı : Güner Söyletir
Konuşmacı : Harald Kessler
- 11:30 - 12:30 Poster Sunum
- 12:30 - 13:00 Yemek (Bio DPC)
- 13:00 - 14:30 **Yuvarlak Masa: Tanısal Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarında Karşılaşılan Sorunlar**
Oturum Başkanı : Selda Erensoy
• Tanısal Mikrobiyoloji Laboratuvarında Nükleik Asit Testlerinin Seçimi ve Değerlendirilmesi (Selda Erensoy)
• Nükleik Asit Testlerinin Uygulamasında Karşılaşılan Sorunlar (Arzu Sayiner)
• Laboratuvarlarda Biyonformatik Kullanımı (Salih Türkoğlu)
- 14:30 - 15:00 Kahve Arası (Tayanç Medikal)
- 15:00 - 17:00 **Panel 2: Moleküler Testlerin Standardizasyonu ve Kalite Kontrolü**
Oturum Başkanı : Gülşen Hasçelik
• Türkiye'de Moleküler Testlerin Güncel Durumu (Gülşen Hasçelik)
• Moleküler Laboratuvarlarının Standardizasyonu (Engin Yılmaz)
• Quality Control in Molecular Diagnostics (Paul Wallace)
- 17:00 - 18:30 **Sözlü Sunumlar**
Oturum Başkanları : Yurdanur Akgün, Seyyal Rota



30 Haziran 2004 Çarşamba

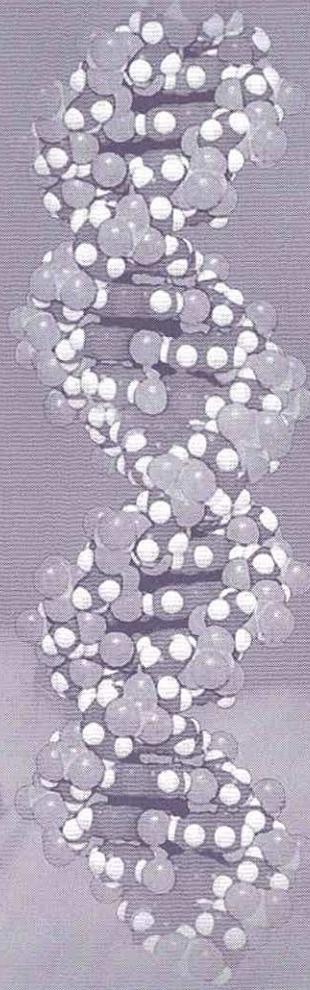
- 09:00 - 10:00 **Konferans 3: Molecular Mechanisms of Beta-Lactam Resistance in Gram Negative Bacteria**
Oturum Başkanı : Ali Albay
Konuşmacı : Patrice Nordmann
- 10:00 - 10:30 Kahve arası (Tayanç Medikal)
- 10:30 - 12:00 **Panel 3: Antimikrobiyal Direncin Moleküler Yöntemlerle Saptanması**
Oturum Başkanı : Tanıl Kocagöz
- Gram Pozitif ve Gram Negatif Bakterilerde Antibiyotik Direncinin Moleküler Yöntemlerle Saptanması (Deniz Gür)
 - Helicobacter Pylori'de Antibiyotiklere Direnç Oluşturan Mekanizmalar ve Moleküler Tanı Yöntemleri (Yakut Akyön Yılmaz)
 - Mycobacterium Tuberculosis'de Antitüberküloz İlaçlara Direnç Oluşturan Mekanizmalar ve Moleküler Tanı Yöntemleri (Ahmet Saniç)
- 12:00 - 12:30 Yemek Arası (Medkim) - Poster Sunumları
- 12:30 - 13:30 Uydu Sempozyum 1 (Euroimmun)
- 13:30 - 15:30 **Panel 4 : Moleküler Epidemiyolojide Neredeyiz?**
Oturum Başkanı : Rıza Durmaz
- Moleküler Epidemiyoloji Neden Gerekli? Başlarken Nelere Dikkat Etmeliyiz? (Rıza Durmaz)
 - Moleküler Epidemiyolojide Temel Yöntemler (Salih Hoşoğlu)
 - Bakterilere Yönelik Moleküler Epidemiyolojik Çalışmalar (Burçin Şener)
 - Viral Moleküler Epidemiyolojik Çalışmalar (Cafer Eroğlu)
 - Mantarlara Yönelik Moleküler Epidemiyolojik Çalışmalar (M. Ali Saraçlı)
- 15:30 - 16:00 Kahve Arası (Tayanç Medikal)
- 16:00 - 17:00 **Panel 5: PCR için Primer Prob Dizaynı**
Oturum Başkanı : Ayhan Kubar
- Primer Prob Dizaynının Önemi (Ayhan Kubar)
 - Primer Prob Dizaynının Önemli Olduğu Yöntemlere Kısa Bakış (Çakır Güney)
 - Primer Prob Dizaynında Kullanılan Bilgisayar Programlarının Değerlendirilmeleri ve Biyoinformatik Analiz (Mehmet Yapar)
- 17:00 - 19:00 **Uydu Sempozyum 2: Moleküler Teknolojide Yenilikler**
Oturum Başkanı : Dürdal Us
Roche, ATC Artus, Euroimmun, Medek
- 20:30 Gala Yemeği (Roche Diagnostik)



1 Temmuz 2004 Perşembe

- 09:00 - 10:30 **Panel 6 : Moleküler Yöntemlerin Bakteriyel Tanı ve Tiplendirmede Kullanımı**
Oturum Başkanı : Murat Özsan
- Bakteriyolojide Moleküler Tanı Niye Gerekli? (Murat Özsan)
 - Anaerob Bakterilerin Moleküler Tanısı (Bengül Durmaz)
 - Mikobakterilerin Tanı ve İdentifikasyonunda Moleküler Yöntemleri (Alpaslan Alp)
 - Helicobacter pylori Tanısında Kullanılan Moleküler Yöntemler (Fatih Köksal)
- 10:30 - 11:00 Kahve Arası (Tayanç Medikal)
- 11:00 - 12:00 **Konferans 4: Utility of Molecular Methods in Diagnosis of Fungal Infections**
Oturum Başkanı : Sevtap Arıkan
Konuşmacı : Lena Klingspor
- 12:00 - 13:00 Yemek Arası - Sözel Sunum
- 13:00 - 14:30 **Panel 7: Parazitlerin Moleküler Tanısı**
Oturum Başkanı : Sibel Ergüven
- Amebiasisde Moleküler Yöntemlerin Yeri (Mehmet Tanyüksel)
 - Leishmaniasisde Moleküler Yöntemlerin Yeri (Seray Özensoy Töz)
 - Sıtma Tanısında Moleküler Yöntemlerin Yeri (Dilek Turgut Balık)
 - Helmint Hastalıklarının Tanısında Moleküler Yöntemlerin Yeri (Metin Korkmaz)
- 14:30 - 15:00 Kapanış Konuşmaları ve Temenniler

**3. ULUSAL
MOLEKÜLER VE
TANISAL MİKROBİYOLOJİ
KONGRESİ**
(Uluslararası Katılımlı)



KONFERANSLAR

**28 Haziran-1 Temmuz, 2004
Bilkent Otel - ANKARA**



K2 REAL-TIME PCR AND NEW DEVELOPMENTS IN MOLECULAR DIAGNOSTIC TECHNIQUES

Harald H. KESSLER

Molecular Diagnostics Laboratory and Reference Laboratory for Hepatitis A, B, C; Institute of Hygiene; Medical University Graz; Austria

Nucleic acid-based tests (NATs) have become the "Gold Standard" for a huge range of applications in molecular diagnostics. The majority of those assays include polymerase chain reaction (PCR). Widespread use of molecular diagnostics, however, depends upon automation. Recently, a large number of more or less automated assays have been introduced but there are still bottlenecks in molecular diagnostics.

Sample preparation is currently considered the major weakness in molecular diagnostic techniques. Conventional sample preparation protocols are usually time consuming, labor-intensive and susceptible to human error as, e.g., contamination. Instruments for automated sample preparation have been introduced providing excellent results. Currently, those instruments allow just nucleic acid extraction from a limited range of specimens but further improvements are already on the horizon.

Conventional PCR requires hybridization and detection of amplification products; quantification is limited by a short dynamic range (2-3 logs). Recently, real-time PCR has been introduced. Real-time PCR combines amplification and hybridization of target DNA with detection of amplification products in the same closed vessel, thus reducing the analytical turnaround time as well as the risk of contamination. For the routine clinical laboratory, detection formats include use of hybridization probes, TaqMan probes, and molecular beacons. Similar to conventional PCR, the introduction of internal controls is essential to meet quality criteria. Quantitative real-time PCR shows a significantly greater quantification range (5-6 logs).

It may be suggested that real-time PCR testing formats largely replace conventional PCR technology in the near future.



K3 MOLECULAR MECHANISMS OF RESISTANCE TO β -LACTAMS IN THE GRAM NEGATIVE RODS *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND *ACINETOBACTER BAUMANNII*

Patrice NORDMANN

Dept. Bacteriology-Virology, Hospital Bicêtre, South-Paris Medical School,
University Paris XI, Le Kremlin-Bicêtre, 94275, France

Resistance to β -lactams in gram-negatives is the result mostly from β -lactamases, porin deficiency, and efflux over-expression, and rarely from penicillin binding protein changes. These mechanisms of resistance have been reported in *P. aeruginosa* and *A. baumannii* that are peculiar gram-negatives, clinically relevant since both of these species have naturally-occurring low level outer-membrane permeability. The most interesting and novel mechanisms of resistance to β -lactams in those species are as follows. For *P. aeruginosa*, extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases are reported increasingly. Carbapenem-resistant *A. baumannii* strains are also a matter of concern. These latter isolates contained either an oxacillinase or a metallo-enzyme, or have outer-membrane protein changes.



K4 UTILITY OF MOLECULAR METHODS IN DIAGNOSIS OF INVASIVE FUNGAL INFECTIONS

Lena KLINGSPOR

Mycology Unit, Division of Clinical Bacteriology, Karolinska Institutet, Karolinska University Hospital, Huddinge, Stockholm, Sweden.

Invasive fungal infections (IFI), are important causes of morbidity and mortality in immuno-compromised patients. Invasive candidosis (IC) is also an increasing problem in the intensive care units. Candida blood stream infections (BSI) carry an attributable mortality of approximately 40 to 50%. *Candida albicans* accounts for the majority of all such infections, but there has been a shift towards more non-*albicans* spp. in BSI. Invasive aspergillosis (IA) is common in allogeneic stem cell transplant recipients, with an incidence of 4-10%, and with a mortality rate of 80-90%.

Although conventional diagnostic tests, such as microscopy and culture, remain the corner-stone of mycology diagnosis, their sensitivities in immuno-compromised patients are low (Blood cultures for *Candida* spp. are positive in < 50%). Non-culture based techniques that have been used in the past, have lacked sensitivity and specificity in immuno-compromised patients.

New rapid methods that can detect IFI early in the course of disease, with high sensitivity and specificity, are needed since treating these infections at an early stage is often essential for a favourable outcome.

Specifically the polymerase chain reaction (PCR), offers great promise for the rapid diagnosis of fungal infections. Different protocols for sensitive detection of fungal DNA by amplification with PCR (conventional PCR, nested PCR, real-time PCR) have been established using universal fungal PCR primers and species-specific probes for a broad variety of fungal pathogens.

One of the problems with fungal PCR has been contamination and that will be addressed.

New methods including real-time PCR, which allow for the online quantification of the DNA-load, have been developed and evaluated for the detection of fungal DNA in clinical specimens.

Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) is an isothermal amplification technology which specifically amplifies RNA sequences in a DNA back ground by using T7 RNA polymerase. NSBA-based assays have been described for both *Candida* and *Aspergillus* spp. The technique may become a valuable tool for sensitive, specific, fast and reliable detection of both *Candida* and *Aspergillus* RNA, with potential for routine diagnosis, including the possibility to test the viability of cells.

Also the DNA-chip technology and different sequencing methods such as pyrosequencing , will help to establish nucleic acid-based detection methods in the routine mycology laboratory. Pyrosequencing is a rapid and easy method for short sequences (up to 60 bases). This method can be used for rapid typing of *Candida* to species level.

PCR fingerprinting, such as arbitrarily (AP)-PCR mediated genotyping , and pulsed-field gel electrophoresis are methods used as epidemiological tools to investigate for example transmission of *Candida* strains between individuals.

Prospective studies evaluating the potential benefits of early therapy based on real-time PCR in patients at high risk for IC and IA, are ongoing at the Karolinska University Hospital, Huddinge.

In our clinical mycology laboratory we have established an assay, using a robot for fully automated extraction of *Candida* and *Aspergillus* DNA, achieving high purity and speed in combination with real-time PCR. The whole assay takes approximately 5- 6 hours to perform. This assay has a sensitivity of 1 to 10 fungal cells per ml of blood. Furthermore, to assess its clinical applicability, a large number of patient samples such as blood samples, and samples from other normally sterile body fluids from patients with suspected IFI have been analysed with real time PCR and compared to culture assay, and /or CT-scan results.

**3. ULUSAL
MOLEKÜLER VE
TANISAL MİKROBİYOLOJİ
KONGRESİ**
(Uluslararası Katılımlı)



PANELLER

**28 Haziran-1 Temmuz, 2004
Bilkent Otel - ANKARA**



P1 HIV: MOLEKÜLER ÖZELLİKLERİ

Ali AĞAÇFİDAN

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul

HIV küre şeklinde ve yaklaşık 100-120 nm çapında RNA virusudur. Zarflı bir virustur. Bu zarf koni biçimli nükleokapsidi kuşatan çift tabakalı bir yapı gösterir. HIV'in hücre membranından tomurcuklanma esnasında b2 mikroglobulin, insan lenfosit DR antijeninin a ve b zinciri, siklofilin gibi bazı hücrel proteinleri aldığı gösterilmiştir. Elektron mikroskopi teknikleri kullanılarak nükleokapsidin 40-60 nm çapında geniş bir ucu ile yaklaşık 20 nm çapında bir ucunun olduğu gösterilmiştir. HIV genomunda yapısal olan gag, pol ve env geni başta olmak üzere dokuz adet gen vardır. Virusta bulunan dokuz adet proteinden gag geni, virus kapsid proteinlerinin öncülerini; pol geni, birçok virion enzim öncülerini (proteaz, revers transkriptaz, Rnase H ve integraz); env geni ise zarf glikoproteinlerinin öncülerini sentezler.

HIV virionunun kolesterol bakımından zengin olan zarfının üzerinde üç köşeli simetri gösteren 72 adet çıkıntı bulunmaktadır. Uzunlukları 9-10 nm olan her bir çıkıntıda yaklaşık 15 nm çapında ovoid bir uç bulunmakta ve 7-8 nm uzunlukta bir sapla lipid zarfa bağlanmaktadır. Bu çıkıntılar gp41 denilen transmembran alt birimi ve gp120 denilen yüzey alt birimlerinden oluşmaktadır.

Genom dizi analizleri ve serolojik özelliklerine göre insanlardan izole edilen HIV iki tipe ayrılmaktadır. İki tipde de en büyük dizi farklılığı env geninde bulunur. Afrika'da maymun türlerinde bulunan Simian immunodeficiency virus (SIV) doğal konaklarında hastalık oluşturmaz. Sooty mangabey türünde bulunan SIVsm HIV-2 ile yüksek derecede benzerlik gösterir. Buna karşın şempanzelerde bulunan SIVcpz HIV-1'e daha çok genetik benzerlik göstermektedir. Bu durum SIV'in HIV etkenlerinin atası olduğu fikrini ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca HIV-1'in deneysel olarak şempanzelerde üretilebilmesi ve diğer maymun türlerinde hastalık oluşturmaması bu tezi doğrulamaktadır.

HIV-1 ve HIV-2 arasında genetik yakınlık bakımından %40 oranında bir benzerlik vardır. HIV-2'nin yapılan araştırmalar sonucu HIV-1'den daha az virulan olduğu gösterilmiştir.

gp41 ve gp120 HIV'in env geni tarafından kodlanan öncül gp160'dan oluşmuştur. Non-kovalent bağlarla gp41 ve gp120 birbirlerine sıkı bir şekilde bağlıdırlar. HIV gp120 glikoproteinleri, yardımcı T lenfositlerinin yüzeyinde bulunan CD4 antijenine bağlanan zinciri içerir. Ayrıca pol geni nükleokapsid ve virion zarfı arasında bulunan p17 matriks proteinini, 5 nm kalınlığındaki kapsidin kabuğunu oluşturan p24 kapsid proteinini ve viral genomu bağlı bulunan p7 nükleokapsid proteinlerini; gag geni ise proteaz (PR), revers transkriptaz (RT) ve integraz (IN) enzimlerini kodlamaktadır.

RT, p51 ve p66 alt ünitelerinden oluşmaktadır. RNA'yı çift zincirli konak hücre nükleik asidine entegre olacak DNA şekline çevirir. Ayrıca replikasyon sırasında sentezlenen RNA/DNA hibridinde RNA'yı parçalayan ribonükleaz aktivitesi içerir.

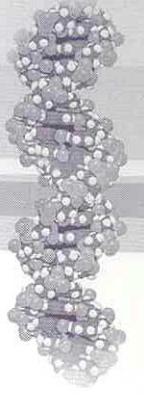
HIV'in Yapısal Proteinleri

gag proteinleri

HIV'de gag öncül proteininin viral proteazlar tarafından parçalanması sonucu daha ufak virus proteinleri oluşmaktadır. Viral mRNA'dan virusun kapsid yapısını oluşturmak için 55 kilodalton ağırlığında büyük bir protein oluşturulmaktadır. p55 de denilen gag öncül proteini daha sonra pol geninin 5' ucunda kodlanan 34 kilobaz ağırlığındaki viral proteaz tarafından en az beş yapısal proteine parçalanmaktadır. Bu parçalanma sonucu oluşan kapsid proteinleri MA (p17), CA (p24), NC (p7) olarak adlandırılmaktadır.

Matriks proteini (MA;p17)

Matriks proteini virusun hücre yüzeyinde yer almasında, konak hücreye yönelmede ve virusun hücre nükleusunu hedef almasında, integrasyon öncesi görev almaktadır. 17000 molekül ağırlığında ve yaklaşık 130 aminoasit içeren olgun matriks proteini matrikste virion kapsidi ve zarfı arasında bulunur.



Kapsid proteini (CA;p24)

Bu protein p55'in orta kısmından kaynaklanır ve p17'nin altında koni biçimli kabuğu oluşturur. 24-27 kilodalton molekül ağırlığındaki CA'nın olgun şekli çok fazla hidrofobik özellik göstermekte ve kapsid kabuğunun esas alt birimini oluşturmaktadır. Kapsid proteininin virusun toplanması ve dağılması esnasında fonksiyonu bulunmaktadır. Ayrıca viral penetrasyon ve/veya soyulmada rol oynamaktadır. HIV-1 p24, hücrel proteinler olan siklofilin A ve B'yi bağlar ve diğer proteinlerin tam olarak toplanmasını sağlar. Partikül oluşması için önemli olan p24 ve siklofilin A ve B arasındaki bu etkileşim virusun infektivitesi için gereklidir. İnfekte kişilerin serumlarında p24 en kolay saptanan proteindir.

Nükleokapsid proteini (NC;p7)

gag polipeptidininin C terminal ucunda bulunan dizilerin proteaz aracılığı ile parçalanmasıyla oluşan ve zarfın iç yüzeyinde bulunan NC, yaklaşık 70 aminoasit uzunluğunda ve 7-9 kilodalton molekül ağırlığındadır. NC'nin fonksiyonları arasında revers transkripsiyonu uyarmak, genomik RNA'nın virion içinde paketlenmesine yardımcı olmak ve viral RNA'nın dimerizasyonu yer almaktadır.

Tablo 1. HIV'in gen ve proteinleri

| Gen | Protein | Fonksiyon | Lokalizasyon |
|-------|---------|--|------------------------------------|
| gag | Pr55 | Virion kor proteinlerinden MA (p17), CA (p24), NC (p9), p7 için prekürsör polipeptid | Nükleokapsit |
| pol | Pr160 | Virion enzimlerinden olan PR:p10, RT, RNase H: p51/66, IN:p32 | Nükleokapsit |
| tat | p14 | Transkripsiyonel transaktivatör ve hücre faktörlerine bağlanır | Primer olarak hücre nükleusu |
| vpr | p15 | Virion proteini, fonksiyonu bilinmiyor | Virion |
| rev | p19 | Transkripsiyon sonrası transaktivatör, viral mRNA "splicing" transportu ve translasyonu | Primer olarak hücre nükleusu |
| vif | p23 | Viral infektivite faktörü, fonksiyonu henüz tam çözülmüş değil | Hücre sitoplazması |
| nef | p27 | T-hücre aktivasyonunu etkiler, virion infektivitesini artırır | Hücre sitoplazması plazma membranı |
| env | gp160 | Kılıf glikoproteini için prekürsör. SU (gp120): CD4 reseptör bağlayan, TM (gp41):membran füzyonu | Virion zarfı, plazma membranı |
| vpu* | p16 | Virus salınımını etkiler | İntegral hücre membranı protein |
| vpx** | p16 | Virion proteini, fonksiyonu bilinmiyor | Virion |

*Sadece IV-1'de vardır.

** Sadece HIV-2'de vardır.



Viral enzimler

HIV-1'in pol geni 5' ucundan 3' ucuna doğru kodlanan ve PR, RT ile IN denilen üç enzimi oluşturmaktadır. Bu viruslar gag geni ürünleri gibi aynı mRNA'dan oluşmaktadır. 55 kilodalton gag prekürsör poliproteinlerinin olduğu gibi, 160 kilodalton prekürsör poliproteininin parçalanması da HIV-1 proteazı tarafından oluşturulmaktadır.

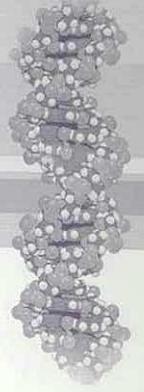
PR: PR'nin olgun şekli, 99 aminoasit uzunluğunda ve 10 kilodalton molekül ağırlığındadır. HIV-1 proteazının defektif mutantları olgunlaşmamış ve dolayısıyla infeksiyöz olmayan partikülleri oluşturmaktadır.

RT ve RNase H: Revers transkriptaz, tek zincirli RNA'yı konak hücre genomuna integre olacak olan çift zincirli DNA'ya çevirmede rol oynamaktadır. p66 ve p51 denilen iki alt birimden oluşmaktadır.

IN: HIV-1 integrasyonu yaklaşık 36 kilodalton ağırlığında ve 228 aminoasitten oluşmakta, viral DNA'nın konak hücre genomuna integre olmasında rol oynamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Hirsch MS, Curran J. Human Immunodeficiency Viruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (eds). Fields Virology 3. ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996;1953-1975.
2. Li X, Wainberg MA. Virology of HIV. In: Armstrong D, Cohen J (eds). Infectious Diseases. Harcourt Publishers, Mosby, 1999;7.1-7.4.
3. Luciw PA. Human Immunodeficiency Viruses and Their Replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (eds). Fields Virology 3. ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996;1881-1952.
4. Streicher HZ, Reitz JR. MS, Gallo RC. Human Immunodeficiency Viruses. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds). Principle and Practice of Infectious Diseases. 5.ed. Churchill Livingstone, New York, 2000; 1874-1887.
5. Watkins BA, Klotman ME, Gallo RC. Human Immunodeficiency Viruses. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds). Principle and Practice of Infectious Disease. Churchill Livingstone, New York. 4.ed. 1995; 1590-1606.



HIV MOLEKÜLER PATOGENEZİ

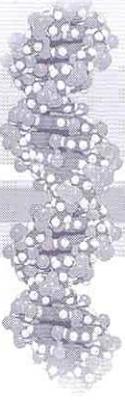
Selim BADUR

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji ve Temel İmmunoloji Bilim Dalı, Çapa, İstanbul.

İlk kez 1981 yılında ABD'den bildirilen ve Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) olarak isimlendirilen ağır immun yetmezlik tablosunun etkeni, iki yıl sonra, mayıs 1983'de Fransız bilim insanları, Luc Montagnier, Françoise Barre-Sinoussi ve Jean-Claude Chermann tarafından, Paris'de Pasteur Enstitüsünde tanımlanmıştır; ekip tarafından Lymphadenopathy associated virus (LAV) olarak adlandırılan bu Retrovirus, daha sonra uluslararası nomanklatür gruplarının çalışması doğrultusunda Human immunodeficiency virus (HIV) olarak isimlendirilmiştir (1). Bugün HIV'in tanımlanmasının üzerinden 20 yıldan fazla bir süre geçmiş olmasına ve pandemiye yol açan bu etken hakkında, kısa sürede çok fazla bilgiye sahip olmamıza rağmen, AIDS konusunda henüz yanıt bekleyen bir çok sorunun bulunduğu yadsınmaz bir gerçektir. Son yıllarda batı ülkelerinde başarıyla uygulanan tedavi protokollerinden, hastalığın yaygın olarak görüldüğü Afrika kıtası ekonomik nedenlerle yararlanamamakta; Asya ülkeleri ve Rusya'da epideminin hızla yayıldığı saptanmakta; ve sonuçta yeryüzünde bugün için 50 milyona yaklaştığı hesaplanan infekte kişi sayısının giderek artış göstereceği kabul edilmektedir. Her ne kadar konu ile ilgili olarak çok sayıda araştırmacı milyarlarca dolarlık bütçeleri ile çalışmalarını sürdürse de; PubMed data bazında, HIV/AIDS konusundaki yayın sayısı 125.000'i aşmış olsa da, yapılan hesaplamalara göre her gün 16.000 kişinin HIV ile infekte olduğu; bir milyonu çocuk olmak üzere her yıl yaklaşık beş milyon yeni olgunun listeye eklendiği kabul edilmektedir. Öte yandan son yıllardaki gelişmelere rağmen henüz tedavi konusunda tüm bir başarı sağlanamadığı, yoğun bilimsel çabalara rağmen etkili bir aşı beklentisinin bir türlü gerçekleşmediği, bugüne dek pilot çalışmalara konu olan ve 10.000 kadar gönüllüde denenilen 20'den fazla immünojenin hiçbirisinin kesin sonuca ulaşmasını sağlayamadığı görülmektedir (2). Ayrıca HIV/AIDS konusu, viroloji ve immünoloji alanlarında birçok yeni kavramın gelişmesine; bilim insanlarının o güne dek doğru olarak kabul ettikleri bazı kavramların tartışılır hale gelmesine yol açmıştır. Burada, HIV/AIDS immünopatogenezinde ortaya konan yeni kavramları kısaca özetlemeye çalışacağım.

Doğrusunu isterseniz HIV/AIDS konusu, kendi içinde bir çok çelişkiyi içermektedir; bu açıdan bakıldığında, ilk akla gelen bazı gariplikleri şu şekilde sıralayabiliriz:

- HIV enfeksiyonu sırasında, hastaların CD4+ T hücrelerinin çok az bir bölümünün infekte olduğu; ama bu hücrelerin denetimindeki immun fonksiyonlarda ağır hasar görülmektedir;
- İnfeksiyon sürecinde, immun sistemin son derece aktif olduğu, buna karşın ağır bir immun yetmezliğin ortaya çıktığı saptanmaktadır;
- Etkene karşı oluşan Anti-HIV antikoru, geçirilmiş bir enfeksiyondan çok persistan enfeksiyonun göstergesi olarak karşımıza çıkmaktadır;
- HIV enfeksiyonu süresince gözlenen, çeşitli sitokinlerin aşırı üretimi viral ekspresyonunun dengesiz biçimde gelişmesine yol açmaktadır ;
- İnfekte kişilerde saptanan: nötralizan antikoru ile HIV spesifik CD8+ ve CD4+ T hücrelerine rağmen, etkeni denetim altına almak mümkün olamamaktadır;
- Özellikle uzun süreli asemptomatik olgularda (USAO) güçlü CD8+ hücre yanıtı görülmesine rağmen, başka virus modellerinde çok etkili olan bu öldürücü hücreler, HIV'e ölüm öpücüğünü konduramamaktadırlar;
- son olarak immun yanıtı rağmen persistan enfeksiyonun varlığını, sadece virusun yapı değiştirmesi ile açıklamak olanaksızdır; bu tip bir kronik enfeksiyonda, aksaklığı, acaba etken yerine farklı işlemeye başlayan ve sonuçta yetersiz kalan immun sistemde mi aramak gereklidir?



İşte HIV/AIDS'de görülen ve klasik immünoloji bilgileri ile açıklanamayan bazı aykırılıklar! HIV enfeksiyonunda, doğal direncin yanısıra humoral ve hücresele bağışık yanıt ortaya çıkar; ancak, örneğin polio, hepatit A, influenza ya da kızamık gibi etkenlere karşı oldukça etkili olan spesifik antikörlerin, persistans özelliğine sahip olan ve genomik değişime açık bulunan Retroviruslar gibi etkenler için aynı başarıyı yakaladıkları söylenemez. Buna karşın T lenfositleri, hem enfekte hücreler üzerine sitotoksik etki göstererek, hem de lenfokinler üreterek etkili olmaya çalışırlar; CD8+ hücrelerce üretilen süpresör faktörler non-sitolitik yoldan HIV replikasyonunu engelleme özelliği gösterirler; HIV replikasyonunun çeşitli hücrelerden, örneğin makrofajlardan ya da stromal hücrelerden kemokinlerin salgılanmasını kamçıladiğı bilinmektedir. Bu durum başlangıçta değindiğim, HIV modelindeki çelişkili davranışlara bir diğere örnektir: HIV replikasyonu arttıkça, daha çok kemokin ve antiviral mediatörler sentezlenecek; bunlar ise, enfeksiyonu baskılama özelliği göstereceklerdir (3, 4).

Klasik bir HIV enfeksiyonunun seyrine bakıldığında, başlangıçta kısa bir süre için yoğun virus replikasyonu olduğu, bu aşamada etkili bir immun yanıtın süratle devreye girerek bu yoğun üremeyi önlediği; ancak tamamen ortadan kaldıramadığı görülmektedir. Mutasyonlar sonucu oluşan değişiklikler HIV'in immun sistemden kaçmasına yaradiğı gibi, örneğin virusun yüzeyel kılıf tabakasının aşırı glikozile olma özelliği taşıması, nötralizan antikörlerin etkisini kısıtlamakta; provirusun latent kalma özelliği, antijen sunum işleminin aksaması, HIV-spesifik lenfositlere karşı saldırı ve nihayet immünokompetan- prekürsör hücrelerin enfekte olmaları gibi bir dizi mekanizma uyarınca, güçlü immun yanıt, etkili olamamaktadır (4).

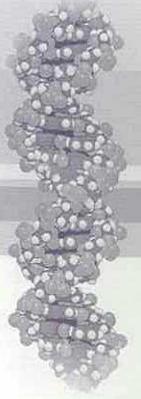
1. HIV'e karşı savunmada ilk aşama: Doğal direnç

Doğal direncin çözünmüş yapıtaşları arasında, özellikle mannozu bağlayan lektin (MBL) ve kompleman sisteminin Anti-HIV etkinliği ön plana çıkmaktadır; her iki komponent, etken üzerine bağlandıktan sonra, ya virusu direkt olarak lizise uğratarırlar, ya da etkeni makrofajların gerçekleştireceği fagositoza duyarlı kılarlar. Nitekim, düşük düzeyde MBL üretiminin, HIV enfeksiyonuna duyarlılığı arttırdığı gösterilmiştir. Bu iki önemli komponentin dışında, a- defensinlerin, kemokinlerin ve diğere sitokinlerin de (IL-12, IL-4, 1L-6, IFN'lar ve TNF- a) farklı mekanizmalarla HIV enfeksiyonu ile mücadele ettikleri bilinmektedir (5,6).

Doğal direncin hücresele yapıtaşlarından ise, tip - I interferon (IFN) üreten hücreler (IPC) ile non-sitotoksik CD8+ T hücrelerinin, Anti-HIV mücadelesinde ön plana çıktıkları görülmektedir. Yapılan çalışmalarda IPC sayısının azaldığı ve IFN-a üretiminin aksadığı bireylerde, HIV- RNA düzeyinin arttığı; Kaposi sarkomu lezyonlarının süreklilik kazandığı ve nihayet bu tip olgularda fırsatçı enfeksiyonların daha sık ortaya çıktığı gösterilmiştir (7). IPC'in Anti-HIV etkinliği incelendiğinde, bu hücrelerin HIV replikasyonunu baskılayarak direkt etki gösterdikleri; ayrıca NK hücreleri gibi, diğere doğal direnç komponentlerini uyardıkları; antijen sunan hücreler (ASH) yüzeyindeki MHC-I ve B7 ekspresyonunu arttırarak indirekt yoldan özgül bağışıklığa katkıda buldukları ve nihayet CD4+ T hücrelerini tip 1 yanıtı doğru yönlendirdikleri saptanmıştır. Bu grupta ele alacağımız diğere hücreler olan ve non-sitotoksik etkinliğe sahip CD8+ T hücrelerinin önemi, USAO'da gösterilmiştir; bu hücreler MHC I /II bağımlılığı olmayan, HIV spesifik etki göstermeyen ve antiviral etkinliğe sahip özel bir sitokin grubu olarak kabul edilen CAF salgılayan hücrelerdir (8). Belirtilen bu hücrelerin dışında, nötrofillerin, dendritik hücrelerin (DC), NK hücrelerinin, ve _d T hücrelerinin , HIV enfeksiyonlarındaki koruyucu rollerini gösteren çalışmalar vardır. Nötrofiller, fagositik etkinliklerinin yanında, bazı proteinleri ve inflamatuvar sitokinleri; DC'ler, kemokinler ve tip-1 IFN'ları salgılayarak; NK hücreleri ya direkt ya da antikora bağlı hücresele sitotoksiste (ADCC) mekanizmaları uyarınca, HIV ile enfekte hücreleri yıkıma uğratarak; mukoza yüzeyinde bulunan _d-T hücreleri ise, yine HIV ile enfekte hücrelere saldırarak etkili olan yapıtaşlarıdır (5).

Tüm bu veriler, ilk yıllarda üzerinde fazla durulmayan doğal direncin, HIV bulaşının yanısıra, fırsatçı enfeksiyonlara ve kanserleşmeye karşı önemli bir savunma sistemini oluşturduğunu; özellikle USAO'lardaki çalışmalar ile bu mekanizmanın rolünün daha iyi anlaşıldığını göstermektedir. Sonuçta gelecekte hazırlanması planlanan etkili bir HIV aşısının, örneğin non-sitotoksik CD8+ T hücrelerini uyaracak; yada doğal direncin etkili silahları olarak kabul edilen bir dizi sitokinin üretimini kamçılacak şekilde dizayn edilmesi öngörülmektedir.

Bu arada insan dışında çok sayıda primatin HIV enfeksiyonuna dirençli oldukları; bu durumda, immun sistemden çok, konak hücrelerde bulunan TRIM5-alfa gibi bazı restriksiyon faktörlerinin viral replikasyonu baskılayarak etki etmelerinin rol oynadığı saptanmıştır (9).



2- HIV' e karşı ikinci savunma aşaması: Özgül bağışıklık

Günümüzde uygulanmakta olan antiretroviral tedavinin (ART) HIV replikasyonunu baskıladığı; ancak virusun özellikle yaşam süreleri uzun olan bellek CD4+ T hücrelerinde latent enfeksiyona yol açması nedeniyle, HIV eradikasyonunu sağlayamadığı bilinmektedir. Bu durumda, ART'ye destek amacıyla immünoterapinin devreye girmesi; buna bağlı olarak da immün sistemin Anti-HIV yanıtının ayrıntılı biçimde ortaya konması gerekmektedir; bu bilgi doğal olarak, etkili aşı üretimi için de gereklidir.

a) İmmün sistemin yöneticisi:CD4+ T hücreleri

HIV enfeksiyonların doğal seyri sırasında, normal koşullarda çeşitli sitokinler salgılayarak immün yanıtı bir orkestra şefi gibi yöneten CD4+ hücrelerinin hem sayısal hem de işlevsel açılarından zayıfladıkları bilinmekte; son aşamalarda, CD4+ hücrelerinin baskılanmasının, CTL aktivitesini de olumsuz yönde etkilediği görülmektedir. CD4+ yanıtı ile viral yük arasındaki denge çeşitli çalışmalarda ve farklı gruplarda kanıtlanmıştır; örneğin p24 antijeni ile uyarılan CD4+ T hücrelerinin proliferasyon oranı saptanarak ya da bu hücrelerdeki hücre içi IFN- γ ekspresyonu ölçülerek, USAO'da kronik enfekte bireylere oranla daha güçlü CD4+ yanıtı saptanmıştır. CD4+ T hücrelerinin sayısal ve işlevsel dengesizliğinde direkt ve indirekt mekanizmalar rol oynar; örneğin: a) viral DNA yığılı, b) hücre içinde gp 120-CD4 otofüzyonu, c) membran bütünlüğünün bozulması, ya da d) spesifik immün yanıtın etkisi ile enfekte hücrelerin yıkımı gibi direkt mekanizmaların yanı sıra; a) sinsityum oluşumu, b) otoimmünite, c) apoptoz, d) lenfopoezisin baskılanışı, e) uygun olmayan sinyal iletimi, ya da f) henüz enfekte olmayan ama yüzeyine viral antijenler bağlanmış olan hücrelerin yıkılması gibi indirekt mekanizmalar uyarınca, CD4+ T hücrelerinin yaşamlarını ve işlevlerini yitirdikleri gösterilmiştir (10). Son yıllarda, etken virusun, özellikle bellekli ve HIV'e spesifik CD4+ T hücrelerine saldırarak, onlara afinite gösterdiğinin kanıtlanmış olması, AIDS olgularında gözlenen ve özel olarak TH¹'lere yönelik etkinin bu denli yoğun olmasını açıklayan bir bulgudur (11).

CD4+ hücreler ele alındığında, elbet sitokinler ile HIV/AIDS ilişkisine yer vermek uygun olacaktır. Bu enfeksiyonu Sitokin hastalığı şeklinde tanımlayan yazarlar vardır. Genel anlamda HIV enfeksiyonu süresince, HIV replikasyonunu çeşitli yollardan kamçılayan proinflatuar sitokin (TNF-a, IL-1b, IL-6, IFN- γ , IL-10) ekspresyonunun arttığı; immüno-regülâtör sitokin (IL-2, IL-12 gibi) üretiminin ise azaldığı görülmektedir. (5).

b) Hümorale yanıt ürünleri: Anti-HIV antikorları

Genel anlamda viral enfeksiyonlara karşı savunmada, nötralizan antikorların önemli rolleri olduğu bilinmektedir. Bu genellemeden hareketle, HIV/AIDS immünopatogenezinin ele alındığı çalışmaların yanı sıra, aşı konusunda başlatılan incelemelerde, hümorale yanıt üzerinde çok durulmuştur. Bu konuda gerçekleştirilen ilk çalışmalarda, diğer kılıflı virüslerde olduğu gibi, HIV'e karşı oluşan nötralizan antikorların, özellikle kılıf (env) bölgesine karşı meydana geldikleri; ve gp 120'nin V3 parçasının bu antikorları uyarıcı en etkili epitop bölgesi olduğu anlaşılmıştır. Ancak bu bölgenin aşırı değişkenliği (hipervariabilite) virüsün, üretilen nötralizan antikorlardan kolaylıkla kaçabilmesinin en önemli nedenini oluşturur. Bu arada, 1990'lı yıllara kadar yapılan çalışmalarda elde edilen olumlu sonuçlar, 1995'li yıllarda ciddi biçimde eleştirilerek yadsınmıştır; o güne dek yapılan çalışmalarda kullanılan ve hücre kültürlerine adapte edilmiş suşların (T-cell line adapted strains-TCLA) yapay biçimde nötralizasyona duyarlı hale geldikleri; hastalardan izole edilen ve çok az pasajı yapılmış primer suşların ise (primary isolates-PI), epitoplarındaki erişim güçlüğü nedeniyle, aynı duyarlılığı göstermedikleri anlaşılmıştır (12). Sonraki yıllarda, HIV-env bölgesi daha ayrıntılı biçimde incelenmiş; gp120-gp41 oligomerlerinin, virion üzerindeki yerleşim özellikleri, konformasyonel yapıları, CD4 ve koreseptörler ile bağlanma biçimleri ve nihayet IgG1b12, 2F5, 4E10, 2G12 gibi elde edilen bir dizi monoklonal nötralizan antikorun bağlanma yerleri aydınlatılmıştır (13).

Sonuçta, etkili bir aşı hazırlarken gözardı edilmemesi gereken humoral bağışıklık konusundaki, şu doğruları yeniden vurgulamak gerekir:

- İnfeksiyonun erken döneminde gözlenen yüksek düzeydeki vireminin henüz nötralizan antikorlar oluşmadan düşüşe geçmesi, bu antikorların savunmadaki etkisini tartışılır kılmaktadır;
- Hayvan deneylerinde antikorlar ile yapılacak pasif bağışıklamanın etkili olabilmesi için çok yüksek titrede antikora gereksinim vardır;



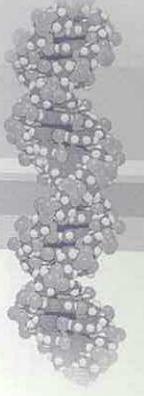
- c) İnfeksiyona direnç gösteren bazı bireylerde, nötralizan antikorlara hiç rastlanmamıştır.
- d) İnfekte kişilerde saptanan antikorların büyük kısmı, non-nötralizan özelliğinde olup, virion artıklarına spesifiktirler;
- e) Nötralizan antikorlar, HIV-env üzerinde üç ayrı bölgeyi tanıyabilir: V3-hipervariabl kısmını; env'un CD4 bağlanma bölgesini; ya da transmembraner gp41 proteinini. Bunlar arasında en etkili görülen Anti-V3'lerin aşılama sonucu oluşturulmasında bazı sorunlar bulunmaktadır: herşeyden önce aşırı değişkenlik özelliği, izolata spesifik nötralizasyon özelliğini beraberinde getirir. Ayrıca env bölgesinin glikolizasyonu sonucu epitoplarnın maskelenişi, oluşacak antikorların erişimini engellemektedir. İkinci bölge olan CD4, değişkenliği env'a göre çok daha az olan bir bölgedir; ancak buraya bağlanacak antikorların nötralizan özelliği zayıftır; gp41 konusunda ise yapılan çalışmaların sayısı azdır; ancak bu bölgenin korunur oluşu, ilerideki aşı çalışmaları için hedef bölge olarak değerlendirilmesini ekte getirir (14,15).
- f) İmmün yetmezlikli farelere, HIV ile infekte lenfoid dokular ve nötralizan monoklonal antikorlar injekte edildiğinde, viral replikasyonun etkilenmediği görülmüştür;
- g) İnfekte kişilere HIV hiperimmün gamaglobülin infüzyonu uygulaması, viral yük ve hastalık gelişimini pek etkilememektedir.

Tüm bu sonuçlar, HIV - nötralizan antikorlar ilişkisinde şöyle bir genellemeyi mümkün kılmaktadır: infekte kişilere sonradan uygulanan pasif bağışıklamanın; ya da geç oluşmaları nedeniyle, primer infeksiyon sırasında oluşacak antikorların koruyucu etkisi önemli değildir. Buna karşın yerleşmiş infeksiyona etkili olamayan antikorlar, eğer canlıda önceden var iseler yeni bir infeksiyonda kesin koruyucu etki gösterebilirler(15). Bu arada son yıllarda üzerinde çalışılan insan nötralizan monoklonal antikorlarının oldukça etkili oldukları deneysel olarak gösterilmiş ve gönüllülerde faz I çalışmalarına geçilmiştir (16).

c) Hücresel sitotoksosite: sitotoksik T hücreleri (CTL-CD8+ hücreler)

İnfekte bireylerde, HIV'in yapısal ve regülatör gen bölgelerine karşı güçlü CTL yanıtının ortaya çıktığını biliyoruz; bu lenfositler bir yandan infekte hücrelere, yüzeylerindeki MHC-I eşliğindeki viral peptidler aracılığı ile tutunup onları lize ederek; diğer yandan MIP-1 a ve b, RANTES gibi kemokinler salgılayıp virusun CD4+ T hücre koreseptörü ile birleşmesine engel olarak ve nihayet CAF , MDC, IL-16 gibi başka bazı çözünmüş faktörler üreterek etki gösterirler (15).

CTL'nin, HIV infeksiyonlarını baskılamadaki rolleri çeşitli deneylerle kanıtlanmıştır; örneğin akut infeksiyon dönemini takiben vireminin azalması, HIV spesifik CTL'in ortaya çıkması ile eşzamanlıdır; ayrıca in vitro koşullarda, HIV ile infekte kişilerden alınan CTL'nin, otolog CD4+ T hücrelerinde viral replikasyonu baskıladığı gösterilmiştir; ve nihayet, virusa özgü CTL'in nakledildiği hastalarda, bu hücrelerin HIV infeksiyonunun bulunduğu bölgelere yöneldikleri ve etki ettikleri gösterilmiştir. Ayrıca hastalığın yavaş seyir gösterdiği kişilerde, CTL yanıtı oldukça güçlüdür; kantitatif olarak HIV spesifik CTL ile viral yük arasında ters orantı vardır ve nihayet, infeksiyonun ilerlemiş dönemlerinde, hastaların lenf nodüllerindeki CTL oranı kademeli olarak azalmaktadır. Özellikle son yıllarda kullanılmaya başlanan, radyoaktif krom işaretli CD8+ T hücrelerin ya da tetramer boyama tekniklerinin yaygınlaşması ile, CTL ile viral yük arasındaki kantitatif denge daha net biçimde ortaya konmuştur. Bu arada Elispot testi ile yapılan çalışmalar, primer infeksiyon sırasında gözlenen CD8+ T hücre yanıtının, şimdiye dek kabul edilenden farklı bazı özelliklerini ortaya çıkarmaktadır; bu duyarlı test ile elde edilen bulgulara göre, primer infeksiyonda CD8+ hücre yanıtı sanıldığı aksine güçlü değildir ve olguların ancak %60'ında saptanabilir düzeydedir; ayrıca bu hücrelerin, erken dönemde tanıdıkları viral peptid sayısı çok kısıtlıdır; dar bir tanıma alanına işaret eden böyle bir bulgu, primer infeksiyonda viral replikasyonun CTL aracılığı ile tam olarak denetim altına alınamamasının nedenidir (17,18). Bu durumun, primer infeksiyon aşamasında bazı peptidlerin (örneğin gag 77-85 ; pol 476-484) tanınmadığı; ancak sonraki aşamalarda ortaya çıkan ve bu peptidlere özgü CD8+ T hücreleri sayısı ile viral yük arasında ters orantılı bir ilişki olduğu ve bu hücrelerin gerçek antiviral etkiye sahip oldukları gösterilmiştir (19). Ve nihayet, CD8+ T hücrelerinin sitokin üretiminin ölçüm yöntemleri, CTL havuzundaki aktif hücrelerin saptanmasını sağlamış; böylece, yeterli CD4+ hücrenin bulunmadığı ortamlarda, gerekli oranda uyarı alamayan CD8+'lerin işlevsel açıdan yetersiz kaldıkları gösterilmiştir (20).



3- Oluşan immün yanıtın başarısızlığı ve yanıtı rağmen HIV enfeksiyonunun gelişimi:

Yukarıda belirtilen şekliyle, HIV enfeksiyonuna karşı immün sistemin her koldan harekete geçmesine rağmen, nasıl oluyor da viral replikasyon güçlenerek varlığını sürdürmekte ve sonuçta immün sistemi nasıl çökertmektedir? Yıllardan beri yapılan çalışmalar ve özellikle USAO'lar gibi bazı özel gruplar da saptanan bulgular, HIV'in bu istenmeyen başarısının nedenlerini ortaya koymuştur.

Her şeyden önce virusun kılıf bölgesinin yapısal özellikleri nötralizan antikörlerin etkisiz kalmasına yol açmakta; HIV'in süratli ve yanılığara yatkın replikasyonu çeşitli mutasyonlara ve antijenik değişimlere yol açarak hücrel ve humoral yanıtın saklanması neden olmaktadır. Öte yandan oluşacak güçlü CTL yanıtı ya da NK saldırısına karşı, MHC molekülü düzeyindeki oynamalar ile, HIV bu tip immünokompetan hücrelerden kaçmayı becerebilmektedir; örneğin özel bazı HLA allellerinin (HLA-B35 ve Cw4) süratli AIDS gelişimi ile; bazılarının ise (HLA B 57 gibi) hastalığın daha ağır ilerlemesi ile paralellik gösterdikleri saptanmıştır. Ayrıca kemokin reseptör genotipleri gibi, konağa özgü bazı faktörlerin de, hastalığın daha ağır seyretmesinde rolleri olduğu gösterilmiştir; viral faktörlerden ise, örneğin Nef bölgesindeki bazı mutasyonların viral patojeniteyi bozduğu kanıtlanmıştır (21) .

Ancak, gerçekleştirilen çalışmaların genel bir değerlendirilmesi yapıldığında HIV enfeksiyonlarında immün sistem yetersizliğinin en ağırlıklı nedeninin, sistemin yöneticisi olan CD4+ T hücrelerinin şu ya da bu şekilde devre dışı bırakılması olduğu görülmektedir. Bu durumda IL-2 , IL-12 gibi sitokin kullanımı; CTL veya CD4+ T hücre nakli; terapötik aşı kullanımı (DNA aşısı, viral vektörlerin kullanım, DC 'lerden yararlanma....) ya da gen tedavisi uygulamaları gibi bir dizi immünoterapi yöntemlerinden yararlanarak AIDS 'e karşı başarı kazanma girişimleri gittikçe ivme kazanmaktadır (14).

Bu arada, HIV/AIDS sürecinde olayların virus yararına gelişmesini açıklamak için bazı farklı kuramsal görüşler öne sürülmüştür. Bunlardan ilginç bulduğum bazılarına kısaca değinmek istiyorum:

a) Bir yaklaşıma göre, HIV enfeksiyonunun (kendi açısından) başarısında, persistan antijenemi durumu belirleyici bir faktördür. Bu görüşe göre, iyileşme ile sonlanan akut bir enfeksiyon modelinde, antijen uyarısını alan naif CD8+ T hücresi (CTL) çoğalır ve kısmen farklılaşmış efektör hücrelere dönüşür; son aşamada IL-2'in katkısı ile, bu hücreler sitotoksik etki için gerekli olan perforin ekspresyonu özelliği kazanırlar. Bu modelde, efektör hücrelerin büyük kısmı ölürken, apoptozisden kaçabilenler bellek hücrelerine dönüşürler (bellek hücreleri, kısmen farklılaşmış efektör hücrelerin IL-15 ve IL-7'ye maruz kalması sonucu da ortaya çıkabilirler). Bir süre sonra aynı antijenin uyarısını alan ve IL-2'nin etkisine giren bellek hücreleri, efektör CTL'ne dönüşürler. Persistan antijenemi söz konusu olduğunda ise, CD4+ T'lerin anerjisine bağlı olarak, ortamdaki IL-2 miktarı azalır ve CD8+ hücreler, sitotoksik etki göstermeden anerji yoluyla yok olurlar. Sonuçta, CTL'nin antiviral sitotoksikite özelliklerinin azaldığı ve HIV ile mücadelenin aksadığı görülecektir (22).

b) HIV'in, infekte olmuş ya da virusla hiç karşılaşmamış hücrelerde apoptoz programlarını indükleyerek, yıkımlarına neden olduğu ve sonuçta immün sistemi harap ettiği saptanmıştır (23); bu tip bir mekanizmanın harekete geçmesinde, etkenin genomu tarafından pro-apoptotik proteinlerinin sentezlenmesi, ya da HIV'in immün sistemin kronik aktivasyonuna neden olarak, klonal delesyona yol açması söz konusudur. Ayrıca makrofajların, infekte olmamış hücreleri apoptoze iterken, infekte hücrelerin de apoptoza uğramalarını önlediği saptanmıştır (24); sonuçta ikinci özelliği gösteren makrofajlar, virus rezervuarları rolü oynamaktadırlar .

c) HIV enfeksiyonunun gelişmesinde ve bir bireyin HIV'e karşı duyarlılık oranında insan genlerinin rolü bulunmaktadır; örneğin virusun hücreye girişinde rol oynayan proteinleri (CCR5, RANTES,vb) kodlayan genlerin dışında; IL-10, TNF gibi sitokinlerin ve nihayet HLA gibi immün yanıtta önemli rolleri bulunan yapı taşlarının üretimi ile ilgili genlerin özellikleri, HIV enfeksiyonunun seyrini etkileyebilmektedir. Örneğin Nef proteininin etkisi ile, antijen sunumu aşamasında önemli rolü olan MHC-I 'in hücre yüzeyinde yeterince eksprese edilmesi engellenmekte; sonuçta CD4 -gp 120 birleşmesi gerçekleşmemektedir; böyle bir durumda, NK hücrelerinin devreye girmesi beklenirken, virusun etki etmediği HLA-C ve HLA-E gibi antijenlerin varlıklarını sürdürmeleri, NK'ların inhibitör reseptörlerini devreye sokmakta;

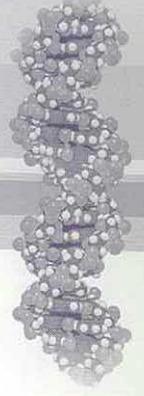


HIV 'in HLA-A ve HLA-B'yi etkilemesine rağmen, devreye girmesi gereken NK'lar etkisiz kalmaktadır. Yapılan bir çalışmada, yüzeyinde HLA-B Bw4-80x molekülü taşıyan HIV ile infekte T hücrelerinin, NK'lara bağlanmadığı; buna karşın yüzeyinde HLA-B Bw4-80I molekülü taşıyanların ise, KIR3DS1 eksprese eden NK'ların hedefi haline gelerek, kolaylıkla yıkıldıkları gösterilmiştir (25). Ayrıca, B27, ya da B57 gibi bazı HLA tipi özelliğindeki kişilerde, hastalığın daha hafif seyrettiği; buna karşın HLA tip B35 yada Cw04'de ise prognozun daha olumsuz gerçekleştiği saptanmıştır (26, 27).

Sonuçta, HIV/AIDS konusunda çok sayıda araştırma ekibinin çalışmalarını yoğun biçimde sürdürdüklerini biliyoruz. Her ne kadar bugün gelinen noktada, eradikasyon ya da korunma gibi pratik önemi olan konularda somut gelişmeler kaydedilmedi ise de; saptanan her doğru, atılan her adım, HIV/AIDS gizemini çözmemize yarayacak aşamalar olarak değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Montagnier L: A history of HIV discovery, *Science* 298: 1727, 2002.
2. Fauci AS: HIV and AIDS: 20 years of science, *Nature Med* 9: 839, 2003.
3. Peterlin BM, Trono D: Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication? *Nat Rev Immunol* 3:97, 2003.
4. Rowland-Jones S: AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us? *Nat Rev Immunol* 3:343, 2003.
5. Levy JA: The importance of the innate immune system in controlling HIV infection and disease, *Trends Immunol* 22: 312, 2001.
6. Cohen J: Mystery Anti-HIV factor unmasked, *Science* 297: 2188, 2002.
7. Siegal FP: The nature of the principal type 1 interferon producing cells in human blood, *Science* 284: 1835, 1999.
8. Nixon DF, Mc Michael AJ: Cytotoxic T-cell recognition of HIV proteins and peptides, *AIDS* 5:1049, 1991.
9. Stevenson M: TRIMing HIV-1's mainsail. *Nature Immunol* 5: 355, 2004
10. Cohen OJ, Fauci AS: Pathogenesis and medical aspects of HIV-1 infection, "Fields Virology, Eds:DM Knipe, PM Howley, Vol. 2," kitabında, s. 2043, 4. baskı, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001.
11. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells, *Nature* 417:95, 2002.
12. Barin F: Virus de l'immunodeficiency humaine et anticorps neutralisants. *Virologie* 6: 249, 2002.
13. Poignard P, Saphire EO, Parren PWI, Burton DR. Gp120: biologic aspects of structural features. *Annu Rev Immunol* 19:253, 2001.
14. Gandhi RT, Walker BD: Immunologic control of HIV-1, *Annu Rev Med* 53:149,2002.
15. Letvin NL, Walker BD: Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections, *Nat Medicine* 9: 861, 2003.
16. Ferrantelli F, Ruprecht R: Neutralizing antibodies against HIV- back in the major leagues? *Curr Opin Immunol* 14:495, 2002.
17. Altfeld M et al: Cellular immune responses and viral diversity in individuals treated during acute and early HIV-1 infection, *J Exp Med* 193: 169, 2001.
18. Dalod M et al: Weak anti-HIV CD8+ T-cell effector activity in HIV primary infection. *J Clin Invest* 104: 1431, 1991.
19. Ogg GS et al: Quantitation of HIV-1 specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* 279: 2103, 1998.
20. Walker BD, Gouider PJR : Escape from the immune system, *Nature* 407:313 , 2000.
21. Johnson WE, Desrosiers RC: Viral persistence:HIV's strategies of immune system evasion, *Annu Rev Med* 53: 499, 2002.
22. Lieberman J, Manjunath N, Shankar P: Avoiding the kiss of death: how HIV and other chronic viruses survive. *Curr Opin Immunol* 14:478, 2002.
23. Gougeon M-L: Apoptosis on HIV strategy to escape immune attack, *Nat Rev Immunol* 3:392, 2003.
24. Mählknecht U, Herbein G: Macrophages and T-cell apoptosis in HIV infection: a leading role for accessory cells?. *Trends Immunol* 22: 256, 2001.
25. Michael NL: Host genetics and HIV -removing the mask, *Nat Med* P:783, 2002.
26. Walker BD, Korber BT: Immune control of HIV: the obstacles of HLA and viral diversity . *Nat Immunol* 2: 473, 2001.
27. Trachtenberg E, Korber B, Sollars C et al : Advantage of rare HLA supertype in HIV disease progression. *Nat Med* 9: 928, 2003.



P2 TÜRKİYEDE MOLEKÜLER TESTLERİN GÜNCEL DURUMU

Gülşen HASÇELİK

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Dünyada her yıl 17 milyon kişi enfeksiyon hastalıkları nedeniyle ölmekte, bunun çoğunluğunu bakteriyel enfeksiyonlar oluşturmaktadır ve bu enfeksiyonlara bağlı sağlık harcamaları her geçen gün artmaktadır. Bu nedenle enfeksiyon hastalıklarının en kısa zamanda doğru tanı ve tedavisi önem kazanmaktadır.

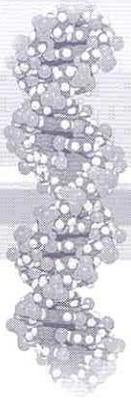
Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında mikroorganizmaların tanımlanması ve antimikrobiyal ajanlara duyarlılık testleri en az iki günü almakta, bu da klinisyenleri pahalı ve birçok hasta için toksik olan ampirik antibiyotik tedavisine zorlamaktadır. Bu amaçla son yıllarda, enfeksiyon hastalıklarının tanısı ve tedaviye yol gösterici olması açısından kısa zamanda sonuç verebilen moleküler tanı yöntemleri geliştirilmiştir. Bu testler önceki yıllarda yavaş üreyen, kültürü zor olan veya yapılamayan mikroorganizmaların tanısında kullanılırken, bugün otomatik nükleik asit ekstraksiyon sistemlerinin kullanımı ve hızlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), hedef bölgenin çoğaltılmasıyla birçok mikroorganizmanın tanısında kullanılmaya başlanmış ve bu alanda enfeksiyon hastalıklarının tanı ve tedavisine yeni bir bakış açısı kazandırmıştır.

Moleküler testler enfeksiyon hastalıklarında etken mikroorganizmanın saptanması ve tanımlanmasının yanı sıra, antimikrobiyal direnç ve virulansla ilgili genlerin ve mutasyonların belirlenmesinde de yardımcı olmaktadır. Bu testler son yıllarda özellikle bazı viral enfeksiyon hastalıklarının tanısında konvansiyonel yöntemlerin yerini almaya başlamıştır. Moleküler testler çeşitli klinik örneklerden çoğunlukla nükleik asit saptanması temeline dayalı olup, 1-2 saat içinde sonuç verebilmektedir. Gelecekte bu alanda spesifik patojenlerle enfekte kişilerde gen ekspresyon profil analizleri yapılarak enfeksiyon hastalıklarının doğası ve konağın bu ajanlara karşı yanıtı belirlenebilecektir. Moleküler alanda görülen bu ilerlemenin yanı sıra, yapılan tüm testlerin hastaların klinik özellikleri ve laboratuvar performansı ile birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca testlerin geçerliliği, klinik yararlılığı ve yarar-zarar ilişkisi gözden geçirilmelidir.

Moleküler testlerde kullanılan yöntemler ve sistemler ülkeler ve laboratuvarlar arasında değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle moleküler testlerin standardizasyonu ve kalite kontrolü önem kazanmaktadır. Gerek rutin, gerekse araştırma laboratuvarlarında standardizasyon, laboratuvar testlerinin yapılması ve değerlendirilmesinde ilk basamağı oluşturmaktadır. Standardizasyonun iyi yapılmadığı durumlarda gereksiz test tekrarı, iş gücü ve zaman kaybı, sonuçta ekonomik kayıp gözlenmektedir. Moleküler laboratuvarlarda standardizasyon, öncelikle testlerin çalışıldığı laboratuvar koşullarından başlamaktadır. Bunu laboratuvarında kullanılan alet , gereç ve reaktifler, kitler ve kullanılan yöntemler izlemektedir.

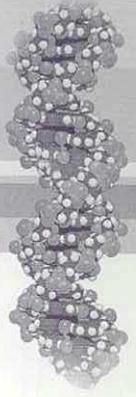
Moleküler laboratuvarlarda kalite kontrolünün iyi yapılabilmesi için öncelikle test edilecek örneğin toplanması, kalitesi ve uygun koşullarda laboratuvara gönderilmesi gerekmektedir. Örneğin laboratuvarında işlenmesi, PCR inhibitörlerinin etkileri, farklı metod performansı, yalancı pozitif ve negatif sonuçlar kalite kontrolünü etkileyen diğer faktörler olarak göze çarpmaktadır. Moleküler testler için standartlar 1995 yılında Ulusal Klinik Laboratuvar Standartları Komitesi (NCCLS) tarafından belirlenmişse de bugün için moleküler testlerde kalite kontrolü henüz emekleme döneminde değildir.

Bu panelde mikrobiyolojide kullanılan moleküler testlerin standardizasyonu ve kalite kontrolü gözden geçirilecektir. Bu amaçla yurdumuzun farklı bölgelerinde bulunan 40 farklı laboratuvara (üniversite, devlet ve özel) hangi moleküler testlerin hangi metodlarla yapıldığını ve bu konuda karşılaşılan problemlerin ne olduğunu içeren anket formu gönderilmiştir. Otuz iki laboratuvar anketimize yanıt vermiştir. Anket sonuçları panelde tartışılacaktır.



KAYNAKLAR

1. Dragon EA, Spadora JP, Madej R. Quality control of polymerase chain reaction. Persing Dh, Smith TF, Tenover FC, White JJ (eds). Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications, 1993, ASM, Washington DC. p.160-169.
2. Holland NT, Smith MT, Eskenazi B, Bastaki M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. Mutation Research 2003;543:217-234.
3. Picard FJ, Bergeron MG. Rapid molecular theranostics in infectious diseases. DDT 2002;7(21):1092-1101.
4. Wolk D, Mitchell S, Patel R. Principles of molecular microbiology testing methods. Infect Dis Clin North Am 2001;15(4):1157-1204.
5. Valentine-Thon E. Quality control in nucleic acid testing-where do we stand? J Clin Virol 2002; 25(3):13-21.



MOLEKÜLER GENETİK LABORATUVARLARININ STANDARDİZASYONU

Engin YILMAZ

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Son 15 yıl içinde büyük gelişmeler gösteren Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Otomatik DNA dizi analizi, hibridizasyon teknolojisi, DNA mikro array tekniği, ve biyoinformatik gibi, moleküler biyolojik tekniklerin uygulama alanlarının giderek artması, genetik ve enfeksiyon hastalıklarının daha iyi analiz edilmelerine ve moleküler tanı testlerinin hızla gelişmesine olanak sağlamıştır.

Önceki yıllarda kültür ve biyokimyasal testler ile analiz edilmeye çalışılan enfeksiyöz ajanlar (bakteriler, mantarlar ve virüsler) günümüzde moleküler genetik tanı yöntemleri ile daha hızlı tanımlanmaya başlanmış ve tedavinin yönlendirilmesine yeni bir bakış açısı kazandırmıştır.

Nükleik asit amplifikasyonuna dayalı test sistemlerinin klinik tanı laboratuvarlarında kullanılmaya başlanması, test kalitesi ve güvenliği için laboratuvar ve test protokollerinin yeniden organizasyonunu gündeme getirmiştir.

Moleküler genetik tanı hizmeti veren laboratuvarlar, biyolojik materyalin alındığı, hazırlandığı, pre-amplifikasyon ve post amplifikasyon laboratuvarları olmak üzere en az dört laboratuvardan oluşmalıdır. Sağlık Bakanlığının 16.06.1998 tarih ve 23368 sayılı resmi gazetede yayınladığı genetik hastalıklar tanı merkezleri yönetmeliğinde bu laboratuvarların özellikleri bildirilmiştir.

Laboratuvarların her biri ilgili cihazları ve reaktifleri içermeli, bu cihazlar ve reaktifler kontaminasyona neden olmaması için bir laboratuvardan diğerine taşınmamalıdır. Tüm reaktifler yeterli miktarlarda ayrı ayrı tüplere bölünmeli, etiketlenmeli ve uygun koşullarda saklanmalıdır. Reaktifler gerekli olduğundan daha uzun süre saklanmamalıdır. Kullanılan tüm reaktiflerin "batch" numaraları kaydedilmelidir.

Nükleik asit amplifikasyonuna dayalı testlerin duyarlılığının yüksek olması nedeni ile uygulamalar sırasında olabilecek yalancı pozitif veya negatif sonuçların anlaşılabilmesi için pozitif, negatif ve internal kontrol örnekleri kullanılmalıdır. Yalancı pozitif veya negatif sonuçlar, örnekten örneğe kontaminasyonla olabileceği gibi genellikle DNA'nın bir önceki amplifikasyonundan bir sonrakine aktarılması ile olur. Ayrıca klonlanmış DNA'lar ve hücre kültüründeki virüsler de kontaminasyon kaynağı olabilirler. Bu nedenle pre ve post amplifikasyon laboratuvarlarının kullanımı çok iyi kontrol edilmelidir.

Moleküler genetik tanı laboratuvarlarının çalışma alanları sodyum hipoklorit solüsyonları ile veya DNAzap gibi ticari olarak satılan solüsyonlar ile düzenli olarak temizlenmeli, laboratuvarların genel dezenfeksiyonları ise ultra-viyole lambalar ile yapılmalıdır.

Moleküler biyolojik tanı laboratuvarlarının ulusal veya uluslararası kalite güvencesi ve değerlendirmesi programlarına katılmaları ve sertifika edinmeleri, uyguladıkları testlerin güvenilirliğini ve kalitesini arttıracaktır. Moleküler biyolojik tanı testlerinin uygulamaları sırasında kullanılan negatif, pozitif veya internal kontroller testin doğru çalışıp çalışmadığının göstergesi olup, yapılan testlerin kalitesini gösterir (Quality Control). Laboratuvar tarafından hastaya rapor edilen sonuçların doğruluğu ve güvenilirliği, uygun testin uygun örnekte çalışması ve doğru sonuç ve yorumun doğru zamanda uygun kişiye verilmesi ise, laboratuvarın kalite güvenini (Quality Assurance) göstermektedir. Laboratuvar tarafından yapılan testlerin kalitesinin belirlenmesi ve değerlendirilmesi ise, kalite değerlendirilmesi (Quality Assessment) dir ve bu ulusal ve uluslararası programlarla sağlanabilir.

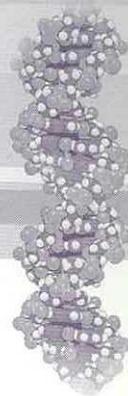


Ülkemizde moleküler genetik tanı testlerinin kalite güvencesinin değerlendirilmesi için bir organizasyon (Ulusal Moleküler Genetik Kalite Güvencesi Ağı: UMGEKA) kurulmuş olmasına rağmen moleküler mikrobiyolojik tanı testlerinin kalite güvencesini değerlendirecek ulusal bir organizasyon henüz kurulamamıştır. Bunun yanı sıra laboratuvarların bireysel olarak katılabilecekleri UK-NEQAS, HKMTA, EMQN gibi uluslararası kalite değerlendirme programları bulunmaktadır.

Sonuç olarak, laboratuvar alt yapısı, kullanılan ekipmanın kalitesi, reaktiflerin stabilitesi ve kalitesi, laboratuvar personelinin eğitimi ve deneyimi, sonuçların yorumlanması, sonuçların rapor edilmesi aşamaları laboratuvarların kalitesini etkileyen faktörlerdir.

KAYNAKLAR

1. Health protection Agency: Good laboratory practical when performing molecular amplification assays. QSOP 38 (2003)
2. Mc Creedy BJ., Callaway TH. Laboratory design and workflow in molecular microbiology-principles and applications. Washington DC. American Society for Microbiology p:149-159
3. T.C. Sağlık Bakanlığı Genetik Hastalıklar Tanı Merkezleri Yönetmeliği Resmi Gazete Tarih 10.06.1998, sayı: 23368
4. Forbes BA. Introducing a molecular test into the clinical microbiology laboratory: Development, evaluation and validation. Arch Pathol Lab Med (2003),127:1106-1111.



QUALITY CONTROL FOR MOLECULAR DIAGNOSTICS

Paul WALLACE
QCMD, Glasgow, UK

External Quality Assessment or Proficiency Testing has always formed an integral part of the laboratories quality system, complementing the internal quality control process in order to support Quality Assurance. It is the most important means of monitoring the entire laboratory in terms of practice and procedure, thus ensuring that routine quality is both sufficient and consistent.

The formation of the European Union Quality Control Concerted Action (EU-QCCA) in 1998, contributed significantly to the quality monitoring through its 14 programs to an average of 85 laboratories in over 20 countries in infectious diseases such as BBV, Enterovirus, and Chlamydia trachomatis. Quality Control for Molecular Diagnostics has continued the work of the EU-QCCA since June 2001 with the re establishment of its QC programs as well as the introduction of further clinically relevant programs for viruses such as Epstein Barr (EBV). The results from these programs have shown significant progress with regards to method specificity with reported false positives for most programs <3%. In contrast, there is still a vast range in reported sensitivity for the various methods used both within an individual QC program and across QC programs and the issues of nucleic acid extraction and the requirement for improved assay precision remain problematic. In addition, the limited availability of suitable reference materials as well as the general lack of internationally accepted standards is still the major obstacle in the integration and subsequent QC of molecular infectious disease diagnostics

The number and range of 'clinically relevant' viral targets that a diagnostic laboratory will be asked to identify and possibly quantify will undoubtedly rise. As a result the number of Nucleic Acid technologies and test protocols available will also increase. This has the potential to place an enormous burden on the diagnostic laboratory in terms of finance, technical resource, and QC requirements. To cope with this increasing demand there will be a necessity to rationalize the diagnostic process. This will undoubtedly lead to combination or multiplex tests and the creation of disease specific diagnostic tests and therefore patient group specific disease management.

In order to facilitate these advances and support the molecular technologies as they develop, it is essential that complementary QC mechanisms are in position on a unified and international basis.

The QCMD proficiency programs help to educate as well as regulate and thus bridge the gap between compliance and science. This provides an infrastructure from which expert International Scientific Advisory Groups in specific infectious disease areas can define quality issues and develop consensus best practice through the provision of proficiency testing and characterized reference materials.



P3 GRAM POZİTİF VE GRAM NEGATİF BAKTERİLERDE ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE SAPTANMASI

Deniz GÜR

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi,
Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara

İnfeksiyon etkenlerinin antimikrobik ilaçlara in-vitro duyarlılığını belirlemek için yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde alınan sonuçlar hem tedavide, hem de dirençli bakterilerin surveyansında kullanılmaktadır. Standartlara uygun olarak yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuçları çoğunlukla tedavide alınan yanıt ile paralellik göstermekte ise de direnç geninin varlığı her zaman tedavide başarısızlığa yol açmayabilir veya tam tersi olarak in vitro olarak ifade edilmeyen bir gen in vivo olarak ifade edilebilir.

Bakteriler üç farklı mekanizma ile antibiyotiklere direnç gösterebilmektedir:

1. İlacın hedefinde değişiklik oluşturulması
 - a. Reseptörün afinitesinde azalma olması
 - b. İlaçtan etkilenmeyen farklı bir enzim ya da metabolik yol kullanılması
2. Sentezlenen enzimle ilacın inaktive edilmesi
3. Hücreye giren ilaç miktarının azaltılması
 - a. Geçirgenliğin azaltılması
 - b. Atım pompaları ile ilacın dışarı atılması

Bir bakteri, bu mekanizmalardan bir kaçını aynı anda kullanarak değişik antibiyotiklere direnç kazanabilmektedir. Bu durumda direnç mekanizmasının fenotipik olarak belirlenmesi oldukça güçtür. Son yıllarda moleküler mikrobiyoloji alanında geliştirilen yeni yöntemler ile bazı antibiyotiklere karşı direnç genlerinin varlığı hızlı ve duyarlı bir biçimde belirlenebilmektedir.

β-LAKTAM ANTİBİYOTİKLER

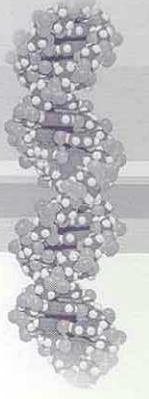
Stafilokoklarda metisilin direnci

Tüm β-laktam antibiyotikler gibi metisilin bakterinin hücre duvarındaki hedefi, hücre duvar sentezinde rol oynayan penisilin bağlayan proteinler (PBP) dir. β-laktam antibiyotikler bu enzimlerle bağlanınca, enzimin kendi substratına bağlanmasını engellemekte, böylece duvar sentezi inhibe olmakta ve bakteri lizise uğramaktadır. Duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarında PBP2 ve PBP3, peptidoglikan sentezinde rol oynayan proteinlerdir. Metisiline dirençli suşlarda (MRSA) ise kromozomdaki *mecA* geninden kodlanan PBP2' (PBP2a) proteini PBP2 ve PBP3' ün işlevini yürütebilmekte, ayrıca tüm β-laktam antibiyotiklere karşı düşük afinite göstermektedir.

Son on yıldır *S.aureus*' da metisilin direncinin saptanması için çeşitli moleküler yöntemler denenmiştir. Fenotipik yöntemler ile kıyaslandığında bazı çelişkiler bulunabilmesine karşın, *mecA* PCR günümüzde oksasiline dirençli stafilokokların saptanması için kullanılabilir en güvenilir yöntemdir ve MRSA'nın tanımlanmasında kullanılan tarama yöntemlerinin kıyaslanmasında "altın standart" olarak kullanılmaktadır. Bu, koagülaz negatif stafilokoklar için de geçerlidir.

Streptococcus pneumoniae' da penisilin direnci

Penisiline dirençli *S.pneumoniae* suşları 1969'dan itibaren tüm dünyada gözlenmeye başlanmıştır. Penisilin minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değeri 0.12-1 mg/ml olan izolatlar "orta düzeyde", 2 mg /ml veya üzerinde olanlar "yüksek düzeyde" dirençli olarak tanımlanmaktadır. Pnömonoklarda penisilin direnci, PBP'lerdeki değişimlere bağlıdır.



PBP'lerdeki değişiklik sonucunda β -laktam antibiyotiklere afinite azalmakta, böylece enzime bağlanma ve inhibisyon için daha yüksek konsantrasyonda β -laktam gerekmektedir. *S.pneumoniae*'de altı adet PBP bulunmaktadır. Bunlar yüksek moleköl ağırlıktaki PBP1a, PBP1b, PBP2a, PBP2x, PBP2b ve düşük moleköl ağırlıktaki PBP3'dür. Bunların tümünün afinitesinde azalma olabilir. Dirençli suşlarda düşük afiniteli PBP1a, PBP2b ve PBP2x bulunmaktadır. Değişmiş bu PBP'leri kodlayan genler "mozaik gen" olarak tanımlanmaktadır çünkü bu genlerde konak hücre DNA segmentlerinin arasında büyük olasılıkla dirençli başka bir tür; örneğin *S.mitis*'den alınan DNA segmentleri bulunmaktadır. *S.pneumoniae*'de penisilinin esas hedefi PBP2b, sefotaksim hedefi ise PBP2x'dir.

S.pneumoniae'da penisiline direncin belirlenmesi için farklı yaklaşımlar denenmiştir. Bir grup araştırmacı düşük afiniteli PBP2b genlerine özgül primerler ile çalışmış, diğer bir grup PBP2b, PBP2x ve PBP1a'nın duyarlı şekillerine özgül primerler ile orta dirençli izolatların %85'ini, yüksek dirençli izolatların tümünü doğru olarak tanımlamıştır. Üçüncü bir yaklaşım ise PCR sonrası uygulanan restriksiyon enzim analizidir (PCR-RFLP). Bu yöntem ile PBP2b'nin duyarlı ve dirençli genotipleri ayırdedilebilmiştir. Duyarlı izolatların tümünün RFLP paterni aynıdır. Orta ve yüksek düzeyde dirençli suşlarda çok değişik paternler gözlenmiştir. Bu PCR çalışmalarının sonuçlarına göre PBP'lerde bulunan mutasyon ve mozaik genler nedeni ile penisiline dirençli suşlarda yalancı negatif sonuçlar alınabileceği gözlenmektedir.

Gram negatif bakterilerde β -laktamazlar

Gram negatif bakterilerde β -laktam grubu antibiyotiklere karşı dirençte en önemli mekanizma, β -laktamazlar ile ilacın inaktive edilmesidir. Bu enzimlerin bakterilerde bulunup bulunmadığı çeşitli yöntemler ile gösterilebilmektedir; buna karşın değişik enzimlerin fenotipik yöntemler ile birbirinden ayrılması güçtür. On yıl öncesine kadar enzimler izoelektrik odaklama (IEF) yöntemi ile izoelektrik noktaları (pI) belirlenerek tanımlanmakta iken günümüzde bilinen bazı β -laktamazların aynı veya birbirine çok yakın izoelektrik noktalara sahip olmaları nedeniyle bu yöntem yeterli olmamaktadır. Artık IEF tek başına β -laktamazların tanımlanmaları için yeterli değildir, moleküler yöntemler ile birlikte kullanılmaktadır.

β -laktamazlara bağlı direncin tanımlanması amacıyla hibridizasyon veya PCR yöntemleri kullanılmaktadır. Bilinen β -laktamaz genlerinden restriksiyon fragmentleri aynı veya benzer genlerin belirlenmesi için prob olarak kullanılabilir. Ayrıca, problar PCR ile amplifikasyon yolu ile elde edilebilir. Bunlardan başka sentetik oligonükleotidler de prob olarak kullanılabilir. Son yıllarda geniş spektrumlu β -laktamazlar (ESBL) ve metallo- β -laktamazların tanımlanmasına yönelik çeşitli moleküler yöntemler denenmiştir, ancak bu enzimlerin tanımlanması rutin tanı için gerekli olmayıp, epidemiyolojik olarak önem taşımaktadır.

AMİNOGLİKOZİDLERE DİRENÇ

Aminoglikozidler ribozomların 30S alt birimine bağlanarak protein sentezini inhibe etmekte, ayrıca hücre duvarındaki polisakkaritleri birbirine bağlayan Mg^{+2} ve Ca^{+2} 'nin yerine geçerek, hücre duvarında delikler oluşmasına ve sonuçta hücre duvarının permeabilitesinin bozulmasına yol açmaktadır.

Gram pozitif ve gram negatif bakterilerde aminoglikozidlere karşı kazanılan dirençte en önemli olan mekanizma, bu antibiyotiklerin amino ya da hidroksil gruplarının enzimatik olarak değiştirilmesidir. Değişikliğe uğrayan aminoglikozid molekölü ribozomlara iyi bağlanamaz ve bakteri aminoglikozid varlığında üremeye devam eder. Aminoglikozid molekölünü değiştiren enzimler, aminoglikozid fosfotransferazlar (APH), aminoglikozid asetiltransferazlar (AAC) ve aminoglikozid nükleotidiltransferazlardır (ANT). Bu üç grup enzim aminoglikozid molekölündeki etki bölgesine göre alt gruplara ayrılmıştır ve bu alt grup parantez içinde bir rakamla belirtilmektedir; örneğin, AAC(2"), 2"-amino grubunun asetile edildiğini göstermektedir. Benzer etki gösteren enzimlerin ayırdedilmesi için buna Romen rakamları eklenmektedir; örneğin AAC(3) enzimi, AAC(3)-I' den AAC(3)-VI 'ya kadar numaralanmıştır. Ayrıca, aynı gruptan olup aynı direnç fenotipini gösteren, buna karşın farklı genlerden sentezlenen enzimler küçük harf ile gösterilmektedir. Örneğin, AAC(6')-I enzimleri AAC(6')-Ia, AAC(6')-Ib, AAC(6')-Ic vs. farklı genlerden kodlanıp 6' pozisyonunda değişime yol açan asetiltransferazlardır ve tobramisin, amikasin, netilmisin, kanamisin ve dibekasini değişikliğe uğratmaktadır. Bir aminoglikozid molekölü birden fazla bölgede değişikliğe uğrayabilir, örneğin, gram negatif bakterilerde gentamisini AAC(2')-I, AAC(3)-I, ve ANT(2")-I enzimleri değiştirebilmektedir. Bugüne değin 50'den fazla aminoglikozid modifiye eden enzim saptanmıştır; bunların çoğu gram negatif bakterilerde bulunmaktadır.



Aminoglikozidleri değişime uğratan enzimlerin substrat ve direnç profilleri farklıdır. Oniki farklı aminoglikozid kullanılarak bir izolattaki enzim türlerini belirlemek olasıdır. Buna karşın, tek bir suşta birden fazla enzim bulunabilir ve bunların direnç profilleri birbiri ile örtüşebilir. Nitekim, ülkemizde gram negatif bakterilerde aminoglikozidlere karşı direnç mekanizmalarını araştıran çok merkezli bir çalışmada, *Klebsiella* spp, *E.coli* ve *Enterobacter* spp. de en sık bulunan 5 enzim ve direnç oluşturdıkları aminoglikozidlerin, ANT(2'')-I (gentamisin-tobramisin), AAC(3)-II (gentamisin-tobramisin-netilmisin), AAC(6')-I (tobramisin-netilmisin-amikasin), AAC(6')-IV (gentamisin-tobramisin-netilmisin-amikasin) ve AAC(6')-III (tobramisin-netilmisin-amikasin-isepamisin) olduğu ve bu enzimlerin bir kaçının aynı bakteride bulunabildiği gözlenmiştir. Bu nedenle, aminoglikozidlere direnç oluşturan enzimlerin belirlenmesinde fenotipik direnç profilinin çıkarılması ile birlikte DNA hibridizasyon veya PCR tekniklerinin birlikte kullanılması gerekli hale gelmiştir.

Aminoglikozidleri değiştiren enzimleri kodlayan genlerin isimlendirilmesinde en sık kullanılan yöntem, enzim isimlerinin küçük harf ve italik olarak yazılmasıdır. Örneğin AAC(6')-Ia ve AAC(3)-Ia enzimlerini kodlayan genler sırasıyla *aac(6')*-Ia ve *aac(3)*-Ia olarak belirtilmektedir. Aminoglikozidlere direncin moleküler yöntemler ile araştırılması epidemiyolojik öneme sahiptir çünkü dirence yol açan enzimleri kodlayan genlerin tümünü kapsayacak hibridizasyon veya PCR teknikleri hem pahalı, hem de vakit alıcıdır.

FLOROKİNOLONLARA DİRENÇ

Kinolonlar bakterilerde DNA replikasyonu için gerekli olan iki tip topoizomerez; DNA giraz (topoizomerez II) ve topoizomerez IV ile etkileşime girerek DNA sentezini durdurmaktadır. DNA giraz, iki GyrA ve iki GyrB alt biriminden oluşan tetramerik bir enzimdir; *gyrA* ve *gyrB* genlerinden kodlanır. Topoizomerez IV de *ParC* ve *ParE* alt birimlerinden oluşmaktadır. Florokinolonların gram negatif ve gram pozitif bakterilerdeki enzim hedefleri farklıdır. Gram negatif bakterilerde birincil hedef DNA giraz iken gram pozitif bakterilerde florokinolona bağlı olarak DNA giraz veya topoizomerez IV'dür.

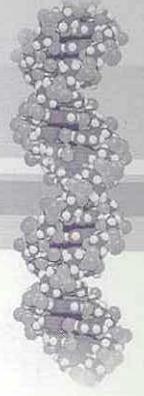
Kinolon grubu antibiyotiklere direnç hedef enzimlerdeki mutasyonlara, geçirgenlikte azalmaya veya antibiyotiğin aktif atımına bağlı olabilmektedir. Bunların tümü kromozom kontrolündedir .

Klinikte en sık gözlenen florokinolon direnci hedef enzimlerdeki değişikliklere bağlıdır. Bu değişiklikler söz konusu enzimleri kodlayan genlerde oluşan spontan nokta mutasyonları ile oluşmaktadır. *GyrA* ve *ParC*'de direnç ile ilişkili mutasyonlar daha sık olarak enzimin amino ucundaki bir bölgede oluşmaktadır. Bu bölgeye "kinolon-direncini belirleyen bölge" (QRDR) denilmektedir ve *Escherichia coli*'de 67 ila 106. amino asitleri içermektedir. Birincil hedef enzimdeki tek bir nokta mutasyonu ile oluşan direnç düzeyinin hem enzimin afinitesindeki azalmaya, hem de florokinolonun ikinci hedefine afinitesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Buna göre, her iki hedefe güçlü afinitesi olan florokinolonların dirençten daha az etkilenmesi beklenir, çünkü birincil hedefte mutasyon oluşsa bile ikincil hedefe karşı aktivitenin devam etmesi bakterinin inhibisyonu için yeterli olacaktır. Tek bir mutasyon sonucu minimum inhibisyon konsantrasyonlarında (MİK) önemli bir yükselme gözlenen florokinolonlara (örneğin *S.aureus* ve *P.aeruginosa*'da siprofloksasin) karşı dirençli mutantların kısa sürede çıkması beklenir, ki gerçekten klinikte de böyle olmuştur.

Bugüne değin incelenen gram negatif bakterilerin klinik izolatlarında yüksek düzeyde kinolon direnci hem *GyrA* hem de *ParC* enzimlerinde mutasyon olduğunu göstermektedir. Sadece *GyrB*'deki mutasyonlara bağlı direnç düşük düzeydedir. Gram negatif bakterilerde *ParC* veya *ParE* mutasyonları, *GyrA* mutasyonu var ise gözlenmektedir.

Florokinolonlara karşı dirençte geçirgenlikte azalma veya antibiyotiğin aktif atımını saptayan genetik testler bulunmamaktadır. Buna karşın hedef genlerdeki nokta mutasyonları belirleyen "diziye özgül oligonükleotid prob hibridizasyonu", "SSCP analizi", "mismatch amplification" "mutasyon analizi", "alele özgül PCR ile birlikte RFLP" gibi çeşitli moleküler yöntemlerin uygulandığı bildirilmektedir.

Araştırmaların çoğunda PCR ile çoğaltılan DNA'da dizi analizleri yapılarak hedef enzimlerdeki değişimler belirlenmiştir. Ancak primerlerin çoğunlukla türe özgül olmaları nedeniyle kinolon direnci için PCR dizi testleri DNA dizi analizi yapılabilen laboratuvarlarca uygulanabilir.



Kinolon direncinin temelini araştırmada kullanılan bir teknik, "plazmid dominans testi" dir. Bu testte kinolona dirençli olan izolata gyrA' nın (veya gyrB) duyarlı alelini taşıyan bir plazmid transforme edilir. Eğer gyrA'nın kromozomdaki kopyasında bir iki nokta mutasyonu oluşmuş ise transformasyon sonrasında izolat tamamen duyarlı hale geçer. Bu genetik dominantlık, plazmiddeki genlerden kodlanan GyrA ve GyrB alt birimlerinin mutasyona uğramış kromozomal alt birimler ile rekabete girmesi ve hücrenin kinolonlara duyarlı hale dönmesine bağlıdır.

Florokinolonlarda hedef değişiklikleri her zaman dirence yol açmayabilir, bu nedenle de QRDR'deki değişikliklerin saptanması araştırma amaçlıdır.

MAKROLİD, LİNKOZAMİD VE STREPTOGRAMİN (MLS)

ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ

Makrolid, linkozamid ve streptogramin antibiyotikler kimyasal olarak farklı, buna karşı biyolojik özellikleri ve etki mekanizmaları benzer olan, bakterilerde protein sentezini inhibe eden antibiyotiklerdir. Gram negatif bakteriler dış membranları nedeniyle bu antibiyotiklere yapısal olarak dirençlidir. Gram pozitif bakterilerde ise üç değişik mekanizma ile direnç oluşmaktadır.

MLS antibiyotiklere karşı enzimatik olarak inaktivasyon ya da atım pompaları ile direnç oluşabilse de MLS antibiyotikler için en önemli direnç mekanizması, ribozomlara bağlanmanın engellenmesidir. erm geni tarafından kodlanan metilaz enzimleri ile 23s RNA değişikliğe uğratılır ve sonuçta MLS antibiyotiklerin ribozomlara bağlanması engellenmiş olur. Çeşitli bakteri türlerinde saptanmış olan en az 30 adet erm geni vardır.

Atım mekanizmaları bir çok gram pozitif bakteride giderek artan bir sıklıkta bulunmaya başlanmış ve mef, msr ve vga olmak üzere üç gen grubu tanımlanmıştır. mef genleri çoğunlukla kromozomda bulunur ve konjugatiftir. Bugüne değin iki mef geni ayrıntılı olarak tanımlanmıştır. mefA geni Streptococcus pyogenes'de, mefE geni de S.pneumoniae'de bulunmuştur. Sadece mef geni içeren streptokoklar makrolidlere dirençli, ancak linkozamid ve streptograminlere duyarlıdır. msr geni içerenler ise MS fenotipi gösterir, makrolid ve streptogramin B'ye dirençlidir. msrA ve msrB genleri S.aureus 'da bulunmuştur. Ayrıca S.aureus 'da bulunmuş olan vga ve vgaB genleri streptogramin direncine yol açmaktadır.

Farklı erm genlerinin saptanması için çeşitli DNA fragment problemleri ve PCR kullanılmıştır. MLS direncinin tanı amaçlı kullanımı sadece mef genleri ile sınırlıdır. Makrolidlere dirençli bir izolatta sadece mef geni bulunduğu saptanırsa tedavide klindamisin kullanılabilir. Bunun dışında MLS direncinin taranması amacıyla genetik yöntemlerin kullanılması direnç mekanizmalarının ve genlerin çok çeşitli olması nedeniyle güçtür.

GLİKOPEPTİDLERE DİRENÇ

Glikopeptid antibiyotikler, peptidoglikan prekürsörlerinin terminal bölgesinde bulunan D-alanin-D-alanine bağlanmakta ve gram pozitif bakterilerde hücre duvarı yapımı sırasında çapraz bağlanma reaksiyonunu engellemektedir. Gram negatif bakteriler dış membranları nedeniyle glikopeptid antibiyotiklere doğal olarak dirençlidir. Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc ve Enterococcus gallinarum da doğal dirençli olan gram pozitif bakterilerdir. Peptidoglikanın sentezlenmesi ve çapraz bağların oluşmasında bir çok enzim rol oynadığından peptidoglikanın yan zincirlerine bağlı olarak glikopeptid direncinin çıkması beklenmeyen bir durumdur. Buna karşı 1988'den itibaren vankomisine dirençli enterokoklar bildirilmeye başlanmıştır.

Glikopeptidlere dirençli enterokoklarda 4 tip direnç bildirilmiştir. Bunlar VanA, VanB, VanC ve VanD olarak isimlendirilmiştir. VanA tipi dirençte hem vankomisin hem de teikoplanine indüklenebilen türde direnç vardır. vanA gen kümesine bağlı olarak yeni bir D-Ala-D-Ala-ligaz olan VanA üretilir, bunun sonucunda glikopeptidlere daha düşük afinite gösteren D-alanil-D-laktat peptidoglikan zincirinde yer alır. VanB tipi direnç vanB gen kümesi ile VanA tipi dirence benzer bir mekanizma ile oluşmaktadır. VanB, VanC ve VanD tipi dirençte teikoplanine direnç yoktur. VanC türü direnç E. gallinarum'da (vanC-1 geni), E. casseliflavus (vanC-2 geni), E. flavescens (vanC-3 geni) ve VanD ise E. faecium'da yapısalıdır.



Stafilokoklarda ilk kez 1996 yılında vankomisine orta derecede dirençli (MİK 8 mg/mL) bir *Staphylococcus aureus* suşu (VISA) Japonya'dan, daha sonra da farklı yerlerden bildirilmiştir. VISA izolatlarında teikoplanin MİK değeri ise 16 µg/ml olarak bulunmaktadır. Glikopeptidlere azalan duyarlılığın kesin mekanizması bilinmemekle birlikte büyük olasılıkla hücre duvarı sentezinin artışına, PBP2'nin aşırı ifadesine, PBP4'deki değişikliklere ve kapsül tip5'in üretimine bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu, vankomisinin önceden bulunan hücre duvarına bağlanmasının artmasına ve sonuçta stoplazmik membrandaki hedefe ulaşabilen vankomisinin miktarında azalmaya yol açmaktadır. Bu izolatların klinikte tedavi başarısızlıkları ile ilgili elde kesin kanıtlar olmamasına karşın uzun süre vankomisin verilmesini gerektiren, güç tedavi edilen olgularda VISA izolatlarının klinik önem taşıyacağı belirtilmektedir. Koagülaz negatif stafilokoklarda da vankomisine duyarlılığı azalmış izolatlar gözlenmektedir. *S.haemolyticus'* larda teikoplanine orta derecede duyarlı izolatlar %30 civarında gözlenmektedir, *S.epidermidis'* de bu daha nadirdir. Henüz stafilokoklarda glikopeptid direncini belirlemek amacıyla kullanılabilir moleküler yöntemler bulunmamaktadır.

Fenotipik yöntemler ile yüksek düzeyde glikopeptid direnci belirlenebilir iken düşük düzeyde direncin saptanması ve farklı Van tiplerinin ayırılması güçtür. *vanA* ve *vanB* genlerinin saptanması için PCR ve hibridizasyon teknikleri kullanılmıştır. Ayrıca *VanA* direncini kodlayan transpozon Tn1546'yı belirleyen moleküler teknikler de uygulanmıştır.

Rutin kültür yerine PCR tekniği ile doğrudan vankomisin direnç genlerinin saptanması uygun olabilir, hatta bazen PCR testleri daha doğru sonuç verebilmektedir. Rutin tanı için olmasa da vankomisine dirençli enterokokların surveyansında PCR'a dayalı yöntemler etkili ve güvenlidir.

TETRASİKİNLERE DİRENÇ

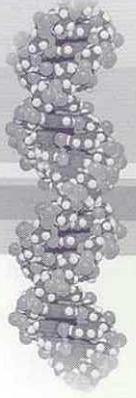
Tetrasiklin, amino açıl-tRNA'nın ribozoma bağlanmasını önleyerek tRNA ile mRNA arasındaki kodon-antikodon etkileşiminin bozulmasına ve sonuçta 30s ribozomda protein sentezinin inhibisyonuna yol açmaktadır.

Bakterilerde tetrasikline direnç (i) sitoplazmik membrandaki proteinler ile ilacın enerjiye bağlı olarak hücre dışına pompalanması (atım), (ii) ribozomal koruyucu proteinler (iii) enzimatik olarak ilacın inaktive edilmesi ile oluşabilmektedir. İlk iki mekanizma direnç oluşumunda en önemli olanlardır. Direnç çoğunlukla Tet determinantlarının alınması ile ortaya çıkmaktadır. Bugüne değin 30'un üzerinde determinant belirlenmiştir, her gün yenileri bulunmaktadır. Bunlardan bazıları atım pompasında rol alan proteinleri, bazıları ise ribozomal koruyucu proteinleri kodlamaktadır. Bu genler hem gram pozitif, hem de gram negatif bakterilerde bulunmaktadır (Tablo). Tetrasikline direnç determinantlarının çoğu plazmid veya transpozonlarda bulunmaktadır.

Tablo. Tetrasikline direnç determinantlarına örnekler

| Atım pompası | | Ribozomal koruma | |
|--------------|--------------|------------------|--------------|
| Gram negatif | Gram pozitif | Gram negatif | Gram pozitif |
| TetA-E | | Tet M | Tet M |
| TetG,H | | Tet O | Tet O |
| Tet I | Tet A (P) | Tet S | |
| Tet K | Tet K | Tet Q | Tet Q |
| Tet L | Tet L | | Tet B(P) |

Atım proteinleri tetrasikline direnç oluşturmamaktadır, minosikline oluşturmamaktadır. Koruyucu proteinler ile oluşan dirençte ise tetrasiklin, doksisisiklin ve minosikline direnç çıkmaktadır.



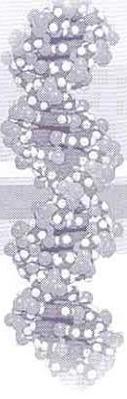
DNA-DNA hibridizasyonu farklı direnç genlerinin tanımlanması için standart yöntemdir. 1990'lara kadar tet genlerinin tanı ve epidemiyolojik amaçlı olarak araştırılmasında hibridizasyon tekniği uygulanmış ve ya tet gen fragmenti içeren bir plazmid ya da sadece fragment kullanılmıştır. Son yıllarda özgül direnç genlerinin saptanması için PCR testleri geliştirilmiştir. Bunların avantajı protein K ile eritilmiş bakterinin veya saflaştırılmış DNA'nın kalıp olarak kullanılabilmesidir. PCR ile doğrudan hasta örneğinde direnç geninin bulunup bulunmadığına da bakılabilir. Tetrasiklin direncinin genetik yöntemler ile araştırılması direncin mekanizmasının belirlenmesi için bir yol sağlayabilir. Ayrıca, değişik tet genlerinin belirlenmesi epidemiyolojik açıdan önemlidir. Bunun dışında kullanım alanı sınırlıdır.

Yukarıdaki antibiyotikler dışında kalan bazı antibiyotikler ve çoklu direnç mekanizmaları ile ilgili çeşitli moleküler araştırmalar vardır, ancak bunlar yaygın değildir. Stafilokoklarda mupirosine dirence yol açan mupA genini saptamak için hibridizasyon ve PCR teknikleri denenmiş ve kullanışlı bulunmuştur.

Bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmalarının moleküler yöntemler ile araştırılması, bu alanda önemli bir bilgi akışı sağlamıştır. Bakteri türlerindeki direnç determinantları ve bunların yayılımına ilişkin önemli bulgular sağlanmıştır. Buna karşın, moleküler yöntemler henüz rutindeki duyarlılık testlerinin yerine geçecek düzeye ulaşmamıştır. Bunun nedeni, dirence yol açan sayısız nokta mutasyonu ve gen oluşu, ayrıca amplifikasyon yöntemlerinin çok emek gerektirmesidir. Bir süre daha moleküler tekniklerin rutin testlerin yerini alamayacağı anlaşılmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Amyes SGB, Gemmell CG. Antibiotic resistance in bacteria. *J Med Microbiol* 1992; 36: 4-29.
2. Brown JC, Amyes SGB. Quinolone resistance. N Woodford ve AP Johnson (eds) *Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications* kitabında s. 617, Humana Press Inc., New Jersey (1998).
3. Courvalin P, Carlier C. Resistance towards aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics in bacteria. *J Antimicrob Agents* 1981;8 (suppl A) : 57-69 .
4. Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 836-871.
5. Hakenbeck R, Kaminski K, König A, Van der Linden M, Paik J, Reichmann P, Zahner D. Penicillin-binding proteins in β -lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial Drug Resistance* 1999; 5: 91-99.
6. Livermore DM, Williams JD. β -lactams: Mode of action and mechanisms of bacterial resistance." V Lorian (ed). *Antibiotics in laboratory medicine, 4.baskı* kitabında s.502, Williams and Wilkins, Baltimore (1996).
7. Över U, Gür D, Ünal S, Miller GH ve Aminoglikozid Direnci çalışma Grubu. Gram-negatif bakterilerde aminoglikozid antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları: Son gelişmeler ve Türkiye sonuçları. *Flora* 2000; 5: 168-178.
8. Payne DJ, Thomson CJ. Molecular approaches for the detection and identification of β -lactamases. N Woodford ve AP Johnson (eds) *Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications* kitabında s. 495, Humana Press Inc., New Jersey (1998).
9. Rice LB, Bonomo RA. Genetic and biochemical mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: LorianV (ed) *Antibiotics in Laboratory Medicine*.Baltimore :Williams & Wilkins, 1985; 453-501.
10. Roberts MC. Resistance to tetracyclines, macrolides, trimethoprim and sulfonamides. N Woodford ve AP Johnson (eds) *Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications* kitabında s. 641, Humana Press Inc., New Jersey (1998).
11. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1109-1117.
12. Shaw KJ, Sabatelli FJ, Naples L, Mann P, Hare RS, Miller GH. The application of molecular techniques for the study of aminoglycoside resistance. N Woodford ve AP Johnson (eds) *Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications* kitabında s. 555, Humana Press Inc., New Jersey (1998).
13. Stratton CW. Mechanisms of action for antimicrobial agents: General principles and mechanisms for selected classes of antibiotics. In: Lorian V ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine, 4th ed*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1996: 579- 603.
14. Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 430-450.
15. Witte W. Antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: epidemiological aspects. *J. Antimicrob Chemother* 1999; 44: 1-9.



HELICOBACTER PYLORI'DE ANTIMİKROBİYAL AJANLARA KARŞI DİRENÇ OLUŞTURAN MEKANİZMALAR VE MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİ

Yakut Akyön YILMAZ

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Helicobacter pylori dünya nüfusunun yarısının gastrik mukozasını kronik olarak enfekte eden Gram negatif mikroaerofil bir bakteridir. Bir çok enfekte kişi asemptomatik olmasına karşın, *H. pylori* gastritin, gastrik ve duodenal ülserin başlıca nedeni ve gastrik kanserin erken risk faktörüdür (1, 2).

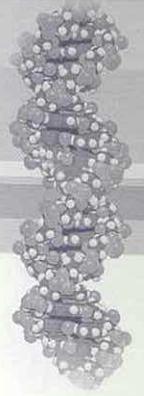
H. pylori enfeksiyonu çoğunlukla çocukluk çağında edinilmekte ve konağın savunma mekanizmalarına ve enflamatuar yanıtına rağmen antimikrobiyal ajanlarla tedavi edilmediği sürece yıllarca varlığını devam ettirmektedir. Maastrich 2-2000 uzlaşısına göre *H. pylori* saptanan, duodenum ve mide ülserli, MALT lenfomalı, atrofik gastritli kişiler, yeni rezeke edilmiş mide kanserli hastalar, mide kanserli hastanın birinci derece akrabası olan kişiler ve isteyen hastalar ilk olarak tedavi edilecek gruptur. İkinci grup tedavi edilmesi gereken kişiler ise fonksiyonel dispepsili hastalar, uzun süreli yoğun asit baskılaması uygulanacak hastalar (gastroözefajiyal reflü hastalığı), non-steroid antienflamatuar ilaç kullanan hastalardır (3).

H. pylori enfeksiyonunun tedavisinde henüz ideal bir kemoterapi rejimi bulunmamaktadır. Metronidazol, klaritromisin, amoksisilin ve tetrasiklin enfeksiyonun tedavisinde seçilen antimikrobiyal ajanlardır. Tedavi protokollerinde kombine antimikrobiyallerin yanısıra H₂-reseptör antagonistleri, proton pompa inhibitörleri ya da bizmut tuzları yer almaktadır. Standart tedavi rejimlerinin uygulandığı hastaların %10-20'sinde *H. pylori* eradikasyon girişimleri başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Tedavideki bu başarısızlığa hasta uyumu, ilaçların yan etkilerinden dolayı tedavinin yarım kalması ve seçilen antimikrobiyallere karşı gelişen veya varolan direnç neden olmaktadır (4).

Maastrich 2-2000 uzlaşısında önerilen ilk seçenek klaritromisin, amoksisilin ve proton pompa inhibitörünün kombine olarak uygulanmasıdır. Tedavi başarısızlığında, ikinci seçenek metronidazol, tetrasiklin, bizmut tuzu ve proton pompa inhibitörünün dördümlü tedavi şeklinde uygulanması yolundadır. Bu uygulama da başarısızlıkla sonuçlanırsa tedavi hasta ve doktorun ortak seçimine bırakılmaktadır (3). Kinolon grubu ve furozolidonlar, başvuru olan diğer antibiyotikler içinde yer almaktadır.

H. pylori'ye karşı varolan ya da gelişen direnci tespit etmek için antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yapılması son yıllarda artan bir ihtiyaç haline gelmiştir. *H. pylori*'de "Food and Drug Administration" (FDA) onayı almış tek antibakteriyel duyarlılık testi agar dilüsyon testidir. Kültüre bağlı testler gerek bakterinin üretilmesindeki zorluklardan gerek uygulamadaki zorluklardan ve sonucun 10-14 gün gibi uzun bir sürede alınmasından dolayı araştırmacılar moleküler yöntemlerle direnç tespitinin geliştirilmesi için çalışmalara yönelmiştir.

Nitroimidazol grubundan olan metronidazolün etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bakteri sitoplazmasına inaktif ön ilaç olarak girer, *H. pylori* oksijene duyarsız nitroredüktaz enzimleri ile metronidazolü aktive eder. Nitroredüktaz enzimlerinin kodlanmasından *rdxA* ve *frxA* genleri sorumludur. Metronidazol DNA, RNA, proteinler, yağ asitleri gibi yaşamsal moleküller üzerine etkilidir. Nitroredüktaz ve/veya flavin oksidoredüktaz enzimlerinin inaktivasyonu, *H. pylori*'de metronidazol direnci gelişmektedir. *rdxA* geninde "frame shift" (çerçeve kaydırma) ve anlamsız mutasyonlar metronidazol MİK değerlerini çok yükseltir. *frxA* genindeki mutasyonlar daha düşük düzeyde dirençten sorumludurlar (5, 6). Metronidazol direncini moleküler olarak saptamak için polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) bağlı moleküler testlerden yararlanılmaktadır. DNA dizi analizi uygulanabilecek bir diğer yöntemdir. Moleküler yöntemlerle metronidazol direncinin saptanması rutin uygulamada önerilmemektedir (Douglas E Berg ile kişisel görüşme).



Makrolid grubundan olan klaritromisin, özellikle son yıllarda kullanım kolaylığından dolayı *H. pylori* eradikasyon tedavisinde tercih edilen antibakteriyel ajanlardan biridir. Klaritromisin, ribozomların 50S alt ünitesine bağlanarak protein sentezini inhibe ederek antimikrobiyal etkisini gösterir. Klaritromisine karşı oluşan direnç nokta mutasyon şeklindedir. 23S rRNA'da 2143-2144 bazlarında oluşan nokta mutasyonlardan, A \rightarrow G sıklıkla, A \rightarrow C nadiren oluşur ve *H. pylori*'de klaritromisin direncinden sorumludur. PCR'a dayalı çeşitli moleküler teknikler, klaritromisin direncini saptamada kullanılmaktadır (7). Klaritromisin direncinin, indüklenebilir bir direnç olduğuna dair yayınlar vardır (8). Ancak yapılan bir çalışmada bu direncin indüklenebilir olmadığı gösterilmiştir (9).

Amoksisilin bakteri duvar sentezini inhibe ederek etkisini gösterir. Bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere karşı gelişen direnç beta-laktamaz üretimlerine, penisilin bağlayan proteinlerdeki (PBP) yapısal değişikliklere veya hücre duvar sentezindeki diğer proteinlerin değişimine bağlı olarak gelişir (10, 11, 12). *H. pylori*'de 7 PBP tanımlanmıştır (13, 14, 15) Mittl ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada da *H. pylori*'ye özgü beta-laktamaz saptanmıştır (16) Ancak bu beta-laktamazların amoksisiline karşı *H. pylori*'de gelişen dirençten sorumlu olduğu, diğer bakterilerdekinin aksine, gösterilememiştir (17). Dirençli suşlarda penisilin bağlayan protein D sentezi tespit edilememiştir (18).

Yapılan son çalışmalar, PBP1A'da serinin \rightarrow arjinine değişiminin yüksek düzeyde amoksisilin direncine yol açtığını göstermiştir (19). Amoksisilin direnci ile ilgili tüm çalışmalar sadece araştırmaya yönelik PCR'a dayalı moleküler yöntemlerdir, henüz rutin olarak yapılması için erkendir.

Tetrasiklinler ribozomların 30S alt ünitesine bağlanarak protein sentezini inhibe ederek antibakteriyel etkisini gösterir. Tetrasikline karşı *H. pylori*'de gelişen dirençte 16S rRNA'daki mutasyonların önemi olduğu bildirilmektedir (20). *H. pylori* 181 suşunda bu mutasyon 16S rRNA'daki 3 baz çifti yer değişimine bağlı olduğu AGA926-928 \neq TTC ve bunun PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) ile saptanabildiği bildirilmektedir (21)

Ülkemizde metronidazol direnci % 50 civarındadır. Klaritromisin direnci ise % 20-30 civarındadır. Henüz tetrasiklin ve amoksisilin direnci bildirilmemiştir (22). Ülkemizde çok yüksek oranda bulunan bu enfeksiyon hastalığının, bakterinin virulans faktörlerine ve hastanın genetik yatkınlığına bağlı olarak kansere neden olabileceği unutulmamalıdır. Bulaş yolu kesin olarak bilinmediğinden, bulaş zincirini kırarak hastalığı önlemek mümkün değildir. Çocukluk çağında edinildiği için, erişkin hastaların tedavisi, ülkemizde çok kullanılan klaritromisin ve metronidazol ile gelişen/seçilen direnç nedeniyle %100 başarılı olamamaktadır. Tedavinin duyarlılık testi yapılmasından sonra uygulanması idealdir ama kültüre bağlı duyarlılık testleri uygulanması hem alt yapı hem uzmanlık hem de süre gerektirdiği için pratik değildir. Şu anda rutin olarak uygulanabilen, klaritromisin direncinin PCR-bağlı yöntemlerle moleküler olarak tespitidir. Yapılan çalışmalar tetrasiklin direncinin de moleküler yöntemlerle rutin olarak tespit edilebileceği umudunu doğurmaktadır. Henüz metronidazol ve amoksisilin için rutin moleküler testlerin yakın gelecekte kullanıma girmesi mümkün görünmemektedir.

KAYNAKLAR

1. Blaser MJ. *Helicobacter pylori*: microbiology of a "slow" bacterial infection. Trends Microbiol 1993; 1: 255-260.
2. Blaser MJ, Parsonnet J. Parasitism by the "slow" bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. J Clin Invest 1994; 94: 4-8.
3. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection - the Maastricht 2-2000 Consensus report. Alimet Pharmacol Ther 2002; 16: 167 - 80.
4. Goh KL. Update on the management of *Helicobacter pylori* infection, including drug-resistant organisms. J Gastroenterol Hepatol 2002; 17: 482-487.
5. Sisson G, Jeong JY, Goodwin A, et al. Metronidazole activation is mutagenic and causes DNA fragmentation in *Helicobacter pylori* and in *Escherichia coli* containing a cloned *H. pylori* rdxA+ (nitroreductase) gene. J Bacteriol 2000; 182 (18): 5091-5096.
6. Mukhopadhyay AK, Jeong JY, Dailidienė D, Hoffman PS, Berg DE. The rdxA ferredoxin gene can down-regulate frxA nitroreductase gene expression and is essential in many strains of *Helicobacter pylori*. J Bacteriol 2003;185(9): 2927-2935.
7. Owen RJ. Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. GUT 2002; 50: 285 - 289.



8. Megraud F. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics and its impact on treatment options. *Drug Res Updates*. 2001; 4: 178 - 86.
9. Fujimura S, Kato S, Iinuma K, Watanabe A. In vitro exposure to macrolide antibiotics in *Helicobacter pylori* strains isolated from children. *J Infect Chemother* 2004; 10: 128 - 130.
10. Livermore DM. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995; 8: 557 - 584.
11. Spratt BG, Cromie KD. Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria. *Rev Infect Dis*. 1988; 10: 699 - 711.
12. Maki H, Murakami K. Formation of potent hybrid promoters of the mutant *lhm* gene by IS256 transposition in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 1997; 179: 6944 - 6948.
13. DeLoney CR, Schiller NL. Competition of various beta-lactam antibiotics for the major penicillin-binding proteins of *Helicobacter pylori*: antibacterial activity and effects on bacterial morphology. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 4: 2702 - 2709.
14. Krishnamurthy P, Parlow MH, Schneider J, et al. Identification of a novel penicillin-binding protein from *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*. 1999; 181: 5107 - 5110.
15. Harris AG, Hazell SL, Netting AG. Use of digoxigenin-labelled ampicillin in the identification of penicillin-binding proteins in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother*. 2000; 45: 591 - 598.
16. Mittl PR, Luthy L, Hunziker P, Grutter MG. The cystein-rich protein A from *Helicobacter pylori* is a beta-lactamase. *J Biol Chem* 2000; 275: 17693 - 17699.
17. Dore MP, Osato MS, Realdi G, Mura I, Graham DY, Sepulveda AR. Amoxicillin tolerance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother*. 1999; 43: 47 - 54.
18. Dore MP, Graham DY, Sepulveda AR, Realdi G, Osato MS. Sensitivity of amoxicillin-resistant *Helicobacter pylori* to other penicillins. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(7): 1803-1804.
19. Gerrits MM, Schuijffel D, van Zwet AA, Kuipers EJ, Vanderbroucke-Grauls CMJE, Kusters JG. Alterations in penicillin-binding protein 1A confer resistance to beta-lactam antibiotics in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46: 2229 - 2233.
20. Trieber CA, Taylor DE. Mutations in the 16S rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline. *J Bacteriol* 2002; 184(8): 2131-2140.
21. Ribeiro ML, Gerrits MM, Benvenuto YHB, et al. Detection of high-level tetracycline resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori* using PCR-RFLP. *FEMS Immun Med Microbiol*. 2004; 40: 57 -61.



MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS'TE ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DİRENÇ OLUŞTURAN MEKANİZMALAR VE MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİ

Ahmet SANIÇ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun

Çok ilaca dirençli tüberküloz sadece ülkemiz için değil tüm dünyada tüberküloz kontrolünü de zorlaştıran önemli bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünyada en az 50 milyon insan çok ilaca dirençli tüberküloz basili ile enfektedir. Antitüberküloz ilaçların düzenli kullanılmaması, HIV pandemisi ve kötü tüberküloz kontrol programları bu sorunu hazırlamıştır. Bu durum tüberküloz tanı ve direnç tayininde daha hızlı ve güvenilir sonuçlar veren yeni yöntemlere gereksinimi artırmıştır.

Son on yıl içinde Mycobacterium tuberculosis Complex'in (MTBC) antitüberküloz ilaçlara geliştirdikleri dirençin moleküler temeli daha iyi anlaşılmağa başlanmış olup, bunlardan tüberküloz tedavisinde kullanılan önemli iki ilaç olan izoniazid (INH) ve rifampisin (RIF) ilgi odağı olmuştur. INH, pirazinamid (PZA) ve etambutol (EMB) sadece MTBC'e ve bazı mikobakterilere etkili olmakla birlikte, streptomisin (STR), RIF ve florokinolon gurubu antibiyotikler geniş spektrumludur ve diğer bakterilere benzer direnç mekanizmalarına sahiptir.

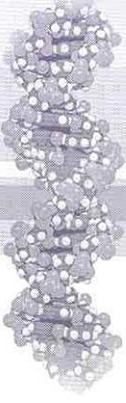
MTBC'de plazmidlere bağlı antitüberküloz ilaç direnci tanımlanmamış olup, bu konuda bakteriler arası genetik bilgi aktarımı söz konusu değildir. Direnç spontan kromozomal mutasyonlara bağlı olarak gelişmektedir. Yetersiz veya düzensiz antitüberküloz ilaç kullanımı, ilaca duyarlı bakterilerin ölmesine ve canlı kalan mutasyona uğramış dirençli bakterilerin seçilip, çoğalmasından kaynaklanmaktadır. Spontan direnç gelişim sıklığı INH ve ETM için 10-6, RIF için 10-8, ve STR için 10-5 olarak belirlenmiştir. Genetik düzeyde direnç kaynağının saptanması amacı ile yapılan çalışma sonuçları tüberkülozun tedavisinde yeni ilaçların ve stratejilerin gelişmesine yardımcı olmaktadır.

IZONİAZİD

Sadece MTBC ve bazı mikobakteriler üzerine etki etmesi yönü ile dar spektrumlu antitüberküloz ilaçtır. Deneysel çalışmalarda kitlesine göre STR'den 80 kat daha güçlü olduğu bulunmuştur. Piridin halkası ve hidrazid gurubu içeren basit bir yapıya sahiptir. Ancak MTBC'e göstermiş olduğu etki karmaşıktır. Önce, katalaz peroksidazı, pigment prekürsörleri, nikotinamid adenin dinükleotid ve peroksidazları içeren mekanizmalarla ilaç tüberküloz basili içine alınır. Peroksidazın etkisi ile izoniazid hidrazin ve izonikotinic aside dönüşür. İzonikotinic asid nikotinic asidin anti-metaboliti olarak etki yapar ve bu reaksiyondaki koenzim A sentezini bozar. Hidrojen peroksid yıkılamaz ve hücrede toksik özellikteki bu maddenin yüksek düzeyde birikimine bağlı olarak hücre ölür. Ayrıca başka bir mekanizma ile mikolik asid sentezinin inhibisyonuna neden olur.

INH'a karşı en önemli direnç katalaz peroksidaz eksikliğine bağlı gözlenmektedir. Katalaz peroksidaz enzimleri gerek INH'ın basil içine alınmasından, gerek ise aktif metabolitine dönüşümünden sorumlu olduğu için KatG geninde oluşan bazı mutasyonlar katalaz ve peroksidaz aktivitelerinin kaybına neden olur. Ayrıca inhA, kasA, mabA ve ahpC gibi gen bölgesi mutasyonlarında da göreceli olarak INH'a karşı direnç gelişiminde rol oynamaktadır.

KatG geninin değişik bölgelerinde gelişen mutasyon değişik derecelerde enzim eksikliğine, dolayısı ile değişik oranlarda INH direnci gelişmesine neden olmaktadır. Yüksek düzey INH direnci (Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu: Mik >50mg/ml) olan MTBC izolatlarında katalaz-peroksidaz aktivitesinde rol oynayan katG geninde missense mutasyonlar, küçük delesyonlar ve insersiyonlar saptanmaktadır. İzoniazide dirençli kökenlerde katG geninde en sık 315. kodonda Ser315Thr mutasyonu gözlenmektedir. Nadir görülen ancak dirence neden olduğu düşünülen diğer mutasyonlar Asp63Glu, His108Gln, Thr262Arg, Ala350Ser ve Gly628Ser'dir. Daha önceleri direnç nedeni olduğu düşünülen Arg463Leu mutasyonunun fonksiyonunun olmadığı anlaşılmıştır. Bir çok katalaz negatif izolatta ahpC bölgesinin promoter bölgesinde mutasyon saptanmaktadır. ahpC genindeki mutasyonların INH tedavisi sırasında seçilen ve katalaz-peroksidaz aktivitesi azalmış suşlarda daha sonra kompensatuvar rol oynadığı ortaya çıktığı anlaşılmıştır.



Enoil redüktaz mikolik asit sentezinde rol oynayan bir enzimdir. MTBC'de aktive olan INH, inhA geni tarafından kodlanan enoil redüktaz enzimine bağlanarak redüktaz aktivitesi önler ve mikolik asit yapımını önler. Bitişik open reading framerlerden oluşan iki genlik mabA-inhA operonun kodladığı ürünler hem INH hem de etionamid direncine yol açmaktadır. MabA proteininin 3-ketoaçil-ACP redüktaz, InhA proteininin enoil-ACP redüktaz enzimlerini kodladığı düşünülmektedir. InhA proteininin NADH bağlayan bölgesinde oluşan amino asit değişiklikleri mikolik asit biyosentezinin inhibisyonunu önleyerek INH direncine yol açmaktadır. INH'a dirençli kökenlerde mabA geninde herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. İzoniazide dirençli izolatların %10-15'inde inhA ve katG geninde mutasyon saptanmamaktadır.

Mikolik asit sentezinde rol oynayan diğer bir enzim b-ketoaçil ACP sentetaz olup, bu enzimi kodlayan kasA geni INH için hedef olduğu yeni anlaşılmiş bir gen bölgesidir. İzoniazide dirençli kökenlerin yanısıra INH'a duyarlı kökenlerde de kasA mutasyonları saptanmaktadır. İzoniazide dirençli kökenlerde kasA mutasyonunun yanında çoğu kez katG ve inhA mutasyonları da bulunmaktadır.

Sonuç olarak çok sayıda farklı gen INH direnci ile ilişkilidir. Bütün bu bilinenlere karşın bir kısım INH'a dirençli kökende direncin mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

RIFAMPİSİN

Streptomyces mediterranei'den elde edilen Rifamisin B'nin semisentetik bir derivativesidir. Bakterinin DNA'ya bağımlı RNA polimerazın potent inhibitörüdür. Rifampisin RNA polimerazı rpoB geni tarafından kodlanan b alt ünitesine bağlanarak inhibe eder. Tüberküloz basili dışında *M. leprae*, nonspesifik bakterilere, klamidya ve pox virüslerine etkilidir. MTBC'de sıklıkla RIF direnci ile birlikte isoniazid direnci de gözlenir.

RIF'e dirençli MTBC kökenlerinin %95'inden fazlasında RNA polimeraz enziminin b-alt ünitesini kodlayan rpoB genin 507-533. kodonları arasındaki 81 baz çifti uzunluğundaki RIF resistance determining region (RRDR) veya hot spot adı verilen bölgede missense mutasyonların, küçük delesyon veya insersiyonların olduğu gösterilmiştir. Buna karşın RIF'e dirençli MTBC kökenlerinin yaklaşık %4-5'inde RRDR bölgesinde genetik değişiklik saptanmamıştır. Bu kökenlerin bir bölümünde rpoB genin RRDR bölgesinin dışında kalan 146, 490, 505, 535, 541, 553 ve 572. kodonlarda mutasyonların olduğu gösterilirken çok küçük bir bölümünde ise direncin mekanizması açıklanamamaktadır.

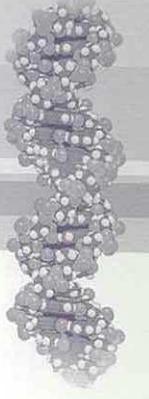
Yapılan çok sayıda çalışmada RIF'e dirençli kökenlerin yaklaşık %34-57'sinde rpoB geninin 531. kodonunda Ser531Leu mutasyonu saptanmıştır. Bunu 526. kodondaki mutasyonlar izlemektedir. Bazı istisnalar olmasına karşın genellikle belli kodonlardaki amino asit değişiklikleri ile RIF için minimal inhibisyon konsantrasyonu değerleri arasında kuvvetli bir ilişki olduğu bilinmektedir. Kodon 531, 526 ve 513'deki mutasyonlar yüksek düzey RIF direncine (MİK \geq 64mg/ml) neden olurken, 514 veya 533. kodonlarda görülen mutasyonlar genellikle düşük düzey RIF direncine yol açmaktadır.

Rifampine dirençli kökenlerin tümünde rifapentine de çapraz direnç görülmekte ve her iki antibiyotik için de aynı MİK değerleri saptanmaktadır. rpoB geninde Leu511Pro, Asp516Tyr, Asp516Val, Ser522Leu ve Leu533Pro mutasyonu olan RIF'e dirençli *M. tuberculosis* kökenlerinin rifabutine duyarlı (MİK \leq 0.5mg/ml) oldukları saptanmıştır.

PIRAZİNAMİD

Pirazinamid nikotinamidle yapısal benzerlik gösteren sentetik bir antitüberküloz ilaçtır. Mikobakterilerin pirazinamide duyarlılığı spesifik amidazin varlığına bağlıdır. Çünkü, pirazinamid hücre içi bir nikotinamidaz yardımı ile pirazinoik aside dönüşerek etkin hale dönüşür. Makrofaj fagolizozomlarında pH 5.5'de aktif hale geçer. PZA'ya karşı direnç kolay gelişir, ancak diğer ilaçlarla çapraz direnç gelişimi söz konusu değildir. Direnç gelişiminde nikotinamidaz aktivitesindeki azalma sorumlu tutulmaktadır.

Pirazinamide dirençli kökenlerin %72-94'ünde pirazinamidaz enzimini kodlayan pncA geninde çeşitli tipte mutasyonların olduğu bilinmektedir. Mutasyonlarının çok fazla değişkenlik göstermesi ve gen boyunca dağılmış olması pncA dışındaki direnç genlerinde görülmeyen bir durumdur. Buna karşın pncA geninin üç bölgesinde mutasyonlar (3 - 17, 61 - 85 ve 132 - 142. kodonlar arasında) belli bir kümeleşme göstermektedir. Bu bölgede missense mutasyonların yanısıra delesyon, insersiyon ve terminasyon mutasyonlarının da olabileceği bilinmektedir.



Mycobacterium tuberculosis'de kazanılmış PZA direncinde çok sayıda farklı mutasyon saptanmasına karşın PZA'ya doğal olarak dirençli olan *Mycobacterium bovis* ve *M. bovis* BCG kökenlerinde *pncA* geninin 169. kodonunda *M. tuberculosis* kökenlerindeki histidin yerine aspartik asit bulunmaktadır.

ETHAMBUTOL

Kimyasal yapısı dietilendiamin hidroklorür'ün dekstro şeklidir. Etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte EMB'nin bir arabinoz analogu olduğu düşünülmektedir. EMB arabinozil transferazın özgül hedefidir. İlaç arabinozun arabinogalaktan ve lipoarbinomannana polimerize olmasına aracılık eden arabinozil transferaz enzimini inhibe ederek arabinogalaktan ve lipoarabinomannanın hücre duvarına taşınmasını engellemektedir.

Arabinozil transferaz enzimini kodlayan üç gen *embC*, *embA* ve *embB* genleri 10 kbp'lik bir operon (*embCAB*) oluşturacak şekilde organize olmuştur. *embCAB*'in sekonder yapısal analizi ile bu proteinin 12 adet transmembran domaini içeren bir integral transmembran proteini olduğu gösterilmiştir. *embB* proteininin sitoplazmik lupunda EMB-resistance determining region (ERDR)'nin yer aldığı ve bu bölgenin farklı mikobakteri türlerinde bulunan ve iyi korunan bir bölge olduğu öne sürülmektedir. Muhtemelen EMB bir arabinoz analogu *embB* ise bir arabinozil transferazdır. Etambutole dirençli *M. tuberculosis* kökenlerinin önemli bir bölümünün *embB* proteininde duyarlı kökenlerde olmayan amino asit değişiklikleri bulunmaktadır. Etambutole dirençli kökenlerde *embB* geninde en sık rastlanan mutasyonlar 306. kodondaki missense mutasyonlardır. EMB direncinin %47-65'inden *embB* genindeki mutasyonlar sorumludur. Yine Phe285Leu, Phe330Val ve Thr630Ile diğer sık görülen mutasyonlardır. Met306Leu, Met306Val, Phe330Val ve Thr63Ile mutasyonlarında EMB için MİK değerleri (MİK \geq 40mg/ml) genellikle daha yüksektir.

STREPTOMİSİN

Aminoglikozid grubundan bir antitüberküloz ilaç olup, ribozomların ribozomal S12 proteini ve 16SrRNA alt grubuna etkileyerek ribozom fonksiyonlarını ve dolayısı ile protein sentezini bozar. Streptomisin etkisini ribozomal proteinlere bağlanıp translasyonu engelleyerek gösterdiği düşünülmektedir. *M. tuberculosis* te streptomisine direncin %80 ninde iki tür mutasyon saptanmıştır.

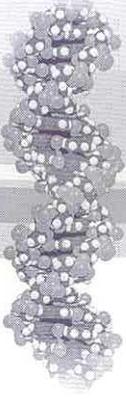
1. Ribozomal S12 proteini kodlayan *rpsL* geninde nokta mutasyonu olmakta bu da tek amino asit değişimine neden olmaktadır. Aminoasit değişimi 88. kodonda lizin arjinine, 43. kodonda ise Lys43Arg veya Lys43Treo değişimi olarak gerçekleşmektedir.

2. Diğer mutasyon ise 16S RNA'yı kodlayan *rrs* geninde olmaktadır. Burada 530. ve 904. nükleotidlerinin çevresindeki bölgesinde mutasyonlar olmaktadır.

STR'ye dirençli organizmaların %65-75'inde *spsL* veya *rrs* geninde mutasyon saptanabilmektedir. *RpsL* proteinindeki amino asit değişiklikleri yüksek düzey (MİK > 500 mg/ml) STR direncine neden olurken *rrs* genindeki mutasyonlar orta düzey (MİK < 250 mg/ml) STR direncine yol açmaktadır. Düşük düzey STR direnci (MİK < 50 mg/ml) olan kökenlerde ise *rpsL* ve *rrs* genlerinde mutasyon saptanamamaktadır. Burada muhtemel mekanizma ilacın alınmasında bir engel oluşmasıdır. Bu da hücre duvar geçirgenliğindeki değişikliğe bağlıdır. Sonuçta düşük veya orta derecede direnç oluşur. Diğer aminoglikozidlerle (kanamisin, amikasin) veya kapreomisin gibi siklik peptik protein ile çapraz direnç gözlenmemiştir. Buna karşın amikasin ile kanamisin arasında çapraz direnç bildirilmiştir.

FLOROKİNOLONLAR

Florokinolonların hedefi DNA'nın negatif süpersarmal oluşturmasını katalizleyen ve bir ATP-bağımlı tip II DNA topoizomeras olan DNA girazdır. Bu enzimin inhibisyonu ile DNA'nın süpersarmal yapısı bozulur ve bakteri hayatını devam ettiremez. Bu durumdan insan DNA etkilenmez. Siprofloksasin, ofloksasin, levofloksasin ve sparfloksasin'in 0.1-4 mgr/ml'lik konsantrasyonları MTBC'ye etkili olup, birinci seçenek antitüberküloz ilaçlara dirençli vakalarda alternatif olarak kullanılmaktadır. Diğer bakteriler üzerine de etkilidir.

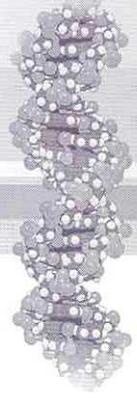


DNA giraz enzimi 2A ve 2B alt ünitelerinden oluşmuş bir heterotetramerdir. Bunlar gyrA ve gyrB genleri tarafından kodlanır. Dirençli suşlarda gyrA ve gyrB genlerinde mutasyonlar saptanmıştır. Yüksek düzeyde siprofloksasin direnci gyrA geninin 90.kodonu civarındaki mutasyonlarla ilişkili bulunmuştur. Yüksek düzeyde florokinolon direnci saptanan kökenlerde bu bölgedeki 40 amino asitlik kısa bir bölümündeki quinolone resistance determining region (QRDR) olarak adlandırılan bölgeyi kodlayan gen bölgesinde mutasyonlar bulunmaktadır MTBC kökenlerinde kazanılmış florokinolon direncinin %75-94'ünden QRDR bölgesindeki gyrA mutasyonlarının sorumlu olduğu gösterilmiştir. Kinolon bağlanma bölgesindeki spesifik mutasyonların akümüasyonu MIC değerlerindedeki kümülatif etki yapmaktadır, dolayısıyla tedavi altındaki hastalarda direnç gelişme tehlikesi bulunmaktadır. İlaça geçirgenliğin azalması ve aktif ilaç pompalanması florokinolon direncine yol açabilen diğer direnç mekanizmalarıdır. MTBC'de ilaç direncine yol açan mutasyonlar ve ilaçların etki mekanizmaları Tablo1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Mycobacterium tuberculosis'de ilaç direncinin mekanizmaları

| İlaç | Etki mekanizması | Dirence yol açan genler | Görevi | Dirençli MTBC'de görülen mutasyon sıklığı (%) |
|---------------|--|------------------------------|---|---|
| İzoniazid | Mikolik asit biyosentez inhibisyonu ve DNA, lipitler, karbonhidratlar'daki diğer potansiyel çoklu etkiler ve NAD metabolizması | katG inhA kasA ahpC | İlacın aktivasyonu İlaç hedefi İlaç hedefi Direnç göstergesi | 42-58 21-34 Saptanamadı 10-15 |
| Rifamisin | Transkripsiyon inhibisyonu | rpoB | İlaç hedefi | 96-100 |
| Pirazinamid | Sitoplazma asitleşmesi Enerjisi tükenmiş membran? Yağ asit sentezi inhibisyonu? | pncA fasI? | İlacın aktivasyonu İlaç hedefi | 72-97 NTM |
| Ethambutol | Arabinogalakton sentez inhibisyonu | embCAB | İlaç hedefi | 47-65 |
| Streptomisin | Protein sentez inhibisyonu | rpsL rrs(16S RNA) | İlaç hedefi İlaç hedefi | 52-59 8-21 |
| Fluorokinolon | DNA giraz inhibisyonu | gyrA gyrB lfrA | İlaç hedefi İlaç bağlanmasına katılır? Taşıyıcı | 75-94 Saptanamadı NTM |
| Etionamid | Mikolik asit biyosentez inhibisyonu | inhA | İlaç hedef | Bulunmadı |

NTM; nontuberculous mycobacteria.



MTBC'DE MUTASYON SAPTANMASINDA KULLANILAN MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Kültürde üretim temeline dayalı antitüberküloz duyarlılık testleri yıllardan beri mikobakteriyoloji laboratuvarlarında uygulanmaktadır. Katı besiyerlerinde kültür ve duyarlılık sonucun geç alınması nedeni ile hızlı kültür sistemleri kullanıma girmiştir. E test ile yapılan çalışmalar henüz NCCLS tarafından onay almamıştır. Sıvı besiyeri içeren hızlı kültür metodları kullanılsa dahi, bakterinin üreme zamanı da dikkate alınırsa kültür temelli direnç saptama yöntemlerinin sonuçlanması 15-30 gün sürmektedir. MTBC'de ilaç direncinin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasından sonra ilaç direnci saptamaya yönelik moleküler uygulamalar geliştirilmiştir. Antitüberküloz ilaçların hedefi olan proteinleri kodlayan genlerin PCR ile in vitro şartlarda çoğaltılması bizlere mutasyonları saptama olanağı vermiştir. Bu şekilde birkaç gün içerisinde MTBC'nin antitüberküloz ilaçlara dirençli olup, olmadığı anlaşılabilir. Ayrıca bu yöntem ile direkt olarak balgamdan MTBC'nin tüberküloz direncine bakılabilmektedir.

DNA DİZİ ANALİZİ

DNA dizi analizi mutasyon tayininde altın standard bir test olarak kullanılmaktadır. İlaça neden olan mutasyonların birden fazla gen bölgesinde bulunabilmesi ve bu durumda her bir direnç geni için ayrı işlem gerektirmesi önemli dezavantajlardır. Ayrıca her mutasyon dirence yol açmaz. Buna karşın rpoB gibi yoğun ve çok kısa segmentte sınırlı olan direnç genlerinin saptanmasında DNA dizi analizi uygun bir tekniktir.

DNA dizi analizinde PCR ile çoğaltılan hedef DNA ve bu DNA kalıbına tutunacak bir primer kullanılmaktadır. Reaksiyon tüpünde ayrıca herbiri farklı floresan boyalarla işaretlenmiş 2'-3'-dideoksinükleotid trifosfatlar (ddATP, ddCTP, ddGTP ve ddTTP) bulunmaktadır. Dideoksinükleotid trifosfatlar DNA polimeraz etkisiyle uzayan DNA zincirine katılırlar fakat 3' uçlarında hidroksil grubu bulunmadığından kendilerinden sonra 5'-3' fosfat bağlanmasını engelleyerek zinciri sonlandırır.

PCR reaksiyonu başladığında PCR karışımı içinde bulunan didoksinükleotid trifosfatlar ile deoksinükleotid trifosfatlar yarışır. Reaksiyona didoksinükleotid girdiğinde DNA zinciri daha fazla uzayamaz ve reaksiyon durur. Didoksinükleotid trifosfat ile sonlanan çeşitli büyüklükte DNA dizeleri elde edilir. Bu DNA dizeleri kapiller elektroforez veya jel elektroforezi ile yürütülür. DNA parçacıkları farklı baz çiftine sahip olduklarından, küçük parçacıklar önden, baz sayısı arttıkça DNA parçacıkları peşisıra yürüyeceklerdir. Kapiller/Jel elektroforezi sırasında dedektör önünden geçen her baz çiftinin sonuna eklenen ddNTP'lerin yaydığı farklı dalga boyundaki floresan ışınlar kaydedilir ve veriler bilgisayar ortamına verilir. Yayılan ışığın dalga boy farklılıklarından yararlanılarak DNA dizesi belirlenir.

PCR-SSCP

Single strand conformation polymorphism (SSCP) yönteminde ilaç direncinden sorumlu gen bölgesi PCR ile çoğaltılır. Çoğaltılan çift zincirli DNA, denatüre edici şartlar altında (ısı-kimyasal) tek zincir olacak şekilde birbirinden ayrılır. Farklı nükleotid dizilerine sahip tek sarmallı DNA fragmanlarının katlanmaları farklı noktalardan olmaktadır. Katlanma yerlerinin değişmesi tek sarmallı DNA'nın üç boyutlu yapısını değiştirerek jel elektroforezdeki gözeneklerden geçiş hızını etkiler. Mutasyon var ise birden fazla bant gözlenir.

HETERODUPLEKS ANALİZ

İlaç direncine yol açan mutasyonların belirlenmesinde kullanımı en kolay olan yöntemdir. Bu yöntemde duyarlı olduğu bilinen basilin ve hastadan izole edilen basilin ilaç direncine neden olan gen bölgesi PCR ile amplifiye edilir. Çoğaltılmış ürünlerden eşit miktar katılarak tüp içinde birbirleri ile karıştırılır. 95oC'de ısıtılarak DNA zincirlerinin birbirinden ayrılmasını sağlar ve tek zincir haline getirilir. Sonra tüp yavaş yavaş oda sıcaklığına kadar soğutulur, DNA'nın birbirleri ile yeniden tutunmalarına izin verilir ve heterodupleks ve homoduplekslerin oluşması sağlanır. Son aşamada oluşan homo ve heteroduplekslerin oluşturdukları bant paternleri elektroforetik olarak incelenir. Eğer hastaya ait bakteriden gelen gende mutasyon yok ise, doğal bir birleşme gerçekleşeceği için, tek bir bant gözlenir. Mutasyon var ise; mutasyon noktasında eşleşme bozukluğu olur, çifte sarmal yapısı bozulur. Bükülmeler meydana gelerek, molekülün üç boyutlu yapısında değişimler olur. Bu farklılık jel elektroforezde farklı hızda yürümesine neden olur ve birden farklı yerde bant gözlenir. Bu yöntemle RNA-RNA heterodupleks analizi de yapılabilmektedir.



REAL-TIME PCR

Real-time PCR'da saptama yayılan ışımının sistemin optik parçası ile okunması temeline dayanmaktadır. Ölçülen floresans PCR sırasında artan PCR ürününün miktarı ile orantılıdır. Sikluslar sırasında reporter boyaların yaydığı floresans sistem tarafından kaydedilerek bilgisayar ortamında değerlendirilir ve kantite edilir. Real-time PCR ile elde edilen ürünlerdeki mutasyonlar çift sarmallı DNA'ya bağlanma özelliği gösteren boyalar (sybergreen, etidyum bromür v.b.) veya özgül proplar yardımıyla saptanmaktadır.

Real-time PCR'da oluşan amplikonların Tm (erime ısı) değerleri belirlenen özgül mutasyonlar saptanabilmektedir. Bu teknikte çift zinciri boyayayan ve floresan verme özelliği olan boyalar kullanılır. Isı yükselmesinde çift zincir halindeki heterodupleks yapı homodupleks yapısına göre 0.5-1,5 oC önce tek zincir haline geçerler. Yani Tm (erime ısı) değerleri daha düşüktür. Mutasyon varlığında heterodupleks yapılar oluşacaktır. Isıtma başlayınca mutasyonlu heterodupleksler daha erken tek zincir haline dönüşeceği için boyayı daha erken bırakacak yani, daha erken ışıma vermemeye başlayacaktır.

Ayrıca real-time PCR yöntemi ile mutasyon belirlemede floresan işaretli proplar kullanılabilir. Förster Resonance Energy Transfer (FRET) yöntemi örnek olarak verilebilir. FRET probları iki farklı floresan boya ile işaretli oligonükleotidlerdir. Problardan birinin 3' ucunun ise 5' ucu floresan boya ile işaretlidir. Proplar amplifiye olan hedef DNA ile birinin kuyruk kısmı diğerinin baş kısmına gelecek şekilde hibridize olurlar. Böylece iki floresan boya birbirine yakın konumda bulunur. İlk proptaki floresan boya sistemin ışık kaynağı ile uyarıldığında belli bir dalga boyunda floresan ışık yayar. Eğer hibridizasyon olmuşsa yani iki floresan boya birbirine yeteri kadar yakınsa (1-5 nükleotid) yayılan enerji ikinci floresan boyayı harekete geçirir ve daha uzun dalga boyunda ikinci bir floresan ışık yayılır. Bu enerji transferi FRET olarak adlandırılır ve iki probun arasındaki uzaklıkla yakından ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda Real-time PCR ile aynı reaksiyon tüpünde RIF ve INH direncinden sorumlu rpoB ve katG mutasyonlarının başarıyla saptandığı bildirilmektedir.

LİNE PROBE ASSAY

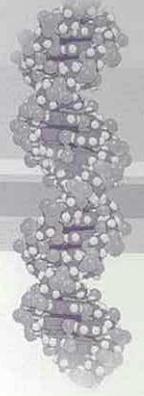
Line probe assay (LIPA) hızlı RIF direnci saptamak amacıyla geliştirilmiş bir kittir. Yöntem revers hibridizasyon temeline dayanmaktadır. LIPA yönteminde RIF direncinden sorumlu rpoB geninin biyotinle işaretlenmiş PCR ürünleri denatüre edilerek nitroselülöz şerit üzerine yerleştirilmiş farklı özgül proba hibridize edilmektedir. Oluşan hibridler alkalen fozfatazla konjuge edilmiş streptoavidin ve kromojen substrat eklenerek saptanmaktadır. Kit sık rastlanan spesifik direnç mutasyonlarıyla hibridize olacak şekilde tasarlanmıştır: R2 (Asp516Val), R4a (His526Tyr), R4b (His526Asp) ve R5 (Ser531Leu).

DNA MICROARRAY

Son yıllarda küçük bir alanda çok sayıda oligonükleotid probun yoğun bir şekilde bulunduğu DNA microarrayler ile farklı DNA dizilerinin tek bir hibridizasyon basamağında incelenmesine olanak sağlayan gen chip teknolojileri geliştirilmiştir. Yöntem PCR ile elde edilen floresanla işaretli amplikonların çok sayıda farklı oligonükleotid prob içeren alanda kendisine uyan proba hibridize olması temeline dayanmaktadır. Bağlı amplikonların yaydığı floresan sinyaller daha sonra optik tarayıcı ile saptanarak bilgisayar ortamında değerlendirilmektedir. RIF'e dirençli *M.tuberculosis* kökenleriyle yapılan DNA microarray çalışmalarında DNA dizi analizi ile uyumlu sonuçlar alınmıştır. Farklı ilaç dirençlerini [INH (katG, inhA), RIF (rpoB), STR (rpsL) ve FQ (gyrA)] birlikte saptamaya uygun proplar içeren DNA microarray geliştirilmesine yönelik çalışmalar sürdürülmektedir.

HABERCİ FAJ SİSTEMİ

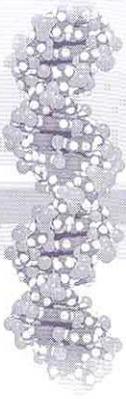
Sadece MTBC'yi ve diğer bazı mikobakterileri infekte edebilen mikobakteriofajlara ateş böceğinin ışık üretiminden sorumlu gen klonlanır. Lusiferaz genini içeren faj mikobakteriye girer ve mikobakteri ürerse faj da çoğalır. Oluşan lusiferaz enzimi mikobakterilerin ürettiği ATP, magnezyum ve oksijen varlığında lusiferin oksitlenir ve ışık üretmeye başlar. Bu ışığın luminometre ile saptanması bakterinin ürediğini gösterir. Klinik örnekte 500-5000 basil olduğunda saatler içinde sonuç alınmaktadır. Bu sistem klinik örneklerde basil varlığını gösterdiği gibi, duyarlılık testi amacı ile de kullanılabilir.



Sonuç olarak, dirence neden olan mutasyonları belirlemek için sözü edilen yöntemler dışında pek çok moleküler metod geliştirilmiştir. Ancak, pratik uygulamalarda bu teknikler çoğu kez RIF direncinin saptanması amacıyla kullanılmaktadır. Tercih nedeni olarak, RIF'in en önemli antitüberküloz ilaçlardan biri olma özelliği yanında, dirençli suşların hemen hemen tamamına yakın bir kısmında *rpoB* geninin 81 bp'lik bölgesindeki mutasyonların olması gösterilebilir. Ayrıca RIF'e dirençli izolatların yaklaşık %90'unda INH direnci de bulunmakta olup, RIF direnci INH direncinin de bir göstergesidir. *KatG*, *pncA* ve *gyrA* gen mutasyonları belli noktalarda kümeleştikleri için bu bölgelerin de mutasyonlarının saptanması pratik klinik uygulamalarına girebilir. Gelecekte DNA mikroarray teknolojisinin yaygınlaşması ile, dirence neden olan pek çok gende bulunan mutasyonlar kısa sürede bir test aşamasında araştırılabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Cockeril FR. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 199-212.
2. Çavusoglu C. *Mycobacterium tuberculosis*'de moleküler antibiyotik duyarlılık test yöntemleri. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu Sempozyum Kitabı, Otak Form-Ofset Basım San. Tic A.Ş., Samsun; 2003:369-387
3. de Viedma DG, del Sol Diaz Infantes M, Lasala F, Chaves F, Alcalá L, Bouza E. New real-time PCR able to detect in a single tube multiple rifampin resistance mutations and high-level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 988-995.
4. Kathleen DE. Molecular diagnosis. In: Radledge C and Dale J (eds) *Mycobacteria Molecular Biology and Virulence*, Blackwell Science, UK; 2000:161-179.
5. Kocagöz T. Tüberküloz tanısında kullanılan moleküler yöntemler. In Ağaçfidan A, Badur S, Türkoğlu S (eds). *İnfeksiyon Hastalıklarının Laboratuvar Tanısında Moleküler Yöntemler*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını (No: 42), İstanbul; 2002: 189-195.
6. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: Molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 496-514.
7. Öztürk R. Mikobakteriyoloji laboratuvarında tür ve direnç tayininde yenilikler. In: Eraksoy H, Yenen OŞ (eds). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul; 2000: 35-43
8. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tubercle and Lung Dis* 1998; 79: 3-29.
9. Riska PF, Jakobs WR, Alland D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 54-510.
10. Saniç A. Antitüberküloz ilaçlar. In: Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (eds). *Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler*. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara; 2003: 509-524.
11. Slayden RA, Barry CE. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection* 2000; 2: 659-669.
12. Torres MJ, Criado A, Ruiz M, Llanos AC, Palomares JC, Aznar J. Improved real-time PCR for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Diagnostic Microbiol and Infect Dis.* 2003; 45: 207-212.
13. Watterson SA, Wilson SM, Yates MD, Drobniowski F. Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 1969-1973.
14. Zhang Y, Telenti A. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* In: Hatful GF, Jacobs WR, Jr (eds). *Molecular Genetics of Mycobacteria*, ASM Press, Washington D.C. ; 2000: 235-254.



P4 MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİ NEDEN GEREKLİ, BAŞLARKEN NELERE DİKKAT EDİLMELİDİR?

Rıza DURMAZ

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

"Molecular epidemiology is one of the most exciting and important areas of research leading into the 21st century."

"Challenge for 21st Century"

Janise S. Dorman, Ph.D.

Moleküler epidemiyoloji, 21. yüzyıla uzanan araştırmaların en önemli ve heyecan verici alanlarından biridir. Moleküler epidemiyoloji, 21. yüzyıla meydan okumaktır¹. Moleküler epidemiyoloji klinisyen, epidemiyolog, çevre sağlığı uzmanı, biyoistatistikçi, insan genetikçisi, moleküler biyolog ve bilgisayar mühendisi gibi birçok bilim adamının birlikte çalışmasını gerektiren multidisipliner bir bilim alanıdır. Moleküler epidemiyoloji insan genom projesi (Human Genom Project=HGP) ile halk sağlığı arasında kritik bir bağ kurmaktadır. Tıbbi tanıların geliştirilmesi, halk sağlığını koruma stratejilerinin oluşturulması, HGP'nin olgunlaştırılmasıyla ilişkili etik, yasal ve sosyal konuların halledilmesi için moleküler epidemiyoloji esastır.

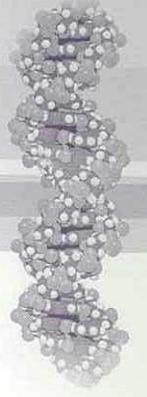
Moleküler epidemiyoloji genel epidemiyolojiye dayanır ve aynı çalışma düzenlerini (Örneğin; vaka-kontrol ve çok merkezli çalışmaları) kullanır. Genel epidemiyolojiden farklı olarak; hastalığın gelişiminde etkili olabilecek spesifik yollar, genler ve molekülleri tanımlayarak hastalığın patogenezindeki bilgilerin artmasına katkıda bulunur. Konağın duyarlılığını belirlemek için aile hikayesi gibi kesin olmayan göstergeler yerine moleküler göstergelerden yararlanılır.

Moleküler epidemiyoloji: İnfeksiyon hastalıklarının tanısı; etkenin biyokimyasal ve moleküler seviyede tanımlanması ve tiplendirilmesi; patogeneze sorumlu genlerin saptanması; genetik duyarlılığın belirlenmesi; konak-patojen ilişkisi; konağın infeksiyonlara duyarlılığından sorumlu faktörlerin incelenmesi; bakteriyel fenotipler içinde doku tropizmi, virülans ve bulaşıcı olabilmeye yönünden farklılık gösterebilen spesifik suşların araştırılması; toplumlar ve akraba grupları arasında hastalığın yayılması, kontrolü ve etiyojisine, moleküler seviyede tanımlanan potansiyel genetik ve çevresel risk faktörlerinin katkısı; infeksiyon hastalıklarının aile içi ve toplumlar arasında yayılmasının önlenmesi üzerinde duran bir bilim dalıdır 2.

Moleküler tiplendirme sistemlerinin geliştirilmesiyle infeksiyon hastalıklarının epidemiyolojisinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu sistemlerde tür içinde değişken ancak suşlarda stabil olan belirli bir genetik gösterge kullanılarak salgın esnasında toplanan, epidemiyolojik olarak ilişkili, aynı tür içindeki izolatların genetik olarak da ilişkili olup olmadıkları araştırılmaktadır. Yani "izolatlar aynı mı, farklı mı?" sorusuna yanıt aranmaktadır. Böylece infeksiyonun kaynağı belirlenmektedir. Genel olarak salgın izolatları (epidemiyolojik yönden ilişkili izolatlar) klonal olarak da ilişkili olup, ortak bir kaynaktan kök alırlar. Klonal ilişkili mikroorganizmalar, ortak virülans, biyokimyasal ve genetik özellikleri paylaşan, aynı türün üyesidirler 2,3. Bu bilgiler, hastanelerde ve toplumda hastalığın yayılmasını anlamak ve kontrol altına almada oldukça yararlıdır.

Moleküler tiplendirme başlıca şu amaçlar için kullanılmaktadır 4-8:

1. Salgın araştırmalarında. Salgınların kaynağı ve yayılma yolları hakkındaki hipotezlerin test edilmesi,
2. Hastaların epidemiyolojik olarak birbiriyle olan ilişkilerinin belirlenmesi,
3. Re-aktivasyonun, re-infeksiyondan ayırt edilmesi,
4. Antibiyotik tedavisinin etkinliğinin belirlenmesi,
5. Hastane infeksiyonları ve toplumsal kaynaklı infeksiyonların ayırt edilmesi,
6. Laboratuvar kontaminasyonlarının saptanması,
7. Antibiyotik direncinden sorumlu gen(ler) hedef alınarak yapılan tiplendirme (antibiyotik-rezistan genotiplendirme) ile dirençli suşların (Metisiline rezistan Staphylococcus aureus=MRSA, vankomisine rezistan enterokok=VRE, penisiline rezistan Streptococcus pneumoniae=PRSP, çoğul ilaca dirençli Mycobacterium tuberculosis=MDR M. tuberculosis gibi) tanımı ve yaygınlıklarının belirlenmesi,



8. Popülasyondaki epidemik klonların sirkülasyonu ve zaman içindeki prevalansını izleyerek, epidemiyolojik sürveyans ve kontrol yöntemlerinin değerlendirilmesi,
9. Virülanstan sorumlu genlerin belirlenmesi ve bunları taşıyan suşların toplum içindeki yaygınlıklarının ortaya konulması (M. tuberculosis'de posfolipase C, PLC geni örnek.)

Moleküler tiplemenin gerekli olduğu durumlar

Birçok kişinin hasta veya kolonize olduğu ortak bir kaynaktan gelen salgınların gözlenmesi ve belli antibiyotik duyarlılık profili veya biyotipe sahip izolatların varlığı, moleküler epidemiyolojik araştırmaları akla getirir. Böyle durumlarda ayrıntılı epidemiyolojik araştırmalar yapıldıktan sonra moleküler tiplendirmeye başlanır ve tiplendirme metodu klinik ve epidemiyolojik hipotezleri doğrulamak için kullanılır. Epidemiyolojik veri toplamadan yapılan tipleme ile salgının tahmin edilebilirliği oldukça düşük ve bulguların hatalı yorumlanma olasılığı yüksektir 2-4. Mümkünse, taraf olmayı önlemek için tiplendirme, epidemiyolojik veriler bilinmeden, kör çalışma olarak yapılmalıdır. İki ayrı veri bağımsız olarak oluşturulmalı, ancak salgın olup olmadığını belirlemek için birlikte değerlendirilmelidir 4,5.

Ağır immün yetmezliği olan hastalar sıklıkla özel bakım birimlerinde birlikte yatmaktadırlar. Bunlardan izole edilen bakterilerin tiplendirilmesiyle belirli bir tür mikroorganizmanın kolonizasyonunun olup olmadığı anlaşılabilir. Böylece potansiyel olarak tehlikeli olabilecek mikroorganizmaların yayılması kontrol altına alınmış olur. Ayrıca bu tip hastalardan izole edilen ve normal florada bulunan bakterilerin hastalık etkeni olup olmadığı hakkında da bilgi edinilebilir. Örneğin; serebro spinal şantı olan bir hastanın kan kültürlerinden arka arkaya izole edilen Staphylococcus epidermidis suşlarının hepsi aynı genetik tipte bulunursa gerçek bakteriyemiği gösterir 7.

Moleküler altipleme çalışmalarına başlamadan önce, moleküler testlerin şu özellikleri dikkate alınmalıdır (4,8-10):

- 1-Moleküler yöntem elde edilebilir mi, geçerli mi, standardize edilebilir mi, tekrarlanabilir mi?
- 2-Elde edilen biyolojik örnekler uygulanabilir mi (versatility)?
- 3-Tür içindeki tüm mikroorganizmalara uygulanabilir mi (tiplendirebilirlik)
- 3-Sosyal ve etik açıdan kabul edilebilir mi?
- 4-Hızlı ve ekonomik mi?
- 5-Özgüllük ve duyarlılığı yüksek mi (ayırım gücü)?
- 6-Sonuçlarının yorumlanması kolay mı?

Bu kriterler bakımından, fenotipleme ve genotipleme yöntemleri karşılaştırıldığında:

Fenotipleme yöntemleri;

- Her bakteri için uygulanamamakta,
 - o Örn. Serotipleme, faj tiplemesi.
- İş yükü fazla,
- Zaman almakta,
- Hatalı gruplama yapılabilmekte,
- Sıklıkla epidemik suşları endemiklerden ayırmada yetersizdirler.
- Çoğunlukla üreme koşulları, üreme fazı ve mutasyona bağlı olarak değişken sonuçlar vermekte
 - o Örn. Kapsül tiplemesi.
- Patojenle-normal flora elemanı arasındaki ayırım yapılamamaktadır. Normal flora veya çevrede yaygın olarak bulunan bakteriler (Escherichia coli, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa gibi) izole edildiğinde konvansiyonel metotlar daha az faydalı olmaktadır.

Genotipleme yöntemleri;

- Yüksek teknoloji gerektirmekte,
- Kurulma maliyeti yüksek,
- Yöntemlerin standardizasyonunda problemler var,
- Oluşturulan profillerin yorumlanmasında zorluklar çekilebilmektedir.



Moleküler epidemiyolojide analizlerin önemi ve problemler11-14:

Bilimin diğer alanlarında olduğu gibi, bu alanda da hipotezlerin test edilmesi ve bir moleküler çalışmadan anlamlı hükümler çıkarmadan önce, dikkate alınması gereken çeşitli faktörler vardır. Bunlar; doğru örneklem, uygun yöntem ve göstergelerin seçimi, uygun analiz ve sonuçların dikkatle yorumlanmasıdır.

a-Örneklem: Örneklem büyüklüğü, test edilen hipotez üzerine direkt etkilidir. Komple örneklem idealdir. Ancak özellikle belirli patojenlerde buna ulaşılması imkansızdır. Bu nedenle ulaşılabilen örneklem derecesi analiz ve yorum aşamalarında dikkate alınmalıdır. Varyasyonun derecesi belirlendikten sonra, başa dönerek çalışılan örnek sayısının testin ayırım gücü için yeterli olup olmadığı kontrol edilmelidir, değilse yeniden örnek alınmalıdır. Bir yöntemin "null" hipotezi (Doğru olan değer ile hipotez değeri arasında gerçek fark yoktur) red etme gücü (null hipotezi yanlış olduğunda onu doğru olarak red etme olasılığıdır) örnek sayısı, veride gözlenen değişiklik ve saptanmaya çalışılan farkın derecesine bağlıdır. İdeal olanı güç analizinin, örneklem şemaları dizayn edilirken yapılması ve örnek sayısının ona göre belirlenmesidir. Ancak, bu her zaman mümkün değildir.

b-Göstergenin seçimi: Seçilecek genetik gösterge, genomdaki varyasyonların tamamını saptayabilecek aralığa sahip olmalıdır. Eğer bir gösterge çok fazla varyasyon saptıyor ise örnek sayısı aşırı derecede fazladır.

Tiplendirmede kullanılan gösterge, transmisyonu izleyebilmek için zaman içinde yavaş değişmeli, fakat aynı zamanda epidemiyolojik olarak ilişkisiz suşların ayırt edilebilmesi için spontan olan yeterli değişimlere açık olmalıdır. Eğer gösterge çok az varyasyon gösteriyor ise örnekler arasındaki farklılığı saptamada yetersiz kalacaktır. *M. tuberculosis* suşlarının tiplendirilmesinde kullanılan insertion sequence IS6110 oldukça stabildir. İn vitro pasajlarda 6 ay stabil kalmıştır ve aynı hastadan bir yıl süreyle izole edilen çoğul ilaca dirençli suşun IS6110 profili stabil bulunmuştur. Global epidemiyoloji nispeten yavaş gelişen varyasyonun kullanımını gerektirir.

Çalışılan amaca uygun gösterge seçimi önemlidir. Bir türü tanımlamak amacıyla kullanılacak ise, gösterge tür içinde istikrarlı, yakın türde farklı olmalıdır. Böylece farklı pattern sağlamalıdır.

Gösterge, kendisini analiz edecek modele uygun olmalıdır. Baz diziliminin analizi için basitten komplekse değişen farklı modeller vardır. Bunlardan, amaca göre, uygun olanının seçilmesi gerekir.

Gösterge tarafsız olarak seçilebilmeli ve mekanizmaları iyi anlaşılabilir olmalıdır. "Housekeeping" genlerdeki (esansiyel metabolik fonksiyonları kodlayan genler) dizi değişimleri idealdir. Çünkü bunların genellikle tarafsız olarak seçimi mümkün olabilmekte ve orijinleri anlaşılabilir olmaktadır. Fakat, ayırt edici bir tiplendirme şeması elde edebilmek için tek bir "housekeeping" gendeki varyasyon oldukça düşüktür. Buna ilave olarak tek bir lokusa dayalı tiplendirme şemaları rekombinasyona karşı çok duyarlıdır ve aslında aynı olan iki izolattan birinin lokusunda oluşan bir rekombinasyon bunları iki ayrı suş gibi değerlendirmeye sebep olabilir. Çoğul housekeeping lokusların kullanılmasıyla bu problem çözülebilir¹². Birden fazla lokus veya gösterge setinin kullanılması hatalı guruplaşmayı da önleyebilir. (*M. tuberculosis*'de IS6110 kopya sayısı düşük olan izolatlarda ikinci bir göstergenin (PGRS, veya DRE) kullanılması hatalı kümeleşmeyi ortadan kaldırmaktadır.

c-Uygun yöntem: Laboratuvarların tiplendirme, veri toplama ve analiz için farklı yöntemleri seçebilmeleri, elde edilen sonuçların karşılaştırmasını zorlaştırmaktadır. Yöntemlerin dikkatle standardizasyonu, kalite kontrollerinin kullanımına özen gösterilmesi ve veri analizinin önemsenmesi laboratuvarların başarısı açısından önemli hususlardır.

Herhangi bir yöntemin laboratuvarlar arası ve laboratuvar içinde tekrarlanabilir olabilmesi deneysel değişkenlerin iyi bilinmesi ve onların kontrol altına alınması ile mümkün olabilmektedir. Mikroorganizmaların üretim ve stoklama koşulları, nükleik asitlerin izolasyon ve saflaştırılması, deneydeki nükleik asit konsantrasyonu, amplifikasyon koşulları, restriksiyon endonükleaz ile kesim, elektroforez koşulları (agaroz ve tamponun yoğunluğu, uygulanan akım, süre gibi) standardize edilmeli ve incelenecek suşların tamamına aynı koşullar uygulanmalıdır.



Ortak veri tabanı oluşturulabilmesi için moleküler tiplerede kullanılacak yöntemlerin standardizasyonu ilk gereksinimlerdenidir. Uygun olan tipleme metodunun seçiminden sonraki aşama metodun standardizasyonu ve farklı laboratuvarların katılımı ile yöntemin onaylanmasıdır. Mulvey ve ark15 Kanada'da metisiline dirençli Staphylococcus aureus (MRSA) suşlarının tiplemesinde kullanılan PFGE yönteminin performansını test etmek için 15 laboratuvara 25 MRSA'dan oluşan panel göndermişlerdir. Başlangıçta laboratuvarlardan gelen sonuçlar karşılaştırılmaz durumda iken, kendilerine gönderilen standardize PFGE protokolünü sıkı uygulamalarından sonra alınan sonuçlar terarlanabilir ve paternlerin karşılaştırılabilirliği mükemmel bulunmuştur.

PFGE'de DNA hazırlık ve elektroforez koşulları üzerinde durularak standardizasyon önemli ölçüde sağlanabilmiştir. Bir DNA izolasyon metodu en az şu özellikleri taşımalıdır¹³: 1) Bakteriyel kromozom bozulmadan eksiksiz olarak izole edilmeli, 2) DNA kalitesi ve deney koşulları restriksiyon enzimleriyle yeterli ve tekrarlanabilir kesimler alınmasına uygun olmalı, 3) Arzu edilen bant profillerinin elde edilebilmesi için DNA konsantrasyonu yeterli olmalıdır. Enzim seçimi en önemli parametrelerden biridir. İyi bir ayırım için bant sayısı en az 10, en fazla 20-30 olmalıdır¹³. Kromozomal DNA yeteri kadar kesilmediğinde PFGE jelinin üst kısmına yakın yerde büyük bir bant veya parlaklaştırılmış jelde silik, küçük bantlar elde edilmektedir. Konvensiyonel elektroforezde olduğu gibi agarozun tipi, konsantrasyonu, jelin kalınlığı, tamponun seçimi, reoriyantasyon açısı, alana çarpan elektrik (pulsed electric field) gücü (volt/cm), total elektroforez süresi ve çarpışın değişim (pulse-switching) zamanı gibi parametreler PFGE'de önemli faktörlerdir. Jelin kalınlığı ve/veya tamponun miktarı uygun olmadığında ya da elektrotlarda problem olduğunda DNA yürüme çizgileri eğri olabilmektedir.

d-Sonuçların analizi: Çalışılan örnek sayısı fazla olduğunda oluşan bant profillerinin analizi bilgisayar destekli programlarla (BioNumerics ve GelCompar gibi), tek jelde yapılan çalışmalarda ise gözle yapılabilir. Bilgisayar destekli analizlerde her jelde yeterli sayıda (üç adet) ve uygun molekül ağırlıkta bantlar içeren moleküler ağırlık standartları bulundurulmalıdır. Her bir bant belirlenip, artefaktlardan arındırılmalı, jel içi ve jeller arası farklılıkların giderilmesi için normalizasyon (aynı büyüklükte oldukları halde elektroforez koşullarından dolayı farklı görünüm veren bantlar normalizasyonla düzeltilebilmektedir) yapılmalıdır.

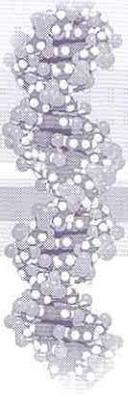
Mikroorganizmaların moleküler tipleme profilleri için bilgisayara bağlı dinamik veri bankalarının oluşturulması, yeni profillerle eskilerinin karşılaştırılmasına olanak sağlayacaktır. Bu karşılaştırmalar epidemiyolojik çalışmalarda oldukça faydalıdır. Bunların sayesinde;

- 1-Spesifik bir patojenin durumu izlenebilir (sürveyans).
- 2-Yeni bir patojene bağlı salgın kısa sürede saptanabilir.
- 3-Klinik izolatların kümeleşmesi (clusters) saptanabilir. Bu kümeleşmeler belirli bir zaman dilimi ve coğrafik lokalizasyonla veya diğer epidemiyolojik verilerle ilişkiliyse ortak bir kaynağa bağlı salgını gösterebilir (salgının tanımlanması).
- 4-Salgınla ilişkisi olmayan geçici kümeleşmiş olgular ayırt edilebilir.
- 5-Salgınla ilişkili spesifik patojenin alttiplerinin takibi ile halk sağlığı kontrol önlemlerinin etkinliği doğrulanabilir.

Moleküler epidemiyoloji iki major tip analizi kullanılır. 1) popülasyon genetiği 2) filogenetik. Popülasyon genetik analizi, toplumların içinde ve arasındaki genetik varyasyonların mevcut durumlarına kısa bir bakış sağlar. Filogenetik analizler, filogenetik ağacı oluşturmak için benzer verileri kullanır, örnekler arasındaki benzerliklere ilaveten, popülasyonun geçmişi hakkında bilgi verebilir.

Veriler farklı yollardan analiz edildikten sonra sunulmalıdır. Analizlerin bütün formları dikkate alınmalı, bunlardan herhangi biri uygun değilse sonuçlar geçersiz sayılmalıdır.

e-Sonuçların yorumu: Moleküler tipleme epidemiyolojik çalışmalardan yalnızca biridir. Doğru değerlendirme yapılabilmesi için klasik epidemiyolojik bilgiler ve klinik verilerle birlikte ele alınmalıdır. Ne kadar benzerlik epidemiyolojik veya klonal ilişkiyi doğrulamaktadır? Bu durumu değerlendirebilmek için;



- kullanılan sistemin ayırım gücü,
- incelenen organizmanın genomik değişkenliği ve
- araştırma periyodunun bilinmesine gereksinim vardır.

PFGE için geliştirilmiş olan kriterlere göre, genetik farklılık sayısı arttıkça ve epidemiyolojik ilişki azaldıkça suşlar arasındaki farklı bant sayısı artmaktadır.

- Restriksiyon fragment pozisyonunda < 3 bant farklılığı (veya \geq %85 benzerlik)
- Tek bir genetik olay sonucu oluşabilir
- Aynı suşun alt tiplerini yansıtabilir
- Restriksiyon fragment profilinde >3 bant farkı durumunda ise
- Epidemiyolojik olarak ilişkili olma olasılığı daha düşüktür¹³.

Bu kriterlerin spesifik çevre (hastane ortamı) ve sınırlı zaman diliminde üretilen izolatlar için kullanılmasının uygun olacağı belirtilmiştir⁵. Daha açık alanlar (toplum sağlığı, bölgesel, global sürveyans gibi) için farklı orijinden gelen izolatlardaki aynı restriksiyon bantları, aynı kromozomal dizilimi yansıtmayabilir. Böyle durumlarda yorumlama kriterleri uygulanırken dikkatli olunmalıdır. Ayrıca, çevreye bağlı olmaksızın, oldukça yüksek klonal mikroorganizmalara (MRSA gibi, bu bakterilerde soy benzerliği yüksektir) bağlı özellikle uzun süreli bir endemik zemin içinde gelişen salgınlar değerlendirildiğinde, PFGE için belirlenmiş kriterler daha dikkatle uygulanmalıdır (örneğin; tek bant farkı önemlidir). Bu durumda daha açıklayıcı bir yanıt için ikinci bir tipleme yöntemi (PCR veya plazmit analizi) eklenmelidir. Tipleme sonuçlarının yorumlamasında suşların toplandığı zaman periyodu da kritik bir parametredir. Salgının süresi kısaltıkça, izolatların PFGE profillerini değiştirecek mutasyonların oluşma zamanı azalmaktadır. Besin kaynaklı salgınlar sıklıkla tek bir kontamine yiyeceğe bağlı olarak aynı zamanda geliştiğinden, farklı hastalardan üretilen izolatlar arasındaki varyasyonun minimal olması beklenir. Diğer taraftan hastane veya toplum kaynaklı salgınlar, suşların personelden personele yayılmasıyla genellikle uzamakta ve PFGE profillerinde değişikliğe sebep olan mutasyonlar için daha fazla şans oluşmaktadır¹⁴.

PFGE sonuçları yorumlanırken iki kaçınılmaz problem göz önünde bulundurulmalıdır: 1) Elektroforez koşulları, aralarında %5-10'dan daha az farklılık olan bantları ayırt etmede yetersizdir, 2) 50 kilo bazın (kb) altındaki bantların görüntülenmesi gittikçe zorlaşmaktadır.

Çok iyi tanımlanmış, spesifik belirli durumlar mümkün olmakla birlikte, universal olarak uygulanabilecek yorumlama kriterlerini geliştirmek muhtemelen imkansızdır. Bir moleküler alttipleme yönteminin sonuçları değerlendirilmeden önce bazı soruların yanıtlanması gerekmektedir (Tablo 1). Yöntemin seçimi en önemli parametredir. Özgüllük ve duyarlılığın yüksek (%100) olması arzu edilir. Altipleme spesifik bir bakteriyel suşun evrimini belirlemek için kullanılacak ise, suş ilişkisini doğru kantitatif ölçümlerle belirleyen tipleme yöntemleri (multilocus sequence typing=MLST gibi) seçilmeli ve yorumlama için yalnızca filogenetik analiz programları kullanılmalıdır. Halk sağlığı veya diğer sağlık merkezlerinde yapılan moleküler alttipleme çalışmalarının çoğu salgını tanımlamaya yöneliktir. Bu durumda bir izolatın diğeriyle filogenetik ilişkisi konu dışıdır. Ancak böyle durumda sorulan basit soru şudur: İki kişi infeksiyonlarını aynı kaynaktan mı almıştır?

Moleküler alttipleme sonuçlarının yorumlanmasında dikkat edilmesi gereken son ve belki de en önemli faktör; epidemiyolojik, çevresel ve laboratuvar bulgularının birbiriyle ne derece örtüştüğüdür. Laboratuvar bulguları, tek başına, bir infeksiyonun kaynağını doğrulama veya red etmede yetersizdir. Aynı suşun iki kişiyi farklı yollardan infekte etmesi her zaman mümkün olabileceği gibi, farklı profile sahip izolatların ortak bir kaynağa sahip olmaları da olasıdır. Birkaç günlük bir sürede aynı restoranda yemek yiyen kişilerden üretilen Escherichia coli O157:H7 izolatlarında en az dört farklı PFGE profili (üç veya daha fazla bant farkı) saptanmıştır¹⁴.



Tablo 1. Moleküler alttıpleme verilerinin yorumlanmasında dikkate alınması gereken beş soru¹⁴.

| Soru | Değerlendirme |
|--|---|
| 1- Hangi metod kullanıldı ? | Bu mikroorganizma için ayırt edici ve tekrarlanabilir mi ? Özgüllük ve duyarlılığı nedir? |
| 2- Organizma ne kadar genetik varyasyon göstermektedir? | Sonuçlarının yorumlanmasında problemler var mı? Genetik varyasyon arttıkça, tipleme sonuçlarındaki benzerliğin önemi daha da artmaktadır. |
| 3- Özel bir moleküler tip ne kadar yaygınlıkta gözlenmektedir? | Eşleşen tiplerin önemi, yaygınlığının görülme frekansıyla azalmaktadır |
| 4- Araştırılan salgının doğası nedir? | Sürekli bulaşa bağlı devam etmekte olan salgınlar, tek kaynaklı salgınlardan daha fazla genetik farklılık gösterirler |
| 5- Tiplemede asıl önemli olan nedir? | Moleküler tipleme verileri, epidemiyolojik ve çevresel araştırmalar ile örtüşüyor mu? |

Moleküler tipleme için kalite kontrol/kalite güvence programı

Moleküler alttıpleme ağının başarılı işleyebilmesi için güçlü ve düzenli bir kalite güvence (QA)/kalite kontrol (QC) programı gereklidir. PulseNet için geliştirilmiş QA/QC programı dışında bilimsel literatürde tanımlanmış QA/QC programları yoktur. (PulseNet Network: 1996 yılında Centers for Disease Control and Prevention tarafından başlatılmış, besin kaynaklı bakteriyel hastalıklar için moleküler alttıplemeye dayalı bir uluslararası surveyans sistemidir). PulseNet'e gönüllü olarak katılan laboratuvarlara 5 günlük bir eğitim süresince PFGE tipleme yönteminin standart protokolleri, sonuçların analizi ve yorumlanması konularında eğitim sağlandıktan sonra, spesifik bir patojenin 5-10 suşundan oluşan bir set gönderilerek standart protokolle analiz etmeleri istenmekte ve sonuçlarının değerlendirilmesinden sonra sertifikasyon/akreditasyon işlemleri yapılmaktadır¹⁴.

Sonuç ve öneriler:

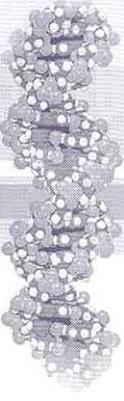
Moleküler alttıpleme yöntemlerini kullanacak olan araştırmacılar, laboratuvar ve klinik çalışmaların her ikisinin de beklentilerini karşılayacak uygulanabilir yöntem(ler)i seçmek durumundadır. Uygulanacak yöntemlerin seçilmesinde şu özellikler dikkate alınmalıdır:

- 1) Yöntem mümkün olduğunca geniş mikroorganizma grubuna uygulanabilmeli,
- 2) Yüksek ayırım gücü ve tekrarlanabilir özelliklere sahip olmalı,
- 3) Sonuçları kolayca yorumlanabilir olmalı,
- 4) Kurulması ve uygulanması kolay olmalı,
- 5) Kullanılan alet ve çözeltileri ucuz olmalıdır.

Bu kriterlerin tamamını karşılayacak tek bir yöntem olmadığı için sistemlerin kombinasyonunu kullanmak gerekli bir kural gibidir 16-18. Tek merkezi ilgilendiren kısa süreli salgından izole edilen suşların ayırımı yapılacak ise, tek tipleme yöntemi yeterli olabilir. Ancak, ülke genelinde yapılacak olan kapsamlı epidemiyolojik çalışmalarda birkaç tipleme yönteminin birlikte kullanılması gerekmektedir 6. Başlangıçta hızlı tarama sistemleri (plazmit profil analizi, PCR-bazlı metotlar gibi) ile klonal ilişkinin varlığı veya yokluğu test edilir. Eğer kullanılan hızlı yöntemin ayırım gücü yeterli değilse, güvenilir bir yöntemle doğrulama yapılabilir. Günümüzde bu ihtiyacı karşılayabilecek en iyi yöntem PFGE gibi görünmektedir 5,19,20.



15. Mulvey MR, Chui L, Ismal J et al. Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2001;39:3481-5.
16. Tenover FC, Arbeit R, Archer G, et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 407-15.
17. Preston MA, Johnson W, Khakhria R, Borczyk A. Epidemiologic subtyping of *Escherichia coli* serogroup O157 strains isolated in Ontario by phage typing and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2366-8.
18. Shimizu A, Fujita M, Igarashi H, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* coagulase type VII isolates from staphylococcal food poisoning outbreaks (1980-1995) in Tokyo, Japan, by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3746-9.
19. Köksal F. Moleküler biyolojik tiplendirme yöntemlerinin hastane infeksiyonlarında kullanımı. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 1999; 3:189-95.
20. Sloos JH, Dijkshoorn L, Vogel L, van Boven CPA. Performance of phenotypic and genotypic methods to determine the clinical relevance of serial blood isolates of *Staphylococcus epidermidis* in patients with septicemia. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2488-93.



MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİDE TEMEL YÖNTEMLER

Salih HOŞOĞLU

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır

Giriş

Moleküler epidemiyoloji, potansiyel genetik ve çevresel risk faktörlerinin katkılarına odaklanmış, mikroorganizmaların etiyolojisini, dağılımını ve yayılma yollarını moleküler seviyede tanımlayan bir bilimdir. Son yıllarda bu alanda geleneksel epidemiyolojik araştırma yöntemlerine moleküler biyolojik yöntemlerin entegrasyonu ile büyük oranda gelişmeler sağlanmıştır. Mikrobiyolojide moleküler biyolojik yöntemlerin kullanıma girmesi ile bir çok temel tanımda değişimler ve gelişmeler olmuştur ve bu değişim devam etmektedir.

Mikrobiyoloji alanındaki moleküler epidemiyolojik çalışmalarda kullanılan yöntemler insan genetiğini araştırmada kullanılan yöntemlerle büyük oranda aynıdır. Artık klasik moleküler tanı ve tiplendirme yöntemleri olarak adlandırabileceğimiz yöntemlerin tamamını mikrobiyolojik moleküler tiplendirmede kullanılmaktadır. Mikrobiyal patojenlerin biyolojik veya genetik yakınlıklarını gösteren laboratuvar yöntemleri en kullanışlı moleküler epidemiyoloji metotlarıdır.

Son 15 yıllık dönemde birçok farklı epidemiyolojik tiplendirme metodu uygulamaya girmiş durumdadır. Bir kısım fenotipik metotlar enfeksiyonların epidemiyolojilerini tanımlamada kullanışlı olsa da bunların çoğunun epidemiyolojik araştırmalarda kullanılması tartışmalıdır. Çünkü bu yöntemler yavaş sonuç vermektedir ve emek yoğun metotlardır. Yeni geliştirilen DNA esaslı tiplendirme metotları bu problemleri büyük oranda ortadan kaldırdığı için epidemiyolojik araştırmalar için en çok bunlar tercih edilmektedirler.

Moleküler tiplendirme bir veya daha fazla test ile farklı suşların aynı veya farklı sonuçları verip vermediğini görmek için yapılır. Epidemiyolojik olarak bağlantılı suşlar aynı DNA profillerini veya paternini paylaşır. Aynı zamanda sporadik veya epidemiyolojik olarak bağlantısız suşlar belirgin şekilde farklı paternlere sahiptirler. Şayet farklı hastalardan izole edilen suşlar aynı fingerprinti paylaşıyorlarsa bu suşların aynı klondan kaynaklandıkları, hastadan hastaya veya ortak bir kaynak veya mekanizma ile bulaştıkları kuvvetle muhtemeldir. Moleküler tiplendirme metotları; araştırmacıların aynı hastada enfeksiyon ve kolonizasyona yol açan suşlar arasındaki ilişkiyi gözlemesinde, kontaminasyon ve enfeksiyona yol açan suşların ayırımında, hastane içinde hastalar arasındaki bulaşmayı takipte, tedavi sonrasında tekrarlayan enfeksiyonun reenfeksiyon mu yoksa rölaps mı olduğunu belirlemede ve antibiyotiklere dirençli suşların hastane içi ve hastaneler arasında yayılımını takip etmede yardımcı olur. DNA esaslı tiplendirme metotları sıklıkla hastane kaynaklı enfeksiyonların epidemiyolojisini araştırmada kullanılırlar. Klinisyenlerin ve araştırmacıların tek başına moleküler tiplendirme metotlarının bir kıymeti olmadığını bilmesi gerekir. Yeterli epidemiyolojik verilerle birlikte değerlendirilmeyen ileri tiplendirme metotları bile enfeksiyonların epidemiyolojisini anlamada ciddi şekilde yardımcı olamazlar ve daha fazla karışıklığa yol açarlar.

Epidemiyolojik tiplendirmede başlıca iki yaklaşım kullanılır: 'Karşılaştırma metodu' ile suşların tamamı aynı anda çalışılarak elde edilen paternler karşılaştırılır. 'Kütüphane tiplendirme metodu' ile oluşturulan fingerprint katalogları kullanılarak elde edilen paternlerin epidemiyolojik bağlantıları ortaya konulmaya çalışılır. Birincisi salgın araştırma sistemi olarak kullanılırken, ikincisi sürveyans yaparken kullanılan tiplendirme sistemidir. Daha çok klinik sonuçlarla ilgilenen mikrobiyoloji laboratuvarları kütüphane tipi tiplendirmeyi pek kullanmazlar.

Moleküler Epidemiyolojide Kullanılan Tiplendirme Yöntemleri

En sık kullanılan moleküler tiplendirme metotları plazmid tiplendirmesi, plazmid ve genomik DNA'nın restriksiyon endonükleaz analizi, özel DNA problemleri kullanılarak Southern hibridizasyon analizi, PCR temelli veya PFGE temelli kromozomal DNA profil analizi ve multilocus sequence typing (MLST)dir. Başlangıçta kromozomal ve plazmid DNA'larının restriksiyon endonükleaz paternlerinin karşılaştırılması şeklinde başlayan moleküler tiplendirme gittikçe daha kompleks olarak yapılmaya başlandı. İkinci jenerasyon genetik tiplendirme metotları olarak spesifik gen problemlerinin kullanıldığı Southern blot hibridizasyon ribotyping, PCR-temelli yaklaşımlar ve PFGE sayılabilir.



Tiplendirilecek suşların sayısı kullanılacak yöntemin seçiminde önemli bir faktördür. Özellikle çok sayıdaki suşun tiplendirilmesi gerekiyorsa kullanılacak yöntemin kolay uygulanabilen ve karşılaştırma yapmaya uygun bir metot olması gerekir. Değişik merkezlerden toplanmış çok sayıda suşun moleküler tiplendirme metotlarıyla tiplendirilmesi ve bu sonuçların karşılaştırılması sıkça görülen bir taleptir. Bu çalışma sonunda o türün farklı coğrafyalarda farklı alttiplerinin olup olmadığı görülecektir. Moleküler metotların ilk karşılaştırması CDC tarafından yapıldı. Bu çalışmayla eğer mikrobiyoloji tecrübesi yeterli ise bu metotların hiç birinin tamamen işe yaramaz olduğunu söylemenin mümkün olmadığı ve genellikle birbiriyle örtüşen sonuçlara ulaşıldığı görüldü. Bu çalışmanın ardından moleküler metotları karşılaştırma amaçlı birçok çalışma yapıldı. Arbitrary primer PCR, repetitif element bazlı PCR ve PFGE metotlarının tekrarlanabilirliği, uygulanabilirliği ve merkezler arasında veri aktarımı karşılaştırıldı. Bu çalışmalar PFGE prosedürü kullanılarak kolayca uygulanabilir bir süreyans tiplendirme sistemi geliştirilebileceğini gösterdi.

Tüm genom analizi yanında amplification fragment length polymorphism (AFLP) de çok sayıda bakterinin çalışılması gereken durumlarda iyi bir tiplendirme seçeneğidir. Selektif PCR- esaslı AFPL reaksiyonları tek mikrobiyal izolattan derive edilmiş tek DNA parçasından hazırlandığı halde yaklaşık % 30-40 genomu kapsayabilmektedir. Bu yaklaşım birbirine yakın karakterdeki yeni gen problemleri veya DNA sekanslarını belirlemede kolaylık sağlar. Aynı zamanda birbirinden uzak sınıflardaki mikroorganizmalar arasındaki gen transferlerini görmeyi de mümkün kılar. Günümüzde bu ileri teknoloji ürünü tiplendirme metotları hala az sayıda akademik ticari kurumla sınırlı kalmaktadır.

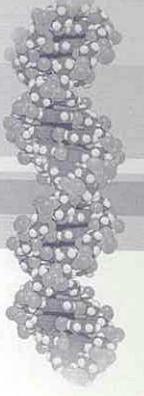
Günümüzde en yaygın kabul gören ve uygulaması olan moleküler tiplendirme metodu PFGE prosedürleridir. PFGE prosedürünün hızındaki artış ve sonuçların yorumlanmasının kolaylaşması bu metodu daha kullanışlı hale getirdi. Birçok merkezde major enternasyonal MRSA klonlarını tanımlamaya yönelik çok sayıda çalışma yapılmaktadır. PFGE bakteri ve fungusların hemen tamamında yeterince diskriminasyon gösterebilmesi ve tekrarlanabilmesi nedeniyle gittikçe daha fazla kullanılır hale geldi.

Yukarıda sayılan metotların çoğu DNA fingerprint band paterni temelli metotlardır. Bunların tekrarlanması ve yansız olarak yorumlanması genellikle zordur. Bu nedenle özetle hibridizasyon sonuçları evet/hayır olan "ikili" (binary) sistem geliştirildi. Binary sistemde bakteriyel DNA probuyla bir genom parçasının var veya yok oluşu araştırılır. Çok sayıda klinik çalışmada 12 prob içeren bir sistem denendi. Bu metodun iyi DNA izolasyonu yapıldığı takdirde merkezler arasındaki karşılaştırma için uygun sonuçlar verdiği gösterildi. DNA izolasyon protokolü geliştirildikten sonra bu metodun bir 'arşiv tiplendirme sistemi' oluşturmaya uygun görünmektedir. Ayrıca protokolün ilk uygulamasında ciddi teknik problemlerle karşılaşabilmektedir.

Mikroorganizmaların yayılımının genetik olarak izlenmesi amacıyla değişik bakteri ve fungusların farklı housekeeping genlerinin DNA sekans analizi (MLST) sonuçlarını içeren şema ve veri tabanları oluşturuldu. İkili tiplendirme sistemi ve MLST sisteminin teknolojik özelliklerinden dolayı değerleri gösterildi. Bu sistemler kolayca taşınabilir ve çiplere yerleştirilmesi mümkündür. MLST başlangıçta *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, ve *Staphylococcus aureus* için geliştirildi. Ancak daha sonra diğer bakteriler ve mantarlar için de kullanılmaya başlandı. Bu yöntem bir türün genetik değişkenliğini göstermede kullanılan klasik multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) metoduna dayanmaktadır. Beş ile yedi housekeeping genin sekans analizi ile oluşturulan bir veri tabanı bu karşılaştırmalar için kullanılır. Bu karşılaştırma sonuçlarına göre izolatlar arasındaki genetik yakınlık ve ayrılmalar görülebilmektedir. MLST oldukça pahalı, zaman alıcı, iş yükü fazla olan bir uygulamadır. Her izolat için 2500'den fazla baz çifti karşılaştırılmalıdır. MRSA gibi genetik varyasyonların housekeeping genlerde sınırlı olduğu durumlarda diskriminasyon yetersiz kalabilir. Eğer yeterli diskriminasyon sağlıyorsa tek-hedef bölge sekansı ucuz, hızlı, objektif ve portable genotiplendirme sağlayabilir. Sekans analizine dayalı metotların gittikçe daha yaygın kullanım alanı bulması beklenmektedir.

Moleküler Tiplendirme Metotlarının Dezavantajları

Yaygın olan paternlerin yorumlanması kompleks ve zor olabilir. Son yıllarda geliştirilen analiz programları bu alanda ciddi kolaylıklar sağlamış bulunuyor. Teknik olarak ciddi altyapı yatırımı gerektirmeleri de önemli bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Moleküler tiplendirme metotlarının çoğu standardize edilmiş değildir. Bu nedenle farklı metotlar ve yorumlar önem kazanmaktadır.



BAKTERİLERE YÖNELİK MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİK ÇALIŞMALAR

Burçin ŞENER

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Tüm dünyada ciddi morbidite ve mortaliteye neden olan bakteriyel enfeksiyon hastalıklarının epidemiyolojisi, bu alanda moleküler yöntemlerin kullanıma girmesiyle birlikte büyük ölçüde ilerleme kaydetmiştir. Epidemiyolojik tiplendirme amacıyla kullanılan fenotipik yöntemler, etken bakterilerin yansıttıkları genetik özellikleri çoğunlukla saptayabilmektedirler. Ancak fenotipik tanımlama yöntemlerinin yetersiz kalmasına yol açan bazı nedenler şu şekilde sıralanabilir:

- a) genotipik olarak farklı bazı suşların aynı fenotipik özellikleri göstermeleri,
- b) genotipik özelliklerin her zaman eksprese olamayan genlerde kodlanabilmesi,
- c) antijen yapısının değişken olması,
- d) direnç genlerinin ekspresyonunun antibiyotik tedavisinden etkilenmesi,
- e) bakterilerin antibiyotik direnç geni kazanıp kaybetmeleri.

Fenotipik yöntemlerin yetersizliği sonucunda geliştirilen genotiplendirme yöntemleri sayesinde bakterilere yönelik epidemiyolojik çalışmalar hız kazanmış ve bazı bakteriler için uluslararası boyutlara ulaşmıştır. Bakteriyel etkenlere yönelik moleküler epidemiyolojik çalışmalar başlıca 3 ana konuda odaklanmaktadır:

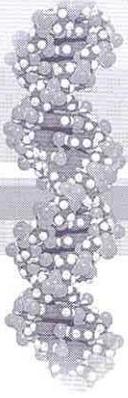
1. Hastane enfeksiyonlarının incelenmesi ve kaynak saptanması
2. Antibiyotik dirençli bakteri klonlarının ve direnç genlerinin popülasyondaki izlemi
3. Popülasyondaki virulan klonların epidemiyolojik sürveyansı

Bakteriyel moleküler epidemiyolojide kullanılan yöntemler

Moleküler epidemiyolojik yaklaşımların tümünde "altın standart" olarak kabul edilen optimal tiplendirebilirlik, yüksek tekrarlanabilirlik, yeterli stabilite ve yüksek ayrıştırma gücü gibi özellikler, bakterilere yönelik çalışmalarda da mutlaka dikkate alınmalıdır. Bunların yanı sıra yöntemin çok pahalı ve komplike olmaması, sonuçların kolay yorumlanabilmesi ve hatta merkezler arası karşılaştırılabilir olması tercih sebepleri arasındadır (30,32).

Çalışılacak popülasyonun lokalizasyonu, büyüklüğü, hastane, şehir, ülke veya dünya çapında bir değerlendirme yapıyor olması seçilecek moleküler tiplendirme yöntem(ler)ini doğrudan etkilemektedir. Küçük çaplı epidemiyolojik araştırmaların, bir bakterinin uluslararası yayılımını araştırmayı hedefleyen çalışmalardan farklı yöntemleri temel alması, hem uygulama hem de sonuçları yorumlama açısından daha uygundur. Örneğin, belirli bir hastanedeki metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) salgınını açığa çıkarmak ve kaynağı saptamak için basit bir yöntem olan "arbitrary primed" polimeraz zincir reaksiyonu (AP-PCR) kullanılabilirken, bir ülkede yaygın olan MRSA klonunun ulusal klonlarla ilişkisini belirlemede, "pulsed field gel electrophoresis" (PFGE) veya "multilocus sequence typing" (MLST) gibi yüksek tekrarlanabilirlik ve ortak sonuç yorumuna olanak sağlayan "web database"leri oluşturulmuş sistemlerin kullanımı gerekmektedir (11, 17). Hastane salgınları veya gıda kaynaklı bir salgın söz konusu olduğunda, epidemiyolojik problemin özelliklerini belirlemek ve enfeksiyon kaynağı ya da yayılma yolu konusunda hipotezler geliştirmek için, ek kültürlerde izole edilen suşların enfeksiyonlarda etken olanlarla benzer olup olmadığı araştırılır.

Yukarıda da belirtildiği gibi çalışılan popülasyona göre yöntemler değişebilmekle birlikte, bakterilere yönelik moleküler epidemiyolojik çalışmalarda sıklıkla başvurulan yöntemler, plazmid profil analizi, ribotiplendirme, AP-PCR, Rep-PCR, ERIC-PCR, PCR-RFLP, PFGE, MLST ve DNA dizi analizi şeklinde sıralanabilir.



Bakteriyel moleküler epidemiyolojik çalışmalarla ilgili literatür incelendiğinde, çalışmaların özellikle MRSA, vankomisin dirençli enterokok (VRE), penisilin dirençli *Streptococcus pneumoniae* (PRSP), genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (ESBL) oluşturan Enterobacteriaceae üyeleri ve ilaç dirençli *Mycobacterium tuberculosis* konularında yoğunlaştığı izlenmektedir. Türkiye’de bu konularda yapılan çalışmaların henüz sınırlı sayıda ve daha çok lokal boyutlarda olduğu dikkati çekmektedir. Ülkemizde yapılan bakteriyel moleküler epidemiyolojik çalışmalarla ilgili bir diğer nokta en çok tercih edilen yöntemin AP-PCR olduğu, bunu PCR-RFLP ve PFGE yöntemlerinin izlediğidir.

Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)

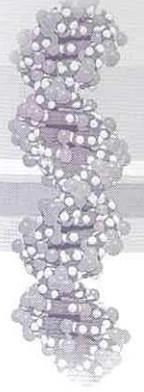
MRSA’ya bağlı hastane epidemileri 1960’lardan itibaren İngiltere ve diğer Avrupa ülkelerinde, 1970’lerin sonlarına doğru da ABD’de gittikçe artış gösteren bir problem olmaya başlamıştır. MRSA, PBP2a adı verilen ve metisiline düşük afinite gösteren yeni bir penisilin bağlayan proteinin oluşumu ile ortaya çıkar. Bu tür direnç kromozomal olup, *S.aureus* suşunun mec geni kazanmasına bağlıdır (23, 24). MRSA oluşumu ve yayılımı, antibiyotiklerin seçici baskısı sonucu dirençli bakterilerin ortaya çıkışı ve yayılımına yönelik en çarpıcı örneklerden birisidir. MRSA suşları ağırlıklı olarak hastane kaynaklı olmakla beraber, son yıllarda yapılan çalışmalar toplum kaynaklı MRSA suşlarının varlığına da işaret etmektedir. Bunun yanı sıra koagülaz negatif stafilokoklarda da metisilin direncinin giderek artan boyutlara varması dikkat çekicidir. Böylesine ciddi bir tehditten korunmak, doğru enfeksiyon kontrol önlemlerinin ve doğru antibiyotik kullanım politikalarının uygulanmasını gerektirmektedir.

Belirli bir merkezdeki MRSA salgınını araştırmak ve kaynağı saptamak için RFLP-PCR, AP-PCR gibi daha basit yöntemler yeterli olabilirken, global epidemiyolojik araştırmalarda önerilen, *arcC*, *aroE*, *glp*, *gmk*, *pta*, *tpi* ve *yqiL* genlerine yönelik MLST, *Smal* enzimi ile PFGE ve *mecA* gen saptanması, *spa* (*staphylococcal protein A*) tiplendirmesi gibi yöntemlerin birlikte kullanımıdır (11,17).

1994-2000 yılları arasında dünya çapında toplanan 3000 MRSA izolatının *mecA:Tn554:PFGE* ve MLST ortak protokolüne göre değerlendirildiği bir çalışmanın sonucunda, uluslararası yayılım gösteren hipervirulan "epidemik MRSA" (EMRSA) klonları tanımlanmıştır. Bunlar; İber, Brezilya, Macaristan, New York/Japonya, pediatrik klon, Berlin, EMRSA15 ve EMRSA16 pandemik klonlardır. Avrupa’da pek çok ülkede İber klonunun, Portekiz’de Brezilya ve pediatrik klonun, Polonya’da pediatrik klonunun, Macaristan’da Macar klonunun, İtalya’da İber ve Brezilya klonlarının yanı sıra farklı bir İtalyan klonunun baskın olduğu izlenmektedir. Bu EMSRA klonlarının ataları araştırıldığında, sadece iki ana klondan kaynaklandıkları görülmüştür. Bu klonlardan birisinin temeli Avrupa’da ilk izole edilen MRSA izolatlarına dayanırken, diğeri de 1950’lerin ortalarında henüz metisilin kullanıma girmeden önce Danimarka’da yaygın olarak saptanan metisilin duyarlı *S.aureus* izolatlarına dayanmaktadır (18, 23, 25).

Türkiye’den 1997 yılında yapılan ve Ankara’dan 6, Bursa’dan bir merkezin katıldığı ve 39 MRSA suşunun PFGE, ribotiplendirme ve AP-PCR yöntemleriyle değerlendirildiği bir çalışmanın sonuçları, suşların 38’inin genetik olarak homojen tek bir klondan kaynaklandığını göstermiştir (31). Başka bir çalışma, İstanbul kaynaklı izolatların da bu suşlarla genetik yakınlığı olduğunu saptamıştır. Ancak Türkiye suşlarının EMSRA klonlarıyla genetik yakınlıkları konusunda henüz elimizde bir veri bulunmamaktadır.

Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi’nde 2001-2002 yılları arasında yapılan bir çalışmada, MRSA izolatlarının %40’a yakın bir bölümünün aynı PFGE paternine sahip tek bir klondan kaynaklandığı ve bu klonun özellikle cerrahi servislere yaygın olduğu belirlenmiştir (26). Kayseri’den 2004 yılında yayınlanan bir çalışmada, kan kültüründe etken olarak saptanan 177 adet MRSA suşu PFGE ile değerlendirilmiş ve %76’sının tek bir klona ait olduğu belirlenmiştir (1). Ülkemizde MRSA ile ilgili olarak yapılan çalışmaların sonuçları gözününe alındığında, çok merkezli ve EMSRA klonlarıyla genetik yakınlığın değerlendirileceği çalışmaların planlanmasının ve aynı zamanda enfeksiyon kontrol önlemlerine daha fazla dikkat edilmesinin gerektiği görülmektedir.



Vankomisin dirençli enterokok (VRE)

Enterokokların hastane ortamında kolaylıkla yaşayabilen mikroorganizmalar olmalarının en önemli nedeni, sık kullanılan bir çok antibiyotige karşı intrinsik direnç taşımaları ve kullanımda olan pek çok antibiyotige karşı direnç geliştirebilme (mutasyon veya plazmid/transpozon aracılığıyla genetik materyal transferi) özelliğine sahip olmalarıdır. Kısa bir süre öncesine kadar, çoklu dirençli enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde en güvenilir olarak kullanılan antibiyotigin vankomisin olmasına rağmen, 1980'lerin sonundan başlayarak Avrupa ve özellikle ABD'den VRE'ye bağlı çok sayıda hastane epidemisi bildirilmiştir. Günümüzde enterokoklarda VanA'dan VanE'ye kadar olmak üzere beş değişik tipte vankomisin direnci tanımlanmıştır (4, 7).

VRE epidemilerinin erken dönemde saptandığı hastanelerde, genellikle tek bir klonun hakim olduğu dikkati çekmektedir. Moleküler tiplendirme sonuçları vankomisin direncinin genellikle transpozon ya da plazmidler aracılığıyla çok sayıda değişik klona transfer edildiğini göstermektedir. ABD ve Avrupa'da VRE epidemiyolojisi yönünden bazı önemli farklılıklar bulunmaktadır. ABD'de yapılan çeşitli çalışmalarda, hastane dışında VRE kolonizasyonunun sık görülmediği ve bunun daha çok nozokomiyal bir sorun olduğu saptanmış ve VRE gastrointestinal taşıyıcılarının ana rezervuar olduğu, bunun yanı sıra hastane personeli ve tıbbi cihazların da VRE geçişindeki rollerinin yadsınamayacağı belirtilmiştir (15). Avrupa ülkelerinde ise, çeşitli hayvan kaynaklarından ve lağımdan oldukça sık oranda VRE izolasyonu yapıldığı belirlenmiştir. Avrupa'da saptanan bu sıklığın, bu ülkelerde kullanılan glikopeptid içeren hayvan yemleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (22). Son yıllarda yapılan çalışmalar VRE suşlarının sadece belirli bir hastane bünyesinde kalmayıp farklı coğrafi bölgelerdeki hastaneler arasında da yayılabildiğini göstermiştir.

VRE yayılımını önleyebilecek kontrol önlemlerinin alınabilmesi için epidemiyolojisinin iyi anlaşılması gerekmektedir. vanA ve vanB ilişkili genler bazı diğer Gram pozitif bakterilerde de saptanmış ve bu genlerin enterokoklara horizontal transferle geçmesi olabileceği ileri sürülmüştür. Bu sonuca göre VRE yayılımında, klonal yayımdan çok horizontal gen transferi yoluyla yayılım daha etkili görünmektedir. vanA geni, Tn1546 transpozonunda olup sıklıkla konjugatif plazmid içinde bulunmaktadır. vanB ise Tn1547 konjugatif transpozonunda yer almaktadır (7).

Bir hastanede VRE ortaya çıkışının, tek bir suşun yayılımından mı yoksa farklı klonların aynı anda var olmasından mı kaynaklandığını saptamak önem taşımaktadır. VRE epidemiyolojisine yönelik olarak antibiyotik duyarlılık profillerine göre yapılan değerlendirmeler, bu suşların çoğunun çoklu dirençli olmaları nedeniyle yeterli olmamaktadır. VRE suşları arasındaki klonal yakınlığı ortaya koymak için ribotiplendirme, plazmid analizi, PFGE, AP-PCR, IS6770 "insertion sequence"a veya vanA ve vanB genlerine yönelik problemlerle hibridizasyon gibi çok çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında PFGE ve plazmid analizine dayalı bir kombinasyonun en doğru sonuçları verdiği belirtilmektedir (7).

Avrupa'dan 27 ülkeden 49 merkezin katıldığı ve 4208 VRE izolatının değerlendirildiği bir çalışmanın sonuçlarına göre, VRE oranı Avrupa'da oldukça düşük (%2.2) olup, vanA/vanB izolatları sık değildir. VRE izolatlarının %75'i vanC genotipi içermekte ve özellikle hastanede yatan çocuk olguların gastrointestinal sistemlerinden izole edilmektedir. vanC'ye bağlı vankomisin direnci en sık Türkiye ve Litvanya'dan izole edilen enterokoklarda saptanmıştır (22).

Ülkemizde VRE ilk kez 1998'de Antalya'da saptanmıştır. VRE genotipleri ile ilgili olarak yapılan çalışmalar incelendiğinde 2001'de Ankara GATA'dan vanA1/vanA2 direnç genleri saptanan bir E.faecium, Antalya'dan 2002'de yine vanA genotipinde olup Tn1546 taşıyan bir plazmid ile yayılım gösteren beş adet farklı E.faecium saptandığı görülmektedir (2, 9). Hastanemizde 2000-2003 yılları arasında riskli ünitelerde yatan olgulardan alınan sürveyans örneklerinin değerlendirildiği bir çalışmaya göre, izole edilen tüm VRE izolatları vanA genotipinde olup, PFGE ile 3 majör klon belirlenmiştir. Bu klonların özellikle beyin cerrahi ve dahiliye yoğun bakım ünitelerinde daha yaygın olması dikkat çekicidir (8).

Çeşitli moleküler yöntemlerin uygulanıyor olması enterokok izolatlarının ayrımı konusunda şansımızı oldukça artırmakta ve özellikle hastane enfeksiyon kontrolü açısından yeni bir bakış getirmektedir.



Penisilin dirençli *Streptococcus pneumoniae* (PRSP)

İlk kez 1967'de Avustralya'da penisilin dirençli pnömokokların belirlenmesinin ardından, pnömokoklarda penisilin direnci tüm dünyada sorun olmaya başlamıştır. Penisiline direnç oranları her ülkede ve ülkelerin değişik coğrafik bölgelerinde farklılık göstermekle birlikte Uzak Doğu, İspanya, Macaristan, Güney Afrika ve ABD'nin pek çok bölgesinde yüksek düzeydedir (16, 21). Dirençli pnömokokların ülkeden ülkeye, hatta kıtadan kıtaya yayılımı bu sorunu daha da ciddi boyutlara taşımıştır. Dirençli pnömokokların yayılımı, direnç genlerinin aktarımı ile bakteriler arasında (horizontal yayılım), ya da suşlar aracılığıyla bireyler ve toplumlar arasında (klonal yayılım) olabilmektedir. Direncin yüksek olduğu ülkelerin, dirençli suşların diğer ülkelere yayılımı açısından kaynak rolü oynadıkları düşünülmektedir.

Dirençli pnömokokların epidemiyolojisini aydınlatmaya yönelik ilk çalışmalar serotiplendirmeye başlamış, ancak kapsül serotip genlerinin transformasyon yoluyla sıklıkla suşlar arasında transfer olması, bu yöntemin yeterli özgüllükte olmadığını ortaya koymuştur.

Bu noktadan sonra epidemiyolojik tiplendirme amacıyla moleküler yöntemlere yönelinmiş, PBP1A, PBP2B ve PBP2X genlerine yönelik PBP analizi, BOX-PCR, PFGE ve MLST gibi yöntemler suşların genetik yakınlığını saptamak için kullanılmıştır (16, 32). Farklı ülkelerde yapılan geniş çaplı moleküler tiplendirme çalışmaları, dirençli bazı pnömokok suşlarının ülkeler hatta kıtalararası yayıldığını ortaya koymuştur. Bu klonların dünya çapında standart olarak tanımlanması, isimlendirilmesi ve yayılımın izlenebilmesi amacıyla 1997 yılında "Pneumococcal Molecular Epidemiology Network" (PMEN) adı altında bir organizasyon kurulmuştur. Bu ağ içinde klonlar PFGE, BOX-PCR ve MLST paternleri temel alınarak tanımlanmakta ve genetik yakınlık belirlenmektedir (16). PMEN tarafından 2003 yılı Ekim itibariyle tanımlanan toplam 26 adet dirençli pnömokok klonu bulunmaktadır (20). Tanımlanan ilk klon Spain23F-1 olup, ilk kez 1980'de İspanya'da izole edilmesini takiben daha sonra ABD, Güney Afrika, İngiltere, çeşitli Avrupa ülkeleri ve Uzak Doğu'da da saptanmıştır. Bu epidemik klonun serotip 19F, 14, 19A, 9N, 3 ve serogrup 6 varyantları da çeşitli ülkelerde gösterilmiştir. Bir diğer epidemik klon Spain9V-3 klonu olup, ilk kez İspanya ve Fransa'da saptanmış, takiben kendisi ve serotip 14, 9A ve serogrup 19 varyantları pek çok Avrupa ülkesi, ABD, Güney Amerika ve Uzak Doğu'da da izole edilmiştir (16).

Belirlenen klonların yeni klonlar mı oldukları yoksa önceden tanımlanan klonlardan mı geldikleri konusunda PFGE ve BOX-PCR yetersiz kalabilmektedir. Bu amaçla PFGE paternleri bir klonla ilişkili bulunan suşlar MLST yöntemiyle tiplendirilmektedir. MLST, pnömokoklarda bulunan yedi adet belirli gen lokusunun allelik profillerini ortaya çıkararak üst düzey bir tiplendirme sağlamaktadır. PRSP suşlarının lokal moleküler epidemiyolojik tiplendirmesi için PFGE yeterli olurken, PMEN tarafından belirlenen epidemik klonlarla ilişkilerinin ortaya konabilmesi içinse MLST uygulanması gerekmektedir.

Ülkemizde penisiline azalmış duyarlılık gösteren pnömokok oranı farklı merkezlerde %29-40 arasında değişmektedir. Türkiye'den altı merkezden toplam 108 adet penisilin dirençli *S.pneumoniae* suşunun PFGE paternlerinin değerlendirildiği bir çalışmada, suşların 15 PFGE paterninde toplandığı, klonal bir yayılımın söz konusu olduğu ancak direnç yayılımını açıklayacak tek nedenin klonal yayılım olmadığı sonucuna varılmıştır (13).

Hastanemizde çocuk ve erişkin hastalardan enfeksiyon etkeni olarak izole edilen 89 adet PRSP suşunun BOX-PCR, PFGE ve MLST yöntemleriyle tiplendirilmesi sonucunda, suşların bir bölümünün PMEN tarafından tanımlanan Spain9V-3, CSR19A-11, Portugal 19F-21 ve Spain23F-1 ile aynı veya yakın ilişkili olduğu, sekiz adet serotip 23B suşunun da daha önceden tanımlanmayan dirençli yeni bir klon olarak tanımlandığı saptanmıştır (19, 27). Bu çalışma ile ilk kez, uluslararası klonlardan bazılarının Türkiye'de de pnömokok direncinin yayılımında rolü olduğu gösterilmiştir.

Pnömokoklarda bir diğer direnç sorunu makrolid direnci olup, bu dirençten sorumlu başlıca mekanizmalar, erm(B) genine bağlı ribosomal metilasyon ve mef(A) genine bağlı atım pompasıdır. Bunların yanı sıra L22 ve L4 ribozomal proteinlerinde mutasyonlar da makrolid dirençli suşlarda bildirilmektedir. ABD, Kanada ve Japonya'da makrolid direnci daha çok mef(A) geni varlığına bağlıyken, Avrupa'da direnç %80-85 oranında erm(B) geni varlığına bağlıdır. Ankara Hacettepe ve Kayseri'de bu konuyla ilgili olarak yapılan çalışmalar, Avrupa sonuçları ile uyumlu olarak bizde de makrolid direncinin daha çok erm(B) genine bağlı olduğunu göstermektedir (28).



Mycobacterium tuberculosis

Tüberkülozun yayılmasını engelleyecek etkin kontrol önlemlerinin alınabilmesi için izolatlar arasındaki klonal ilişkinin ortaya çıkarılması gerekmektedir. Moleküler tekniklerin gelişmesiyle birlikte *M.tuberculosis*'in filogenetik özellikleri ve yayılma dinamikleri daha iyi anlaşılabilir hale gelmiştir. Tüberküloz salgınlarında bulaşın tanımlanması, reaktivasyon ve reenfeksiyon ayrımı, laboratuvar kontaminasyonunun belirlenmesi, farklı izolatların moleküler benzerliklerinin araştırılması ve dirençli suşların yayılımının gösterilmesi moleküler epidemiyolojik yöntemlere dayanmaktadır (6, 33).

M.tuberculosis genomunun tamamı tanımlanmış olup, genomda sınırlı sayıda sessiz nükleotid değişimleri görülmektedir. Genom üzerinde saptanan farklı "insertion sequence" (IS) elementlerinin genetik polimorfizm oluşturdukları ve bu nedenle farklı suşlar arasındaki ayırmada kullanılabilecekleri kabul edilmektedir. *M.tuberculosis*'in moleküler düzeyde tiplendirilmesi için IS6110 RFLP yöntemi standart yöntem olarak kabul edilmektedir (34).

IS6110'un genomdaki sayısı tür ve suşa bağlı olarak değişmektedir. Bazı toplumlarda IS6110 kopya sayısı çok düşük olduğundan yeterli polimorfizm sağlanamamakta ve IS6110 tipleme yöntemi yetersiz kalmaktadır. PGRS-RFLP bu durumlarda *M.tuberculosis* suşlarının tiplendirilmesinde sekonder yöntem olarak kullanılmaktadır. PGRS tüberküloz kompleksinde en çok bulunan tekrarlanan element olup, pTBN12 plazmidini içindedir. PGRS-RFLP bu plazmidin prob olarak kullanıldığı tipleme yöntemidir (5).

IS6110-RFLP, tüberkülozun uluslararası epidemiyolojisinin çalışılması için standart metod olarak kabul edilmektedir. PGRS-RFLP, IS6110 ile aynı grup içinde tanımlanan suşlar arasındaki benzerliği doğrulamak veya düşük kopyalı suşları tiplendirmek için önerilmektedir. Lokal salgın araştırmalarında ve laboratuvar içi çapraz bulaşın değerlendirilmesinde IS6110-RFLP kullanılmakla birlikte, zaman alıcı bu yöntemin yerine daha basit ve hızlı yöntemler olan spoligotiplleme (kromozomdaki "direct repeat", DR lokusundaki polimorfizme dayalı) veya MIRU (mycobacterial interspersed repetitive units) bazlı tipleme yöntemleri tercih edilmektedir (6, 32).

IS6110-RFLP yöntemine dayanarak gerçekleştirilen uluslararası çalışmalar, Çin'den kaynaklanan W-Beijing genotipinin en sık saptanan *M.tuberculosis* genotipi olduğunu ve bu genotipin daha sonra Rusya, çeşitli Asya ülkeleri ve hatta Kuzey Amerika'da da yaygın olduğunu ortaya çıkarmıştır (3).

Ülkemizde tüberküloz moleküler epidemiyolojisi ile ilgili olarak yapılan ve yedi coğrafi bölgeden 320 izolatın IS6110-RFLP ve pTBN12 yöntemleriyle değerlendirildiği çalışmanın sonuçları, *M.tuberculosis* suşları arasında yaklaşık %50 oranında bir kümeleşme varlığını ve bu kümelerdeki olguların çoğunun birbirleriyle ilişkilerinin olduğunu ortaya koymuştur (10). Bu durum da, ülkemizde tüberküloz açısından daha etkin kontrol önlemlerinin alınması gerektiğini vurgulamaktadır.

Tüberküloz dışı mikobakterilerin (MOTT) türlerinin saptanması, mikobakteri enfeksiyonlarının epidemiyolojisi hakkında bilgi edinilmesi açısından önem taşımaktadır. Mikobakterilerde bulunan hsp65 geninin RFLP yöntemiyle incelenmesi mikobakteri tiplendirmesinde kullanılan bir yöntemdir. Hastanemizde bu yöntemeye dayalı olarak yapılan tiplendirme sonuçlarına göre MOTT türleri içinde en sık izole edilen tür *M.gordoniae*'dir.

Diğer bakteriyel etkenler

Yukarıda adı geçen bakterilerin yanı sıra, ülkemizde özellikle hastane enfeksiyon etkeni olarak saptanan *P.aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *S.maltophilia* izolatlarının moleküler epidemiyolojisinin aydınlatmaya yönelik olarak yapılan çeşitli çalışmalar ve yine hastane enfeksiyon etkeni olarak saptanan Gram negatif bakterilerde özellikle genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların (GSBL) türlerine ve genetik ilişkilerine yönelik olarak düzenlenen farklı çalışmalar dikkati çekmektedir (14, 29). Ülkemiz için ciddi bir problem olan *Salmonella typhi* moleküler epidemiyolojisine yönelik olarak Diyarbakır yöresinde yapılan bir çalışmada, izolatların poliklonal özellikte PFGE paternleri gösterdikleri saptanmış, ancak bazı hasta-hasta ve hasta-çevre izolatları arasında genetik yakınlığın belirlenmesinin, *S.typhi* bulaşı açısından önem taşıdığı belirtilmiştir (12).



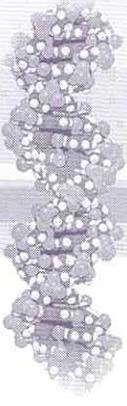
Moleküler epidemiyolojik çalışmalar aynı zamanda, reenfeksiyon ile relaps ve kontaminasyon etkeni ile enfeksiyon etkeni ayırımında ve laboratuvarın dirençli bakterilerle kontaminasyonunun incelenmesinde de kullanılmaktadır. Örneğin, kistik fibrozis olgularının kronik *P.aeruginosa* enfeksiyonları yönünden izleminde, yeni bir suşla enfeksiyonun ya da hastalar arası çapraz bulaşın aydınlatılmasında AP-PCR sıklıkla başvurulan yöntemlerden biridir (29).

KAYNAKLAR

1. Aygen B, Yörük A, Yıldız O, et al. Bloodstream infections caused by *Staphylococcus aureus* in a university hospital in Turkey: clinical and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microb Infect* 2004, 10: 309-314.
2. Başustaoğlu A, Aydoğan H, Beyan C, Yalçın A, Ünal S. First glycopeptide resistant *Enterococcus faecium* isolate from blood culture in Ankara, Turkey. *Emerg Infect Dis* 2001, 7: 1-2.
3. Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, Kreiswirth BN. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol* 2002, 10: 45-52.
4. Boyce JM, Opal SM, Chow JW, et al. Outbreak of multidrug resistant *Enterococcus faecium* with transferable VanB class vancomycin resistance. *J Clin Microbiol* 1994, 32: 1148-1153.
5. Chaves F, Yang Z, el Hajj H, et al. Usefulness of the secondary probe pTBN12 in DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1996, 34: 1118-1123.
6. Collins TA, Gascoyne-Binzi DM, Hawkey PM. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* : does it help in understanding the epidemiology of tuberculosis. *Rev Med Microbiol* 2002, 13: 119-127.
7. Çetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev* 2000, 13: 686-707.
8. Çetinkaya Y, Zarakolu P, Altun B, et al. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in a Turkish University Hospital. The Society for Healthcare Epidemiology of America, 14th Annual Scientific Meeting, April 17-20 2004, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
9. Çolak D, Naas T, Günseren F, et al. First outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital in Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2002, 50: 397-401.
10. Durmaz R, Günel S, Yang Z, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2003, 9: 873-877.
11. Enright MC, Day NPJ, Davies CE, et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000, 38: 1008-1015.
12. Hoşoğlu S, Loeb M, Geyik MF, et al. Molecular epidemiology of invasive *Salmonella typhi* in southeast Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2003, 9: 727-730.
13. Kocagöz S, Gür D, Altun B, et al. Epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Turkey. 40th ICAAC, 2000, Canada, Abstract: 1813.
14. Köseoğlu Ö, Gülmez D, Altun B, Gür D, Şener B. *Stenotrophomonas maltophilia* as a nosocomial pathogen. 43rd Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Sep.14-17 2003, Chicago, Illinois, USA.
15. Mato R, deLancastre H, Carraher M, et al. Multiplicity of genetic backgrounds among vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates recovered from an outbreak in a New York city hospital. *Microb Drug Resist* 1996, 2: 309-317.
16. McGee L, McDougal L, Zhou J, et al. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the Pneumococcal Molecular Epidemiology Network. *J Clin Microbiol* 2001, 39: 2565-2571.
17. Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, et al. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol* 2003, 41: 1574-1585.
18. Oliveira DC, Tomasz A, deLancastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* 2002, 2: 180-189.
19. Pınar A, Köseoğlu Ö, Şener B, Yenişehirli G. Molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a university hospital, Ankara, Turkey. *Clin Microb Infect* 2004, (baskıda).
20. Pneumococcal Molecular Epidemiology Network, Proceedings of the 7th Meeting, 14 Sep. 2003, Chicago IL, USA.
21. Richter SS, Heilmann KP, Coffman SL, et al. The molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 1994-2000. *Clin Infect Dis* 2002, 34: 330-339.



22. Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF, et al. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000, 19: 816-822.
23. Shopsin B, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2001, 7: 323-326.
24. Stefani S, Agodi A. Molecular epidemiology of antibiotic resistance. *Int J Antimicrob Agent* 2000, 13: 143-153.
25. Stefani S, Varaldo PE. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2003, 9: 1179-1186.
26. Şahin GÖ, Altun B, Kocagöz S, et al. Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesinde metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarının moleküler karakterizasyonu. 4.Ulusal İç Hastalıkları Kongresi, 25-29 Eylül 2002, Kemer, Antalya, P230.
27. Şener B, McGee L, Pınar A. Genomic backgrounds of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Ankara, Turkey: Identification of emerging clones. (Unpublished data).
28. Şener B, Köseoğlu Ö, Gür D, Bryskier A. Mechanisms of macrolide resistance in clinical pneumococcal isolates in a university hospital, Ankara, Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2004, (baskıda).
29. Şener B, Köseoğlu Ö, Özçelik U, Kocagöz T, Günalp A. Molecular epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Int J Med Microbiol* 2001, 291: 387-393.
30. Van Belkum A, Struelens M, De Visser A, et al. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 2001, 14: 547-560.
31. Van Belkum A, Van Leeuwen W, Verkooyen R, et al. *Staphylococcus aureus* among Turkish hospitals. *J Clin Microbiol* 1997, 35: 978-981.
32. Van Belkum A. High-throughput epidemiological typing in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect* 2003, 9: 86-100.
33. Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993, 31: 406-409.
34. Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med* 2001, 249: 1-26.



MANTARLARA YÖNELİK MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİK ÇALIŞMALAR

Cafer EROĞLU

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Samsun

Epidemiyoloji hastalıkların toplumda sıklık ve yaygınlığını araştırır. Bir infeksiyon hastalığına toplumda yakalanma riski etkene, konağa, toplumun davranışlarına, çevre ve ekolojik faktörlere bağlıdır. Hastalıkların gelişimi epidemiyoloji sayesinde kantitatif olarak ölçülebilmesi ile hastalıkların doğası daha iyi anlaşılmiş ve onların kontrolü yönünde önemli bir adım atılmıştır. Epidemiyoloji; hastalıkların etyolojisinde mikroorganizmaların rolünün aydınlatılmasında, hastalığın çevresel faktörleri ile etkenin ilişkisini anlamamızda, konak duyarlılığının saptanması ve bulaş yollarının belirlenmesinde, aşı ve ilaçların denenmesinde büyük rol almıştır (1-3).

Geleneksel epidemiyoloji klinik hastalığın raporlanmasına dayanır. Daha sonraları geçirilen hastalığa bağlı gelişen serum antikollarının ortaya konması daha kesin sonuçlar verdiği görülmüştür. Serolojik testlerle klinik gözlemin korelasyonu klinik ve subklinik infeksiyonların oranının tespitini sağlamıştır. Seroepidemiyoloji halk sağlığı açısından son derece önemlidir. Seroepidemiyoloji bir hastalığın sıklığının, eradikasyon ve aşılama programlarının belirlenmesinde, coğrafi yayılımın, ortaya çıkma veya yeniden önem kazanmanın saptanması açısından önemlidir (1-3).

Moleküler Epidemiyoloji

Moleküler epidemiyoloji terimi moleküler biyolojik metotların hastalıkların epidemiyolojisinin araştırılması için kullanılmasını ifade etmektedir. 1950'li yıllarda DNA molekülünün çift sarmal yapısının ortaya konmasından sonra moleküler biyolojik testlerle ilgili çalışmalar çok hızlanmıştır. Bunun sonucunda da giderek daha hassas moleküler testler ortaya konmuştur. Moleküler biyolojik testler yoğun şekilde hastalıkların ortaya konmasında ve birbirinden ayrılmasında kullanılmıştır. Özellikle DNA ve RNA'nın moleküler biyolojik testlerle manipüle edilebilmesi moleküler epidemiyolojiye büyük katkı sağlamıştır. Daha sonra hibridizasyon ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) gibi moleküler yöntemlerin ortaya konması moleküler epidemiyoloji olarak bildiğimiz alt dalın oluşmasını sağlamıştır. Bu gün günümüzde bütün hastalıkların moleküler epidemiyolojisinin ortaya konması hastalıkların tanı, tedavi ve önlenmesine büyük katkı sağlamıştır (1,4).

Moleküler epidemiyoloji özellikle üretilmesi nispeten zor olan virüsler gibi mikroorganizmaların epidemiyolojinin aydınlatılmasında büyük fayda sağlamıştır. Ayrıca moleküler viroloji hassas hızlı ve sofistike metotlar sağlayarak virüs genomunun araştırılmasını ve farklılıkların ortaya koymasını sağlamıştır (3). Moleküler epidemiyoloji önceden viral genomun araştırılmasını ve farklılıkların ortaya konmasını gerektirir. Moleküler epidemiyolojik tekniklerle elde edilen genom bilgisi ile virüslerin nereden kaynak aldıkları ve gelecekte ortaya çıkacak epidemiler ve hastalıklar hakkında bilgi sağlanabilir. Genetik epidemiyolojik metotlarla virüslerin orijini ortaya konabildiği gibi gelişen mutasyonlarla virüslerin değişimi ve hatta antivirallere karşı gelişen dirençte ortaya konup izlenebilmektedir. Moleküler epidemiyolojik metotlarla virüslerin alt tiplerinin tayini ve bunların yaygınlığı ve hangi konakları etkilediği gösterilebilir. Ayrıca virüslerin toplumdaki değişimleri, bulaş yolları ve yaygınlığı ortaya konabilir (1-4).

Genotiplerin dağılımı, risk grupları, yaş ve tedaviye yanıt gibi faktörler toplumdan topluma değişiklik göstermektedir. Ülkemizdeki ilk moleküler epidemiyolojik çalışmalar 80'li yıllarda başlamasına rağmen asıl yoğun çalışmalar PCR'nin otomatize hale gelmesiyle 90'lı yıllarda yapılmıştır (5).

Ülkemizde yapılan viral moleküler epidemiyolojik çalışmalar ağırlıklı olarak hepatit virüsleri ile ilgilidir. Ülkemizdeki hepatitis C virus (HCV) genotiplerinin belirlenmesi için yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar tablo 1'de gösterilmiştir. Çeşitli hasta gruplarında (kronik hepatit, hemodiyaliz hastaları ve kan donörleri) yapılan çalışmaların sonuçları birbirine paralel olup genotip 1 (özellikle genotip 1b) en büyük kısmı oluşturmaktadır (6-20). Genotip 1'in interferon tedavisine en kötü yanıt verdiği bilinmektedir.



Tablo 1. Ülkemizde HCV genotipleri ile ilgili yapılmış çalışmalar

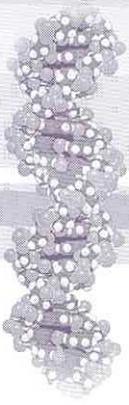
| Araştırmacı | Kaynak | Yıl | Sayı | Genotip % | | | | | | | |
|-------------|--------|------|------|-----------|------|------|------|-----|------|------|------|
| | | | | 1a | 1b | 2a | 3a | 4 | K* | T** | D*** |
| Abacıoğlu | 6 | 1995 | 89 | 19 | 75 | 3 | | 2 | | | |
| Bozdayı | 7 | 1996 | 60 | 12 | 80 | 5 | 1.5 | 1.5 | | | |
| Sönmez | 8 | 1996 | 59 | | 70 | | | | 5 | 25 | |
| Tuncer | 9 | 1996 | 58 | 21 | 72 | 5 | | | | | 2 |
| Türkoğlu | 10 | 1996 | 79 | 8.8 | 46.8 | | 5 | | 14 | 25 | |
| Uzunlumoğlu | 11 | 1996 | 37 | 5.4 | 83.7 | | | | | | 10.8 |
| Ülgen | 12 | 1996 | 6 | | 100 | | | | | | |
| Arslan | 13 | 1998 | 59 | 16.9 | 57.6 | | - | | 5.1 | | 20.3 |
| | | | 45 | 17.7 | 66.6 | | 4.4 | | 6.6 | | 4.4 |
| Akkız | 14 | 1999 | 118 | 8.8 | 88 | 1 | | 1 | | | |
| Yalçın | 15 | 1999 | 28 | | 100 | | | | | | |
| Eyigün | 16 | 2000 | 30 | 10 | 90 | | | | | | |
| Şahin | 17 | 2000 | 58 | 3 | 93 | | | | 3 | | |
| Tülek | 18 | 2000 | 33 | 57.5 | 57.5 | 18.1 | 6 | | | 15.1 | 3 |
| | | | 35 | 51.4 | 51.4 | 5.7 | 11.4 | | 11.4 | 11.4 | |
| Bozdayı | 19 | 2002 | 36 | 22 | 78 | | | | | | |
| Erensoy | 20 | 2002 | 50 | 30 | 60 | | | | 10 | | |

*K: karışık genotipler, **T: tiplendirilemeyen, ***D: diğer genotipler

HCV ile ilgili bu çalışmaları daha sonraki yıllarda Hepatit B virüsü (HBV), hepatit D (Delta) virüsü, TT virüsü (TTV) ve hepatit G virüsü (HGV) ile ilgili moleküler epidemiyolojik çalışmalar izlemiştir. HBV ile ilgili genotip çalışmaları dünyada olduğu gibi ülkemizde de son yıllarda artmıştır. Özellikle farklı genotiplerin, oluşacak hastalık tablosunu farklı biçimlerde etkileyip etkilemediği; tedaviye yanıtta, genotipler arasında fark olup olmadığı; ya da kronikleşme eğiliminin, bazı genotipler için daha büyük olasılıkla söz konusu olup olmadığı araştırılmaktadır. Genotiplerin anti HBe Ag serokonversiyon oranını, precore ve core promoter bölgesindeki mutasyonları ve hastalığın ciddiyetini etkilediği gösterilmiştir (21). Dünya'da yapılan genotipleme çalışmalarının bazılarında, genotipler ile patogenez arasında ve tedavi yanıtı açısından fark olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bazı genotiplerde (genotip D) belli bölgedeki mutasyonların (pre cor gibi) daha sık görüldüğü bildirilmektedir. Genotiplerle ilgili yapılan yoğun çalışmalar sonucunda genotiplemenin gerekli olup olmadığı ortaya konacaktır (21).

Hepatit B virüsü; DNA dizi analizi, restriction fragment length polymorphism (RFLP), Line prob assay, genotip spesifik primerler ve ELISA ile A'dan H'ye kadar 8 genotipe ayrılabilir (21). Bu genotipler dünyada farklı bölgelerde farklı dağılım göstermektedir. Ülkemizde HBV genotipleri ile ilgili yapılan çalışmalarda % 79-100 arasında genotip D olarak tespit edilmiştir (22-33). Ülkemizdeki genotip dağılımı ile ilgili çalışmalar ve sonuçları tablo 2'de verilmiştir. Akut 158 ve kronik 88 hastada yaptığımız Türkiye'den 22 farklı merkezin katıldığı çalışmada ülkemizdeki baskın genotipin D olduğu gösterilmiştir (29,32).

Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda miks (ko-infeksiyon) genotiplerin aynı hastada bulunabildiği gösterilmiştir (34, 35). Miks genotiplerin ayrılması için Core RFLP and genotype specific probe assay (GSPA) metotları geliştirilmiştir (34,35). Bu metotlar kullanılarak yapılan çalışmalarda HBe Ag pozitif grupta miks infeksiyon % 67 bulunurken taşıyıcı grupta % 10.9 olarak saptanmıştır (34,35).



Biz HBV genotip D'nin pre-S1 bölgesindeki 33 bazlık delesyondan yola çıkarak yeni basit bir genotipleme metodu geliştirdik (36). Metodun temeli HBV genotip D'nin diğer genotiplerden yaklaşık 33 baz daha kısa olmasına dayanmaktadır. Tanımladığımız yöntemde tüm genotiplere spesifik primer çifti kullanıldığında Genotip D de yaklaşık 79 bazlık PCR ürünü elde edilirken diğer genotiplerde yaklaşık 112 bazlık ürün elde edilmektedir. Genotip D ve diğer genotipler arasındaki yaklaşık 33 bazlık bu fark agaroz jel elektroforezi ile kolaylıkla ayrılabilir. Çalışmamızda daha önceden RFLP metodu ile tiplendirilen 20 akut, 40 kronik HBV genotip D ve 4 HBV genotip A bu metotla birbirinden ayrılabilmiştir. Bu metotla aynı örnekte bulunan miks genotiplerinde (genotip D ve A gibi) birbirinden ayrılabilirdiği genotip D ve genotip A taşıyan örnekler belli oranlarda karıştırıldıktan sonra çalışılarak gösterilmiştir. Bu metot özellikle genotip D'nin prevalansının yüksek olduğu bölgeler (Akdeniz ülkeleri) için uygundur. Çoğu genotipleme metodu yeterli hassasiyete ulaşamazken bu metodun hassasiyeti 1000 kopya/ml civarındadır. Ayrıca bu metot ekstra alet gerektirmemekte klasik PCR alt yapısı olan her laboratuarda uygulanabilmektedir (36).

Tablo 2. Ülkemizde HBV genotipleri ile ilgili yapılmış çalışmalar

| Araştırmacı | Kaynak | Yıl | Sayı | Genotip % | | | | | Subtip ayw |
|---------------|--------|------|------|-----------|-----|---|---|----|------------|
| | | | | A | D | F | G | T* | |
| Türkyılmaz | 22 | 1999 | 83 | | | | | | 99 |
| Yarkin | 23 | 2000 | 16 | | | | | | |
| Bozdayı | 24 | 2001 | 67 | | 100 | | | | 100 |
| Türel | 25 | 2001 | 52 | | 100 | | | | |
| Uysal | 26 | 2001 | 48 | 10 | 79 | 5 | | 6 | |
| Gültaş | 27 | 2002 | 23 | | 100 | | | | |
| Külah | 28 | 2002 | 84 | | 100 | | | | 100 |
| Leblebicioğlu | 29 | 2002 | 158 | | 100 | | | | |
| Mısırlıoğlu | 30 | 2002 | | | 100 | | | | |
| Badur | 31 | 2003 | 106 | | 99 | | 1 | | |
| Sunbul | 32 | 2003 | 88 | | 92 | | | 8 | |
| Yalçın | 33 | 2004 | 73 | | 100 | | | | |

*T: tiplendirilemeyen

HDV sekans analizi ile üç genotipe ayrılmıştır. Genotip I bütün dünyada en yaygın olan tiptir (37). Özellikle Yunanistan, İtalya ve Afrika da genotip I yaygındır (37,38). Ülkemizde özellikle güney doğu Anadolu bölgesinde sık görülmesine rağmen HDV ile ilgili moleküler epidemiyolojik çalışmalar nispeten azdır. Şengezer ve ark.'nın 1999'da yaptıkları çalışmada 59 örnekte RT-PCR RFLP yöntemi ile tüm HDV tiplerinin genotip I oldukları gösterilmiştir (39). Bu sonucun diğer çalışmalarla doğrulanması gerekir. HDV genotiplerinin moleküler epidemiyolojik olarak izlenmesi viral geçişin ve kaynakların araştırılmasında faydalı olabilir (37-40).

HGV ile ilgili ülkemizde yapılan çalışmalarda HGV farklı hasta gruplarında % 2.5 ile % 53 arasında pozitif olarak saptanmıştır (41-51).

TT virüsü ile ilgili yapılan çalışmalarda TTV değişik hasta gruplarında %4 ile %80 arasında pozitif olarak saptanmıştır (52-56). İzmir ve İstanbul'dan toplam 39 izolatanın ORF nükleik asit dizi analizine göre, %64'ü tip 2, %36'sı tip 1; tip 2'lerin %88'i ise 2c olarak belirlenmiştir (57).

Aseptik menenjit etyolojisinde yer alan Echovirus'ların tiplerinin belirlenmesi için Uysal ve ark.'larının yaptığı çalışmada Echovirus 30'un en sık tip olduğu ortaya konmuştur (58).



Human papillomavirus tiplerinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda Human Papillomavirus tip 16 ve 18'in genital patolojilerde en yaygın tip olduğu gösterilmiştir (59).

Gastroenterit etkeni olan Adenovirüslerin Restriksiyon Endonükleaz Analizi ile tiplendirildiği çalışmada adenovirus izolatlarının %3.1' i tip 40 ve %2.1'i tip 41 enterik adenovirus olarak tanımlanmıştır (60). Ayrıca Adenovirus tip 5 için prob hazırlanmıştır (61).

Ülkemizde poliovirus eradike edilirken son periyotta izole edilen poliovirus'ların tiplerinin belirlenmesi amacıyla Özkaya ve ark.'larının yaptığı çalışmada tüm suşların poliovirus tip 1 olduğu gösterilmiştir (62).

Kızamık virusünün hala salgınlar yaptığı ülkemizde Yılmaz ve ark.'ları tarafından hasta materyalinden kızamık virüsü üretilerek RT-PCR ile doğrulanmıştır (63).

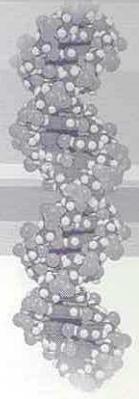
Sonuç olarak ülkemizde yapılan viral moleküler epidemiyolojik çalışmalar ağırlıklı olarak hepatit virüsleri ile ilgilidir. Ayrıca ülkemizde yapılan moleküler çalışmalar çok merkezli değildir ve nispeten küçük gruplarla yapılmıştır. Aile içi hepatit virüslerinin geçişini araştıran çalışmalarda genellikle ELISA kullanılmış moleküler testler kullanılmamıştır. Ülkemizde yapılan moleküler epidemiyolojik çalışmalar 90 yıllardan bu yana giderek artmış ve teknik imkanların artması ile son yıllarda DNA dizi analizi ile desteklenmeye başlanmıştır.

KAYNAKLAR

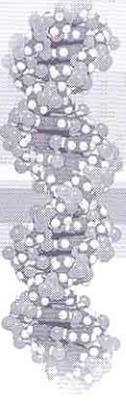
1. White DO, Fener FJ. Medical Virology. Epidemiology of Viral Infections. 4th ed. Academic Pres London 1994;233-255
2. Knipe DM, Howley PM. Molecular Epidemiology. in Fields Virology. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins 2001;385-386
3. Cann AJ. Principles of Molecular Virology. 2nd ed. Academic Pres London 1997
4. Strauss JH, Strauss EG. Viruses and Human Diseases. Academic Pres London 2002
5. Türkoğlu S, Çamurdan AP, Akış N, Badur S. İstanbulda Rota Virus Çocuk diyareleri Epidemiyolojisinin Virus Genom RNA'sı Elektroforezi ile Araştırılması. Mikrobiyoloji Bülteni 1993;27:93-99
6. Abacıoğlu YH, Davidson F, Tuncer S, Yap PL, Ustacelebi S, Yulug N, Simmonds P. The distribution of hepatitis C virus genotypes in Turkish patients. J Viral Hepat. 1995;2(6):297-301
7. Bozdayı AM, Uzunalimoğlu Ö, Bozkaya H, Karayalçın S, Yurdaydın C, Çetinkaya H, Aydoğan H, Arslan M, Özsan H. Türkiye'de kan donörlerinde hepatit C virüs genotipleri. Gastroenteroloji 1996, 7(1 Ek):10
8. Sönmez C, Taşyaran MA, Kızılkaya N, Korkut H, Tombul Z, Akçam Z, Yılmaz Ş, Köksal F, Leblebicioğlu H, Ekici H. Hepatit C Virüsü (HCV) ile İnfekte 59 Hastada HCV Genotiplerinin Dağılımı: Çok Merkezli Bir Çalışma. FLORA 1996;1(2):92-95
9. Tuncer S, Özkuyumcu C, Arıkan S. PCR ve hepatit C virüs genotipi ile serolojik reaktivite arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi. Viral Hepatit Derg 1996, 1:10-18
10. Türkoğlu S, Bozacı M, Bozfakioğlu S, Kaymakoğlu S, Badur S. İstanbul'da HCV genotiplerinin araştırılması. III.Viral Hepatit Simpozyumu Program ve Kongre Kitabı, İstanbul, 1996, s.16
11. Uzunalimoğlu Ö, Çetinkaya H, Bozdayı AM, Bozkaya H, Yurdaydın C, Karayalçın S, Dökmeci A. C hepatitli hastaların genotipleri, interferona cevapları. III.Viral Hepatit Simpozyumu Program ve Kongre Kitabı, İstanbul, 1996, s.18
12. Ülgen SK, Kalaycı C, Avşar M, Caner M, Özer A, Çırakoğlu B. Hepatit C Virüsünün Dizi Analizi ve Dot Blot Hibridizasyon Yöntemi ile Genotiplendirilmesi. Gastroenteroloji 1996; 7 (1 Ek): 13
13. Arslan H, Tunçbilek S, Hızal N, Boyacıoğlu S, Özdemir N, Haberal M. Hemodiyaliz ve hemodiyaliz dışı hastalarda HCV genotipinin dağılımı. Viral Hepatit Derg 1999, 2:127-130
14. Akkız H, Yıldız E, Pınarbaşı E, Işıksal F, Öksüz M, Öztürk M. Ülkemizde Hepatit C Virüs Genotipleri. III. Ulusal Hepatoloji Kongresi Program ve Kongre Kitabı, İstanbul, 27-29 Mayıs 1999, s.144
15. Yalçın K, Değertekin H, Akız H. Güneydoğu Anadolu'da HCV'ye Bağlı Kronik Hepatitlerde HCV Genotipleri. The Turkish Journal of Gastroenterology 1999;10(3):249-252
16. Eyigün CP, Turhan V, Şengül A, Orkunoğlu F, Avcı İY, Pahsa A. Türkiyede ve Avrupa ülkelerinde yaşayan Türklerdeki HCV Genotip Dağılımı. V. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu Program ve Kongre Kitabı, Ankara, 2000, s. P-C9



17. Şahin K, Durmaz R, Özerol İH. Line Prob Assay (LİPA) ile HCV Genotiplerinin Araştırılması. V. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu Program ve Kongre Kitabı, Ankara, 2000, s. P-C13
18. Tülek N, Taş E, Çağatay M, Mert A. Hemodiyaliz hastaları ve kronik hepatit olgularında hepatit C virüs prevalansı. *Viral Hepatit Derg* 2000, 1:8-11
19. Bozdayı G, Rota S, Verdi H, Derici U, Sindel S, Bali M, Basay T. The presence of hepatitis C virus (HCV) infection in hemodialysis patients and determination of HCV genotype distribution. *Mikrobiyol Bul.* 2002;36(3-4):291-300
20. Erensoy S, Göksel S, Akarca US, Özkahya M, Canatan D. Hepatit C Virüsünün Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürünlerinin Doğrudan Dizi Analizi İle Genotiplemesi. *FLORA* 2002;7(2):104-111
21. Chu, C.J., Lok, A.S., 2002. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. *Hepatology* 35, 1274-1276
22. Türkyılmaz AR, Bozdayı AM, Wend U, İbrahimioğlu D, Aydemir F, Bozkaya H, Gerlich W, Uzunalımoğlu Ö. Hepatit B Virüsü Taşıyan Hastalarda HBV Yüzey Geni Subtiplerinin Belirlenmesi. III. Ulusal Hepatoloji Kongresi Program ve Kongre Kitabı, İstanbul, 27-29 Mayıs 1999, s.45
23. Yarkin F, Hafta A. Hepatit v Virusu Taşıyıcılarında Prekor Tag Mutantının Prevalansı. V. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu Program ve Kongre Kitabı, Ankara, 2000, s. P-B56
24. Bozdayı AM, Bozkaya H, Türkyılmaz A R et al: Nucleotide divergences in the core promoter and precore region of genotype D hepatitis B virus in patients with persistently elevated or normal ALT levels, *J Clin Virol* 2001; 21: 91-101.
25. Türel F, Ertem D, Avşar E, Özdoğan O, Giral A, Kalaycı C, Aslan N, Bozdayı M, Tözün N. 4. Ulusal Hepatoloji Kongresi ve Uluslararası Falk Workshop. P: 31, June 14-16 2001 Istanbul, Turkey.
26. Uysal P, Oğuzoğlu N, Özer A. Restriksiyon Fragmen Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) ile HBV Genotip Tayini. 4. Ulusal Hepatoloji Kongresi ve Uluslararası Falk Workshop Program ve Kongre Kitabı, İstanbul, 14-16 Haziran 2001, s.170
27. Güldaş NŞ, Abacıoğlu YH. Hepatit B Virüs Genotiplerinin S geninin Nükleotit Dizi Analizi ve RFLP Yöntemleri ile Belirlenmesi. VI. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu, P: 23, 31 Ekim- 2 Kasım 2002, Ankara
28. Külah C, Yalınay MC. Hepatit B virus enfeksiyonu olan Türk hasta grubunda Hepatit b virus genotiplerinin DNA analizi yöntemi ile belirlenmesi. VI. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu, P: 88, 31 Ekim- 2 Kasım 2002, Ankara
29. H. Leblebicioğlu, C. Eroğlu, Hepatitis Study Group. Acute hepatitis B virus infection in Turkey: epidemiology and genotype distribution. *Clin Microbiol Infect* vol: 10, in press
30. Mısırlıoğlu M, Kayın E, Akman E, Tuncer S. Hepatitis B Virus Genotypes and Viral Load analysis in Pre and Post Vaccination Sera From Carrier Children. 2nd Molecular and Diagnostic Microbiology Congress. P: 152, Kemer, Antalya Turkey. April 21-25, 2002.
31. Badur S. Viral Hepatitlerin Tanısında Moleküler Biyoloji Teknikleri. In: Tekeli, E., Balık, İ. (Eds.), *Viral Hepatit. Viral Hepatitle Savasım Dernegi*, İstanbul, 2003.
32. Sunbul M, Leblebicioğlu H and Hepatitis Study Group. Distribution of Hepatitis B Virus Genotypes in Patients with Chronic Hepatitis B Infection in Turkey. 38th European Association for the Study of the Liver Conference. P:175, Ceneva, Switzerland 3-6 July 2003
33. Yalcin K, Degertekin H, Bahcecioglu IH, Demir A, Aladag M, Yildirim B, Horasanli S, Ciftci S, Badur S. Hepatitis B virus genotype D prevails in patients with persistently elevated or normal ALT levels in Turkey. *Infection*. 2004;32(1):24-9.
34. Hannoun, C., Krogsgaard, K., Horal, P., Lindh, M.,. The INTERPRED Trial Group 2002. Genotype mixtures of hepatitis B virus in patients treated with interferon. *J. Infect. Dis.* 186, 752-759.
35. Kato, H., Orito, E., Suguchi, F., Ueda, R., Koshizaka, T., Yanaka, S., Gish, R.G., Kurbanov, F., Ruzibakiev, R., Kramvis, A., Kew, M.C., Ahmad, N., Khan, M., Usuda, S., Miyakawa, Y., Mizokami, M., 2003. Frequent coinfection with hepatitis B virus strains of distinct genotypes detected by hybridization with type-specific probes immobilized on a solid-phase support. *J. Virol. Methods* 110, 29-35
36. Eroglu C, Leblebicioğlu H, Gunaydin M, Turan D, Sunbul M, Esen S, Sanic A. Distinguishing hepatitis B virus (HBV) genotype D from non-D by a simple PCR. *Journal of Virological Methods* 119 (2004) 183-187
37. Shakil AO, Hadziyannis S, Hoofnagle JH et al. Geographic distribution and genetic variability of hepatitis delta virus genotype. *Virology* 1997;234:160
38. Niro GA, Smedile A, Andriulli A et al. The predominance of hepatitis delta virus genotype I among chronically infected Italian patients. *Hepatology* 1997;25:728



40. Eroğlu C. Hepatit D Epidemiyolojisi. In: Tekeli, E., Balık, I. (Eds.), Viral Hepatit 2002 Deniz Ofset, 2002;237-239
41. Sünbül M, Günaydın M, Pekbay A, Leblebicioğlu H, Eroğlu C. Sağlık personelinde hepatit G sıklığı. *Viral Hepatit Derg* 2000;2:123-125
42. Pekbay A, Günaydın M, Esen Ő, Eroğlu C, Őetin M, Leblebicioğlu H. Őeřitli risk grupları ve sağlıklı toplumda hepatit G virusu prevalansının belirlenmesi. *Viral Hepatit Derg* 2000;1:58-61
43. Pekbay A, Őetin M, Bedir A, Saniĉ A, Günaydın M. HGV RNA'nin Saptanmasında Touchdown-PCR'nin Önemi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 2002;32(3-4):247-249
44. Ülgen Kip S, Avşar W, Ovalı E, et al. Kemik iliği transplantasyonu uygulanmış olgularda HGV seroprevalansı ve HGV enfeksiyonunun önemi. 14.UGK, 28 Eylül-3 Ekim 1997, Mersin, *Türk Gastroenteroloji Derg* 1997; 8 (suppl 1): A34
45. Avşar E, Ülgen Kip S, Yücelten D, et al. Hepatitis G infection in patients with lichen planus. Abstracts. World Congresses of Gastroenterology September 6-11, 1998, Vienna, Austria. *Digestion* 1988;59:282
46. Uzunalimoğlu Ö, Bozdayı AM, Bozkaya H, Őađsin S, Özkan H. Multipl transfüzyon yapılan hastalarda HGV RNA prevalansı. 13. UGK, 8-13 Ekim 1996, Antalya, *Türk Gastroenteroloji Derg* 1996;7(suppl 1): A34
47. Kocabaş E, Antmen B, Yarkın F, et al. Prevalence of GB virus C/hepatitis G virus infection in pediatric patients receiving multiple transfusions in Southern Turkey. *Turk J Pediatr* 1999;41:81-90
48. Hızal N, Boyacıoğlu S, Tunĉbilek S, et al. Hemodiyaliz hastalarında hepatitis G virus prevalansı ve bunun HCV RNA ile ilişkisi. II Ulusal Hepatoloji Kong 5-7 Haziran 1997, İstanbul Özet Kitabı 1997, A22
49. Günaydın M, Bedir A, Akpolat T, et al. Prevalence of serum HGV RNA among hemodialysis patients in Turkey. *Infection* 1997, 25:307-9
50. Özener C, Geyik G, Bihorac A, et al. Hepatitis G virus infection in patients on continious ambulatory peritoneal dialysis. European Renal Association European Dialysis and Transplant Association Annual Congress, Madrid, Spain 5-8 September, 1999, *Neprology Dialysis Transplantation* 1999. 14:2188
51. Özkahya M, Ok E, Ünsal A, et. al. Hepatitis G virus (HGV) does not cause liver disease in renal transplantation (RT). Abstracts. XXXVI Congress of the European Renal Association European Dialysis and Transplant Association September 5-8, 1999, Madrid, Spain: 387
52. Türkoğlu S. TTV'nin (Transfusion-Transmitted Virus) Farklı Hasta Gruplarında Araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 2001;31(3-4):259-262
53. Arslan H, Ergin F, Özdemir N, Arat Z, Tarakĉı Ö. Hemodiyaliz hastalarında TT virus DNA sıklığının araştırılması. Birinci Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, 24-27 Nisan 2000, Kapadokya, A37
54. Mıstık R, Usta M, Aydın Ö, et al. Hemodiyaliz, renal transplantı glomerulopati olgularla sağlıklı kişilerde TTV DNA prevalansı. 5. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu 5-11 Kasım 2000, Ankara
55. Gürbüz OA, Ülkar GB, Mert A: Kan vericilerinde ve hepatit B virus DNA, hepatit C virus RNA pozitif hastalarda TT virus prevalansı. *İnfeksiyon Derg* 2002; 16:91-5
56. Kocazeybek B. Etyolojisi saptanamayan ve klinik olarak post transfüzyon hepatit kuşkulu olgularda TT virusunun araştırılması. *İnfeksiyon Derg* 2002; 16:151-7
57. Erensoy S, Sayiner AA, Türkoğlu S, Canatan D, Akarca US, Sertöz R, Özacar T, Batur Y, Badur S, Bilgiĉ A: TT virus infection and genotype distribution in blood donors and a group of patients from Turkey. *Infection* 2002
58. Uysal G, Güven A, Özkaya E, Yılmaz N, Korukluoğlu G. Yaz Aylarındaki Aseptik Meninjitli Olgularda Etiyolojide Echovirus 30. *İnfeksiyon Dergisi* 2002;16(3):275-278
59. Bozdayı G, Biri A, Rota S. Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında Human Papillomavirus'un, Genital Biyopsi Örneklerinden PCR ile Hızlı Tanısı ve Tip Tayini için Yapılan Bir Ön Őalıřma. *Türkiye Klinikleri Jinekoloji-Obstetrik* 2002;12(6):463-465
60. Tuncer S, Ceyhan M, Yurdakok K, Karna G, Ustaĉelebi Ő. İnsan Adenovirüslerinin Restriksiyon Endonükleaz Analizi ile Tiplendirilmesi ve Çocuk Gastroenteritlerinde Enterik Adenovirüs Sıklığının Belirlenmesi. *Flora* 1997;2(3):195-207
61. Őevikbaş A. Adenovirus Tip 5 (Ad5)'in Üretilmesi, DNA'sının Saflaştırılması ve Probenun Hazırlanması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 1992;22(1-2):30-35
62. Ozkaya E, Ishiko H, Miura R, Shimada Y, Alaeddinoglu I, Artuk C, Miyamura K, Yamazaki S. Phylogenetic analysis of wild-type 1 polioviruses isolated during the final period of transmission in Turkey. *J Gen Virol.* 2004 Jun;85(Pt 6):1591-5
63. Yılmaz N, Artuk Ő, Taşyürek T. Türkiyede ilk kez Hasta Materyalinden Kızamık virusunun Doku Kültüründe Üretilmesi. *İnfeksiyon Dergisi* 2000;14:115-122



MANTARLARA YÖNELİK MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİK ÇALIŞMALAR

M. Ali SARAÇLI

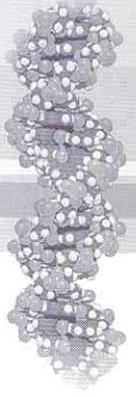
GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

İnvaziv fungal infeksiyonlardaki artış, fungal infeksiyonların önlenmesi ve tedavisinde yeni gelişmelere gereksinim doğurmuştur. Bu bağlamda, infeksiyonun diğer sağlıklı bireylerden veya çevreden ekzojen olarak mı kaynaklandığı, sadece tek bir köken tarafından mı oluşturulduğu, reinfeksiyon ya da reküran infeksiyon mu olduğu gibi bazı soruların cevaplanması gerekli olmaktadır [7]. Geleneksel yöntemler, tanısal mikrobiyolojide olduğunun aksine epidemiyolojik çalışmalarda genellikle yetersiz kalırlar ve çeşitli genotiplendirme yöntemlerine başvurulur [24]. Bazı fenotiplerin hem morfolojik hem de fizyolojik olarak birden fazla türde görülebilir olması ve yaşlanma veya kültür şartlarına bağlı olarak serotip ve biyotip gibi fenotipik karakteristiklerde görülen değişiklikler de epidemiyolojik açıdan yanıltıcı olabilmektedir. Örneğin, *Candida albicans* WO-1 kökeninde, beyaz-gri koloni dönüşümü geri dönüşümlü olarak ve kendiliğinden 10-3 sıklıkla ortaya çıkar ve özellikle fenotipe dayalı olarak gerçekleştirilen biyotiplendirme ve serotiplendirme çalışmalarında hatalı sonuçlara neden olur. Benzer fenotipik değişiklikler *C.glabrata*, *C.tropicalis* ve *Cryptococcus neoformans* için de bildirilmiştir [7]. Ancak, kromozom dışı genetik elemanlar olan plasmidler ve mini kromozomların da çok sabit olmadıkları, çevresel şartlara bağlı olarak kaybedilebilecekleri veya mutasyona uğrayabilecekleri akılda tutulmalı ve genotipik yöntemler de dikkatle yorumlanmalıdır [3, 24, 25]. Kimi zaman ise, salgına neden olan alt mikroorganizma popülasyonu, türün genel genomik yapısına çok yakın olabilir ve yeni moleküler teknikler bile farklılıklarının ortaya konmasında yetersiz kalabilirler [27].

Fungal genotiplendirme çalışmalarında değişik gen bölgeleri hedef olarak kullanılmaktadır. Bu bölgeler kitin sentaz ve beta-tubulin gibi protein kodlayan intron bölgeleri olabilecekleri gibi, rDNA gibi protein kodlamayan genler de olabilir. Ribozomal DNA gen bölgesinin seçilme sebepleri arasında; çoklu tekrar sayısı, bazı bölgelerinin çok iyi korunmuş, bazı bölgelerinin ise aşırı değişken oluşu sayılabilir. Ribozomal DNA gen bölgesinin 25 S ve 18 S bölgeleri sınırlı oranda değişikler ve sıklıkla taksonomik incelemelerde kullanılırlar. Buna karşılık, daha değişken olan Internal Transcribed Spacer (ITS) gen bölgeleri ise tanısal amaçlarla veya mikroevrimsel incelemeler için uygundur [8].

Fungal genotiplendirmede karşılaşılan sorunlar

Tıp literatüründe bakteri ve virüslerle ilgili genotipik çalışmalara daha sıklıkla rastlanmaktadır. Bu durumun nedenleri arasında mantarların ökaryotik yapıda olmalarının doğurduğu zorluklar önemlidir. Fungal genotiplendirmede karşılaşılan temel farklılıklar, ökaryotlarda görülen doğal rekombinasyonlardan, bazı fungal patojenlerin diploid yapı göstermeleri dolayısıyla ortaya çıkan allelik değişkenliklerden ve bazı mantarların dimorfik yapıda olmalarından doğmaktadır [24]. Ayrıca, *Ajellomyces capsulatus* gibi birçok mantar haploid (N) yapıda olup, seksüel ürerlerken, *C.albicans* ve *A.fumigatus* gibi bazı türler aseksüel ürerler. *Candida albicans* gibi bazıları diploid (2N), *C.neoformans* gibi bazı basidiomycetler dikaryon (N+N) ve bazı basidiomycetler ise konak vücudunda iken haploid yapıda olabilmektedirler. Seksüel üreme gösteren mantarların *Pseudallescheria boydii*, *Aspergillus nidulans* ve *Basidiobolus ranarum* gibi bazıları kendileri ile eşleşebilirken (homotalik), *Ajellomyces capsulatus*, *A. dermatitidis* ve *Filobasidiella neoformans* gibi türler farklı eşeylere gereksinim duyarlar, yani heterotaliktirler. Rekombinasyonlar, diğer ökaryotlarda olduğu gibi mantarlarda da "reassortment" veya "crossing over" yolu ile mayoz sırasında ortaya çıkarken, mantarlarda ilave olarak paraseksüalite olarak adlandırılan yolla, yani birbirine çok yakın genetik özelliklerdeki bireylerin vejetatif hifleri arasındaki birleşmeler yoluyla da mayoz dışı rekombinasyonlar olarak görülebilirler. Bu açıdan bakıldığında, homotalik seksüel üreme gösteren bir mantar rekombinal değil, aslında klonal bir üreme göstermiştir. Rekombinal üreme sonucunda klonal üremeden çok daha fazla farklılaşmanın ortaya çıkacağı kesindir. Ancak, ata hücreler ile yavru hücre arasındaki farklılık düzeyi sadece üremenin klonal veya rekombinal oluşu ile değil, aynı zamanda lokusların kromozom üzerindeki fiziksel yerleşimi ile de belirlenir. Bir diğer karmaşık nokta ise, aşırı değişken lokuslarda ortaya çıkan farklılaşmaların bir rekombinasyonu taklit edebilmeleridir [26]. Bu bilgilerin ışığında, aseksüel üreme gösteren bir fungus, klonal olarak çoğalacağından tek bir aşırı değişken lokusun incelenmesi yeterli epidemiyolojik bilgi sağlayabilirken, seksüel üreyen mantarda rekombinasyonlar görülecek ve genotiplendirmenin güvenilirliğini arttırabilmek için polimorfik tek lokus



yerine birden çok sayıda lokusun paralel olarak değerlendirilmesi gerekecektir [7, 15]. Yine, *C.albicans* dışındaki çoğu tıbbi öneme sahip mantarın haploid olması nedeniyle mantarlarda klonal/rekombinal üreme ayrımı için tek bir lokusun incelenmesi yeterli değildir. Haploid mantarlarda herhangi bir allelin var veya yok olduğunu ortaya koymak olası iken, diploid olanlarda homozigot/heterozigot ayrımı prob hibridizasyonu veya Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) gibi bir yöntem ile ortaya konamaz ve Hardy-Weinberg denkleminde başvurulur [7, 26]. Bu sebeplerle, medikal mikologların moleküler epidemiyolojik çalışmalara geçmeden önce, incelenen mantarın üreme şekli ve genomik özellikleri ile ilgili bilgi sahibi olmaları bir zorunluluktur.

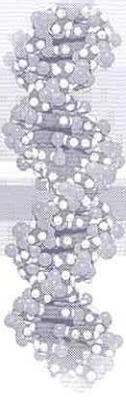
Fungal genotiplendirme çalışmalarının ilk basamağında yapılan genel hataların başında, kültür ortamındaki üremenin klonal olduğu ve tek bir genotipik köken içerdiği varsayımından yola çıkılmasıdır. Ancak, bu varsayım kimi zaman yanlıştır ve besiyerinde genotipik olarak farklı iki veya daha fazla sayıda kökeni bulunmaktadır. Çoklu köken taşıyıcılığının hasta yaşı ile birlikte arttığı da bildirilmiştir [13]. Bu nedenle, genotipleme çalışmaları öncesinde tek koloni ekimlerinin yapılması ve genotipik incelemelerin birden fazla koloni üzerinde gerçekleştirilmesi gerekli olmaktadır. Bir diğer önemli nokta ise örneklem sürecidir. Bu süreç olabildiğince kısa tutulmalıdır. Çünkü lokal bir bölgede yaklaşık beş yıllık bir süre içerisinde kökenlerde ortaya çıkabilecek mikroevrimsel değişimler, genomik olarak farklı kökenlerin varlığını düşündürecek kadar fazla olabilir [24]. Epidemiyolojik çalışmalarda önemli olan hususlardan bir diğeri, rekombinasyonların araştırıldığı çalışmalarda çalışmanın gerçekleştirileceği bölgenin coğrafik olarak kökenler arasında akrabalıklara izin verecek kadar dar tutulmasının sağlanmasıdır. Aksi halde geniş saha çalışmalarında incelenen kökenlerin klonal olarak çoğaldığı gibi yanlış bir ön yargıya varılması kaçınılmazdır [26]. Elektroforetik mobilitesi aynı olan bandların aslında aynı mı oldukları sorusu ise bir diğer problemidir. Bu sorunun cevabı, eğer alleller farklı restriksiyon kesim bölgeleri taşıyorsa "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP) ile, taşıyorlarsa baz dizi analizi veya "Single Strand Conformational Polymorphism" (SSCP) gibi ikinci bir yöntemle ortaya konabilir. SSCP öncesinde incelenen bandlar önce RAPD ile amplifiye edilirler ve bu uygulama "Sequence-confirmed Amplified Region" (SCAR) analizi olarak bilinir [7].

Funguslara yönelik moleküler tiplendirme çalışmalarından optimum bilgiyi sağlayabilmek için üç noktanın hedeflenmesi gerekmektedir;

- Her biri için allellerin incelenebileceği, birbirinden bağımsız, genetik belirteçler olarak adlandırılacak genomik bölgeler saptanmalıdır.
- Kesin yorumlar öncesinde üzerinde çalışılacak türün çok sayıda kökeni incelenmiş olmalıdır. Çünkü, bazı türlerde coğrafyaya bağlı değişkenlikler söz konusu olabilmektedir. Örneğin, *Coccidioides immitis*' in Kaliforniya ve Kaliforniya dışı kökenlerinin farklı olmaları gibi.
- İncelenen mantarın filogenetik atası ile ilişkisinin klonal veya rekombinal mi olduğu tanımlanmalıdır. İncelenen köken klonal üreme sonucunda ortaya çıkmış ise ebeveynlerden birisinin tam kopyası iken, rekombinasyon sonucu ise atalarından farklı izler taşıyacaktır [15].

Fungal genotiplendirmede incelenmesine karar verilen genetik belirteçlerin belirli özellikleri taşımaları gereklidir;

- Seçilmiş olan bölge mutasyonlara orta düzeyde açık olmalıdır. Düşük düzeyde değişken gen bölgelerinde değişkenlikler saptanamayabilir ve yetersiz ayırım gücü ortaya çıkarken, yüksek düzeyde mutasyona açık bölgelerin seçilmesi kökenlerin gruplandırılmalarını zorlaştırır.
- Seçilmiş olan bölge evrimsel baskı altında olmamalıdır. Aksi halde genetik ilişki konusunda yanlış yargı oluşturabilir.
- Belirteçteki mutasyonların geri dönüşüm ihtimali düşük olmalıdır. Örneğin, transpozonların bu amaçla seçilmesi hatalı olacaktır.
- Aynı mutasyonun iki farklı kökende ortaya çıkma ihtimali düşük olmalıdır. Aksi halde ataları farklı, ancak ortak karakteristikler yani homoplasi görülür ve yanlış yorumlara neden olur [7].



Fungal genotiplendirmede popüler yöntemler

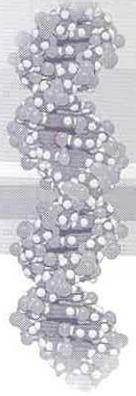
Fungal genotiplendirmede farklı yaklaşımlar uygulanabilir. Bunlardan bir tanesi orta veya aşırı değişken gen bölgelerinin incelenmesidir. Bu yaklaşımda, sadece hedef seçilen gen bölgesi veya gen bölgeleri incelenmektedir. Bir diğer yaklaşım ise, tekrarlanan gen bölgelerinin incelenmesi yolu ile aynı anda birden çok kromozomun değerlendirilmesidir. Sıklıkla başvurulan genotiplenme yöntemlerinden bazıları ile ilgili önemli noktalar şöyle özetlenebilir;

RFLP: Fungal genom, bakteri ve virüslerden daha fazla sayıda tekrar bölgeleri içerir. Bu durumun doğurduğu genomik kompleksliğe bağlı olarak mantar restriksiyon enzim kesim profilleri daha karmaşıktır ve RFLP tekniği mantarlarda sıklıkla kullanılan moleküler yöntemlerden bir tanesidir. En çok tekrarlanan bölgeler olan rDNA ve mtDNA gen bölgeleri, RFLP paternlerindeki koyu bandların çoğunluğunu oluştururlar. Zayıf bandlar ise birçok araştırmada genellikle bilgisayar destekli programlarca tanınamayacak kadar kötü çözünürlükte oldukları ve manuel olarak bilgisayara aktarılmasını gerektirmektedir. Bu sebeple hibridizasyonla sonlandırılmamış RFLP yöntemi epidemiyolojik olarak ilişkisiz kökenlerin ayırt edilmesinde yeterli bir ayırım sağlayabilirken, orta ilişkili kökenlerin "cluster" analizleri için başarılı değildir. Uygun hibridizasyon problemleri kullanılarak bu problem aşılabilir ve değerlendirilebilir profiller oluşturulur. Ancak her şeye rağmen, ökaryotik ribozomal sistronların yığın olarak bulunması, bakterilerdekinden çok daha basit prob paternlerinin oluşumuna neden olur ve etkin ayırt edicilik sağlayamadığı için geniş epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmaz. Amaca göre farklı prob tiplerinin seçilmesi mümkündür. Örneğin, tek gene yönelik problemler allelik farklılıkların araştırılmasına uygundur ve genellikle birden çok ve birbirinden bağımsız prob paralel kullanılarak multilokus genotiplendirmeler gerçekleştirilir. Buna karşılık, tekrarlanan gen bölgelerine yönelik problemler daha çok ilişkisiz kökenlerin ayırt edilmesinde tercih edilirler. Kompleks prob olarak adlandırılan problemler ise hem tek hem de tekrarlanan genlere yönelik prob tipinin de özelliklerini taşırlar. Kompleks probun tekrarlanan bölgelere yönelik kısmı ile birden çok kromozom aynı anda değerlendirilebilirken, aşırı değişken yörelerden seçilmiş tek gene spesifik kısmı ile mikroevrimsel farklılıklar araştırılır [7]. *Candida albicans* genotiplendirilmesi için önerilen en popüler kompleks problemler Ca3, 27A ve CARE-2' dir. CARE-2 birbiri ile yakın ilişkili kökenlerin genotiplendirilmesinde ve mikroevrim araştırmalarında tercih edilirken, diğerleri orta derecede ilişkili kökenlerin ayırt edilmeleri için daha uygundur [24]. Özetle, fungal genotiplendirmede kökenlerin birbirleri ile muhtemel ilişki seviyelerine ve genotiplenmenin gerçekleştirilmek istenen düzeyine göre prob seçilmesi gerekmektedir.

RAPD: Fungal epidemiyolojik tiplendirme amacıyla en çok başvurulan yöntemlerden bir diğeri olan RAPD tekniğinde yaklaşık 10 bazlık primerler ile amplifikasyon gerçekleştirilir. Primer seçimi tiplendirilecek mikroorganizmanın genom bilgisine gereksinim olmaksızın tamamen rastgele olarak seçilebileceği gibi, genom içerisinde belirli bölgelere yönelik olarak, örneğin ITS bölgeleri ve çeşitli rDNA genlerine uygun ve bilinçli olarak da seçilebilir [17]. *Candida* türleri başta olmak üzere bir çok mantar türü için genotiplendirmeye uygun randomize primerler tanımlanmıştır. T3B gibi "intergenic tRNA spacer region" gen bölgesine ya da (GTG)₅ gibi mikrosatellit gen bölgesine yönelik olarak tasarlanmış randomize primerlerin tekrarlanabilirlikleri, 10 baz oligonükleotidlere göre daha iyidir. *Candida albicans* için CARE-2, COM-21 ve RPS1 gibi bir çok gen bölgesine yönelik primerler tasarlanmıştır. Ancak, RAPD yönteminin aynı laboratuvar içindeki tekrarlanabilirliğinin bile bir çok faktörden etkilenebileceği akılda tutulmalıdır [24].

Mikrosatellit analizi: Mikrosatellitler, ökaryotlarda protein kodlayan bölgelerin arasında bulunan, genellikle 2-4 nükleotidin 10-20 veya daha fazla sayıda tekrarından oluşan ve DNA polimerazın hatalı okumasıyla ortaya çıkan mutasyon bölgeleridir. Mutasyon, tekrarlanan birimlerin tekrar sayısında azalma veya artma şeklinde ortaya çıkar [7, 15]. Bu bölgeler, RFLP+Prob hibridizasyon ve RAPD gibi teknikler ile incelenebilirler [26]. Mikrosatellit bölgeleri aşırı değişken olmaları dolayısıyla homoplasi yönünden dikkatle değerlendirilmelidir. Aynı elektroforetik hareketlilikteki bandlara diğer tekniklerde olduğu gibi dikkatle yaklaşılmalı ve aynı olup olmadıkları ortaya konmalıdır [7].

Elektroforetik Karyotipleme: Elektroforetik karyotipleme, *C. albicans* başta olmak üzere bir çok mantar türünde uygulanmış ve tekrarlanabilirliğinin oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir. Ancak, birçok tür için referans yöntem olmasına karşın, *C. albicans* gibi hem yüksek hem de düşük sıklıkta kromozomal reorganizasyonların görüldüğü türlerde, özellikle orta ilişkili kökenlerin birbirinden ayırt edilmesinde yetersiz kalmakta ve ilişkisiz kökenlerin benzermiş gibi yorumlanmasına neden olabilmektedir [24]. Yine, elektroforetik hareketlilikleri aynı olan kromozomların aslında farklı olabilecekleri ve rDNA genlerini taşıyan kromozomlarda aşırı değişkenlikler görülebileceği akılda tutulmalıdır [7].



Bununla birlikte, elektroforez öncesi kromozomların enzimatik kesime uğratılması ile karyotiplenmenin çözünürlüğünü arttırmak da mümkündür.

Baz Dizi Analizi: Evrimsel açıdan bakıldığında, moleküler tiplendirme yöntemleri arasında referans yöntemin baz dizi analizi olacağı açıktır. Bugün için yüksek maliyeti nedeniyle geniş epidemiyolojik çalışmalarda kullanılması uygun olmasa da, otomatize dizi analiz sistemlerinin yaygınlaşması ve maliyetlerin düşmesi ile gelecekte bu yöntemin yaygın kullanılması muhtemeldir. *Pneumocystis carinii*, *C. immitis* ve *Candida spp.* gibi birçok mantar türünde değişik gen bölgeleri dizi analizine tabi tutulmuş ve genotiplendirilmiştir. Bununla birlikte, hangi gen bölgesinin istenen düzeyde değişkenlikler gösterdiği ve diploid türler ile ilgili dizi analiz stratejileri henüz tanımlanmamıştır [24].

Mantarlarda epidemiyolojik tiplendirme amacıyla yukarıda özetlenmiş olan RAPD, RFLP ve elektroforetik karyotipleme dışında multilokus genotipleme ya da "interrepeat PCR" (IR-PCR) yöntemleri gibi daha bir çok teknik kullanılmaktadır [5, 14, 30].

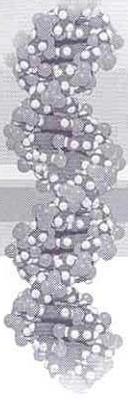
Birden fazla yöntemin kombine kullanılması ile genotiplendirme çalışmalarını daha da etkinleştirmek mümkündür. Örneğin, *A. fumigatus* genotiplendirmesinde RFLP, RAPD, sekans spesifik DNA primer analizi ve polimorfik mikrosatellit marker (PMM) analizi yöntemlerinin kıyaslandığı bir çalışmada, PMM ve *Afut1* ile RFLP kombinasyonunun en başarılı uygulama olduğu saptanmıştır [12]. Tiplendirme çalışmalarında ilave ikinci bir moleküler yöntem başvurulma nedenlerinden bir diğeri ise, ortaya çıkan patern farklılık veya benzerliklerinin teyid edilmesidir [2].

Fungal genotiplendirme uygulama örnekleri

Moleküler yöntemlerin mantarların epidemiyolojik amaçlı genotiplendirilmelerinde en yaygın kullanım alanları şöyle özetlenebilir;

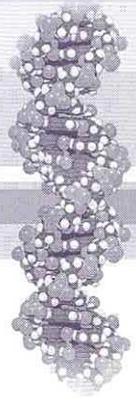
1. Salgınların kaynağı ve yayılma yollarının belirlenmesi,
2. Antifungal tedavi görmüş hastadan aynı etkenin tekrar izole edilmesi durumunda, bunun yetersiz tedaviye bağlı bir rölaps mi yoksa bir reinfeksiyon mu olduğunun belirlenmesi,
3. Hastane ortamındaki mikroorganizma klonlarının ortaya konması,
4. İnfeksiyon etkeni mikroorganizmanın endojen mi, yoksa ekzojen kaynaklı mı olduğunun belirlenmesi,
5. Virulan ve kommensal mikroorganizmaların genomik farklılıklarının incelenmesi [1, 4, 6, 19].

Yukarıda ana başlıklar altında özetlenmiş olan uygulama alanlarında gerçekleştirilmiş bazı araştırma örnekleri ise Tablo' da verilmiştir:



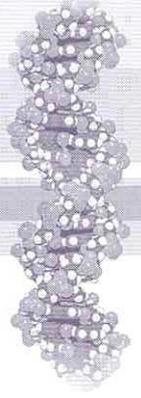
Tablo. Bazı Fungal Moleküler Epidemiyolojik Uygulama Örnekleri

| Kaynak | Yöntem | Çalışmanın Özeti |
|------------------------------|--------------------------|--|
| Tümbay E. (Süren çalışma) | PCR Eşey tiplendirme | 12 klinik veya çevresel <i>C. neoformans</i> kökenleri 3 farklı genotip oluşturmuş. Köken dağılımları VN6 için 7, VN4 için 2 ve VN3 için 3 köken. Eşey tiplendirme dağılımları ise MATAalfa: 8, Aa:4, Dalfa:4 |
| 9 | RAPD | 29 hastadan üriner sistem kaynaklı olarak soyutlanmış 38 <i>C. albicans</i> kökeni iki farklı primer ile 22 ve 24 patern oluşturmuş. |
| 32 | RAPD | 16 hastadan 27 <i>Candida</i> spp. OPE-03 ve RP4-2 primerleri ile genotiplendirilmiş. 21 <i>C. albicans</i> kökeni 12, 3 <i>C. tropicalis</i> kökeni 3 ve 3 <i>C. glabrata</i> kökeni ise 2 ve 3 farklı patern oluşturmuş. Çoğu endojen kaynaklı olarak tanımlanmış. |
| 20 | PFGE | 9 hastadan soyutlanmış fungemi etkeni <i>C. glabrata</i> kökenleri aynı genotipi göstermiş, bu genotip süt şişesi kaynaklı köken ile aynı bulunmuş. |
| 21 | PFGE | 6 hastadan soyutlanmış 6 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> kökeni genotiplendirilmiş. Kan kaynaklı 5 köken aynı, ürolojik kaynaklı 1 köken farklı karyotip göstermişler. |
| 22 | PFGE Eşey tiplendirme | Türkiye' de 54 il, 634 farklı çevresel örnekten 26 <i>C. neoformans</i> var. neoformans kökeni soyutlanmış. PFGE ile 24 farklı karyotip gösterilmiş. Eşey tiplendirme dağılımları ise 20 MATalfa, 4 MATa, 1 MATa/alfa ve 1 eşeyi saptanamamış köken. |
| 10 | PFGE | 18 <i>C. kefir</i> kökeni genotiplendirilmiş. 5 farklı karyotipte köken sayıları dağılımları 6-8-2-1-1 köken. |
| 16 | PCR parmakizi | 11 ülkeden 366 klinik <i>C. neoformans</i> kökeni PCR fingerprinting ve RAPD yöntemi ile genotiplendirilmiş, A.B.D. kaynaklı kökenlerin genomik olarak heterojen, diğerlerinin homojen olduğu gösterilmiş. |
| 31 | RAPD | 10 hastanın tırnak kültürlerinden 50 <i>T. rubrum</i> kökenlerini genotiplendirmiş. Altı hastanın birden fazla <i>T. rubrum</i> kökeni tarafından infekte oldukları gösterilmiş. Kronik seyir nedeni olarak açıklanmış. |
| 11 | PCR parmakizi | Değişik coğrafi bölgeden 38 hastadan soyutlanmış 46 <i>T. mentagrophytes</i> kompleks kökeni genotiplendirilmiş. Birlikte yaşayan iki kişide farklı kökenlerin ve aynı kişideki farklı lezyonlarda ise aynı kökenin etken olduğu saptanmış. |
| 29 | RAPD | 66 çevresel 19 klinik <i>A. fumigatus</i> kökeni genotiplendirilmiş, hava ve su kaynaklı çevresel kökenler farklılık göstermişler. Klinik kaynaklı iki grup su, bir grup ise hava kaynaklı çevresel kökenlerle uygunluk göstermiştir. |
| 23 | AFLP | 17 hastadan 5 aylık sürede fungemi etkeni olarak soyutlanmış 48 <i>C. parapsilosis</i> kökeni 25 farklı karyotip oluşturmuşlar. Toplam 9 hastanın sıralı kökenleri aynı, 8 hastanın sıralı kökenleri ise farklı genotipte bulunmuş. Persistan infeksiyon ve reinfeksiyon ayrımında faydalı bulunmuş. |
| 28 | PFGE RFLP MspI+EcoRI | 24 hastadan soyutlanmış 102 <i>C. glabrata</i> kökenleri ve 3 çevresel köken 28 farklı patern oluşturmuşlar. Çevresel olanlar ve 5 hasta kökeni aynı genotipte bulunmuşlar. Ekzojen nozokomiyal infeksiyon göstergesi olarak değerlendirilmiş. |
| 18 | RFLP HinI | 30 HIV (+) hastadan 7' sinde flukonazol tedavisinden 90 gün sonra aynı genotipte <i>C. albicans</i> soyutlanması rekürren infeksiyonu göstermiş. |



KAYNAKLAR

1. Arbeit RD. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington DC: ASM; 1995; 190-208.
2. Barton RC, van Belkum A, Scherer S. Stability of karyotype in serial isolates of *Candida albicans* from neutropenic patients. *J Clin Microbiol* 1995;33(4):794-6.
3. Costa MRE, Lacaz CDS, Kawasaki M, Camargo ZP: Conventional versus molecular diagnostic tests. *Medical Mycology* 2000; 38(Suppl 1): 139-45.
4. Dembry LM, Vazquez MD, Zervos MJ. DNA analysis in the study of the epidemiology of nosocomial candidiasis. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 1994, 15(1):4853.
5. Di Francesco LF, Barchiesi F, Caselli F, et al. Comparison of four methods for DNA typing of clinical isolates of *Candida glabrata*. *J Med Microbiol* 1999;48(10):955-63.
6. Fridkin S, Jarwis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews* 1996, 9(4): 499-511.
7. Gil-Lamagnere C, Roilides E, Hacker J, Müller FMC. Molecular typing of fungi- a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clinical Microbiology and Infection* 2003, 9: 172-85.
8. Guarro J, Gene J, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews* 1999, 12(3): 454-500.
9. Gulay Z, Ergon C, Ozkutuk A, Yucesoy M, Bicmen M. Molecular epidemiologic surveillance and antifungal agent sensitivity of *Candida albicans* isolated from anesthesia intensive care units. *Mikrobiyol Bul.* 2002 Jul-Oct;36(3-4):309-16.
10. Guzel O., E. Senol, R. Karakus, M.A. Saracli, A. Gonlum, L.Doganci, A. Kalkanci. "Changing pattern of *Candida* spp. isolated from neutropenic patients in a single institution". 13th ECCMID, Glasgow, 185, Blackwell, 2003.
11. Kac G, Bougnoux ME, Feuilhade de Chauvin M, Sene S, Deroin F. Genetic diversity among Trichophyton mentagrophytes isolates using random amplified polymorphic DNA method. *British J Dermatol* 1999, 140: 839-44.
12. Lasker BA. Evaluation of performance of four genotypic methods for studying the genetic epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Mic* 2002, 40(8): 2886-2892.
13. Lockhart S, Jolly S, Vargas K Swails-Wenger J, Enger L, Soll DR. Natural defences against *Candida* colonization break down in the oral cavity of the elderly. *J Dent Res* 1998, 78: 857-68.
14. Luu LN, Cowen LE, Sirjusingh C, et al. Multilocus genotyping indicates that the ability to invade the bloodstream is widespread among *Candida albicans* isolates. *J Clin Microbiol* 2001;39(4):1657-60.
15. McEwen JG, Taylor JW, Carter D, Xu J, Felipes MS, Vilgays R, Mitchell TG, Kasuga T, White T, Bui T, Soares CMA. *Medical Mycology* 2000, 38(suppl.1): 189-97.
16. Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, Igreja RP, Hardke C, Methling K, Viviani MA, Chindamporn A, Sukroongreung S, John MA, Ellis D, Sorrell TC. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA-a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis* 1999, 20: 1790-7.
17. Milan EP, de Laet Sant' Ana P, de Azevedo Melo AS, et al. Multicenter prospective surveillance of oral *Candida dubliniensis* among adult Brazilian human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;41(1-2):29-35.
18. Millon L, Manteaux A, Reboux G, Drobacheff C, Monod M, Barale T, Michel-Briand Y. Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in Human Immunodeficiency Virus-positive patients : Persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. *J Clin Mic* 1994, 32(4): 1115-8.
19. Müller FMC, Lischewski A, Harmsen D, Hacker J. Standardized molecular typing. *Mycoses* 1999, 42(Suppl 2): 69-72.
20. Nedret Koc A, Kocagoz S, Erdem F, Gunduz Z. Outbreak of nosocomial fungemia caused by *Candida glabrata*. *Mycoses* 2002, 45 (11-12): 470-5.
21. Saracli MA, Sener K, Gonlum A, Yildiran ST, Wickes BL. Genotyping of clinical *Rhodotorula mucilaginosa* isolates by pulsed field gel electrophoresis. *Mycoses* 2003, 46(11-12): 487-91.
22. Saracli MA., Doganci L., Yildiran ST., Sener K., Gonlum A. "Karyotyping of Turkish environmental *Cryptococcus neoformans* variety *neoformans* isolates by pulsed field gel electrophoresis". 13th ECCMID, Glasgow, 221-2, Blackwell, 2003.



P5 PRİMER PROP DİZAYNININ ÖNEMİ

Ayhan KUBAR

GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji Bilim Dalı, Ankara

Primer, prob ya da kısaca oligonükleotid adı altında söylediğimiz özel DNA dizilimleri ile uğraşlar, gelişen teknolojiler nedeniyle ciddi bir Ar-Ge alanı oluşturmaktadır. Laboratuvar deneyimlerimiz ve dünyada yapılan birçok çalışma aynı etken mikroorganizma için onlarca farklı oligonükleotid dizaynını ortaya çıkarabilmektedir. Tüm araştırmacıların ortak hedefi ise şüphesiz daha iyiye ulaşabilmektedir. Oligonükleotid dizi ortaya koyma çalışmalarının diğer önemli boyutu da ticari gelişmelerdir. Günümüzde herhangi bir mikroorganizma tanısı veya başka amaçlar için "daha iyi", "daha kolay", "daha hızlı" ve "daha ekonomik" sözcükleri ile anlatılan moleküler testler hep spesifik oligonükleotid dizi analiz ve performanslarının daha iyi olması ile mümkün görünmektedir.

Spesifik oligonükleotid oluşturabilmenin bizim gibi araştırmacılara sunduğu en önemli avantaj sanırım özgürlüktür. Yani başka bir deyişle uğraştığımız bir mikroorganizma ya da gen bölgesi için dünyada çeşitli firmalarca üretilmiş primer/prop olması ya da olmamasının bizi etkileyen kısmının sadece rekabet olması ve karşılaştırma yapmadan öte bir anlam taşımamasıdır. Başka açılardan bakıldığında da, eğer uğraştığımız mikroorganizma ya da gen bölgesi için spesifik oligonükleotid dizilimler yoksa bunları dünyada ilk kez yaparak önemli bilimsel çalışmalar gerçekleştirme şansımız olabilir.

Söylemeye çalıştıklarımı pratik anlamda örnekleyecek olursak, yakın geçmişte ülkemizin karşılaştığı Kırım-Kongo hemorajik hastalığının etkeni olan aynı isimli virus için GATA Viroloji olarak geliştirdiğimiz spesifik oligonükleotidler ve testler bu alanda güzel bir özgürlük örneği teşkil etmektedir. Oligonükleotidler ile yaptığımız RT-PCR testleri bu konuda yayınlanmış bulabildiğimiz primerlerden daha iyi sonuçlar vermiştir. Diğer yandan kabakulak virusu tek basamak Taq-MAN RT-PCR testi de dünyada ilk kez laboratuvarımız tarafından geliştirilmiş ve yayınlanmıştır. Bunlar ve benzeri örnekleri çoğaltmak elbette mümkündür. Ancak adı geçen çalışmalar ve benzerlerini yapabilmemiz için sanırım öncelikle oligonükleotid dizaynı konusunda özgür olmamız gereklidir.



PRİMER VE PROB DİZAYNININ ÖNEMLİ OLDUĞU YÖNTEMLERE KISA BAKIŞ

Çakır GÜNEY

GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji Bilim Dalı, Ankara

Enfeksiyon hastalıkları ile ilişkili mikroorganizmaların saptanması ve özelliklerinin ortaya konması için uygulanan in-vitro nükleik asitlere özgül prob ve primer kullanma konseptinin temel harcı 1970'li yıllarda ortaya atılmıştır. 1980'li yıllarda DNA prob tekniğinin ilk pratik uygulama alanına girmesinin ardından otomatik oligonükleotid sentezinin de dahil olduğu bazı teknolojik gelişmeler yardımı ile in-vitro nükleik asit saptanmasında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu alandaki gelişmelerin son halkası olan in-vitro nükleik asit amplifikasyon yöntemi olan Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) 1983 yılında Kary Mullis tarafından tanımlanmış ve 1985 yılında Saiki ve arkadaşları tarafından ilk pratik uygulanması yayınlanmıştır. In-vivo nükleik asit replikasyonlarını taklit eden PCR metodunun temel prensibi bilinen primerler (çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgül) kullanılarak in-vitro olarak organizmalara ait genetik materyalin belirli bir bölgesinin enzimatik olarak çoğaltılarak saptanmasıdır. Yöntemin özgüllüğünü sağlayan ana unsur uygun primer ve problemlerin seçimidir. Primerler ve problemler hedef bölgelere (DNA/RNA) komplementer 18-30 nükleotidli (daha uzun olabilir) baz dizileridir. Geçtiğimiz yaklaşık 20 yıl içinde PCR'nin öncülüğünde prob ve primerlerin kullanıldığı nükleik asit amplifikasyonu ile ilgili sayısız metod geliştirilmiştir. Bu metodlar teknik farklılıklarına göre üç genel kategoriye ayrılır:

1. Hedef amplifikasyon yöntemleri; PCR ve modifiye şekilleri ile Transcription-Based Amplification Systems (TAS), self-sustaining sequence replication(3SR) ve strand displacement amplification (SDA).
2. Prob amplifikasyon yöntemleri, Q β replicase veya thermostable DNA ligase chain reaction (LCR).
3. Sinyal amplifikasyon yöntemleri veya branch DNA.

Hedef amplifikasyon sistemleri

In-vitro olarak hedef molekülleri enzimatik olarak çoğaltıp saptanabilir düzeye getiren yöntemlerdir. Bu yöntemlerde son ürün (amplikonlar) hedef bölgeye ait dizi bilgileri ihtiva etmektedir. Bu nedenle bu yöntemlerin diğer yöntemlerden farkı etkenlerin tanımlanması yanında çoğaltılan hedef bölgelere ait dizilerin daha ileri analizleri ile patojenlerin identifikasyonlarında da kullanılabilir olmasıdır. Hedef amplifikasyon yöntemlerinin en iyi bilinen şekli PCR'dir. Bu yöntemde hedef genomun belirli bir bölgesi (~50-1500 nükleotid), spesifik primerler ve ısıya dayanıklı DNA polimeraz (taq veya Tth polimerase) enzimleri yardımı ile in vitro şartlarda çoğaltılır. Bu yöntemle çok kısa sürede teorik olarak tek bir DNA dizisi milyon kere (10⁶-10¹²) çoğaltılarak elektroforez veya işaretli problemler kullanılarak hibridizasyonla hızla tanımlanır. PCR günümüzde bir çok enfeksiyon ajanının tanımlanması yanında, genetik bozuklukların saptanmasında, bireysel genetik materyallerin identifikasyonlarında, adli tıp alanında, fingerprint'lerde, babalık tayini ve soy kütüklerinin hazırlanması gibi daha bir çok alanda kullanılmaktadır.

PCR'nin, nested PCR, Semi-nested PCR, Multipleks PCR, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), in situ PCR, degenerate PCR gibi değişik uygulanma şekilleri vardır. Örneğin; Nested ve semi-nested PCR, duyarlılık ve özgüllüğü arttırmak, Multipleks PCR, birden fazla ajanın saptanması için kullanılırken, RNA veya mRNA'ların saptanması için de RT-PCR kullanılır.

1989 yılında tanımlanan transkripsiyona dayalı amplifikasyon yöntemleri (Transcription-Based Amplification Systems/ self-sustained sequence replication based amplification; TAS/3SR), revers transkriptaz (RT), RNase H ve RNA polimeraz enzimleri kullanılarak DNA sentezi ve RNA transkripsiyonu gerçekleştirilmesi esasına dayanan iki basamaklı bir hedef amplifikasyon yöntemidir. Bu yöntemde primerlerin bir ucunda hedef bölgeye spesifik diziler bulunurken aynı primerin 5' ucunda T7 RNA fajının polimeraz enziminin promotor bölgesi vardır. Primerlerden biri hedef bölgeye bağlandıktan sonra RT enzimi aracılığı ile hedef nükleik asit dizisine komplementer bir DNA (cDNA) molekülü sentezlenir ve hedef RNA, RNase H enzimi ile yok edilir. Daha sonraki aşamada ikinci primer komplementer DNA'ya bağlanarak T7 promotorunu ihtiva eden çift iplikli DNA'yı oluşturur. Bu çift iplikli DNA'dan daha sonra RNA polimeraz aracılığı ile çok sayıda RNA kopyaları çoğaltılır. Çoğaltılmış RNA dizileri çeşitli hibridizasyon yöntemleri ile gösterilebilir. 3SR(self-



sustained sequence Replication) ve NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification) TAS'ın modifiye şekli olan teknolojik yöntemlerdir. Bu yöntemler izotermal olup 41° C de gerçekleştirilir ve çok hızlıdır. Reaksiyon süresince oluşan çift iplikli DNA'lar tekrar tekrar RNA sentezleri için kalıp olarak kullanılarak reaksiyonu devam ettirirler. Ancak PCR'dan daha az duyarlıdır. Bu yöntemlerin, thermal cycler'e ihtiyaç göstermemesi, hızlı olması ve direkt RNA'yı amplifiye edebilmesi gibi avantajları vardır. Yarım saat içinde hedef nükleik asitleri 108 kez çoğaltabilmektedir.

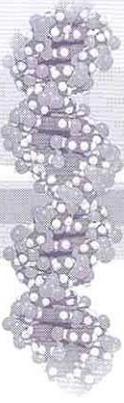
İplikcik uzaklaştırarak amplifikasyon (Standart Displacement Amplification; SDA); 1991 yılında "Becton Dickinson" firması tarafından geliştirilen, hedefin eksponensiyonel (katlamalı) olarak çoğaltılması için spesifik primerler , bir DNA polimeraz (ekzonükleaz aktivitesi olmayan) ve restriksiyon enzimleri kullanılan bir hedef DNA amplifikasyon yöntemidir. 3' ucunda hedef bölgeye komplementer baz dizileri bulunan primerlerin 5' tarafında restriksiyon enzimleri için kesim yeri bulunmaktadır. SDA iki aşamalı bir reaksiyondur. Birinci aşama hedef jenerasyon fazı, ikinci aşama ise eksponensiyonel fazdır. Jenerasyon fazında çift iplikli DNA ısı ile dentüre edilerek iki ipliğe ayrılır ve primerler bağlanarak, ekponensiyonel faz için hedef oluşturulur. Eksponensiyonel fazda ise, tekrarlanan kesme , polimerizasyon ve iplik ayrıştırma basamakları sonunda hedef bölgenin DNA' sı çoğaltılır. SDA'nın en önemli avantajı, denatürasyondan sonra tek bir ısı basamağında oluşturulması (izotermal) nedeniyle tek bir ısı kontrollü cihaz dışında özel bir laboratuvar donanımı gerektirmemesidir. Reaksiyon tek bir tüp içerisinde 30 dakika ile 2 saat gibi bir sürede gerçekleştirilir. Bunun yanında düşük ısıda gerçekleştirildiğinden nonspesifik bağlanmalar ve amplifikasyonlar sık görülür. Bu da duyarlılık ve özgüllük üzerine olumsuz etki yaratır. Reaksiyon ortamına DMSO veya gliserol gibi organik solventler ilave edilerek bu problemin üstesinden gelinebilir. SDA örnekteki 10-50 hedef molekülü saptayabilir. Bu yöntemle balgam örneklerinde 1-5 Mycobacterium tuberculosis genomu saptanabilmektedir. Ayrıca yönteme RT basamağı ilave edilerek kantitatif olarak RNA'lar saptanabilmektedir (RT-SDA). Örneğin SDA HIV infeksiyonlarının tanısında viral yük tayininde kullanılmaktadır. Yöntem boyalarla işaretli problar kullanılarak real-time olarak da uygulanabilmektedir.

Prob Amplifikasyon Yöntemleri

Hedef amplifikasyon yönteminden farklı olarak hedef nükleik asit dizileri yerine bu dizileri saptamak için kullanılan oligonükleotid probları çoğaltan yöntemlerdir. Hedef nükleotid dizileri hakkında bilgi vermez, ancak mikroorganizmalara ait spesifik dizilerin varlığını saptayarak tanı konulmasını sağlar. Ligaz Zincir Reaksiyonu (ligase chain Reaktion, LCR) bu yöntemlerden en sık kullanılanlardan biridir. LCR, iki küçük DNA oligonükleotidi ve onları birleştiren termostabil ligaz enzimi kullanarak, DNA kopyalarını hızla çoğaltan bir sistemdir. Bu yöntemde hem orijinal baz dizileri hem de yeni oluşan yeni oligonükleotidler bir sonraki siklüslarda kalıp olarak kullanılırlar. Eğer başlangıç aşamasında amplifikasyon oluşmazsa daha sonraki aşamalarda amplifikasyonlar oluşmaz. Bu nedenle, LCR yöntemi özellikle hedef nükleik asitlerdeki nokta mutasyonlarının saptanması için yararlıdır. LCR ile örneğin ml. sinde 7-10 genom saptanabilmektedir. PCR'a göre yüksek derecedeki ısılarda daha özgüldür. Ayrıca otomatik uygulanma sistemleri vardır. Düşük ısılarda çalışan enzimlerle birlikte uygulandığında nonspesifik amplifikasyon ürünlerinin oluşması ve kontaminasyon kontrol sisteminin olmayışı gibi dezavantajları vardır.

Sinyal amplifikasyon yöntemleri

Hedef nükleik asitlere (DNA/RNA) spesifik baz dizilerine bağlanan problemlerin yaydığı sinyallerin arttırılma esasına dayanır. Bu yöntemde farklı hedeflere karşı kullanılan çok sayıda işaretli problar veya prob sinyallerini arttırmak için yine çok sayıda primer ve prob kombinasyonları kullanılır. Hedef amplifikasyon sistemlerinin analitik duyarlılığı genelde sinyal amplifikasyon sistemlerinden daha fazladır. Fakat, teknolojik gelişmeler bazı uygulamalarda sinyal amplifikasyon sistemlerinde de saptama sınırlarını hedef amplifikasyon testleri ile rekabet edebilecek seviyelere yükseltmiştir. Sinyal amplifikasyon yöntemlerinin duyarlılığı 103-105 moleküldür. Sinyal amplifikasyon sistemlerinin hedef amplifikasyonlara göre bazı avantajları vardır. Sinyal amplifikasyon testlerinde hedef molekül sayısı değişmez ve sonuç olarak oluşan sinyal klinik örneklerde bulunan hedef dizileri ile doğru orantılıdır. Bu da hem kantitatif ölçümlerin yapılmasına olanak sağlar, hem de çapraz kontaminasyona bağlı yalancı pozitif sonuçlarla ilgili kaygıları azaltır. Sinyal amplifikasyon sistemleri hedef dizileri amplifiye edecek enzimatik işlemlere bağımlı olmadığından klinik örneklerdeki enzim inhibitör varlığından etkilenmezler ve sonuç olarak, daha az uğraşı isteyen nükleik asit ekstraksiyon yöntemlerinin kullanılmasına olanak sağlarlar. Tipik olarak sinyal amplifikasyon sistemlerinde ya daha geniş ya da hedef amplifikasyon sistemlerinden daha çok prob kullanılır; bu da hedef dizilerin heterojenitesinden kaynaklanan hataların daha az olmasına neden olur. Ayrıca, RNA düzeyleri cDNA sentez ara basamağına gerek olmadan ölçülebilirler.



Dallanmış DNA (branched DNA, bDNA) yöntemi, çok sayıda sentetik oligonükleotid prob kullanılan bir sinyal amplifikasyon yöntemidir. Bu teknolojiye anahtar rol, her birine 3 tane işaretli prob bağlanabilen "amplifier" denilen 15 identik dalı bulunan bir bDNA molekülüdür. Bu yöntemde katı yüzeye bağlanmış çok sayıda hedefe spesifik prob ile hedef molekülü yakalanır. Aynı zamanda ikinci bir set hedef spesifik problemlerde hedef molekülüne bağlanır. Sonra Preamplifier molekülü hedef problemleri ve bDNA amplifier'lerine bağlanır. Enzimle (Alkalenfosfataz) işaretli dallara özgü problemler amplifier'le hibridize olur. Daha sonra ortama enzime uygun substrat ilave edilerek, prob amplifier'in oluşturduğu sinyaller luminometre ile ölçülür. Oluşan sinyal örnekteki hedef miktarı ile doğru orantılıdır. Bu sistem, özellikle HIV ve HCV gibi genomik dizi heterojenitesi gösteren infeksiyöz ajanların saptanmasında yararlıdır.

Yukarıda bahsedilen konvansiyonel PCR metodları genelde klinik örneklerdeki mikroorganizmaların kalitatif analizlerinde kullanılmakta ve elde edilen ürünlerin jelde yürütülmesiyle tespit edilmektedir. Genetik materyallerin kantitatif analizlerinin yapılması genelde bu yöntemlerle sınırlıdır. 1990'lı yılların başlarından itibaren otomasyon, standardizasyon ve minyatürizasyon alanındaki teknolojik gelişmeler, daha hızlı, daha doğru ve daha ekonomik yeni nesil kantitasyona dayalı PCR sistemlerinin gelişmesinde önemli rol oynamıştır. Bu gelişmeler bilgisayar destekli PCR'nin lazer teknolojisi ile birleştirilmesi sonucu hız kazanmıştır. Bu sistemlerde hem hedef amplifikasyonu hem de amplifiye olan ürünlerin her siklusta saptanması (kantitasyonu) aynı anda "real time" ve aynı tüp içinde gerçekleştirilmektedir. Çift iplikli DNA'ya bağlanan floresan boyalar kullanılarak PCR ürünlerinin saptanması bu yöntemlerin en basit şeklidir. SYBR Green bu tür uygulamalarda kullanılan boyalardan biridir. Bu boya çift iplikli DNA'ya bağlandığında floresan ışınma daha fazla iken bağlanmamış boyaların ışınması daha azdır. SYBR ekonomik, uygulanması kolay ve duyarlılığı oldukça fazladır. Ancak boya hem spesifik hem de nonspesifik PCR ürünlerine bağlanır ve PCR ürünlerinin beklenenden daha fazla saptanmasına neden olabilir. Tek dezavantajı budur. Bu dezavantaj da, spesifiklik; erime eğrisi analizi ile tanımlanır. Kısaca, PCR işlemi sonunda ısı kademeli olarak artırılarak ortamdaki floresan ışınma değişimine ait erime eğrisi çizdirilir. Çünkü spesifik PCR ürünleri ile nonspesifik primer dimer ürünleri farklı erime eğri pikleri oluştururlar.

Çift işaretli veya ardışık problemler, ve moleküler beacon, SYBR Green'e alternatif olarak geliştirilen, floresan boya kullanılan diğer yöntemlerdir. Bu yöntemlerin hepsi hedef amplifikasyon ürünlerini saptamak için reaksiyon ortamına ilave edilen hibridizasyon prob moleküllerinin hedefi tanıma sonrası floresan özelliklerindeki değişime, Floresan Rezonans Enerji Transfer (fluorescence resonance energy transfer; FRET) mekanizmasını kullanan yöntemlerdir. Bu yöntemlerde kullanılan problemler bir floresan boya ya da floresan boya ile birlikte bir baskılayıcı (quencher) boya kombinasyonu ile işaretlenir. Problemlerin ucundaki floresan boyalardan biri raportör (yüksek enerjili) diğeri ise floresan boyanın yayılımını engelleyen (quencher; baskılayıcı, düşük enerjili) boyadır. Floresan boya uyarıldığı zaman, floresan vermeden ziyade, enerjiyi yakınındaki baskılayıcı boya molekülüne transfer ederek floresan vermeyen prob şeklinde kalmasını sağlar.

TaqMan veya 5' nükleaz assay denilen çift işaretli prob kullanılan bu tür uygulamalarda, PCR amplifikasyonunun yeni iplik sentez aşamasında, kullanılan 5'-3' nükleaz aktivitesine sahip Taq DNA polimeraz enzimi 5'-3' yönüne doğru ilerlerken, yolu üzerindeki bir önceki siklularda oluşan ipliklere bağlanan iki tarafı işaretli problemleri parçalar. Bu parçalanma sonucu floresan ve quencher boyalar birbirlerinden uzaklaşarak FRET etkinin ortadan kalkmasına bağlı olarak raportör boyanın sinyalleri ortaya çıkar. Ortaya çıkan bu floresan sinyalin yoğunluğu ise her siklusta meydana gelen ürün miktarı ile doğru orantılıdır. Bu sistemden biraz farklı olarak, PCR esnasında oluşan ürünlere spesifik işaretli ardışık ya da birkaç nükleotid ara ile bağlanabilen iki probun kullanıldığı FRET sisteminde ise, problemlerden birinin 3' ucu bir verici (donor) boya ile diğeri probun ise 5' ucu bir alıcı (acceptor) boya ile işaretlenmiştir. Amplifikasyon esnasında (problemler hedef bölgeye bağlandığı zaman), verici boya uyarıldığı zaman, alıcı boyaya enerji transfer etmekte ve ürün konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak oluşan floresan bir optik okuyucu ile saptanmaktadır. Her iki prob da uygun bölgeye bağlanmadıkça uygun dalga boyunda floresan oluşmamaktadır. Hedef bölgedeki baz dizilimindeki farklılık, farklı bir Tm'e neden olacağı için "Floresan erime eğrisi" analizi ile de bu sistemle hem nükleik asit saptanması hem de tiplendirme yapılabilmektedir. Amplifikasyon ürünlerinin saptanmasında enerji transfer sistemi kullanılan diğeri bir metod 'molecular beacon probe' yöntemidir. Bu metod hairpin (5'-3' uçları birbirlerine komplementer, arada kalan kısımda hedef bölgeyi tanıyacak yapıda) yapılarıdaki oligonükleotid hibridizasyon problemleri ile yapılır. Hibridizasyon problemlerinin 5' ve 3' uçlarına bir donor fluorofor ve bir de quencher boya yerleştirilmiştir.



Molecular beacon problemleri hairpin yapıda olduğu zaman donör fluoroforun floresansı yoktur. PCR esnasında oluşan ürünlerden birine bu problemler hibridize olduğu zaman hairpin yapı açılır FRET etkinin ortadan kalkmasına bağlı olarak floresan etki ortaya çıkar ve oluşan ürünlerin miktarı yine her siklüste oluşan ürün problemlerin hibridize olma konsantrasyonuna bağlı olarak saptanır. Ancak, Taqman assay'den farklı olarak bu yöntemde, oluşan ürünlerin varlığı, amplifikasyon esnasında direkt olarak değil, amplifikasyon sonrası hibridizasyon problemlerinin oluşan ürünlere bağlanması ile saptanır.

Günümüzde ampliconla birleştikten sonra kendiliğinden floresan veren çok sayıda tek bir floresan boya işaretlenmiş primer kullanılan yöntemler geliştirilmiştir (Self-fluorescing amplicon). Scorpion primerleri, Sunrise primerleri ve Lux (Light Upon eXtension) primerleri kullanılan yöntemler bunlar arasında yer alır. Bu yöntemlerde hedef dizi amplifikasyonu olduğu zaman, işaretli primerlerin konfigürasyonunun değişmesine bağlı olarak floresan etki ortaya çıkmaktadır. Bu yöntemlerin hem proba dayalı yöntemler kadar kullanışlı hem de bir prob gerektirmediğinden maliyetinin daha düşük olduğu iddia edilmektedir.

Klinik uygulamalarda patojenlerin varlığının kalitatif ve kantitatif olarak saptanmasının yanında, tiplendirme ve sub-tiplendirme amacıyla yönelik primer ve problemlerin kullanıldığı konvansiyonel PCR ve Real-Time PCR yöntemlerinin birbirlerinden farklı avantaj ve dezavantajları vardır. Konvansiyonel PCR yöntemleri; duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı (24-48 saat içinde), birden fazla mikroorganizmayı bir arada saptayabilen, hastalıkların tanı ve takibi yanında epidemiyoloji ve direnç çalışmaları gibi avantajlarının yanında, otomatize uygulamalarının bulunmaması, amplifikasyon sonucu işlem gerektirmesi, dolayısıyla işlem sayısının fazla olması ve kontaminasyon, deneyimli personel gerektirmesi ve kantitatif olarak uygulanmalarının zor olması gibi dezavantajları da vardır. Konvansiyonel PCR yöntemlerinden farklı olarak, Real-Time PCR tekniklerinde, kullanılan işaretli primer ve problemlerin yardımı ile hedefin çoğalması sonucu oluşan sinyallerin ölçümü amplifikasyon esnasında lazer güdümlü her siklüste real time olarak tek bir tüp içinde saptanmaktadır. Bu da zaman alıcı PCR sonrası elektroforez gibi basamaklara olan ihtiyacı ortadan kaldırmakta, dolayısıyla amplifikasyon sonrası elektroforez işlemine bağlı kontaminasyon riskini en aza indirmektedir. Otomatik olarak uygulanır, duyarlılığı ve özgüllüğü oldukça yüksektir. Buna ek olarak bu yöntemler, uluslararası standardize edilmiş mikro kuyucuk formatında amplifikasyonlarla birkaç saat içerisinde çok sayıda örneğin daha az kimyasal kullanılarak taranmasına olanak sağlamaktadır. Bu yöntemlerin genelde kantitasyona daha uygun olması, genotiplendirme ve mutasyon analizlerine de olanak vermesi ve multipleks uygulanabilir olması diğer avantajlarıdır. Ancak, prob-hedef uyumsuzluğuna bağlı olarak yalancı negatiflik, floresan oluşumunun sağlanması ve oluşan floresan sinyallerinin saptanması için özel thermal cycles gibi pahalı bir cihaz gerektirmesi gibi dezavantajları da vardır.

Sonuç olarak, günümüzde teknolojik gelişmeler sayesinde primer ve problemlerin kullanıldığı farklı uygulanma şekilleri olan pek çok sayıda moleküler yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler sayesinde üretilmesi zor ya da mümkün olmayan bir çok yeni patojenin saptanması ve idenfikasyonu daha kısa sürede, daha az emek harcanarak mümkün olmuştur.

KAYNAKLAR

1. Clegg RM. Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods Enzymol.* 1992;211:353-88. Review.
2. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature.* 1991, 7;350(6313):91-2.
3. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991, 88(16):7276-80.
4. Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990, 87(7):2725-9.
5. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 2001, 25(4):386-401. Review.
6. Kricka LJ. Nucleic acid detection technologies -- labels, strategies, and formats. *Clin Chem.* 1999, 45(4):453-8. Review.
7. Kricka LJ, Wilding P. Microchip PCR. *Anal Bioanal Chem.* 2003, 377(5):820-5. Review.
8. Kwok DY, Kwok TJ. Target amplification systems in nucleic acid-based diagnostic approaches. *Am Biotechnol Lab.* 1990, 8(13):14-25. Review.

- 
9. Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 1993, 11;21(16):3761-6.
 10. Little MC, Andrews J, Moore R, Bustos S, Jones L, Embres C, Durmowicz G, Harris J, Berger D, Yanson K, Rostkowski C, Yursis D, Price J, Fort T, Walters A, Collis M, Llorin O, Wood J, Failing F, O'Keefe C, Scrivens B, Pope B, Hansen T, Marino K, Williams K, et al. Strand displacement amplification and homogeneous real-time detection incorporated in a second-generation DNA probe system, BDProbeTecET. *Clin Chem.* 1999, 45(6 Pt 1):777-84.
 11. Lowe B, Avila HA, Bloom FR, Gleeson M, Kusser W. Quantitation of gene expression in neural precursors by reverse-transcription polymerase chain reaction using self-quenched, fluorogenic primers. *Anal Biochem.* 2003, 1;315(1):95-105.
 12. Luo J, Bergstrom DE, Barany F. Improving the fidelity of *Thermus thermophilus* DNA ligase. *Nucleic Acids Res.* 1996, 1;24(15):3071-8.
 13. Marras SA, Kramer FR, Tyagi S. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.* 2002, 1;30(21):e122.
 14. Marras SA, Kramer FR, Tyagi S. Genotyping SNPs with molecular beacons. *Methods Mol Biol.* 2003;212:111-28.
 15. Nazarenko I, Lowe B, Darfler M, Ikonomi P, Schuster D, Rashtchian A. Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic Acids Res.* 2002, 1;30(9):e37.
 16. Nolte FS and Caliendo AM. : Molecular Detection and Identification of Microorganisms. In PR. Murray, Baron EJ., Jorgensen JH., Pfaller MA., Tenover FC., Tenover FC. (eds), *Manual of Clinical Microbiology*, ASM pres., Washington DC, 2003, pp:234-256.
 17. Nuovo GJ. In situ strand displacement amplification: an improved technique for the detection of low copy nucleic acids. *Diagn Mol Pathol.* 2000 Dec;9(4):195-202
 18. Nycz CM, Dean CH, Haaland PD, Spargo CA, Walker GT. Quantitative reverse transcription strand displacement amplification: quantitation of nucleic acids using an isothermal amplification technique. *Anal Biochem.* 1998, 1;259(2):226-34.
 19. Persing DH.: In vitro Nucleic acid amplification techniques. In DH Persing, Smith TF., Tenover FC., White TJ. (eds), *Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications* ASM pres., Washington DC, 1993, pp:51-87.
 20. Peter JB, Sevall JS. Molecular-based methods for quantifying HIV viral load. *AIDS Patient Care STDS.* 2004, 18(2):75-9. Review.
 21. Poveda E, de Mendoza C, Cuesta M, Toro C, Rodes B, Soriano V. Can drug resistance mutations influence the measurement of plasma HIV-RNA by different viral load techniques? *AIDS Patient Care STDS.* 2003, 17(7):321-4.
 22. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988, 29;239(4839):487-91.
 23. Selvin PR. Fluorescence resonance energy transfer. *Methods Enzymol.* 1995;246:300-34.
 24. Tenover FC. And Unger ER. Nucleic acid probes for detection of infectious agents. In DH Persing, Smith TF., Tenover FC., White TJ. (eds), *Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications* ASM pres., Washington DC, 1993, pp:3-25
 25. Thelwell N, Millington S, Solinas A, Booth J, Brown T. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* 2000, 1;28(19):3752-61.
 26. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol.* 1996, 14(3):303-8.
 27. Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, Little MC, Nadeau JG, Malinowski DP. Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res.* 1992, 11;20(7):1691-6.



PRİMER-PROB DİZAYNI VE BİYOİNFORMATİK ANALİZLERİNDE KULLANILAN BİLGİSAYAR PROGRAMLARININ DEĞERLENDİRİLMELERİ

Mehmet YAPAR

GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji Bilim Dalı, Ankara

Oligonükleotidlerin kullanıldığı moleküler teknikler tanısal amaçlı ve araştırma alanlarında gittikçe yaygınlaşmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonları (PCR), sekanslama ve hibridizasyon gibi birçok tekniğin etkinliği ve duyarlılığı, uygun oligonükleotid dizilerinin seçilmesine bağlıdır. Hedeflenen nükleik asit dizisinden amaca uygun şartlar taşıyan primer ve problemlerin manuel olarak dizayn edilmesi hem çok zor, hem de zaman alıcıdır. Çünkü oligonükleotidler seçilirken birçok gerekli şartın aynı anda sağlanması gerekmektedir. Bu nedenle adı geçen moleküler tekniklere paralel olarak çok sayıda oligo dizayn yazılımları da geliştirilmeye başlanmıştır (PrimerExpress, Oligo6, Prime+, Primo, Medusa, Doprimer, Pride, Amplify, PC-Rare, Codehop, Primer3, Netprimer, PrimerDesign, PrimerPremier vs.). Bu yazılımların temel amacı optimal şartları sağlayan oligoların dizaynına ve seçilmesine yardımcı olmak ve biyoinformatik analizlerinin yapılmasını sağlamaktır. Ayrıca internet aracılığıyla GenBank ile bağlantı kurup birçok işlemi kolaylaştırma gibi avantajları da sunmaktadırlar.

Hemen hemen tüm yazılımlarda oligo dizaynında kullanılan temel fonksiyonlar şunlardır:

1- Ergime ısı (Melting Temperature, Tm) uygunluğunun sağlanması: PCR siklusu 95 oC ile başlar. Bu yüksek ısıda çift zincirli DNA'nın hidrojen bağları koparak tek zincirli hale gelir. Primerlerin kendi komplementleri olan DNA zincirine yapışması için ısı 45-65 oC gibi daha düşük seviyelere düşürülür. Tm denilen bu ısıda, nükleik asit molekülleri %50 dubleks, %50 denatüre durumdadır. Tm değeri kritik önem taşımaktadır. Çok yüksek derecelerde ayarlandığında yetersiz primer-hedef hibridizasyonundan dolayı PCR amplikonu zayıf olur. Çok düşük derecelerde ise, yanlış eşleşme toleransı artacağından spesifik olmayan bağlanmalar oluşacaktır. Hemen hemen tüm yazılımlarda Tm kullanıcı tarafından istenilen şekilde ayarlanabilmektedir. Tm hesaplamasında farklı formüller kullanılmaktadır. En sık kullanılan formül, 'Nearest Neighbour' metodu denilen termodinamik değerlerin kullanıldığı formüldür.

2- Hedef diziyeye spesifikliğin sağlanması: Primerin uzunluğu sekans uygunluğu, spesifiklik, stabilite ve maliyet açısından önem taşımaktadır. 8-10 mer gibi kısa primerler farklı birkaç amplifikasyon ürününe yol açarken, 25 mer'den daha uzun primerlerde yanlış eşleşme toleransı artmaktadır. Bazı yazılımlarda primer uzunluğu 18-22 mer arasında sınırlandırılmıştır.

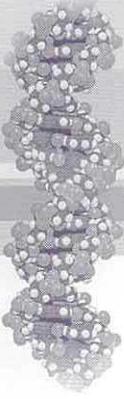
3- Oligo-hedef dizi arasındaki stabilitenin sağlanması: Oligoların 3' ucunda bulunan guanin/sitozin (G/C) nüleotidleri daha stabil bir hibridizasyon sağlamaktadır. Bu nedenle bazı yazılımlarda primer dizaynı yapılırken bu durum da göz önünde bulundurulmaktadır.

4- Dupleks (dimer, hairpin) oluşumlarının engellenmesi: Primerlerin kendi üzerlerinde veya diğer primerlerle yaptıkları hibridizasyon sonucu oluşan dupleks oluşumlarının mümkün olduğunca engellenmesi gerekmektedir. Çünkü bu durumlarda primerlerin asıl hedef dizi üzerindeki hibridizasyonları önlenir. Özellikle oligoların 3' ucunun yapışması, dupleks oluşumlarında daha etkili olmaktadır. Bazı yazılımlarda kabul edilebilir dupleks oluşturan nükleotid sayısı manuel olarak girilebilmektedir.

5- Optimal G/C içeriğinin sağlanması: Optimal G/C içeriği stabil bağlanmalar ve etkin Tm için gereklidir. Genel olarak G/C içeriği %40-60 arasında sınırlandırılmaktadır.

Bu temel şartlara ek olarak bazı yazılımlarda özel durumların da karşılanabilmesi için farklı seçenekler bulunabilmektedir. Sekanslama, real-time PCR, allelik diskriminasyon, multipleks PCR, nested PCR, RT-PCR gibi özel menüleri bulunan yazılımlar da mevcuttur.

Tarafımızdan geliştirilen OligoYAP 1.0 yazılımının temel fonksiyonları arasında, GenBank'tan veri aktarımı, nükleotid dizisinde korunmuş bölgelerin saptanması, bu bölgelerden uygun primer ve problemlerin seçilmesi ve biyoinformatik analizlerinin yapılması yer almaktadır.



P6 BAKTERİYOLOJİDE MOLEKÜLER TANI NİYE GEREKLİ?

Murat ÖZSAN

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Bilindiği gibi "besiyerlerinde çoğalan" bakterilerin koloni morfolojileri ve biyokimyasal özellikleri incelenerek ortaya konulan fenotipik karakterleri "çoğunlukla" tanı koymada yeterli olmaktadır. Bununla birlikte bu tanımlama herşeyden önce "besiyerinde üreyebilen mikroorganizmalar" için ve "çoğunlukla" geçerlidir. Dolayısıyla "pratikte" bir takım sorunlar ile karşılaşmaktadır:

1. Bir çok önemli patojen kültür ortamında üretilememekte veya çok zor üremektedir. Özellikle anaeroblar, patojenik Neisseria'lar ve mikobakteriler gibi özel transport ve kültür ortamı gerektiren bakterilerin üretilmelerinde zorluklar yaşanmaktadır.
2. Bazı patojen mikroorganizmaların kültüre dayalı tanısı uzun zaman almaktadır (Örn: Mycobacterium tuberculosis). Bu da etkin tedavinin seçilmesini geciktirerek, prognozunu olumsuz yönde ilerlemesine neden olmaktadır.
3. Bir mikroorganizmaya ait bazı fenotipik karakterler, laboratuvar koşullarında değişime uğrayabilmektedir. Bu da tekrarlanan pasajlar sonrasında tanı koymayı güçleştirmektedir. Örn; bazı meningokoklar ilk izolasyonda maltozu metabolize edemedikleri halde, tekrarlanan pasajlardan sonra maltoz pozitif olabilmektedirler.
4. Belirli bir fenotipik karakter, bir çok değişken gen tarafından oluşturulabilmektedir. Bu durumda aynı fenotipik görünümü veren, genetik olarak farklı mikroorganizmalar, fenotipik olarak tek bir mikroorganizma gibi algılanabilmektedirler.

Bunlar bakterilerin tanısında karşılaşılan güçlükler olarak özetlenmektedir. Bu gibi durumlarda moleküler tanı yöntemleri çoğunlukla konvansiyonel yöntemlere destek, bazı durumlarda ise tanıdaki tek seçenek olarak kullanılmaktadırlar.

Son yıllarda klinik bakteriyoloji laboratuvarlarında klinik örneklerde mikrobiyal DNA'nın direkt saptanması için, in-house ve ticari üretilmiş polimeraz zincir reaksiyonunu (PCR) temel alan bir çok test ve nükleik asit amplifikasyonuna dayalı diğer yöntemler gittikçe artan oranlarda kabul görmekte ve kullanılmaktadırlar. PCR sayesinde in-vitro olarak besiyerlerindeki biyolojik üremenin yerini nükleik asitlerin enzimatik yolla çoğaltılması yöntemleri almıştır. Bu gelişme yavaş üreyen bakteriler için önemli, kültürü zor yapılan mikroorganizmalar için ise zorunlu hale gelmiştir. Aynı zamanda immün yetmezliği olan bir hastada infeksiyon tanısının zamanında konulmasını sağlayarak hayat kurtarıcı olabilmektedir. PCR temelli yöntemler, duyarlılık ve özgüllükte artmayı sağlarken, işlemlerin otomatize olması ve izotopik olmayan görüntüleme şekli sayesinde testin daha kolay yapılmasına olanak vermektedir.

KAYNAKLAR

1. Whelen AC, Persing DH. The role of nucleic acid amplification and detection in the clinical microbiology laboratory. *Annu Rev Microbiol* 1996; 50: 349-73.
2. Sintchenko V, Iredell JR, Gilbert GL. Is it time to replace the petri dish with PCR? Application of culture-independent nucleic acid amplification in diagnostic bacteriology: Expectations and reality. *Pathology* 1999; 31: 436-9.
3. Houpikian P, Raoult D. Traditional and molecular techniques for the study of emerging bacterial diseases: one laboratory's perspective. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 122-31.
4. Versalovic J, Lupski JR. Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. *Trends in Microbiol* 2002; 10: 15-21.
5. Louie M, Louie L, Simor AE. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *CMAJ* 2000; 163: 301-9.
6. Su WJ. Recent advances in the molecular diagnosis of tuberculosis. *J Microbiol Immunol Infect* 2002; 35: 209-14.
7. Hayden R, Persing DH. Diagnostic molecular microbiology. *Curr Clin Top Infect Dis* 2001; 21: 323-48.
8. Tong CY, Mallinson H. Moving to nucleic acid-based detection of genital Chlamydia trachomatis. *Expert Rev Mol Diagn* 2002; 2: 257-66.



ANAEROP BAKTERİLERİN MOLEKÜLER TANISI

Bengül DURMAZ

İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.

Moleküler yöntemler, özellikle polimeraz zincirleme reaksiyonu (PCR) teknolojisi, kültürde üretilmeyen ya da üretilmesi zor olan bakteri türlerini tanımlayabilmesi, kültürü yapılabilen ancak fenotipik olarak birbirine yakın özellik gösteren bakteri türlerini de birbirinden ayırt edebilmesi yönünden, kültür yöntemleri ile karşılaştırıldığında daha hızlı, daha duyarlı ve daha kesin sonuçlar verir.

Moleküler yöntemlerle çalışırken canlı mikroorganizmalar gerekmediğinden anaerop örneklerin alınması ve taşınması sırasında aerob atmosferle karşılaşmaları sonucu, anaerop bakteriler ölmesine rağmen, bakteri kaybı olmayacağından, özellikle anaerop bakterilerin tanımlanmasında çok büyük avantaj sağlamaktadır (1). Bilinen anaerob kültür yöntemleri ile klinik örneklerden şimdiye kadar üretilmemiş, anaerob bir çok yeni bakteri türü moleküler yöntemlerle tanımlanarak, sınıflandırılmakta ve hastalıkların etiyolojisindeki rolü araştırılmaktadır.

Günümüzde bilinen cins ve türlere uymayan biyokimyasal karakterlere sahip, anaerob bakteriler, klinik örneklerden izole edilmektedir. Bu durumda DNA'nın ekstraksiyonu, PCR ile çoğaltılması, baz dizi primerleri kullanılarak 16s rRNA geninin DNA baz sırasının tanımlanması ve bu ürünün baz sırasının gen bankasında bilinen 16s rRNA gen sırası ile karşılaştırılması sonucu, anaerob bakteri türleri arasındaki baz farklılığı temeline dayalı filogenetik ağaç yapılandırılmakta ve bu bakteri yeni bir sınıf içinde yer alabilmektedir.

Moleküler yöntemlerin antibiyotik tedavisi sırasında güvenle kullanılabilmesi de ayrı bir avantaj sağlar. Moleküler yöntemlerle anaerob infeksiyonların hızlı tanısı yapılarak, antibiyotiklerin doğru seçimi ve böylece hastaların hastanede kalma süresi de kısaltılabilir. Sadece anaerob infeksiyonların tanısı yapılmakla kalmaz, ilaç direnci ile ilişkili genin saptanması ile ilaca dirençli bakteri fenotipi tahmin edilebilir (2-6)

Moleküler yöntemlerle ilişkili araştırmaların en sık uygulandığı alan diş ve diş eti ile ilgili infeksiyonlardır. PCR yöntemleri, diş kökü ve onu çevreleyen dokuları kapsayan endodontik infeksiyonların patogeneğinde rol oynayan anaerob bakterilerle ilgili devamlı yeni bilgi sağlayarak, ileri tedavi stratejilerinin belirlenmesi yönünde yardımcı olmaktadır.

PCR uygulandığında; endodontik infeksiyonlarda, infekte kök kanallarında, nekrotik pulpa ve tedaviye dirençli vakalarda veya sağlıklı kişilerin tükürüğünde ve implantasyon dişleri ile ilişkili infeksiyonlarda birçok yeni anaerob bakteri türü gösterilmiştir. Zor üreyen anaerob bakteri türlerinin, kültür yöntemleri ile bildirilenden daha yüksek prevalansta oldukları saptanmıştır (1,7-9).

Periodontit, dentoalveolar apseler ve gingivitis vakalarında, 16S rRNA temeline dayalı PCR uygulanıp, amplifikasyonun özgüllüğü amplikonların restriksiyon enzimleri ile kesilip, DNA baz dizisi belirlenerek doğrulanması ile, hangi anaerob bakterilerin bu infeksiyonların etiyolojisinde daha çok rol oynadığı veya hangilerinin patojen olmadıkları saptanabilmektedir (10-12). Aynı yöntemle diş çürüğü olan ve olmayan çocuklardan alınan örneklerde bulunan bakteriler karşılaştırılmakta, yeni türler veya kültürü yapılamayan tipler ve diş çürüğü ile daha önceden ilişkili bulunmayan türler tanımlanabilmektedir. Örneğin: *Actinomyces gerencseria* ve diğer *Actinomyces* türlerinin çürüklerin başlamasında önemli rol oynamakta olduğu ve yeni bir *Bifidobacterium*'un derin çürüklerde başlıca patojen olduğu gösterilmiştir (13).

Endodontik orijinli apselerin "Checkerboard" DNA-DNA hibridizasyon yöntemi ile mikrobiyolojik değerlendirilmesi yapılarak, bu tip apselerin etiyolojisine ilave bilgiler sağlanmıştır(14).

Real-time PCR yöntemi ile, çürük dişlerin mikrobiyolojisi kantitatif olarak saptanarak kronik pulpa iltihabında oluşan histopatolojik değişikliklerle anaerobların ilişkisi ortaya koyulmuştur (15).



"Checkerboard" DNA-DNA hibridizasyon tekniğinin anaerop bakteriyolojide kullanılması ile periodontal mikrofloranın yeniden tanımlanması ile ilgili çalışmalar hızlanmıştır. Asemptomatik, periapikal endodontik lezyonlarda anaerop bakteriler tanımlanabilmekte ve bakterilerin periapikal invazyonu saptanabilmektedir. Periodontal ceplerde bulunan bakterilerin dişe uygulanan cerrahi işlem sırasında alt dokulara ulaşarak bakteriyemilere neden olabildiği düşünülürse, bu yöntemlerle tanının önemi daha da artmaktadır (16).

"Denaturing gradient gel electrophoresis" (DGGE) analizi ile parmak izi ve 16S rDNA baz dizi analizi ile genotipleme yöntemleri uygulanarak, bilinen anaerop kültür yöntemleri ile tanımlanamayan ciddi infeksiyonların araştırılması mümkün olmaktadır. Örneğin: bir kornea ülserinde kompleks anaerop bakteri topluluğunun önemli rol oynadığı bu yöntemlerin birlikte uygulanması ile saptanmıştır(17).

Atopobium vaginae, metronidazol dirençli bir anaerop bakteri olması ile dikkat çekmekte ve tubo-ovarian apselerden izole edilmektedir. Vajen florasının değişmesi ile karakterize polimikrobiyal bir sendrom olan bakteriyel vajinozu (BV) olanlarla normal vajen florası olan kadınlarda yapılan moleküler analizler (DGGE yöntemi ile), *Atopobium vaginae*'nin anormal vajen florasını oluşturan kompleks bakteri ekolojisinin önemli bir elemanı olduğu gösterilmiştir(18).

PCR ürünlerinin "single strand conformational polymorphism" (SSCP) analizi hızlı bir yöntem olarak anaerop bakteri türlerini ayırt etmede kullanılmaktadır. Örneğin: Bu yöntemle karaciğer taşlarında anaerop *Clostridium* türlerinin identifikasyonları yapılarak, *Bacteroides fragilis* ile birlikte taş oluşumunda önemli rol oynadıkları saptanabilmektedir (19).

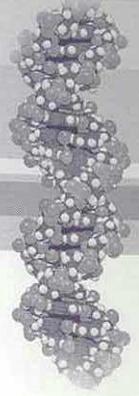
Bakterinin hücre içine invazyonu, patojenite faktörlerinden birisi olup, kommensal bakterilerle oluşan persistant infeksiyonlarda önemli olmaktadır. Çevre koşulları değiştiğinde, kommensal organizmalar fırsatçı patojen olurlar. Floresan in-situ hibridizasyon (FISH) ve lazer tarama konfokal mikroskopi kullanılarak çene epitel hücreleri içinde *Actinomyces actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* ve henüz tanımlanamamış başka türler gibi periodontal patojenlerin, hücre içi üremeleri gösterilerek, bakteri konak ilişkisinde rol oynayan hücre içine invazyonu açıklayıcı, infeksiyonların patogenezi ile ilişkili çalışmalar yapılabilmektedir(20).

İnsan ve hayvan bağırsak normal florasının son derece kompleks olduğu, 400'den daha fazla tür içerdiği ve bunlardan da 30-40 türün dominant olarak bulunduğu bilinmektedir. Anaerop bakteriler, insan bağırsak florasında baskın bir şekilde bulunurlar ve insan sağlığı için çok önemli görevler üstlenmişlerdir. İnsan fizyolojisinde son derece önemli olan insan bağırsağındaki bakteri popülasyonunun dinamiklerini etkileyen faktörleri saptamakla ilişkili çalışmalar, moleküler yöntemlerin uygulanması ile daha hızlı ve güvenilir bir şekilde yapılabilmektedir.

Bağırsak flora bakterilerinin bağırsak kanserine sebep olduğuna dikkat çeken çalışmalar vardır. Antibiyotiklerin bağırsaktaki anaerop floranın kompozisyonuna ve dinamikleri üzerine etkisi araştırılmakta, iki yaşına kadar ağızdan verilen antibiyotik tedavisinin daha sonra oluşacak atopik hastalıkların insidansını arttırdığı ileri sürülmektedir. Bağırsak florası gibi kompleks bir flora içinde etkilenen bakteri gruplarını tanımlayabilen yöntemlerden birisi "terminal restriction fragment pattern" (TRFP) yöntemi diğeri ise PCR-DGGE yöntemidir. Bu yöntemlerin diğer yöntemlere göre üstünlüğü, bir tek örnekten birçok mikroorganizmayı aynı zamanda tanımlayabilmeleridir (21,22).

Arbitrary primed PCR (AP-PCR) ile klonal seviyede tiplendirme yapılarak, infeksiyonlarda etken anaeroplara potansiyel kaynağı ve bulaş yolu saptanabilir. Klinik örneklerden izole edilen anaerop bakterilerin türe özgül tanımlamaları yapılabilir (23-25).

Multiplex PCR yöntemi ile farklı klinik örneklerden aynı anda farklı anaerop bakteriler tanımlanabilmektedir. Bu yöntemle cins ve türe özgül primerler kullanılarak, klinik örneklerden izole edilen çeşitli Gram pozitif anaerop koklar önce cins seviyesinde daha sonra da tür seviyesinde tanımlanabilmektedir. Böylece fenotipik testlerle sınıflandırması çok zor olan Gram pozitif anaerop kokların basit, hızlı ve güvenilir olarak, infeksiyonlardaki rolü daha iyi tanımlanabilmekte, grup üyelerinin antibiyotiklere direnç dereceleri daha doğru olarak değerlendirilebilmektedir(26,27).



Gram pozitif anaerob kokların son derece heterojen grupları içermesi onların sınıflandırılmalarının günümüzde halâ devamlı revizyona uğramasına sebep olmaktadır. PCR ile çoğaltılan rDNA ISR (16S-23S intergenic spacer region) polimorfizm yöntemi uygulanarak sınıflandırılmaları, daha hızlı ve daha ucuz bir yöntem olarak 16s rRNA baz dizi analizi ile sınıflandırmanın önüne geçmiştir (28).

Clostridium difficile'in patojenitesi, salgıladığı toksin A ve B ile doğrudan ilişkilidir. Günümüzde bu toksinleri kodlayan genlerin, dışkı örneğinde doğrudan araştırılmasında hızlı, duyarlı ve özgül bir moleküler yöntem olarak real-time-multipleks PCR kullanılmakta ve anaerob kültür yöntemlerine göre 100 kat daha duyarlı bulunmaktadır. PCR yöntemi, tedavi sırasında ve sonrasında toksik olmayan suşla kolonizasyonun izlenmesine de olanak sağlamaktadır(29, 30).

C.difficile' in hastane kaynaklı bulaşlarının veya hastane salgınlarının saptanmasında AP-PCR ve PCR-ribotipleme benzer ayırt etme gücüne sahiptir, PFGE kullanılarak degradasyona duyarlı DNA'lara sahip *C.difficile* suşlarının da moleküler tiplendirmesi yapılabilmektedir (31,32).

Kalın barsakta sıklıkla kolonizasyona neden olan ve ishal etkeni olarak da bildirilen enterotoksijenik *Bacteroides fragilis* suşlarının, enterotoksin (fragilizin) geninin dışkıdan doğrudan nested PCR yöntemi ile tanımlanması ile inflamasyondaki rolü saptanabilmektedir. Bu toksinin hücre kültürlerinde proto-onkogen c-myc transkripsiyon ve translasyonu ile ilişkili olduğu ve onkojenik transformasyona katılma potansiyeli kazandığı Revers - Transkripsiyon PCR (RT-PCR) ile gösterilerek, kronik kolon patolojilerindeki rolü araştırılabilmektedir (33, 34).

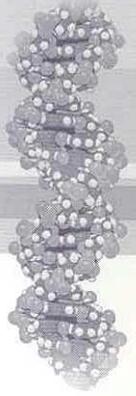
Yurdumuzda anaerob bakterilerin izolasyonunda, birkaç merkez dışında, yeterli olunmadığı bilinen bir gerçektir. Hızlı, duyarlılığı yüksek ve doğru sonuç veren moleküler yöntemlerin anaerob örneklerle uygulanması, anaerob infeksiyonların tanısı, takip ve tedavisinde daha ekonomik ve iş yükünü azaltan yeni stratejiler belirlenmesine yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Siqueira Jr, J F, Roças IN . PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. J Dent, 31:333-339, 2003.
2. Arzese AR, Tomasetig L, Botta GA. Detection of tetQ and ermF antibiotic resistance genes in *Prevotella* and *Porphyromonas* isolates from clinical specimens and resident microbiota of humans. J Antimicrob Chemother, 45:577-582, 2000.
3. Avelar KES, Otsuki K, Vicente ACP et all. Presence of the cfxA gene in *Bacteroides distasonis*. Res Microbiol, 154:369-374, 2003.
4. FosseT, Madinier I, Hannoun L et all. High prevalence of cfxA beta-lactamase in aminopenicillin-resistant *Prevotella* strains isolated from periodontal pockets. Oral Microbiol Immunol, 17:85-88, 2002.
5. Koch CL, Derby P, Abrat VR. In-vitro antibiotic susceptibility and molecular analysis of anaerobic bacteria isolated in Cape Town, South Africa. J Antimicrob Chemother, 42 :245-248, 1998.
6. Mastrantonio P, Spigaglia P, Cardines R. Molecular typing and MLC resistance genes in *Clostridium difficile* nosocomial strains. Clin Microbiol Infect 7(suppl 1): abstracts 1-394, 2001.
7. Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B. et all. Molecular and cultural analysis of the microflora associated endodontic infections. J Dent Res, 81:761-766, 2002.
8. Downes J, Munson MA, Spratt DA et all. Characterisation of Eubacterium-like strains isolated from oral infections. J Med Microbiol, 50:947-951, 2001.
9. Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP et all. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. J Clin Microbiol 39:3282-3289, 2001.
10. Riggio MP, Lennon A, Smith A. Detection of *Peptostreptococcus micros* DNA in clinical samples by PCR. J Med Microbiol. 50:249-254, 2001.
11. Riggio MP, Lennon A . Specific PCR detection of *Peptostreptococcus magnus*. J Med Microbiol, 52:309-313, 2003.
12. Mattö J, Saarela M, Alaluusua S et all. Detection of *Porphyromonas gingivalis* from saliva by PCR by using a simple sample-processing method. J Clin Microbiol, 36:157-160, 1998.



13. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol*, 40:1001-1009, 2002.
14. Siqueira JF, Rocas IN, Souta R et al. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 92:451-457, 2001.
15. Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N. Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J Clin Microbiol* 40:1698-1704, 2002.
16. Sunde PT, Tronstad L, Eribe ER et al. Assessment of periradicular microbiota by DNA-DNA hybridization. *Endod Dent Traumatol*, 16:191-196, 2000.
17. Schabereiter-Gurtner C, Maca S, Kaminsky S et al. Investigation of an anaerobic microbial community associated a corneal ulcer by denaturing gradient gel electrophoresis and rDNA sequence analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 43:193-199, 2002.
18. Ferris MJ, Maszta A, Aldridge KE et al. Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis. *BMC Infect Dis*, 13:4-5, 2004.
19. Liu Y, Lam K, Tang YJ. et al. Anaerobic bacteria and intrahepatic stones. Detections of *Clostridium* sp and *Bacteroides fragilis*. *Chin Med J(Eng)*, 113:858-861, 2000.
20. Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. Intracellular *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in buccal epithelial cells collected from human subjects. *Infect and Immun*, 69:2700-2707, 2001.
21. Khan AA, Nawaz MS, Robertson L et al. Identification of predominant human and animal anaerobic intestinal bacterial species by terminal restriction fragment patterns (TRFPs): a rapid, PCR-based method. *Mol Cell Probe*, 15: 349-355, 2001.
22. Tannock GW. Analysis of the intestinal microflora using molecular methods. *Euro J Clin Nutr*, 56: S44-S49, 2002.
23. Teng L, Hsueh P, Tsai J. PCR assay for species-specific identification of *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J Clin Microbiol*, 38:1672-1675, 2000.
24. Guillot E, Mouton C. A PCR-DNA probe assay specific for *Bacteroides forsythus*. *Mol Cell Probe*, 10:413-421, 1996.
25. Goncalves RB, Robitaille M, Mouton C. Identical clonal types of *Porphyromonas gingivalis* or *Prevotella nigrescens* recovered from infected root canals and subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*, 14:197-200, 1999.
26. Conrads G, Flemmig TF, Seyfarth I. et al. Simultaneous detection of *Bacteroides forsythus* and *Prevotella intermedia* by 16SrRNA gene- directed multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 37:1621-1624, 1999.
27. Song Y, Liu C, McTeague M et al. Rapid identification of Gram- positive anaerobic coccid species originally classified in the genus *Peptostreptococcus* by multiplex PCR assays using genus- and species-specific primers. *Microbiology*, 149:1719-1727, 2003.
28. Hill KE, Davies CE, Wilson MJ. et al. Heterogeneity within the gram-positive anaerobic cocci demonstrated by analysis of 16 S-23S intergenic ribosomal RNA polymorphisms. *J Med Microbiol*, 51:949-957, 2002.
29. Karasawa T, Nojiri T, Hayashi Y. Laboratory diagnosis of toxigenic *Clostridium difficile* by polymerase chain reaction: presence of toxin genes and their stable expression in toxigenic isolates from Japanese individuals. *J Gastroenterol*, 34:41-45, 1999.
30. Belanger SD, Boissinot M, Clairoux N et al. Rapid detection of *Clostridium difficile* in Feces by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol*, 41:730-734, 2003.
31. Wullt M, Burman LG, Laurel MH et al. Comparison of AP-PCR typing and PCR-ribotyping for estimate of nosocomial transmission of *Clostridium difficile*. *J Hosp Infect*, 55:124-130, 2003.
32. Fawley WN, Wilcox MH. Pulsed- field gel electrophoresis can yield DNA fingerprints of degradation-susceptible *Clostridium difficile* strains. *J Clin Microbiol*, 40:3546-354, 2002.
33. Durmaz B. İshal etkeni olarak Enterotoksijenik *Bacteroides fragilis*. *Mikrobiyol Bül*, 36:99-103, 2002.
34. Wu S, Morin PJ, Maouyo D, Sears CL. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. *Gastroenterol*, 124:392-400, 2003.



MİKOBAKTERİLERİN TANI VE İDENTİFİKASYONUNDA MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Alpaslan ALP

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Mikobakteri ailesinde Mycobacterium tuberculosis kompleksi ile birlikte, seksenden fazla tür bulunmaktadır. M. tuberculosis kompleksi dışındaki mikobakteriler non-tüberküloz mikobakteriler (NTM: Non-tuberculous mycobacteria veya MOTT: Mycobacteria other than M. tuberculosis) olarak isimlendirilmişlerdir. Bunların bir kısmı patojenik, bir kısmı fırsatçı, bir kısmı ise patojen olmayan mikroorganizmalardır.

Mikobakteri ailesinin en önemli türü olan M. tuberculosis, dünya genelinde her yıl iki milyondan fazla insanın tüberküloz nedeniyle ölmesine neden olmaktadır. Hasta kişilerin tüberküloz basilini bulaştırmalarını önleyebilmek için, tüberküloz tanısının kısa sürede konması ve zaman kaybetmeden tedaviye başlanması gerekmektedir. Tüberküloz hastalarının erken tanı ve tedavisi, toplumun bu hastalıktan korunmasında en etkili yoldur. Tüberküloz tanısında en yaygın olarak kullanılan yöntemler, aside dirençli boyama yöntemleri sonrasında mikroskopik inceleme ile basilin görülmesi ve bakterinin çeşitli sıvı veya katı besiyerlerinde üretilerek tanımlanmasıdır. Ancak tanı için bu yöntemlerin önemli eksiklikleri vardır. Mikroskopik incelemede aside dirençli basilin görülebilmesi için örneğin mililitresinde en az 10.000 kadar bakteri bulunması gerekmektedir. Kültür ile örnekteki birkaç canlı bakterinin dahi gösterilebilmesi mümkündür ancak kolonilerin katı besiyerinde gözle görülebilir hale gelmesi 4-6 hafta kadar sürebilmektedir. Bu nedenle tüberküloza yakalandığı düşünülen hastaların tanılarını sağlayacak, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı sonuç veren, uygulaması kolay ve pahalı olmayan laboratuvar yöntemlerinin günlük kullanıma girmesi önemli bir gereksinim haline gelmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda geliştirilmiş olan moleküler yöntemler, günümüzde tüberküloz tanısında rutin kullanımda yer almaya başlamışlardır.

Klinik Örneklerden M. tuberculosis Saptanmasında Kullanılan Moleküler Yöntemler

I. Nükleik Asit Hibridizasyon Yöntemleri

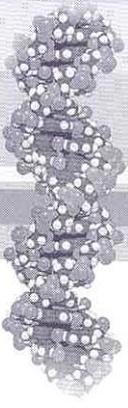
Nükleik asit hibridizasyon yöntemleri, örnekteki hedef nükleik asit dizisinin, komplementeri olan işaretli bir prob ile birleştirilmesi (hibridizasyon) esasına dayanmaktadır. Böylece mikobakterilerin kromozomal DNA veya ribozomal RNA'larının, bunlara özgül olarak bağlanabilen DNA veya RNA problemleri yardımı ile, tür düzeyinde belirlenmesi sağlanabilmektedir. Bu amaçla kullanılan problemler, 30-40 nükleotitten oluşmuş ve hedef dizinin karşılığı olarak laboratuvar ortamında sentezlenmiş, genellikle bir dedektör molekülüyle işaretlenmiş oligonükleotitlerdir. Bu yöntemlerin özgüllüklerinin çok yüksek olmasına karşın duyarlılıkları fazla yüksek değildir. Prob olarak kullanılan moleküllerin örneğe yeterince bağlanabilmesi için örnekte çok sayıda nükleik asit bulunması gerekmektedir. Bu nedenle problemler genellikle, kültürde üremekte olan mikobakterilerin erken saptanması veya nükleik asit çoğaltma yöntemlerinde amplifikasyon sonrasında elde edilen ürünlerin tanımlanması amacıyla kullanılmaktadırlar.

II. Nükleik Asit Çoğaltma Yöntemleri

Bu yöntemler, aranan etkende bulunan özgül bir nükleik asit dizisinin, saptanması mümkün bir düzeye ulaşana kadar çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Hedef nükleik asit dizisi, özgül primerler ve enzim kullanılarak çoğaltıldıktan sonra, çeşitli yöntemler kullanılarak saptanırlar. Nükleik asit çoğaltma yöntemleri ile örnekteki çok az miktardaki mikroorganizmanın saptanabilmesi mümkündür. Ancak bu yöntemler örnekteki inhibitörlerden etkilenebilir ve kontaminasyona duyarlıdır. Bu iki sorun hibridizasyon yöntemlerinde görülmez.

A. Nükleik asitte hedef bölgenin çoğaltılması

1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR): PCR yöntemi, çoğaltılması istenen DNA örneğinin, DNA replikasyonu için gerekli maddelerle birlikte, üç değişik ısıda bir siklus içerisinde tutulması esasına dayanır. Denatürasyon, birleşme ve replikasyon basamakları sonrasında hedef DNA çoğaltılmış olur. PCR ile M. tuberculosis'in balgam, plevral sıvı, apse içeriği, BOS, idrar ve biyopsi materyali gibi klinik örneklerde saptanması mümkündür. PCR ile klinik örneklerde 10 kadar basilin saptanabilmesi mümkün hale gelmiştir. Ancak duyarlılığı bu derece yüksek olan bir yöntemin yalnızca pozitif sonuçları da birlikte getirmesi kaçınılmazdır. Örneklerin PCR için hazırlanması sırasında, bakteri ya da eski



PCR ürünlerinin bulaşması zaman zaman önemli sorunlar doğurabilmektedir. Yöntemin güvenilirliğinin sağlanabilmesi için örneklerle birlikte mutlaka bir negatif ve bir pozitif kontrol çalışılmalı, sonuçlar klinik bulgular ve diğer laboratuvar yöntemleri ile birarada değerlendirilmelidir. Çoğaltılan ürünlerin elektroforez yapılmaksızın saptanmasına yönelik olarak yapılan çalışmalar sonucunda, otomatize PCR sistemleri ve real time PCR yöntemleri geliştirilmiştir.

Amplificor Sistemi: Bu yöntemde öncelikle *M. tuberculosis* 16S rRNA'sı biyotin ile işaretli primerlerle çoğaltılır. Çoğaltma sonrasında amplikonlar denatüre edilir ve elde edilen tek zincirler, özgül problarla hibridize edilir. Bunu takiben avidinle bağlı peroksidaz konjugatı, biotinle işaretli amplikona bağlanır. Bağlanmış konjugat, peroksit varlığında 3,3', 5,5'-tetrametil benzidin ile reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluşturur. Sonuçlar fotometre ile ölçülerek değerlendirilir. Bu işlemlerin tamamı, kapalı bir sistem olan Amplificor cihazı (Roche Diagnostics) içerisinde gerçekleştirilir.

Real Time PCR: Nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalinin ölçülmesiyle, kantitatif sonuç alınabilen PCR yöntemidir. Böylece *M. tuberculosis*, elektroforeze gerek kalmadan kısa bir süre içinde saptanabilmektedir. Tüpler açılmadan test tamamlandığı için kontaminasyon riski azalmaktadır. Günümüzde tüberküloz tanısında kullanım alanı bulmuş çeşitli real time PCR yöntemleri mevcuttur.

Syber Green Boyası Kullanılarak Real Time PCR ile Amplifikasyonun Saptanması: Primerlerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan "cyber green" miktarı artar ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenir. Elde edilen floresansın istenen hedef bölgenin amplifikasyonu ile gerçekleştiği, yoksa primer dimer oluşumu ile ortaya çıkmış non-spesifik bir ürün mü olduğunu anlayabilmek için "melting curve" (erime eğrisi) analizi yapılır.

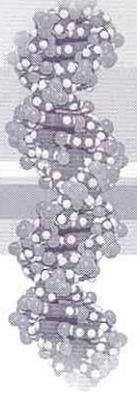
Özgül Problar Kullanılarak Real Time PCR ile Amplifikasyonun Saptanması (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer): Özgül problardan biri 3' ucundan floresans boya ile işaretli (donör boya), diğeri 5' ucundan alıcı boya (acceptor dye) ile işaretlidir. Problar hedef bölge üzerinde birbirine yakın yere (1-5 nükleotid uzaklıkta) bağlanır ve işaretli uçlar yanyana gelmiş olur. İki boyanın yanyana gelmesiyle açığa çıkan enerji, ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna neden olur. Oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine (PCR ile oluşan ürün miktarına) bağlı olarak artar.

TaqMan Probları Kullanılarak Real Time PCR ile Amplifikasyonun Saptanması: Bu sistemde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli TaqMan problemleri kullanılır. Probu 5' ucunda raportör florokrom, 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom bulunur. Prob, tek sarmal hale getirilen hedef bölge üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob-hedef bölge arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' ucundaki baskılayıcı florokrom madde tarafından engellenir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için TaqDNA polimeraz enzimi 5'-3' ekzonükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' ucundan itibaren yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen ürün arttıkça, floresans miktarında artma gözlenir.

2. Transkripsiyon Bazlı Amplifikasyon (TMA): Tüberküloz tanısında kullanılabilen izotermal bir RNA amplifikasyon yöntemidir. Transkripsiyon bazlı olan bu yöntem, RNA polimeraz ve revers transkriptaz enzimleri yardımıyla RNA çoğaltılması esasına dayanır. RNA'nın DNA'ya göre daha labil olması nedeniyle, kontaminasyon riski daha düşük, özgüllük daha yüksektir.

A. Nükleik asit üzerinde özgül problemlerin çoğaltılması

LCR (Ligase Chain Reaction): DNA saptanması amacıyla geliştirilmiş bir prob hibridizasyon-ligasyon yöntemidir. Bu sistem primerlerden amplikon üretmek yerine, termostabil ligaz enzimi yardımıyla prob çoğaltılması esasına dayanır. PCR'da olduğu gibi termal döngü cihazına gereksinim vardır. Termostabil ligaz enziminin kullanıldığı LCR ile sadece iki primer boyu kadar uzunlukta amplikonlar elde edilir. Denatürasyon sonrasında kalıp tek zincirli DNA üzerindeki hedef dizilere yanyana yerleşen oligonükleotid problemler, termostabil ligaz enzimi yardımı ile birleştirilirler (ligasyon). Ligasyona uğramış oligonükleotid çiftleri ve orijinal diziler bir sonraki siklusta kalıp olarak kullanılır ve tekrarlayan sikluslar sonrasında milyarlarca hedef dizi üretilir.



Tüberküloz Tanısında Kullanılan Moleküler Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tüberküloz şüphesi bulunan hastalardan tanı amacıyla, üç farklı günde alınmış örneklerin değerlendirilmesi önerilmektedir. Tüberküloz tanısında kullanılacak olan moleküler yöntem, hastadan alınmış olan ilk örneğe uygulanmalıdır. Hem mikroskopik inceleme sonucu hem de moleküler test sonucu pozitif olarak bulunursa, hastanın tüberküloz olduğu sonucuna varılabilir. Mikroskopik incelemenin pozitif, moleküler testin negatif bulunduğu durumlarda, örnekte inhibitör varlığı araştırılmalıdır. Bazı testlerde kullanılan internal kontrollerle inhibitör varlığı saptanabilmektedir (Amplicor sistemi). Bunun mümkün olmadığı yöntemlerde, örneğin bulunduğu tüp içerisine *M. tuberculosis* DNA'sı katılarak inhibitör varlığının araştırılması sağlanabilir. İnhibitör saptanmaması durumunda mikroskopik inceleme sonucunun pozitif çıkması, örnekte NTM varlığı ile açıklanabilir. Eğer inhibitör varlığı saptanmışsa, sözkonusu örnek için moleküler testlerin tanısal bir değerinin olamayacağı sonucuna varılır. Mikroskopik inceleme sonucunun negatif, moleküler test sonucunun pozitif çıkması durumunda, test yeni bir örnekle tekrarlanmalı, yine pozitif sonuç alınması durumunda hastada tüberküloz olduğu düşünülmelidir. Hem mikroskopik inceleme, hem de moleküler test sonuçlarının negatif olarak bulunması durumunda hastanın tüberküloz olmadığı düşünülür. Ancak böyle bir durum, hastada kesin olarak tüberküloz bulunmadığı anlamına gelmemelidir. Tedaviye yönelik kararın alınmasında klinik değerlendirmeler ışığında yorum yapılmalıdır.

Tüberküloz tanısında kullanılmakta olan moleküler yöntemler, tanı konma sürecini belirgin derecede kısaltmaktadırlar. Ancak buna rağmen moleküler testler, mikroskopik inceleme ve kültür yöntemlerinin yerini alamamışlardır.

Mikobakterilerin İdentifikasyonunda Kullanılan Moleküler Yöntemler

Günümüzde klinik örneklerde saptanan mikobakterilerin tür düzeyinde identifikasyonu amacıyla biyokimyasal testler yerine moleküler yöntemler tercih edilmektedir. NTM infeksiyonlarının laboratuvar tanısında moleküler yöntemler, mikobakteri türleri arasında farklılık gösteren gen bölgelerinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Hedef olarak seçilen başlıca gen bölgeleri 16S rRNA, hsp65, recA ve rpoB genleridir. Bu gen bölgelerinin dizi analizi sonucunda saptanarak, standart suşlarla karşılaştırılması ile güvenilir bir şekilde tür tayini yapılabilmektedir. 16S rRNA geni, bakterilerin moleküler identifikasyonunda altın standart olarak kabul edilen bir hedef bölgedir. Çünkü hem her bakteriye özgü çok iyi saklanmış diziler içerir, hem de her türe göre değişen dizilere sahiptir. Bu değişken dizilerin PCR ile çoğaltılması sayesinde tür tayini mümkün olabilmektedir. 16S rRNA geninin dizi analizi tüm mikobakteri türlerinin tanımlanmasını sağlayabilmektedir. Mikobakteri identifikasyonunun dizi analizi ile yapılabilmesi amacıyla üretilmiş olan çeşitli ticari kitler mevcuttur. Bunlardan MicroSeq 500 16S rDNA bakteriyel dizi analizi kiti (Applied Biosystems), mikobakteriyel 16S rRNA 5' ucundan 500 baz çiftlik bir bölgenin amplifikasyonunu ve sonrasında dizi analizini sağlayarak tür düzeyinde identifikasyon sağlamaktadır.

16S rRNA dizilerinin karşılaştırılması mikobakterilerin identifikasyonunda güvenilir bir yöntem olmakla birlikte, *M. gastri* ve *M. kansasii* gibi bazı türlerin ayırtdedilmesinde yetersiz kalabilmektedir. Bu gibi türlerin identifikasyonu amacıyla, recA gen dizilerinin karşılaştırılmasından da yararlanılmaktadır. recA geni tüm bakterilerde bulunan, DNA hasar onarımı, DNA sentezi ve hücre bölünmesinde rolü olan bir gendir. Bu gen bölgesinin kullanılmasıyla, özellikle 16S rRNA gen dizileri çok benzer çıkan türlerin ayırtdedilebildiği gösterilmiştir.

"Single-stranded conformation polymorphism analysis" (SSCP) yöntemi, mikobakterilerin identifikasyonunda dizi analizine alternatif olan bir yöntemdir. Bu yöntemde hedef genin PCR ile çoğaltılmış küçük dizileri kullanılır. Bu diziler ısı ile denatüre edilerek, tek zincirler elde edilir. Tek zincirlerin renatürasyonu sonrasında, farklı dizilerdeki parçalar farklı tersiyer konformasyonlar oluştururlar. Bu parçalar elektroforez ile ayrıştırıldığında, her parça farklı bir hızla hareket eder. Bu yöntem temel olarak genomik DNA'daki nokta mutasyonlarının belirlenmesinde kullanılır. Mikobakteri türlerinin identifikasyonuna yönelik olarak geliştirilmiş olan SSCP yönteminde, mikobakteriyel 16S rRNA geninin değişken bölgelerine özgül dört ayrı çift iplikçikli parça, dört çift fluoressan primer ile çoğaltılmakta ve elde edilen ürünlerin SSCP analizi yapılmaktadır. Bu yöntemle PCR sonrasında SSCP analizi sonucu 30 dakika içinde alınabilmekte, kapiller elektroforez sistemi sayesinde aynı anda 16 örnek test edilebilmektedir.

PCR-restriksiyon enzim analizi yöntemi, mikobakterilerin identifikasyonunda kullanılan pratik ve ekonomik bir yöntemdir. Restriksiyon enzim analizi için çeşitli çalışmalarda 16S rRNA, hsp65 "heat shock protein" geni ve rpoB geni

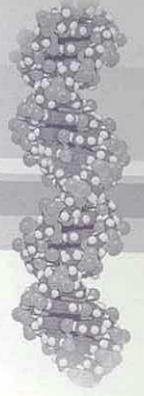


hedef olarak seçilmiştir. Yapılan çalışmalarda, RNA polimeraz enzimini kodlayan rpoB geninin dört restriksiyon enzimi ile (HaeIII, HindII, MvaI ve AccII) kesilmesi ile elde edilen bant paternleri, standart bant paternleri ile karşılaştırılarak mikobakteri türlerinin identifikasyonu sağlanmıştır. PCR-restriksiyon enzim analizi yönteminde son yıllarda seçilmiş hedef bölgelerden biri de ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesidir. Bu bölge, 16S ve 23S rRNA'ları kodlayan genler arasında bulunan bir diziden oluşmaktadır. Bu dizide de, her türe özgü farklı nükleotidler bulunması nedeniyle, yapılan çalışmalarda mikobakterilerin identifikasyonu sağlanabilmektedir. Ancak bu bölgedeki polimorfizm oranının çok yüksek olması nedeniyle, sonuçların değerlendirilmesinde bazı zorluklar yaşandığı görülmüştür.

65 kDa ağırlığındaki hsp65 genini hedef alarak yapılan PCR-restriksiyon enzim analizi, yaygın olarak kullanılmakta olan mikobakteri identifikasyon yöntemlerinden biridir. hsp65 geni, hem çok iyi korunmuş diziler içermekte, hem de türden türe farklılık gösteren diziler bulundurmaktadır. PCR-restriksiyon enzim analizinde bu genin 441 baz çiftlik bir dizisi çoğaltılarak kullanılmaktadır. İki özgül primer kullanılarak çoğaltılan ürünler, BstII ve HaeIII restriksiyon enzimleri ile kesilmektedir. Böylece elde edilen restriksiyon parçaları poliakrilamid jelde yürütülerek ayrıştırılmaktadır. Poliakrilamid jel elektroforezi sonrasında görülen bantın molekül ağırlığının tam olarak anlaşılabilmesi için molekül ağırlık standartı ile karşılaştırılması gereklidir. İki restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda, 80'e yakın mikobakteri türünün herbiri kendine özgü bantlar oluşturduğundan, oluşan bantların molekül ağırlığının belirlenmesi mikobakterilerin identifikasyonunu sağlamaktadır. Bunun için tek yapılması gereken, örneklerde oluşmuş bantların moleküler ağırlık standartı ile karşılaştırılarak ağırlıklarının saptanması ve hangi türün bantları ile uyduğuna bakılmasıdır. Böylece her örnekte iki restriksiyon enzimi ile oluşturulan parçalardaki bantlar saptanarak NTM türünün ismi belirlenebilmektedir. Ancak bazen klasik moleküler ağırlık standartları ile yapılan karşılaştırmalarda, birbirine çok yakın bantların değerlendirilmesinde güçlükler yaşanabilmektedir. Bu güçlüğü aşabilmek amacıyla geliştirilmiş olan bir NTM identifikasyon kitinde, bilinen mikobakteri türlerinin hem BstII restriksiyon enzimi ile, hem de HaeIII restriksiyon enzimi ile kesildiğinde oluşturacağı olası bant şekillerini içeren iki değişik moleküler ağırlık standartı bulunmaktadır (Mycotype-All, Salubris). Bu iki moleküler ağırlık standartı ile karşılaştırma yapılırken, elde edilmiş olan bantların tamamının bir karşılığı olduğundan, değerlendirme sırasında hata payı önemli ölçüde azalmaktadır. Çeşitli çalışmalarda elde edilen sonuçlar, PCR-restriksiyon enzim analizi yönteminin mikobakteri türlerinin identifikasyonunda rutin laboratuvar kullanımına uygun, ekonomik, pratik ve hızlı bir yöntem olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E et al. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2799-2806.
2. Cloud JL, Neal H, Rosenberry R et al. Identification of *Mycobacterium* spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. *J Clin Microbiol* 2002 ; 40:400-406.
3. DesJardin LE, Chen Y, Perkins MD et al. Comparison of the ABI 7700 system (TaqMan) and competitive PCR for quantification of IS6110 DNA in sputum during treatment of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1964-1968.
4. Durmaz R. Polimeraz zincir reaksiyonunun tipleri. Durmaz R (edt), *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*, 2. baskı, Kozan Ofset, Ankara, s :35-43.
5. Ergin A, Kocagöz T, Us D. Evaluation of 120 mycobacterial strains isolated from clinical specimens to the species level by polymerase chain reaction-restriction enzyme analysis. *Scand J Infect Dis* 2000; 32:657-662.
6. Gillman LM, Gunton J, Turenne CY et al. Identification of *Mycobacterium* species by multiple-fluorescence PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3085-3091.
7. Huggett JF, McHugh TD, Zumla A. Tuberculosis: amplification-based clinical diagnostic techniques. *Int J Biochem Cell Biology* 2003; 35:1407-1412.
8. Kaul KL. Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis*: Impact on patient care. *Clin Chemistry* 2001; 47:1553-1558.
9. Kocagöz T. Tüberküloz tanısında kullanılan moleküler yöntemler. Ağaçfidan A, Badur S, Türkoğlu S (edt), *İnfeksiyon hastalıklarının laboratuvar tanısında moleküler yöntemler*, M.G.G. As Matbaacılık, İstanbul, s:189-195.
10. Scarparo C, Piccoli P, Rigon A et al. Comparison of enhanced *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct test with Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1559-1562.
11. Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chemistry* 2001; 47:809-814.



HELICOBACTER PYLORI TANISINDA KULLANILAN MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Fatih KÖKSAL

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana

Özet: *Helicobacter pylori* ve gastroduodenal hastalıklar arasındaki ilişkinin ispatı gastroenteroloji ve Klinik Mikrobiyoloji disiplinlerinin ortak çalışmaları ile 20. yy'ın sonunda elde ettikleri en büyük başarıdır. Bu çok önemli buluş nedeni çok iyi bilinmeyen önemli bir hastalık grubu için yeni ve başarılı tedavi imkanı ile riski azaltma şansı vermiştir. Ancak *H. pylori*'nin hastalardan çok sağlıklı asemptomatiklerdeki mide kolonizasyonu, kolonize hastalardaki prognozun farklılığı, bu mikroorganizmanın hastalık oluşturma yeteneğinde farklılıklar olduğu virulansla ilişkili faktörlerin suşlar arasındaki dağılımın farklı olduğunu göstermiştir. Bu şartlar altında klinik örneklerde sadece bakterinin varlığını gösteren düşük duyarlılığa sahip kültürde izolasyon gibi fenotipik karakterlere dayalı tanı yöntemlerinin yerine, örnekdeki bakterinin genotipik karakterlerini ortaya koyan, virulansla ilgili gen karakterlerini veya bir gene ait alleleri tanımlayabilen yüksek duyarlılık ve özgüllükteki moleküler tanı yöntemleri çeşitli modifikasyonları ile yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır. *H. pylori* ve gastroduodenal patoloji ilişkisinde bu gün hala cevaplanamamış pek çok soru olmakla beraber, bilgilrimizin birçoğunu ve daha da önemlisi sorgulama yeteneğimizin gelişimini moleküler tanı yöntemlerine borçluyuz.

Burada *H. pylori* çalışmalarında kullanılan genel testler içerisinde moleküler tanı yöntemlerinin yeri, önemi, virulansın açığlanmasında kazandırdıkları hakkında literatüre dayalı bilgi aktarılacaktır.

Genel Bilgiler: *H. pylori* gram-negatif, spiral şeklinde bir uçta yer alan 4-6 adet arasında değişen sayıdaki kılıflı flagellaları ile son derece hareketli, mikroaerofilik mikroorganizmalardır. Antibiyotik ve üreme faktörleri eklenmiş zenginleştirilmiş besiyerlerinde 30-370C arasında iyi üreyen 250C'de üremeyip, 420C'de üreme yeteneği suşlar arasında farklılık gösteren *H. pylori* oksidaz, katalaz ve güçlü üreaz aktivitesi, nitrat redüksiyon yeteneği, sülfürlü bileşikler kullanarak H₂S oluşturabilmesi, hippurati hidrolize edememesi, nalidiksik aside dirençli, sefalotine duyarlı olması ile laboratuvarında tanımlanabilir. *H. pylori* suşları her ne kadar in vitro şartlarda major karbonhidratları katabolize edemeseler de nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ile bu bakterilerde monosakkarit kinaz aktivitesinin olduğu gösterilmiştir. Bu bakteriler in-vivo şartlarda vücutta bol miktarda bulunan glikozu fermente etmekten çok enerji dönüşümünde fosfat alıcısı-substrat- olarak kullanılmaktadır. Ayrıca *H. pylori* suşları *campylobacter*'lerden farklı olarak elektron transport sistemlerinde proton taşıyıcısı olarak görev yapan, protein yapıda olmayan metillenmemiş MK-6 kinonlara sahiptir (23). *H. pylori* izolatlarının identifikasyonu ve tiplendirilmesinde bakterinin LPS O spesifik yan zincirine veya Lewis antijenlerine karşı elde edilen spesifik antikolar da kullanılmaktadır. Ancak özellikle Lewis antijenleri konservatif antijenler oldukları için genetik yapıdaki küçük ancak önemli mutasyonları tespitite yetersiz kalmış, klinik izolatların yaklaşık olarak % 15'i de bu yöntemlerle tiplendirilememiştir. Fenotipik özelliklere göre tiplendirme için yeni yöntemler denenmektedir. Mesela LPS'in spesifik O yan zincirindeki karbonhidratlara bağlanan lektin bazlı tiplendirme ile 16 farklı ülkeden toplanan 309 suş ile yapılan bir çalışmada 10 farklı lektin tipi belirlenmiştir (31).

H. pylori konak ve doku tropizmi gösteren bir bakteridir. İnsanlarda mide mukozasına tropizm gösterir. Doğada kedi, köpek, domuz ve kemiriciler gibi bir çok farklı hayvan türünde farklı intestinal *Helicobacter* türü tanımlanmıştır. Ancak insanlara en iyi uyum sağlamış, gastroduodenal patolojiye sebep olan tür *H. pylori*'dir (30). *H. pylori*-insan birlikteliği en azından 2500 yıllık bir geçmişe dayanmaktadır (58). *H. pylori* infeksiyonlarının insidansı gelişmekte olan ülkelerde %3-10/yıl, prevalansı da >%75 iken, gelişmiş ülkelerde insidans %0.5 prevalans oranı ise %10-30 arasında değişmektedir. *H. pylori* infeksiyonları sıklıkla çocukluk döneminde kazanılır ve birden fazla suş bu dönemde midede kolonize olabilir. Ancak suşların çoğu spontan olarak eradike edilebilir. Baskın genotip aileseldir ve bu baskın yerleşim uyum sağlayan bir genotip konakta kalıcı kolonizasyon gösterebilir. Baskın genotip aileseldir ve bu baskın yerleşim diğer suşlarla bir yarış sonu kazanılan bir kalıcılık olmayıp ailenin şartlarına uyum sağlamış gastrik kolonizasyona adaptasyonun sonucudur (34). "Rhesus" maymunlarında 7 farklı suşun birlikte verildiği deneysel infeksiyonlarda da benzer sonuçlar alınmıştır (21). Her ne kadar ileri yaştaki hastaların mide biyopsi örneklerinde batı toplumlarında



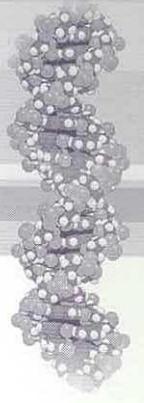
%10.8, Brezilya'da %15.4, Portekiz'de %44.5, Meksika'da %65.0 ve Güney Amerika'daki diğer ülkelerde %23.8 oranında birden fazla suşun görüldüğü bildirilmişse de bu miks kolonizasyonun gerçekten bir miks enfeksiyona mı yoksa midenin antrum ve korpus gibi farklı bölgelerinde adapte olmaya çalışan bir suşun genotipik mutantlarına mı bağlı olduğu kesin açıklanamamıştır. Ancak kişi ve çevre hijyeni bozuk toplumlarda hayatın her döneminde yeniden enfeksiyon riski miks enfeksiyon ihtimalini artırmaktadır (5, 27).

H. pylori mide kolonizasyonu esnasında taşıyıcıların çok az bir kısmında kronik gastrit indüklenmekte, mide ve duodenumda ülser, atrofik gastrit, düşük dereceli MALT lenfoma ve adenokarsinoma görülebilmektedir. Yüksek prevalansa rağmen H. pylori ile enfekte kişilerin sadece %30'unda semptom gelişmektedir. Bu düşük insidans H. pylori ile gastroduodenal hastalıklar arasındaki etiyolojik ilişkiye kuşku düşürse de gerek geniş vaka grupları ile klinik yapılan çalışmalar, gerekse "pigtail macaque" ve "Rhesus" maymunları ile yapılan deneysel çalışmalarda H. pylori'nin yüzeyel gastrite yol açtığı ispatlanmıştır. Rhesus maymunlarında H. pylori enfeksiyonu ile yaratılan gastritin H. pylori eradikasyonu ile iyileşme sürecine girdiği gösterilmiştir (43). H. pylori patogenezi ile ilgili çok sayıda spekülasyon bulunmakla birlikte immunopatoloji en çok kabul gören hipotezdir. H. pylori 1994 yılında tip 1 karsinojen olarak kabul edilmiştir. Enfekte kişilerde gastrik kanser gelişme riski %3.8-8.7 arasında değişmektedir. Karsinogenezin ve MALT lenfomanın patofizyolojisi tam olarak aydınlatılamamış olmakla beraber burada da immunopatoloji etkindir. H. pylori enfeksiyonu esnasında midede pH 4.5'e kadar çıkmaktadır. Yüksek pH adi bakterilerin ve metabolitlerinin midede aşırı derecede artışına sebep olmakta, bu metabolitler nitratların nitritlere redüksiyonunu indüklemektedir. Mideye çeşitli gıdalar veya ilaçlarla alınan aminler ve amidler bu nitratlarla birleşerek karsinojen N-nitrozo bileşiklerini oluştururlar. Kronik inflamasyonda yer alan polimorf nüveli lokositler, lenfositler ve makrofajların yarattığı oksijen ve nitrik oksit radikalleri de mukozal hücrelerde neoplastik transformasyonu tetikleyebilirler (62). H. pylori ile enfekte hastalarda mukozal askorbik asit miktarı düşmekte ve lipid peroksidasyonu artmaktadır ki bu da karsinogenezi tetiklemektedir. Sonuç olarak H. pylori ile kolonize kişilerin en az %2-4'ünde 10 yıllık bir süre içerisinde mukozal hücrelerdeki hasara bağlı olarak diffüz veya intestinal tip adenokarsinoma gelişebilmektedir (23). Günümüzde H. pylori ile ilgili çalışmalar gastroduodenal patolojinin gelişimini etkileyen bakteri, konak ve çevreye ait faktörlerin belirlenmesi ve H. pylori kolonizasyonunun yanı sıra kolonize suşlardaki muhtemel virulans faktörlerini tayin edecek tanı yöntemlerinin geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Bu bağlamda moleküler tanı yöntemlerinin kullanıldığı çalışmalarda çok değerli sonuçlar üretilmiştir.

Patoloji: Moleküler tanı yöntemleri kullanılarak yapılan araştırmalarda H.pylori enfeksiyonlarının seyrini etkileyen bakteri ve konağa ait önemli bilgiler elde edilmiştir.

Bakteriye ait faktörler: H. pylori genomu bakterinin bulunduğu çevre şartlarına kendisini adapte edebilmesi amacı ile bilinen diğer bakterilere göre çok daha yüksek oranda değişkenlik gösterir. Suşlar arasındaki %3-5 oranına ulaşan genetik farklılıklar; son derece iyi korunmuş genlerdeki nokta mutasyonları kadar, non-konservatif bölgeler, mozaik genler ve kromozomal organizasyonlardaki delesyon ve insersiyon mutasyonları şeklinde de görülür. Genotipik değişimler etnik yapı ve coğrafi bölgeye göre şekillenebildiği gibi aynı konakta antrum ve korpusta kolonize olan suşlar arasında da görülebilmektedir. Hatta bir tek biyopsi örneğinden üretilen suşun kolonileri ayrı ayrı incelendiğinde, koloniler arasında bile genetik farklılaşmalar gösterilmiştir. Genetik değişiklikler sıklıkla farklı bir konağın enfeksiyonu esnasında uyum amaçlı olarak şekillense de, aynı konak değişen şartlara bağlı olarak 7-10 yıl gibi bir süre içerisinde nokta mutasyonları ve hatta cagA gibi önemli genlerin kaybı ile sonlanan delesyonel mutasyonlar şeklinde de ortaya çıkmaktadır (18).

H. pylori'nin genetik yapısındaki bu değişkenlik bakteriye ait varsayılan virulans genlerinin de önemini tartışılır hale getirmektedir. Mesela gastrik karsinoma olgularının en sık görüldüğü Japonya (tahminen 235.000 vaka veya % 0.4/yıl insidans) ve Çin gibi ülke izolatlarında çok yüksek prevalansta olup virulansla ilişkilendirilemeyen cagA ve vacA gibi bazı genler ve sekrete ettikleri proteinler batı dünyasında gastrik adenokarsinoma ve peptik ülser için prediktif değer taşımaktadır. Bu nedenle virulansa etki eden bakteriye ait faktörleri tespit için daha geniş grupları kapsayan moleküler düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu güne kadar yapılan çalışmalarla bakteriye ait cagPI ile ilişkili genler, vacA gibi genler virulansla ilişkilendirilmiştir.



cag (cytotoxin associated gene) patojenik ada (cagPI) genleri : cagPI, 40kb büyüklüğünde ve cagA, cagE, cagG, cagH, cagI, cagL, cagM, ve virB11 gibi 30'dan fazla genden oluşan bir ORF (open reading frame) bölgesidir. Bu gen adası diğer bakterilerde olduğu gibi virulansla ilgili ve özellikle de tipIV sekresyon sisteminde rol alan agresif proteinleri kodlar. cagPI'ye sahip suşlar konakta IL-8 gibi proinflamatuvar kemokinlerin salgılanmasını artırarak immunopatolojiyi tetiklerler. cagPI taşıyan suşlar tip I suşlar olarak tanımlanırlar ve bu suşlar ülser ve gastrik karsinomalar gibi ciddi klinik tablolarla ilişkilendirilirler. cagPI taşımayan suşlar ise tip II suşlar olarak tanımlanıp, daha çok non-ülser dispepsi gibi benign gastrointestinal rahatsızlığı olan hastalardan izole edilirler. *H. pylori* suşlarına bilinmeyen bir bakteriden aktarıldığı düşünülen ve glutamat rasemaz geni içerisine yerleşen bu gen adası suşlar arasında horizontal olarak aktarılmaktadır. cagPI genleri, ya aralıksız olarak peşpeşe dizilerek bir bütünlük gösterir veya araya giren insersiyon segment IS605 ile ayrılmış sağ, cagPI-I ve sol, cagPI-II olarak tanımlanan 2 altüniteye bölünürler. cagPI-II subünitesinin 3' ucunda yer alan ve tip IV sekresyon sisteminin en önemli komponenti olan cagE geni virulans faktörlerinin hücre membranından salgılanmasını sağlayan 101kDa luk bir polipeptidi kodlar. cagPI'de yer alan cagA geni cagPI için bir indikatör olarak kullanılmaktadır. Ancak bakterinin konağa uyum çabasının bir sonucu olarak cagPI de cagA'nın da dahil olduğu genlerde yüksek oranda delesyonel mutasyonlar görülmektedir (13).

PCR, mikroarray DNA ve DNA dizi analizi yöntemi kullanarak 66 klinik izolatin değerlendirildiği bir çalışmada izolatların %76'sında cagPI'nin intakt olduğu, %15'inde delesyona bağlı olarak kısmi cagPI görüldüğü, suşların %9'unda ise cagPI'nin hiç olmadığı gösterilmiştir. Mutant suşlardan 3 tanesinde cagA olmadığı bildirilen çalışmada, cagA'nın cagPI için bir önşart olmadığı belirtilmiştir. İntakt cagPI'ye sahip suşların delesyonel mutasyon gösteren suşlara göre daha yüksek oranda IL-8 üretimini uyardığı bildirilerek virulansa atıfta bulunulmuştur (43). Bir başka çalışmada cagA pozitif 10 hastaya ait izolat ile cagA negatif 6 hastaya ait izolatların besiyerinde üretilmiş 150 farklı kolonisi cagPI'deki mutasyonlar yönünden PCR ve RAPD yöntemlerini kullanarak araştırılmış ve test edilen cagPI pozitif suşların %24.7'sinde kısmi veya total delesyonel mutasyon görüldüğü tespit edilmiştir. Mutant suşlar arasında cagA genindeki delesyonun %87.3 oranında, cagE'de ise % 77 oranında görüldüğü bildirilmiştir. Ancak farklı bölgelerde farklı etnik yapıya sahip ve farklı patolojik tabloların görüldüğü hastalardan izole edilen suşlarda bu mutasyonların klinik tabloyu değiştirdiğini göstermek mümkün olamamıştır (56, 67).

cagA: Bu gen Tip I suşlarında CagA olarak tanımlanan, 120 ila 140 kDa molekül ağırlığında, 1.147-1.181 amino asit uzunluğunda, güçlü immunojenik aktiviteye sahip olan sitotoksik bir dış membran proteinini kodlar. Etnik, bölgesel ve klinik farklılıklar göstermekle birlikte *H. pylori* suşlarının %50-90'ında CagA üretilir. IL-8, IL-6 ve tümör nekrotizan faktör (TNF) gibi proinflamatuvar kemokinlerin salınımını uyararak CagA proteini sitotoksik özelliğinin yanı sıra epitele bağlanmada da rol oynar. CagA proteini TipIV sekresyon sistemi yardımı ile ekstrasellüler ortama salgılanır. CagA gastrik hücrelere transloke olduktan sonra konak hücre kinazlarını uyarır. CagA içerisindeki fosforillenmiş tirozin residüleri gastrik epitelde bakterinin bağlanma alanlarındaki proteinlerin fosforilasyonuna sebep olur. Bunlar ökaryotik sinyal transdüksiyon şantını, nükleer faktörleri ve sitoskeletal esnekliği aktive ederler. Sitokinlerin salınımı indüklenmiş olur. cagA negatif mutant suşlarla yapılan çalışmalarda epitel yüzeyindeki adeziv proteinlerin fosforillenmesi gerçekleşmez (4). *H. pylori* CagA proteini içerisinde 3 tane farklı nükleotid tirozin fosforilasyon motifi tespit edilmiştir. Bunlar TPM A, B ve C olarak tanımlanmıştır. Bu motiflerin cagA geni veya CagA proteininin virulansına olan etkisi tartışmalıdır (12). Yapılan gen mutasyon çalışmalarında cagPI'de yer alan cagA dışındaki diğer bazı genlerin de bağımsız olarak IL-8 sekresyonunu indüklediği gösterilmiştir.

Batı toplumlarından izole edilen suşlarda CagA üreten TipI suşları virulansla ilişkili olarak bulunmuşken, Asya suşlarının % 90'ından fazlası TipI suşları olarak belirlenmiştir. Bu bulgular nedeni ile cagA varlığı dışında cagA allellerinin virulans yönünden daha önemli olabileceği düşünülmüştür. CagA'nın 5' ucu son derece konservatif iken 3' ucunda farklı sayıda tekrarlayan diziler yer alır. CagA proteinin molekül ağırlığındaki farklılık bu değişken bölgenin ürünüdür. Genin 3' ucundaki bu tekrarlayan dizilerin klinik ve biyolojik işlevi bilinmemekle birlikte CagA'nın antijenik ve immunojenik gücünün değişmesi, bunun da prognozu etkilemesi beklenmektedir. Ancak diğer bir çok potansiyel virulans faktöründe olduğu gibi cagA alttiplerinin Japonya, Çin ve Batı ülkelerinden izole edilen suşlardaki dağılımının klinikle korelasyon göstermedikleri görülmüştür. Örneğin PCR bazlı çalışmalarda Japonya'da izole edilen suşlarda 3' ucunda yer alan diziler nedeni ile A, B, C ve D olarak tanımlanan 4 alttipten 642-651 bp uzunluğuna sahip Tip C gastrik adenokarsinoma ve peptik ülserle ilişkili bulunmuşken, Çin'de *H. pylori* izolatlarında belirlenen 3 alttipten (tipI 825 bp, tipII 900bp



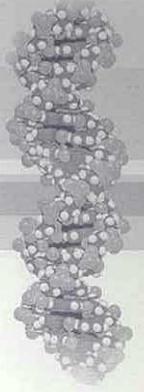
ve tip III 950bp) en sık tipli alttipine rastlandığı ancak ne alttiplerinin ne de cagA'nın virulansla ilişkisinin olmadığı bildirilmiştir (61, 67). Afrika kökenli 59 suş ile yapılan bir başka çalışmada ise vacAs1a ve cagA 3' ucunda kısa fragmentli suşların peptik ülser ile, vacAs1b / m1 ve CagA 3' ucunda fragmentli suşların gastrik karsinoma ile ilişkili suşlarda yüksek prevalansta görüldüğü bildirilmiştir (16, 35, 45) .

VacA geni: vacA *H. pylori*'nin major virulans faktörlerinden birisi olan ve memeli hücrelerinde vakuolizasyona sebep olan 87 -93 kDa ağırlığında CagA proteinini kodlamaktadır. Gen 3933 bp büyüklüğünde bir ORF'dir. *H. pylori* suşlarının tamamında bu gen bölgesi bulunmasına karşılık suşların yaklaşık olarak % 50'sinde gen aktiftir ve vacA proteini üretir. vacA geni 1287-96 aminoasitlik bir prekürsör VacA proteini kodlar. Bu amino asit dizisi sekresyon esnasında karboksi ve aminoterminal bölgelerinden delesyona uğrar ve önce 142 kDa'a düşer, sekresyondan sonra da 87-93 kDa'luk aktif protein haline dönüşür. *H. pylori* suşlarında iki genetik element birbirleri ile kesinlikle bağlantılı olmasa da vacA genellikle cagA ile birlikte Tipli suşlarında görülür. Asya kökenli suşların %98'inde vacA ve cagA birlikte görülmektedir (7, 40). vacA *Neisseria* ve hemofiluslar gibi bazı bakterilerde görülen mozaik gen yapısına benzer polimorfizm gösteren bir işaret dizisi -s-, bir de yüksek toksisite ile ilişkili olan proteinin kodlandığı orta bölgesi-m-bulunmaktadır. Yapılan çok sayıdaki çalışmada vacA geninin 4 farklı s (s1a, s1b, s1c ve s2) işaret dizisi ile 3 farklı m (m1, m2a ve m2b) m bölge dizisi allelinin bulunduğu gösterilmiştir. vacA alleli dağılımını tespiti yönelik çalışmalarda suşlarda s2/m1 kombinasyonu hariç diğer s/m kombinasyonlarının tamamının görülebildiği tespit edilmiştir.

İn-vitro şartlarda yapılan çalışmalarda s1 genotiplerinin, özellikle de s1/m1 kombinasyonunun s2 genotiplerine göre daha fazla toksin ürettikleri gösterilmiştir. cagA/vacA birlikteliği de sadece vacAs1 alleline sahip suşlarda görülmüştür. Kuzey Avrupa, İngiltere, İrlanda ve İskoçya gibi Avrupa kökenli suşların çoğunda s1a, Merkezi ve Güney Afrika kökenli suşlarda s1b allellerinin kombinasyonları görülürken, Asya kökenli suşların %80'inden fazlasında s1c allelinin hakim olduğu gösterilmiştir. Klinik izolatlarda yapılan çalışmalarda vacAs1/m1-cagA pozitif suşlar, peptik ülser ve gastrik adenokarsinoma ile ilişkili suşlarda daha yüksek prevalansta bulunmuştur. Buna karşılık s2/m2 alleleri non-toksijenik suşlarda, s1/m2 kombinasyonu ise nispeten düşük toksisite ile iyi huylu hastalıklarla ilişkili suşlarda bulunmuştur (9, 27). vacA m2 alleline sahip suşların da MALT lenfomalı hastalarda predominant alttip olduğu ileri sürülmüştür (36). Asya kökenli suşlar arasında ise s1c ve m1 allelinin gerek çocuklarda gerekse yetişkinlerde görülen duodenal ülserle ilişkili suşlarda daha yüksek prevalansta bulunduğu gösterilmiştir.

IceA geni (inducible by contact with epithelium gene): iceA, gastrik epitel hücre ile temas sonrası uyarılan bir genidir. *H. pylori* suşlarında sayıları 14-15 tane olan tip II restriksiyon metilasyon (R/M) enzimi bulunmaktadır. Bu enzimlerden iceA1 olarak tanımlanan hpyl-R geni epitel hücre ile temas sonucu aktive olmaktadır. Bazı suşlarda hpyl-M korunmuş olmasına karşılık hpyl-R mutasyona uğramış ve ice2 gen alleli ortaya çıkmıştır. hpylIII-R'de görülen mutasyonda yer alan hrgA alleli gibi iceA2'de artan sıklıkta iceA1'in yerini almaya başlamıştır. Ancak bu allellerin virulansa katkıları ve klinik önemleri tartışılmaktadır. Amerika ve Hollanda gibi batı toplumlarından izole edilen suşlarda iceA1 varlığı peptik ülser ve gastrik karsinomalar için önemli bir risk faktörü olarak görülürken, Japonya, Çin, Kore; Kolombiya ve Teksas'da yapılan çalışmalarda böyle bir ilişki kurulamamıştır. Koehler ve arkadaşları iceA1 allelinin ülser ve gastrik karsinomalı ve MALT lenfomalı hastalardan izole edilen suşlarda, gastritli hastalardan izole edilen suşlara göre 3.6 kat, vacAs1 alleli ile birlikte ise 5.6 kat daha yüksek prevalansta görüldüğünü bildirmişlerdir (36). iceA geninin diğer genotipi olan ve görülme sıklığı giderek artan iceA2 geni daha çok gastritli veya non-ülser dispepsili hastalardan izole edilen suşlarda görülmektedir. Ancak Çin ve Asya kökenli suşlarda iceA allellerinin spesifik bir patoloji ile ilişkisi gösterilememiştir (66). Ashour ve arkadaşları da Brezilya kökenli 142 hastadan izole ettikleri *H. pylori* suşlarında iceA allellerinin görülme sıklığını ve bunların muhtemel klinik yansımalarını araştırmışlar, sonuçta iceA'nın klinik fark gözetmeksizin izolatların %90'ından fazlasında bulunduğunu, sıklığın 7 yaş üzerindeki hastalarda daha yüksek oranda olduğunu belirlemişlerdir (5, 21).

babA ve babB genleri: Bu genler dış membran proteinleri ailesi içerisinde yer alan ve *H. pylori* suşlarının gastrik epitel yüzeyindeki Lewis b kan grubu antijenlerine bağlanmasını sağlayan proteinleri kodlarlar. Bu proteinler sayesinde bakteri mide peristaltizmi ve ortamın asidine karşı korunur. Lewis b'ye bağlanmada daha etkin olduğu düşünülen babA aynı zamanda flagellindir. *H. pylori* suşlarındaki bab genlerinde 5' ve 3' uçları konservatif olmakla beraber merkez kısmında en az %54 oranında değişiklikler görülür. Pride ve arkadaşları bab geni allellerinin coğrafi ve etnik



önemi ile kliniğe olan katkısını tespit amacı ile RFLP ve multilokus enzim elektroforezi teknikleri kullanarak yaptıkları çalışmada değerlendirdikleri 42 örnek içerisinde, merkez bölgelerindeki mutasyonlar sebebi ile 5'i babA'da (AD1, AD2, AD5) 3'ü de babB geninde (BD1, BD2 ve BD3) olmak üzere 8 allel belirlemişlerdir. Bu allelik farklılığın coğrafi ve etnik bir temeli olmadığı gibi Lewis B antijenine bağlanmada da bir farklılık yaratmadıklarını bildirmişlerdir (14). hrgA geni : hpy1R genindeki mutasyona benzer bir mutasyonda HpyIII R/M geninde görülmüştür. Farklı coğrafi bölgelerden izole edilen H. pylori suşlarının PCR-RE analiz çalışmaları sonunda suşların tamamında HpyIIIM gen bölgesinin bulunduğu ancak bazı suşlarda HpyIIIR bölgesinin bulunmadığı ve bunun yerine hrgA olarak tanımlanan yeni bir genin/allelin yer aldığı gösterilmiştir. C.jejuni suşlarında görülen cj1602 geni ile homolog olan bu yeni genin ne tür bir biyolojik fonksiyonu olduğu tam olarak gösterilememekle birlikte, batı toplumlarından izole edilen suşlarda Asya suşlarına göre daha yüksek oranda görüldüğü (%53-%25) bildirilmiştir. Buna karşılık Asya'da gastrik adenokarsinomali hastalara ait suşlarda hrgA geninin gastritli hastalardan izole edilen suşlara oranla daha yüksek prevalansta (%43-%17) olduğu da tespit edilmiştir. PCR ile tespit edilebilen bu genin yeni bir virulans göstergesi olabileceği tartışmaya açılmıştır (3).

Diğer gen bölgeleri: Gastrik karsinomali hastalardan izole edilen suşlarda esnek bölge -plasticity region- olarak tanımlanan ve H. pylori genomundaki en değişken bölgeyi oluşturan yeni bir ORF bölgesi gösterilmiştir. Büyüklüğü suşlar arasında değişiklik gösteren (J99 suşunda 45 kb ve 26695 suşunda ise 68 kb) bu bölgelerde kanser oluşumu ile ilişkili olduğu düşünülen genler, JHP940 ve JHP947 ile gastritle ilişkili olduğu düşünülen ve sadece 26695 suşunda gösterilen bir gen, (HP986), yer almaktadır. Brezilya'da gastrik kanser, ülser ve gastritli hastalardan izole edilen 200 suş ile yapılan PCR bazlı çalışmada sadece JHP947 genine sahip suşların kanser ve ülser ile ilişkili oldukları gösterilmiş, diğer iki genin hastalığın prognozuna etkisinin olmadığı saptanmıştır. Ancak JHP947 geninin cagA ile birlikteliğine dikkat çekilmiş ve bu yeni genin vacA ve cagA ile birlikte önemli bir virulans faktörü olabileceği ileri sürülmüştür (33, 44, 51).

H. pylori'nin bir başka önemli virulans faktörü Fts membran proteindir ve fts geninde kodlanır. Bu protein salgılanan proteinlerin transportunda rol oynar ve proteolitik aktiviteye sahiptir. Benzer bir proteinin E.coli'de ekstrasellüler virulans faktörlerinin hücre dışına taşınmasında rol oynadığı gösterilmiştir (23).

H. pylori dışında diğer helicobacterler türlerinin insan infeksiyonlarındaki görülme sıklığı çok düşüktür. Ancak H.heilmannii tip 1 (%78.5) ve H.salomonis (%2.4) gibi bazı H. pylori dışındaki suşlar da insanlarda intestinal sistemde kolonize olabilmektedir. Bu kolonizasyonun midedeki prevalansı tam olarak bilinmemekle birlikte İtalya'da %0.01, Tayland'da ise %6.2 oranında olduğu bildirilmiştir. Bu türlerden H. heilmannii'nin MALT lenfomaya sebep olduğu, kronik kolonize hastalarda bu türün eradikasyonundan sonra klinik tablonun düzelmesi ile ispatlanmıştır (12). Yine kronik kolonize hastalarda H. pylori infeksiyonlarının evdeki köpeklerin eradikasyon tedavisinden sonra sonlandığı bildirilmiştir. Buna karşılık moleküler yöntemlerin kullanıldığı bir çalışmada Huijsdens ve arkadaşları mide ve barsak mukoza biyopsi örnekleri ile gaita örneklerini değerlendirdikleri gastritli ve İnflamatuvar Barsak Hastalığı -IBD- olan hastalarda H. pylori dışında başka helicobacter türüne rastlamadıklarını bildirmişlerdir (30).

Hastaya ait faktörler

H. pylori infeksiyonlarının insidansı ve prognozunda hastaya ait yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, genetik yatkınlık, eğitim düzeyi ve aile yapısı gibi faktörlerin etkisi epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir. Örneğin ailede gastrik karsinoma öyküsünün varlığı H. pylori ile birlikte gastrik karsinoma riskini artırmaktadır. Ancak çoğu gözleme dayalı bu ve benzer tespitlerin moleküler düzeyde izaha ihtiyacı vardır. H. pylori'ye yönelik moleküler çalışmalar konakta özellikle gastrik mukozada predispozan genetik materyalin de tespitine yönelmiştir. Örneğin H. pylori mide kolonizasyonu ile midede epitel hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen surfaktan protein-D (SP-D) arasındaki ilişki, mide biyopsi örneklerinde SP-D kodlayan gene ait mRNA bölgelerinin RT-PCR ile kantitatif amplifikasyonu ve epitel yüzeyindeki SP-D'nin varlığı immunfloresan yöntemi kullanılarak gösterilmiştir. MALT'a ait organlarda doğal immunité proteinleri içerisinde yer alan, midede pilordaki mukus salgılayan hücrelerde, akciğerde özellikle tip II alveoler hücrelerde, terde, plazentada ve amniyotik sıvıda görülen SP-D proteinleri bakterilerde LPS'ye bağlanıp hem hareketlerini durdurarak invazyon yeteneklerini sınırlamakta hem de fagositozu kolaylaştırmaktadır. İnsanlarda 10q22.2-23.1 kromozomda kodlanan SP-D gen aktivitesinin H. pylori infeksiyonlarında arttığı gösterilmiştir (42). Yine MALT'la



ilgili t(11;18)(q21;q21) spesifik kromozomal translokasyon H. pylori MALT lenfomaya zemin hazırlamaktadır. Bu translokasyon AP12 geninin amino terminal ucu ile MALT1 geninin karboksi terminal ucunun birleşmesi sonucu şekillenen bir şimerik füzyon ürünüdür. Kronik inflamatuvar hastalıklarda tetiklenerek lenfomaları başlatan bu yapı pulmoner lenfomalarda olduğu gibi MALT lenfomada da sık görülmüş ve cagA tarafından indüklenen radikallerin bu gen bölgesini aktive ederek MALT lenfomayı başlattığı ileri sürülmüştür (63).

H. pylori infeksiyonlarında kilo kaybı, anemi ve gelişme geriliği görülen bazı hastalarda fundus bezlerinde mRNA ve salgılanan leptin seviyesinde azalma, buna karşılık plazma leptin seviyesinde ise artış kaydedilmiştir. Midedeki lokal leptin seviyesindeki düşüklüğün mü H. pylori'ye zemin hazırladığı yoksa H. pylori infeksiyonlarının IL-6, IL-8 ve TNF-alfa gibi inflamatuvar mediatörler üzerinden mi mide leptin seviyesini düşürdüğü daha geniş hasta grupları ile yapılacak moleküler çalışmalarla aydınlatılacaktır (8).

H. pylori infeksiyonlarının patogenezi aydınlatmak amacı ile moleküler yöntemlerin kullanıldığı çok sayıda çalışma ve hedef olarak belirlenen gen bölgeleri bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalarda elde edilen sonuçların çoğu hala lokal hipotezden öteye geçmemiş olduğu için burada sadece nispeten daha çok kişi tarafından kabul görmüş sonuçlar verilmeye çalışılmıştır.

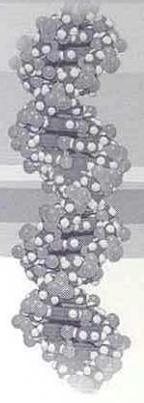
H. pylori infeksiyonlarında kullanılan tanı yöntemleri

H. pylori infeksiyonlarının doğru ve hızlı tanısı, tedaviye erken başlanması ve eradikasyon tedavisinde başarının takibi için önemlidir. Tanıda non-invaziv ve invaziv testler olarak iki başlık altında toplanan çok sayıda yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin seçimi yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğü, hızı, uygulama kolaylığı, maliyeti gibi parametrelerin yanında tanı konulacak hastanın yaşı, klinik yakınmaları ve her hangi bir antibiyotik veya anti asit kullanımını gösteren medikal geçmişi ile de ilgilidir. Masthrich 2.2000 ortak kararında tanı ve tedavi başlangıcı ile ilgili çalışmalar tekrar gözden geçirilmiş ve yeni rehber üretilmiştir. Bu rehber göre infeksiyonun sık görüldüğü bölgelerde 45 yaş altındaki hastalarda kanama, kusma, iştahsızlık, anemi ve kilo kaybı gibi alarm semptomlar yoksa, tanı değeri çok önemli olmakla beraber pahalı ve zaman alıcı olması sebebi ile üst endoskopi bazlı invaziv testler yerine, gaitada H. pylori antijenlerinin araştırıldığı veya nefesde işaretli C moleküllerinin ölçüldüğü üre soluk testleri (ÜST) önerilmektedir. Ancak endemik bölgelerde veya alarm semptomların görülmesi halinde üst endoskopik girişim ve bununla ilintili olan biyopsi bazlı invaziv testler önerilmektedir. Moleküler tanı yöntemleri biyopsi örneklerinin yanı sıra tükürük, diş taşları ve gaita gibi örneklerdeki H. pylori belirlenmesinde de kullanılan protokollere sahip olduğu için hem invaziv hem de non-invaziv testler arasında yer almaktadır. Bu yöntemler daha çok araştırma amaçlı olup, tanı, antibiyotik duyarlılığının tespiti, genotipik varyasyonların belirlenmesi ve virulans faktörlerinin tespiti için kullanılmıştır. Burada kısaca tanı testlerinden bahsedilecektir.

Non invaziv testler

Bu grup içerisine, serolojik testler, Üre Soluk Testi (ÜST), gaitada antijen arayan testler ve PCR bazlı testler girmektedir.

Serolojik testler: Serolojik testler ilk uygulanan non invaziv testlerdir. Hasta serumundan IgG antikoranı tespiti için geliştirilmiştir. Ancak sınırlı kullanımı vardır. Bu testler mikroorganizma ile teması işaret eder, ancak hali hazırda devam etmekte olan bir infeksiyonu göstermezler. H. pylori antikoranı tedavi edilen hastalarda bile en az 1 yıl kanda ölçülebilir seviyelerde kalmaya devam eder. Buna karşılık testlerdeki antijen kalitesi ve uygulama farklılığı gibi sebeplerle özellikle de çocuklarda serolojik testlerle olguların %20-30'una yalancı negatif tanı konur. H. pylori tanısında ilk kullanılan serolojik test ELISA'dır. Onaltı farklı ticari ELISA kiti kullanılarak yapılmış 21 çalışmaya ait meta-analiz sonuçları bu testlerin duyarlılığının %85, özgüllüğünün de %79 olduğunu göstermiştir. Testlerin doğruluk oranı da %78 (68-82) olarak bulunmuştur. Duyarlılık ve özgüllüğü artırmaya yönelik çabalar sonucu vacA ve cagA gibi klinik ve patolojik önemi olan spesifik proteinlere karşı antikor cevabını ölçebilen ELISA, RIBA, Rekombinant IB ve Westernblotting gibi yeni serolojik yöntemler geliştirilmiştir. Bu testler içerisinde Helico-blot 2.0 ve Helico-blot 2.1 ile Recombinant Immunoblotting Assay Strip RIBA testleri oldukça yüksek duyarlılık ve özgüllük göstermiştir.



Üre Soluk Testi : Nispeten pahalı bir yöntem olmakla beraber gerek tanı gerekse tedavinin takibi amacı ile kullanılabilen yüksek duyarlılık (%95) ve özgüllük (%100) oranına sahip testlerdir. Hastanın sitrik asit içerisinde 75 mg 14C veya 13C ile işaretli üreyi yutmasından 30 dakika sonra nefes örnekleri toplanır. 13C ÜST radyoaktif madde içermemesi, gebelerde ve çocuklarda kullanım güvenliği gibi sebeplerle tercih edilmekte olup, non-invaziv testler içinde altın standarttır. Ancak bu test antibiyotik, PPI veya ranitidin kullanan hastalarda %40 oranında yalancı negatif sonuçlar vermektedir.

Gaitada antijen arayan testler (H. pylori stool antigen tests): Gaitada H. pylori antijenlerini tespiti yönelik testler non-invaziv testler arasında yer alan UST'ne en iyi alternatif olarak görülmektedir. Gaitada H. pylori antijenlerini tespit amacı ile kullanılan ve ticari olarak geliştirilmiş 2 temel sistem bulunmaktadır. Bunlardan ilki tavşanlardan elde edilen poliklonal antikörlerin kullanıldığı "Premier Platinum HpSA" (Meridian Diagnostics, Inc., Cincinnati, Ohio) olup poliklonal antikörler kullanılmaktadır. Bu test yüksek özgüllük göstermesine karşılık özellikle bakteri yoğunluğunun düşük olduğu örneklerde duyarlılığı genellikle düşük bulunmuştur. Bir diğer test ise monoklonal antikör karışımının kullanıldığı "FemtoLab H. pylori", (Connex GmbH, Martinsried, Germany) test kitidir. FemtoLab H. pylori HpSA'dan daha duyarlı ve benzer özgüllükte bulunmuştur. Bu iki test arasındaki duyarlılık farkı yöntem ve kısmen sonuçların spektrofotometrik ölçümüne bağlıdır. Her iki testin değerlendirme absorbans değeri 0.1-1.5 arasındadır. H. pylori pozitif olup da HpSA ile negatif bulunan hastaların çoğunda absorbans değeri 0.1 in altında hatta 0.05'in altındadır. Bu yalancı negatif sonuçlara yol açmaktadır. Femtolab H. pylori testinde çift antikör sandviç yöntemi kullanılarak sonuçlar amplifiye edilmiştir. Böylece aynı miktardaki bakteriye ait absorbans spektroda okunabilir sınırlara çekilmektedir. Ancak bu testlerin her ikisinde de en önemli problem standardizasyon ve antijen bilgisidir. Bu testlerin duyarlılıkları lot bağımlı değişmekte ve kullanılan antijenler bilinmemektedir. 260kDa ağırlığındaki H. pylori katalaz enziminin antijen olarak kabul eden monoklonal antikörün kullanıldığı yeni bir antijen testi daha geliştirilmiştir. Katalaz antijeninin tüm hastaların gaitasında görülen 3 antijenden birisi olması nedeni ile bu testin duyarlılık ve özgüllüğünün oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (52, 53).

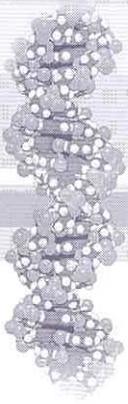
Moleküler bazlı testler: Diş taşları, tükürük, mide sıvısı aspiratı ve gaitada H. pylori spesifik gen dizilerinin PCR ve modifikasyonları ile amplifikasyonları esasına dayalı testlerdir. Bu testlere ait bilgiler invaziv testlerin sonunda tartışılacaktır.

Invaziv Testler

İnvaziv testler üst gastrointestinal endoskopi girişimi ve lezyondan alınan biyopsi materyalinin incelenmesi esasına dayalı testlerdir. Bu testler arasında direkt bakı ile doku hasarının lokalizasyonunun yeri, histolojik muayene, biyopsi materyalinden veya gastrik sıvıdan bakteri üretilmesi, hızlı üreaz testi ve yine mide biyopsi örneği ve sıvısından H. pylori spesifik gen bölgeleri ve allellerinin özgül primerler yardımı ile amplifikasyonu ve muhtemel mutasyonları tespiti yönelik moleküler tanı yöntemleri yer almaktadır.

Histolojik muayene: H. pylori infeksiyonlarında histolojik tanı dokudaki inflamasyonun ve varsa prekarsinojen değişimlerin şiddetini belirlemek amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu testlerin duyarlılık ve özgüllüğü çeşitli faktörlerin etkisi altında olmakla beraber sırası ile <% 90 ve >%95'dir. Bu oranlar biyopsi ve araştırmacıya ait faktörler tarafından değişir. Muhtemel örnekleme hataları mikroorganizmanın farklı kolonizasyon yoğunluğuna bağlı olabilir. İnfekte midede pilorun küçük kurvatüründen alınan örneklerde pozitif bulma şansı %90'ın üzerine çıkmaktadır. Duyarlılık antrum ve gövdeden en az iki örnek alınması ile arttırılabilir. Kullanılan boyama yöntemi de sonuçları etkiler. Sıklıkla modifiye Giemsa, Warthin-Stary, gümüş boyama HpSS, modifiye McMullen ve Gimenez gibi histokimyasal veya IFAT ve IP gibi immunohistokimyasal boyalar kullanılmaktadır. Immunohistokimyasal boyalar histolojik muayenede en duyarlı ve özgül metodlar olup altın standarttır.

Kültürde izolasyon: H. pylori'nin seçici kültür ortamlarında üretilmesi tanıda altın standarttır. Ancak bu yöntem örneğin sayısı veya büyüklüğü, örnekteki bakteri miktarı, örneğin transport şekli ve süresi, kullanılan besiyerleri ve inkübasyon şartları ile çalışanın tecrübesine dayanarak değişken duyarlılık gösterir. Optimal şartlarda duyarlılık ve özgüllük sırası ile >%95 ve <%80'dir. Bakteri dış şartlardan kolaylıkla etkilenecek kültürde üretilmeyen kok-dormant-formlara dönüştüğü için örnek materyal hemen laboratuvara taşınır ve ekilirse izolasyon şansı artmaktadır. Ancak



hemen değerlendirilemeyecek örnekler için transport vasatları kullanılmaktadır. Biyopsi örneklerinin transportunda tuzlu su, %20 glukoz ve Stuart transport medium gibi vasatlar kullanılmıştır. Stuart vasatında transport edilen örnekteki bakterinin +4Co'de 24 saat yaşayabildiği, ancak inkübasyon ısısının >15Co ye çıkması halinde ise yaşama süresinin 6 saate kadar indiği gösterilmiştir. *H. pylori* güç üreyen bir bakteridir. Zenginleştirilmiş besiyerlerinde CO₂'li ve %96-100 nem oranına sahip atmosferde üreyebilirler. İlk izolasyonda özellikle %7-10 oranında at kanı ilave edilmiş BHIA, Brusella agar, Colombia agar, Mueller-Hinton agar ve Wilkins-Chalgren agar gibi katı veya BHIB ve Brusella buyyon gibi sıvı besiyerlerinde iyi ürerler. Sıvı besiyerlerinin sık sık çalkalanması homojen gaz dağılımının sağlanması açısından önemlidir. Bu besiyerlerinde 370C de mikroaerofilik şartlarda 3-5 günlük inkübasyon süresinde bakteriler kolaylıkla üreyebilir. Sıvı besiyerlerinde üreyen bakteri 4-210C'de 3-4 gün canlılığını korur. İzole edilen suşlarda agar dilüsyon ve E test gibi yöntemler kullanılarak antibiyotik duyarlılık testleri yapılabilir.

Gaita, diş plakları, tükürük, su ve gıda gibi örneklerdeki *H. pylori* suşlarını üretmek imkansız derecede zordur. Bu amaçla antibiyotikli Wilkins-Chalgren agar kullanılabilir. Ancak optimal şartlarda dahi izolasyon şansı %10'u geçmemektedir. *H. pylori*'nin su ve gıda gibi örneklerdeki varlığını tespit için a) immuno-separation (IMS)- PCR, b) [3H]thymidine işaretli problemlerin kullanıldığı otoradyografi yöntemi c) ATP- bioluminescence reaksiyonu gibi canlı bakteriyi tanıyan duyarlı ileri teknikler kullanılmaktadır (23).

Hızlı üre testi (HUT): Gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* üreaz aktivitesinin tespiti prensibine dayalı bir testtir. Test ortamında kullanılan üre besiyerinde örnekte bulunan *H. pylori*'nin üreyi hidrolizi sonucu açığa çıkan amonyağın pH'yı yükselterek renk indikatörü olan fenol kırmızısında renk değişikliği yaratması esasına dayanır. Orofarenkste yerleşen ve üreaz üreten bazı kommensal bakteriler tükürükle gastrik biyopsi örneğini kontamine edebilir. Ancak böyle zayıf enzimler midenin asidik lümeninde (pH<2) kolayca denatüre edileceklerinden testin özgülüğünü etkilemezler. Ticari olarak kullanıma sunulan gel test (CLO test, Hpfast), strip test (pyloriTek) ve tablet testler bulunmaktadır. Bunların duyarlılığı %80-95, özgülüğü de %95-100'dür. Duyarlılık örnekteki bakteri miktarından etkilenir. Yapılan kantitatif çalışmalarda örnekte en az 104 bakteri olması halinde pozitif sonuç alınmaktadır. Örneklerin çoğu sıklıkla bu sayının altında bakteri taşımaktadır. Bazı araştırmacılar birden fazla biyopsi örneğinin kullanılması halinde duyarlılığın artabileceğini bildirmişlerdir. Ancak fazla örnek reaksiyonun hızını artırmakta duyarlılığı artırmamaktadır. Ticari kitler içerisinde pyloriTek 20 dakika ile bir saat gibi kısa bir sürede oldukça duyarlı ve özgül sonuç verdiği için hasta başı test olarak önerilmiştir. Bu testler kanayan, aklorhidri, antibiyotik ve/veya proton pompa inhibitörü kullanan hastalarda düşük duyarlılık göstermektedir.

Moleküler Tanı Yöntemleri

Son yıllarda moleküler biyolojik tanı yöntemleri *H. pylori* biyolojisi, infeksiyonlarının tanısı, spesifik virulans faktörlerinin tayini, konakta ortaya çıkan cevabın genetik temeli, antibiyotik direncinin belirlenmesi, eradikasyon tedavisinden sonraki tekrarlayan infeksiyonların nedeninin tespit edilmesi ve kültürde üretilmeyen kokoid formların tanımlanması gibi amaçlar için yoğun olarak kullanılmıştır. Ancak nükleik asit amplifikasyon bazlı teknikler canlı ve ölü bakteri ayırımı yapamadıkları için yalancı pozitif sonuçlar verebileceklerinden eradikasyon tedavisinin takibinde önerilmemiştir. *H. pylori* izolatlarında moleküler tanı yöntemleri kullanılarak belirlenen gen mutasyonları, suşların coğrafi ve etnik dağılımlarının yanı sıra kolonize toplulukların etnik geçmişlerini tayinde de önemli bilgiler üretmiştir (2, 22, 34). Moleküler yöntemlerle, kültür ortamlarında üretilen bakterilerin yanı sıra, tükürük ve diş plakları, mide sıvısı ve biyopsi örnekleri ile gaita gibi örneklerde de *H. pylori* suşlarına ait spesifik nükleik asit dizilerini direkt olarak araştırmak mümkündür (10, 25, 60,64).

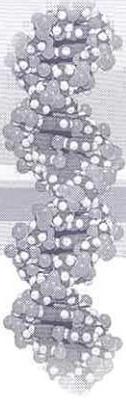
H. pylori ile yapılan moleküler düzeyli çalışmalarda, suşların özgül nükleik asit bölgelerinin PCR, RT-PCR, nested-heminested-PCR, Gerçek Zamanlı PCR, kalitatif-kantitatif PCR, multipleks PCR, RAPD, AFLP-PCR, RFLP ve PCR-RFLP gibi amplifikasyon ve restriksiyon bazlı fingerprinting yöntemleri ile DNA dizi analizi ve mikroarray yöntemi gibi modifiye moleküler teknikler kullanılmıştır (29, 38, 41, 42, 47, 57). Bir çok mikroorganizmanın genotipik tanımlanmasında kullanılan PFGE yöntemi, suşlarının uzun tanıma bölgesine sahip restriksiyon enzimlerine ve in-situ hibridizasyona dirençli olmaları sebebi ile *H. pylori* genotiplemesinde çok fazla kullanılmamıştır.



Amplifikasyon bazlı yöntemler: Amplifikasyon yöntemleri ile *H. pylori*'nin 16S rRNA geni, *cagA*, *vacA* ve allelleri, *cagE* ve alleli, *iceA* ve allelleri, *babA* ve *babB*, *üreA*, *üreB* ve *üreC*(*glmM*) geni, RNA polimeraz altünitlerini kodlayan *rpoB* ve *rpoD* genleri ve HP0638 gibi özgül ve virulansla ilgili olduğu düşünülen genlerin varlığı araştırılmıştır (2, 37, 38). Çalışmalarda çeşitli PCR modifikasyonları denenmiştir. Bu tekniklerin tamamı kültür ve histolojik inceleme başta olmak üzere kıyaslandıkları diğer yöntemlere göre daha yüksek özgüllük (%98-100) ve duyarlılık (10-100 cfu bakteri/0.1 pg DNA) ile yüksek pozitif ve negatif kabul edilebilirlik değerlerine (PPV -NPV) sahip, hızlı ve güvenilir testler olarak yorumlanmıştır. Ancak bu yöntemler, sonuçları etkileyecek olan örnek seçimi, transport şekli, DNA ekstraksiyonunda kullanılan yöntemler, amplifikasyon için seçilen gen bölgeleri ile primer dizilerinin tam olarak standardize edilememiş olması sebebi ile rutin tanıdan çok araştırma amaçlı olarak kullanılmıştır. *H. pylori* araştırmalarında kullanılan amplifikasyon bazlı yöntemlerde iki önemli sorun bulunmaktadır. Bunlar a) örnekleme ve nükleik asit ekstraksiyonu b) hedef diziler ve seçilen primerlerdir.

a) Örnek seçimi ve nükleik asit ekstraksiyonu: Örnek sıklıkla mide biyopsi dokusudur. *H. pylori* mide mukozasında yamalı bohça benzeri dağılım gösterdiği için, alınan her örnek kolonizasyonu temsil etmeyebilir. Antrum ve korpusdan alınan biyopsi örneklerinde, farklı suşlarla kolonizasyon farklı sonuçlar yaratabilir. Hastanın yaşı veya hastalığın süresi de mide biyopsisi bazlı yöntemlerde duyarlılığı düşürür. Çünkü uzun süren enfeksiyona bağlı olarak gelişen atrofik gastrit veya intestinal tip hücre artışı *H. pylori* için duyarlı epitelyal alanı azaltır. Bu nedenle yaşlı veya kronik enfeksiyonu olan hastalarda örnek iyi seçilmeli ve birden çok alınmalı veya biyopsi yerine gastrik sıvı örnekleri amplifikasyon amacı ile kullanılmalıdır. Biyopsi örneklerinden *H. pylori* nükleik asitlerini elde etmek için genellikle 3 yöntem kullanılmaktadır. Bunlar DNA ticari ekstraksiyon kitlerinin kullanımı, Proteinaz-K fenol kloroform ekstraksiyonu ve kaynatmadır. Çeşitli çalışmalarda bu üç yöntem için farklı değerlendirmeler yapılmıştır. Proteinaz-K, enol-kloroform yönteminin en kaliteli DNA eldesine imkan veren yöntem olduğu bir çok yayında ileri sürülürken, işlemlerin artması halinde taşınma kontaminasyon riskinin artacağı, proteinaz-K ve fenolün tam olarak uzaklaştırılamayacağı için duyarlılığın düşeceği, işlemin ne kadar basit olursa sonuçta elde edilen DNA'nın o derecede saf olacağını bildiren yayınlar da vardır. Örneğin doku biyopsi örnekleri çalışılıyorsa inhibitörleri engellemek ve temiz DNA elde etmek için; dokunun mekanik olarak parçalanması, daha sonra ya olduğu gibi veya Chelex-100 gibi bir zayıf katyonik ajan ilave edilerek kaynatılması önerilmektedir. Biz laboratuvarımızda hem proteinaz-K, fenol-kloroform hem de kaynatma yöntemi ile ekstraksiyonu denedik. DNA kalitesi yönünden bir fark olmamasına karşılık, özellikle bol DNA gereken hallerde kaynatmanın daha yararlı olduğunu gördük. Klinik örneklerde moleküler yöntemlerin duyarlılığını düşürecek muhtemel inhibitörler çok sayı ve miktarda bulunabilir. Bunlardan korunmak için PCR reaksiyon karışımına %0.5 bovin serum albumin ilave edilmesi ve ekstraksiyonda mümkün olduğu kadar az kimyasal kullanılması önerilmektedir (49). Thoreson ve arkadaşları *H. pylori* 16S rRNA genini tespit amacı ile yaptıkları bir çalışmada mide biyopsi örneklerinin %42'sinde inhibitör maddelerin varlığını belirtmişler, örneklerin seyreltilerek tekrar çalışılması ile yalancı negatif sonuçların azaldığını göstermişlerdir (55). Gaita gibi bakteri yoğunluğunun düşük, inhibitör maddelerin yoğunluğunun yüksek olduğu örneklerde DNA ekstraksiyonu esnasında %0.5 bovin serum albumini kullanımı veya QIAmp Stool Mini Kit (Qiagen, Milan, Italy) gibi standardize edilmiş ekstraksiyon kitlerinin kullanımı önerilmektedir. Ayrıca örnekteki bakteriyi yoğunlaştırmak için *H. pylori* kaplanmış manyetik partiküllerin kullanılmasının duyarlılığı artırdığı bildirilmiştir (60, 64, 66).

b) Hedef bölge ve primerlerin seçimi: Hedef bölgeler çalışma amacına göre belirlenmelidir. Örneğin 16S rRNA diğer *helicobacter*'ler ve bazı gram negatif bakterilerde ortak dizilere sahip olduğu için bu bölgeleri hedef alan primerlerle yüksek duyarlılıkta ancak düşük özgüllükte sonuçlar üretilmektedir. Gastrik biyopsi örneklerinde özellikle mutasyonların sık görüldüğü *vacA* ve *cagA* gibi genlerin aynı allellerin amplifikasyonu için kullanılan farklı primerlerin farklı duyarlılıkta sonuçlar ürettiği gösterilmiştir. Gaitada *H. pylori* tanısında PCR kullanılacaksa hedef gende mümkün olan en kısa fragmenti tanıyan primerlerin seçilmesi önerilmiştir (66). Diş taşlarında *H. pylori* tespiti için dizayn edilmiş PCR çalışmalarında %0-97 arasında prevalans bildirilmiştir. Bu büyük fark toplumsal hijyen veya kültür farkından çok PCR protokollerindeki farklılıktan kaynaklanmaktadır (24). *H. pylori* tanısında uygulanan bazı PCR protokollerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, kültür pozitif 24 biyopsi örneği ile kültür negatif 26 biyopsi örneği, 16S rRNA genini hedef alan 3 farklı primer seti, SSA genini tanıyan bir primer seti, random seçilmiş dizileri tanıyan bir primer seti, *üreA* geni ve *üreC*(*glmM*) genini hedef alan primer setleri kullanılarak incelenmiş ve sonuçlar kültür pozitifliği ile kıyaslanmıştır. Sonuçta 16S rRNA'yı hedef alan primerlerin diğer primerlere göre 10 kat daha duyarlı olmasına rağmen



(0.01pg DNA-0.1 pg DNA) özgülüğünün çok düşük olduğu gösterilmiştir. 4 farklı bölgeyi hedefleyen PCR protokolleri içerisinde ureC genini hedef alan PCR'ın PPV değeri %100, NPV değeri de %96 olarak bulunmuştur (39). H. pylori PCR tekniklerinde amplifikasyon tekniklerindeki genel problemlere karşı duyarlı olunmalı, yalancı negatiflik veya pozitifliği karşı üniöersal tedbirler alınmalıdır. Yalancı negatif sonuçların belirlenmesi için mutlaka internal kontroller kullanılmalıdır (41, 47). Özellikle ekstraksiyon aşaması birden fazla olan protokollerde taşıma kontaminasyonlar her zaman risk olarak kabul edilmeli ve bunun için dTTP yerine dUTP kullanılmalıdır. Ayrıca primer-dimer oluşumunu engellemek için de "hot-start" yöntemi kullanılmalı ve reaksiyon karışımı içerisinde 16mM amonyum sulfat veya DMSO ilave edilmelidir.

Restriksiyon bazlı yöntemler: Bu yöntemlerde ya total genomik DNA veya genomda amplifiye edilmiş spesifik bir bölgenin restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu ortaya çıkan fragmentlerin sayı ve büyüklükleri dikkate alınarak tür, suş ve allel bağlamında tanı konabilir. Donatı ve arkadaşları cagA genine ait 1.161 bp uzunluğundaki bir bölgeyi amplifiye ettikten sonra Saull, BglII, Hhal, ve HaeIII ile kesmişler, HaeIII ile enzim sonucu ortaya çıkan paternin peptik ülserli hastalardan izole edilen suşlarda homolog yapı gösterdiğini bildirmişlerdir (15, 20). Fujimoto ve arkadaşları da inatçı H. pylori suşlarındaki zaman içerisinde gelişecek muhtemel mutasyonlarla, antrum ve korpusdaki bakterilerin genetik özelliklerini tespit amacı ile 5 aylık aralıklarla aynı hastalardan izole ettikleri 25 suşun ureaz C genine ait 820 bp lik fragmentini amplifiye ettikten sonra Hhal, Mbol, veya MseI enzimleri ile kesmişlerdir. Bu grup antrum ve korpusdaki suşlar ile ilk izolat ve 5. aydaki izolat arasında RFLP fragmentleri açısından bir fark olmadığını göstermişlerdir (19).

Bir başka panelde değerlendirileceği için burada antibiyotik direncinin tespitinde moleküler tanı yöntemlerinin kullanımı, önemi, sonuçların klinik yansımaları hakkında bilgi verilmemiştir.

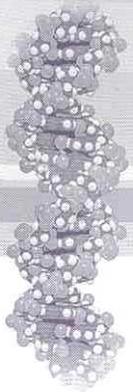
Sonuç: Moleküler seviyede yapılan yoğun çalışmalara rağmen H. pylori ile ilgili hala pek çok karanlık nokta bulunmaktadır. Küçük gruplarla yapılan çalışmalardan elde edilen ve sıklıkla bölgesel farklılıklar dolayısı ile tekzip edilen bilgiler tatmin edici olmaktan uzaktır. Gelişmekte olan ülkelerin klinik tanıda Masthrich 2.2000 konsensusundaki kriterler doğrultusunda hareket etmeleri, en fazla bölge veya ülke bağlamında baskın olan suşu tespit amacı ile vacA ve cagA genotipine yönelik sınırlı çalışmalar yapmaları hem inanç eksikliği hem de kaynakların israfının önlenmesi açısından daha doğru olacaktır.

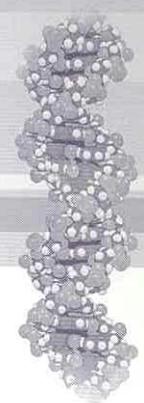
KAYNAKLAR

1. Alarcón T. Prevalence of CagA and VacA Antibodies in Children with Helicobacter pylori-Associated Peptic Ulcer Compared to Prevalence in Pediatric Patients with Active or Nonactive Chronic Gastritis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7:5. 842-844,, 2000.
2. Ando T, Peek R.M, Pride D. Polymorphisms of Helicobacter pylori HP0638 Reflect Geographic Origin and Correlate with cagA Status. *Journal of Clinical Microbiology*, 40:1, 239-246,2002.
3. Ando T, Wassenaar T.M, Peek R.M, (et.al). A Helicobacter pylori Restriction Endonuclease-replacing Gene, hrgA, Is Associated with Gastric Cancer in Asian Strains *Cancer Research* 62, 2385-2389, 2002.
4. Asahi A, Azuma T, Ito S (et.al). Helicobacter pylori CagA Protein Can Be Tyrosine Phosphorylated in Gastric Epithelial Cells. *The Journal of Experimental Medicine*,191, 4, 593- 602, 2000.
5. Ashour A A R, Collares G.B, Mendes E.N. (et.al): iceA Genotypes of Helicobacter pylori Strains Isolated from Brazilian Children and Adults. *JCM*: , 39:5:1746-50. 2001.
6. Atherton J. C, Cao P, Peek R. M. (et.al) :Mosaicism in Vacuolating Cytotoxin Alleles of Helicobacter pylori. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology* 270 (30) 28, 17771-17777, 1995.
7. Atherton J.C, Cover T.L, Twells R.L (et.al). Simple and Accurate PCR-Based System for Typing Vacuolating Cytotoxin Alleles of Helicobacter pylori. *Journal of Clinical Microbiology*, 37:9, 2979-2982, 1999.
8. Azuma T, Suto H, Ito Y, (et.al). Gastric leptin and Helicobacter pylori infection. *Gut* 49:324-329 :2001.
9. Basso D, Navaglia F, Brigato F, (et.al). Analysis of Helicobacter pylori vacA and cagA genotypes and serum antibody profile in benign and malignant gastroduodenal diseases *GUT*;43:182-186.1998.

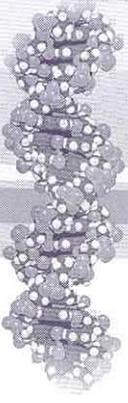


10. Bickley J, Owen R J, Fraser A.G and Pounder R.E. Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque *The Journal of Medical Microbiology*, 39, 5. 338-344, 1993.
11. Blaser M.J : Polymorphic Bacteria Persisting in Polymorphic Hosts: Assessing *Helicobacter pylori*-Related Risks for Gastric Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 94 : 22, 1662-1663, 2002.
12. Camargo PL, Alfieri AA, Bracarense APFRL (et.al): Use of Polymerase Chain Reaction and Enzymatic Cleavage in the Identification of *Helicobacter* spp. in Gastric Mucosa of Human Beings from North Paran., Brazil. 265 Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 98(2): 265-268, 2003.
13. Censini S. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93,. 14648-14653, 1996.
14. David T. Pride, Richard J. Meinersmann, and Martin J. Blaser Allelic Variation within *Helicobacter pylori* *babA* and *babB*. *Infection and Immunity*, 1160-1171, 69 : 2.2001.
15. Donati M, Storni E, D'Apote L (et.al) PCR-Based Restriction Pattern Typing of the *vacA* Gene Provides Evidence for a Homogeneous Group among *Helicobacter pylori* Strains Associated with Peptic Ulcer Disease *JCM*:37:4: 912-915.1999.
16. Enroth H, Kraaz W, Engstrand L.(et.al): *Helicobacter pylori* Strain Types and Risk of Gastric Cancer: A Case-Control Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* Vol. 9,981-985, 2000.
17. Fabre R., Sobhani I., Laurent-Puig P. (et.al). Polymerase chain reaction assay for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens: comparison with culture, rapid urease test, and histopathological tests. *Gut*, 35, 905-908, 1994.
18. Falush D, Kraft C. (et.al). Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: Estimates of clock rates, recombination size, and minimal age *PNAS* : 98 : 26 .15056-15061. 2001.
19. Fujimoto S, Marshall B and Blaser MJ. PCR-based restriction fragment length polymorphism typing of *Helicobacter pylori*. *JCM*32:2.,331-34.1994.
20. Gibson J. R., Slater E., Xerry J, (et.al). Use of an Amplified-Fragment Length Polymorphism Technique To Fingerprint and Differentiate Isolates of *Helicobacter pylori*. *JCM*: 36:9: 2580-85.1998.
21. Gold B.D, Doorn L.V, Guarner J (et.al). Genotypic, Clinical, and Demographic Characteristics of Children Infected with *Helicobacter pylori*. *JCM* :39:4:1348-52.2001.
22. Ghose C, Perez-Perez G.I (et.al). East Asian genotypes of *Helicobacter pylori* strains in Amerindians provide evidence for its ancient human carriage. *PNAS* | vol. 99 | no. 23 , 2002.
23. Gold B. D. Colletti R B, Abbott M. (et.al). *Helicobacter pylori* Infection in Children: Recommendations for Diagnosis and Treatment .*J.Pediatr. Gastroenterol and Nutrition* 31(5).490-97.2000.
24. Goosen C, Theron J, Ntsala M, (et.al). Evaluation of a Novel Heminested PCR Assay Based on the Phosphoglucosamine Mutase Gene for Detection of *Helicobacter pylori* in Saliva and Dental Plaque. *Journal of Clinical Microbiology* 40:1 205-209. 2002.
25. Gramley W.A, Asghar A, Frierson Jr H.F (et.al). Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Fecal Samples from Infected Individuals. *Journal of Clinical Microbiology*, 37:7,2236-2240, 1999 .
26. Guslandi, M. Stool immunoassay for *Helicobacter pylori* is not specific enough. *Br. Med. J.* 320:1541.2000.
27. Gusmão V.R.D, Mendes E.G., Maria De.D, (et.al). *vacA* Genotypes in *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Children with and without Duodenal Ulcer in Brazil. *J Clin Microbiol* 38:8:2853-57, 2000.
28. Gzyl A, Dzierzanowska D, Rozynek E (et.al). PCR-based diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in Polish children and adults.
29. He Q, Wang J.P, Osato M. (et.al). Real-Time Quantitative PCR for Detection of *Helicobacter pylori*. *JCM*. 40:10,3720-28.2002.
30. Huijsdens X.W , Linskens R.K, Koppes J. Detection of *Helicobacter* species DNA by quantitative PCR in the gastrointestinal tract of healthy individuals and of patients with inflammatory bowel disease. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. Article in Press 2004.
31. Hynes S.O, Broutet N, Eurohepygast Study Group (et.al) Phenotypic Variation of *Helicobacter pylori* Isolates from Geographically Distinct Regions Detected by Lectin Typing. *JCM* 40:1.227-32. 2002.

- 
32. Israel D.A, Salama N , Krishna U (et.al). *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host PNAS 98 : 25: 14625-14630 2001.
 33. Israel, D. A., N. Salama, U. Krishna, (et.al). *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:14625-14630.2001.
 34. Kersulyte D., Mukhopadhyay A .K., Velapatiño B, (et.al). Differences in Genotypes of *Helicobacter pylori* from Different Human Populations Journal of Bacteriology,182:113210-3218, 2000.
 35. Kidd M, Lastovica A.J, Atherton J.C, (et.al). Heterogeneity in the *Helicobacter pylori* vacA and cagA genes: association with gastroduodenal disease in South Africa? Gut;45:499-502. 1999.
 36. Koehler C I, Mues M B, Dienes H P (et.al). *Helicobacter pylori* genotyping in gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma by multiplex PCR analyses of paraffin wax embedded tissues. Molecular Pathology ;56:36-42 : 2003.
 37. Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A, Burette A. (et.al). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. J Clin Microbiol. 33(10): 2752-6. 1995.
 38. Lim C Y, Lee K H. Detection of *Helicobacter pylori* in Gastric Mucosa of Patients with Gastroduodenal Diseases by PCR-Restriction Analysis Using the RNA Polymerase Gene (rpoB). Journal of Clinical Microbiology, 41:7. 3387-3391,2003.
 39. Lu J.J, Shyu CLPYR, Chen C.H (et.al). Comparison of Five PCR Methods for Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Gastric Tissues. Journal of Clinical Microbiology, 37:3, 772-774,1999.
 40. Maeda S.,Ogura K,Yoshida H (et.al). Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. GUT;42:338-343 , 1998.
 41. Monteiro L, Hua J, Birac C (et.al). Quantitative polymerase chain reaction for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens .Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 16(2):143-9. 1997.
 42. Murray,E, Khamri K., Walker M.M, (et.al). Expression of Surfactant Protein D in the Human Gastric Mucosa and during *Helicobacter pylori*.Infection Infection and Immunity, 70,. 3 1481-1487 2002.
 43. Nilsson C.,Sillén A, Eriksson A., (et.al). Correlation between cag Pathogenicity Island Composition and *Helicobacter pylori*-Associated Gastroduodenal Disease. Infection and Immunity, Vol. 71, No. 1, 6573-6581, 2003.
 44. Occhialini, A., A. Marais, R. Alm, (et.al). Distribution of open reading frames of plasticity region of strain J99 in *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric carcinoma and gastritis patients in Costa Rica. Infect. Immun. 68:6240-6249, 2000.
 45. Owen R J,Sharp S, Lawson A J (et.al): Investigation of the biological relevance of *Helicobacter pylori* cagE locus diversity, presence of CagA tyrosine phosphorylation motifs and vacuolating cytotoxin genotype on IL-8 induction in gastric epithelial cells.FEMS Immunol and Medical Microbiol36:3:135-140, 2003.
 46. Owen R.J., Sharp S.I.,Chisholm S.A, (et.al). Identification of cagA Tyrosine phosphorylation DNA motifs in H. pylori isolates from peptic ulcer Patients by novel PCR-RFLP and real time PCR assays. JCM :41 : 7.3112-18 . 2003.
 47. Ozpolat B, Rao XM, Lachman LB. (et.al). Quantitative and bioluminescent assay to measure efficacy of conventional and DNA vaccinations against *Helicobacter pylori*. Comb Chem High Throughput Screen;3(4):289-302, 2000.
 48. ParkC.Y, Cho K Y, Kodama T. New serological assay for detection of putative *Helicobacter pylori* virulence factors JCM .12 :4753-56, 2002.
 49. Rudi J. Rudy A, Maiwald M. (et.al). Direct determination of *Helicobacter pylori* vacA genotypes and cagA gene in gastric biopsies and relationship to gastrointestinal diseases. The American Journal of Gastroenterology :94:6,1525-31.1999.
 50. Smith S.I,Kirsch C,Oyedeji K.S (et.al). Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA and iceA genotypes in Nigerian patients with duodenal ulcer disease. Med. Microbiol. Vol. 51 :851-854, 2002.
 51. Santos A, Queiroz D M M, Ménard A. (et.al). New Pathogenicity Marker Found in the Plasticity Region of the *Helicobacter pylori* Genome.JCM 41:4:1651-55:2003.
 52. Suzuki N,Wakasugi M,Nakaya S. (et.al). Production and Application of New Monoclonal Antibodies Specific for a Fecal *Helicobacter pylori* Antigen. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 9:1: 75-78, 2002.
 53. Suzuki N,Wakasugi M,Nakaya S. (et.al). Catalase, a Specific Antigen in the Feces of Human Subjects Infected with *Helicobacter pylori* Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology,):4:. 784-788, 2002.
 54. Şimşek İ, Menevşe S and Şahin F.İ. PCR and RFLP Analysis for Identification and Typing of *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Gastric Biopsy Specimens. Tohoku J. Exp. Med.,190:3 ..2000.



55. Thoreson A.C, Borre M, Andersen L.P (et.al): Helicobacter pylori detection in human biopsies: a competitive PCR assay with internal control reveals false results J Clin Microbiol.38:9:3436-3441, 2000.
56. Tomasini L.M , Zanussi S, Sozzi M .(et.al). Heterogeneity of cag genotypes in Helicobacter pylori isolates from human Biopsy specimens. J Clin Microbiol 976-80 : 41. 3.2003.
57. Vaira D.,Gatta L, Ricci C.(et.al): Review article: diagnosis of Helicobacter pylori infection. Aliment Pharmacol Ther; 16 (Suppl. 1): 16-23. 2002.
58. Velázquez M and Feirtag J. M. Helicobacter pylori : characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implicating foods and water. International Journal of Food Microbiology 53:2-3, 15, 95-104 . 1999.
59. Vinette K.M.B.,Gibney K.M, Roy Proujansky., (et.al). Comparison of PCR and clinical laboratory tests for diagnosing H. pylori infection in pediatric patients BMC Microbiology 4:5. 2004.
60. Watanabe T, Tomita S, Kudo M. (et.al). Detection of Helicobacter pylori gene by means of immunomagnetic separation-based polymerase chain reaction in feces. Scand J Gastroenterol;33(11):1140-3. . 1998.
61. Wen S, Felley C.P, Bouzourene H , (et.al).Inflammatory Gene Profiles in Gastric Mucosa during Helicobacter pylori Infection in Humans. The Journal of Immunology, 172: 2595-2606. 2004.
62. Yamaoka Y , Kodama T.:Variants of the 3' region of cagA. J Clin Microbiol : 8;2258-63 1998.
63. Ye H,Liu H,Attygalle A. (et.al). Variable frequencies of t(11;18)(q21;q21) in MALT lymphomas of different sites: significant association with CagA strains of Helicobacter pylori in gastric MALT lymphoma. Blood, 102:3.1012-18. 2003.
64. Yoshida H., Hirota H, Use of a Gastric Juice-Based PCR Assay To Detect Helicobacter pylori Infection in Culture-Negative Patients .Journal of Clinical Microbiology, 36:1:. 317-320, 1998.
65. Zambon C.F, Navaglia F, Basso D. (et.al). Helicobacter pylori babA2, cagA, and s1 vacA genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. Journal of Clinical Pathology ;56:287-291 2003.
66. Zambon C.F, Basso D, Navaglia F. (et.al). Non-invasive diagnosis of Helicobacter pylori infection: simplified 13C-urea breath test, stool antigen testing, or DNA PCR in human feces in a clinical laboratory setting? Clin.biochem37:4 261-67 2004.
67. Zheng P.Y, Hua J,Yeoh K.G, (et.al). Association of peptic ulcer with increased expression of Lewis antigens but not cagA, iceA, and vacA in Helicobacter pylori isolates in an Asian population Gut;47:18-22.2000.
68. Zhou J., Zhang.J, Xu C, (et.al). CagA genotype and variants in Chinese Helicobacter pylori strains and relationship to gastroduodenal diseases J Med Microbiol 53(3), 231-35, 2004.



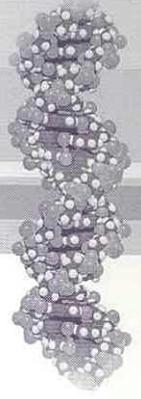
P7 AMEBİASİSDE MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN YERİ

Mehmet TANYÜKSEL

GATA Tıbbi Parazitoloji Bilim Dalı, Ankara

Gelişmekte olan ülkelerde daha hızlı ve yıkıcı olmakla birlikte, tüm dünyada ishal ile seyreden hastalıklar büyük bir sorun olarak devam etmektedir. Örneğin, Bangladeş'te her 5 yaş altı 10 çocuktan biri ishal ya da dizanteriden kaybedilmektedir (1,2). Amebiasis paraziter hastalıklardan ölüm nedenleri arasında üçüncü sırada kabul edilmektedir. Entamoeba histolytica tarafından oluşturulan amebiasis çoğunlukla tanısında sorunlar yaşanan önemli bir enfeksiyon hastalığıdır. Tanıda mikroskopi ön plandadır. Ancak, morfolojik benzerlikleri nedeniyle E. dispar ve E. moshkovskii patojen olmamalarına karşın mikroskopi ile birbirlerinden ayırt edilemezler. Klasik olarak, amebik kültür lizatlarından oluşturulan izoenzim patternleri ile patojen - non patojen köken ayrımı mümkündür. Ancak, zaman alması, kontaminasyon riski ve pratikte kullanım sınırlılıkları gibi nedenler "altın standart" olarak kabul edilen kültür yöntemini sıklıkla kullanmamıza engel olmaktadır. Sargeant ve arkadaşları izoenzim analizi (3), Strachan ve arkadaşları immünolojik (4), Tannich ve arkadaşları da genetik olarak (5) patojen-non patojen ayrımını, dolayısıyla E. histolytica / E. dispar farklılıklarını ortaya koymuşlardır. Klinik olarak ise E. histolytica kolit ve amebik apselere yol açarken, E. dispar'a ait herhangi bir klinik tablodan söz edilmemektedir.

Amebiasis tanısında moleküler yöntemlerin dışında örneklerde antijen saptamaya yönelik testler, (ELISA) halihazırda güven duyulan ve sürekli geliştirilen yöntemlerdir. Bu testlerde antijene karşı elde edilen monoklonal antikörlardan yararlanılır. Kullanım kolaylıkları, pratiklik ve genelde ekonomik olmaları nedeniyle taze dışkı örneklerinde E. histolytica'nın değişik antijenlerini saptamaya yönelik çalışmalar ve ticari testler mevcuttur. Özellikle dışkı örneklerinde antijen saptamaya yönelik kitlerde E. histolytica lektinine karşı monoklonal antikörlar daha sık kullanılmaktadır. E. histolytica kolon epitel hücresine Gal /GalNAc lektin aracılığıyla adhezyonu gerçekleştirmektedir. Lektin, ağır (170 kDa) (Hgl) ve hafif altbirimler (31/35 kDa) (Lgl) ile bunların non-kovalen birliktelik gösterdiği intermediate altbirimin (150 kDa) (Igl) oluşturduğu 260 kDa'lık bir heterodimer yapı gösterir ve patogenezde önemli bir rol oynayan virülans faktörüdür. Lektin, hem konak galaktozuna hem de N-acetyl-D-galactosamine'e bağlanmaktadır. Aynı zamanda proteaza direnç özelliği veren sisteini yüksek oranda içerir. Klinik izolatlarla yapılan çalışmalarda, lektinin ağır altbirimindeki CRD (carbohydrate recognition domain) diye isimlendirilen bölgesinde mutasyon görülmemesi, hem tanı hem de aşı amaçlı araştırmalarda hedef olmasını sağlamıştır (6). Önceleri, lektin hgl ile yapılan araştırmalarda oldukça yararlı sonuçlar alınmıştır. Hgl'in değişik rekombinant fragmanları ile yapılan çalışmalarda, Shenai ve arkadaşları (7), Zhang ve arkadaşları (170 kDa) (8), Soong ve arkadaşları (9) %90-95 arasında duyarlılıklara ulaşmışlardır. Lotter ve arkadaşları (10) 125 kDa'luk yüzeyel antijenle %100, Kimura ve arkadaşları 43.5 kDa'luk alkol dehidrogenazla %88 (11) ve Stanley ve arkadaşları (12) SREHP (sisteinden zengin E. histolytica protein) nin 46 ve 52 kDa'luk antijenlerine karşı da %82 lik duyarlılık bulmuşlardır. Soong ve arkadaşları (13) 29 kDa'luk yüzeyel antijenle kolitli hastalarda %8, amebik karaciğer apseli (AKA) hastalarda ise %76 duyarlılık saptamışlardır. Igl ile yapılan çalışmalarda, spesifik monoklonal antikörların hamsterlerde karaciğer apse oluşumunu önlediği, trofozoitlerin memeli hücrelerine adherans ve sitotoksitesine engel olduğu, eritrofagositozu durdurduğu görülmüştür. Igl, 1101 aminoasitten oluşan sisteinden zengin protein olup, aminoasit sekansında çoklu CXXC motifleri içermektedir. Tachibana ve arkadaşları, Igl konusunda yaptıkları birçok çalışmada bu proteinin özelliklerini tanımlamışlar, bir çalışmada amebik apse, kolit, asemptomatik kist taşıyıcı ve diğer protozoon enfeksiyonlu kişilerin serumlarında Igl ve üç parçasının rekombinant proteinlerinin reaktivasyonunu ELISA ve Western immunoblotting ile değerlendirmişlerdir. Tüm Igl'in kullanılması durumunda duyarlılık ve özgüllüğünü %90 ve %94 olarak bulurken, karboksil (C) ucunun %97 duyarlılık ve %99 özgüllüğe sahip olması nedeniyle amebiasis tanısında bu bölgenin daha uygun ve yararlı bir antijen olabileceği üzerinde durmuşlardır (14). Kullanılan antijenlerin özellikle erken enfeksiyon safhasında yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olmaları önemlidir. Halihazırda piyasada bulunan ticari kitlerden, Merlin Optimun S antijen kiti SREHP'ye karşı monoklonal antikörların, Alexon kiti E.histolytica'a karşı poliklonal antikörların, TechLab kiti de E. histolytica lektine karşı monoklonal antikörların özgüllüğünü göstermektedir. Bazı araştırmacılar, TechLab E. histolytica antijen kitini E. histolytica enfeksiyonlarını saptamada zimodem analizine ek olarak altın standart olarak kabul edilen kültür yönteminden daha duyarlı bulmuşlardır (15). Sonuç olarak, lektin, E. histolytica'nın 170-kDa'luk immunodominant antijenik molekülü

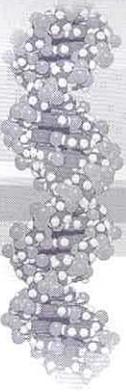


olup, sadece tanı amaçlı değil aynı zamanda aşı çalışmalarında da kullanılan önemli bir yüzey adhesin faktörüdür ve daha bir çok tanı testi bu konu üzerinde yoğunlaşmaya devam etmektedir.

Amebiasis tanısında başvurulan moleküler temele dayalı yöntemleri, klinik örneklerde genetik materyali saptamaya yönelik testler ve *E. histolytica*'nın genotiplendirmesine yönelik yöntemler (RFLP, RAPD, DNA mikroarray) başlıkları altında incelemekte yarar vardır.

Genetik materyali saptamaya yönelik yöntemler

Son yıllarda moleküler ve hücresel biyoloji alanındaki gelişmeler, moleküler yöntemlerin tanı ve epidemiolojik prevalansın değerlendirilmesinde uygulama olanaklarını sağlamıştır. Moleküler tanı yöntemlerinden birisi olan PCR yöntemi, *E. histolytica*'nın tanımlanmasında hızlı, daha duyarlı sonuçlar vermesinin dışında, olası dışkı lökositleri ve makrofajlarından kaynaklanan mikroskopi hatalarını ortadan kaldırmaktadır (16). Kültür uygulamalarının zahmetli olmaları, zaman almaları ve pratik uygulama zorlukları ve zimodem analizlerine ait farklı yorumlar bizi moleküler yöntemlere yöneltmiş, gerçekleştirilen uygulamalar neticesinde parazitin çok az miktarında bile varlığının gösterilmesi, amebiasis tanısında moleküler yöntemlerin uygulanmasına farklı bir boyut kazandırmıştır. 40C'de 1 ay bekletilmiş *E. histolytica* kistlerini bile PCR ile yakalama şansımız bulunmaktadır (17). Moleküler yöntemlerin ELISA yöntemlerine göre daha duyarlı oldukları istatistiksel olarak da gösterilmiştir (16). Maliyetinin yüksek ve daha fazla zaman alması dezavantaj olarak değerlendirilmektedir. Yeterince eğitilmiş personel ve ekipman olmayışları nedeniyle gelişmekte olan ülkelerde çok da kullanışlı olmadığı öne sürülmektedir (18). Ancak, geleneksel yöntemlerle konan tanının doğrulanması ve tür tayini çalışmalarında ELISA'ya karşı üstünlükleri göz ardı edilemez. Belki daha da önemlisi epidemiyolojik verilerin değerlendirilmesi, türler arası varyasyonların belirlenmesi, tanı kitleri ve aşı çalışmalarının geliştirilmesinde de çok önemli bir yere sahiptir. Birçok araştırmacı amebiasis tanısında PCR uygulamalarının oldukça başarılı olduğunu rapor etmişlerdir (19-27). PCR yönteminin özellikle AKA tanısında abse materyali elde edilebilecekse oldukça yararlı olduğu bildirilmiştir (27). Başarılı PCR uygulaması için dışkıdan DNA izolasyonu en önemli noktalardan biridir. Bugün için değişik DNA izolasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Klasik fenol-kloroform işlemi yanında ticari kitlere de başvurulabilmektedir. "DNA isolation kit (Qiagen)" in dışkıda uygulama kolaylıkları sağlaması nedeniyle başarı şansı yüksek olarak gösterilmektedir (26) Bir diğer avantaj, DNA izolasyonu için formalin ile fikse edilmiş dışkı örneklerinde de uygulanabilmesidir. Bu durum örneğin saklanması ve güvenli biçimde taşınmasını da kolaylaştırmaktadır (23,24). Bu teknikte, dışkının 1 mg'daki bir tek *E. histolytica* trofozoitinin bile saptanabileceği, yedi günlük süre içinde formalin fiksasyonunun PCR amplifikasyon sonuçlarına olumsuz etkide bulunamayacağı bildirilmiştir (28, 29). Sistein proteinaz, sitopatik etkideki rolü nedeniyle *E. histolytica*'nın önemli virülans faktörlerinden birisidir. Patojenik *E. histolytica* non patojen *E. dispar*'dan anlamlı derecede daha fazla sistein proteinaz salgılamaktadır. Prakash ve arkadaşları, intestinal tutulumlu ve AKA'lı hastalarda mikroskopinin negatif olmasına karşın, bu hastalarda "acp1" geni spesifik primerlerle PCR pozitif bulmuştur. Sistein proteinaz gen varlığına işaret eden bu PCR amplifikasyon yöntemi, AKA'lı hastalarda intestinal olgularla karşılaştırıldığında gen kopya sayısının artmış olması nedeniyle hızlı, erken ve kolay uygulanabilir bulunmuştur (30). Verweij ve arkadaşları, 234 hastanın dışkı örneğinden 35'ini mikroskopik olarak *E. histolytica* / *E. dispar* negatif bulmalarına karşın, PCR ile pozitif bulmuşlardır. PCR açısından en önemli yalancı negatiflik sebebi, dışkıdaki inhibitörlerin PCR reaksiyonunu engellemesidir. Aynı çalışmada dışkıdaki inhibitörlerin PCR'ı etkilediği oran %1.7 olarak bulunmuştur (423 örnekten beşinde) (26). Linder ve arkadaşları Nikaragua'da AKA şüpheli 24 hastanın 20'sinde *E. histolytica* aktin genini PCR ile pozitif bularak %90 duyarlılığa ulaşmışlardır. Aynı hastaların 16'sında p30 PCR, 9'unda hemolizin gen ekstrakromozal PCR, 5'inde ssrRNA PCR pozitif bulunurken 17 hastada ELISA ile 10 hastada ise ID testi ile seropozitiflik bulunmuştur (31). Küba'da multipleks PCR ile iki çift spesifik primer kullanılarak dışkıdan hem *E. histolytica* hem de *E. dispar* tanımlanabilmiştir. Yüksek oranda duyarlılık (%94) ve özgüllüğün (%100) bulunması da epidemiyolojik saha çalışmalarında güvenilir ve uygulanabilir olduğunu göstermektedir. Aynı çalışmada dikkat çeken bir diğer nokta da, Meksikalı çocuklarda *E. histolytica* ve *E. dispar* koinfeksiyon oranının %24.5 olarak saptanmasıdır (32). Başka bir çalışmada, özellikle miks infeksiyonlarda *E. dispar* ve *E. histolytica*'yı ayırt etmede oldukça yararlı bir yöntem olarak "nested multipleks PCR" önerilmiştir. Saptama eşiği 1 gram dışkıda 200 *E. dispar* trofozoiti ya da 1000 *E. histolytica* trofozoiti olarak gösterilmiştir. Özellikle kültürde yaşanan zorluklar ve mikroskopideki yetersizlikler göz önüne alındığında, "nested multipleks PCR" uygulanmasının basit, hızlı ve yüksek duyarlı ve özgül olduğu belirtilmiştir (33).



Dışının fiksasyonu ve süresi PCR sonucu etkileyebilmektedir. Formalinin %1 lik konsantrasyonundan fazlası, sodium asetat formalinin 2 günden fazla süre ile tutulması PCR'ın duyarlılığını (hedef DNA'nın bozulması nedeniyle) olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Nadiren bazı örneklerde 14 güne kadar PCR amplifikasyonlarının olumlu olduğu da görülmüştür. SAF içindeki dışkıya 100mM EDTA ilavesinin bozulmayı 16 saatliğine engellediği, bu yöntemle saptama limitinin 16srRNA genin bir kopyası kadar olabildiği ve miks infeksiyonlarda kolaylıkla saptanabildiği bildirilmektedir (34). Kanada'daki bir çalışmada, PCR yöntemi ELISA ile karşılaştırıldığında uyumluluk %85 olarak bulunurken; PCR ELISA'dan daha spesifik olarak bildirilmiştir. Bunun gerekçesi mikroorganizmaların sayısının azlığı nedeniyle yalancı negatifliğe bağlanmıştır. Yine +40C de 3-4 güne kadar tutulan dışkı örneklerin DNA ları bu sürenin üstünde hızlıca bozulmaya başladığı, testin duyarlılığının azaldığı bildirilmiştir (35). Vietnam'da amebiasis için endemik düşünülen bir bölgede 15 aylık bir süreçte E. histolytica genomunda lokus 5-6 ve lokus NK 'ya uygun bölgeler için PCR ile yapılan analizde, randomize seçilen 383 bireyin %11.2 sinde pozitiflik (prevalans) saptanırken, yıllık yeni infeksiyon oranı %4.1 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada dikkati çeken noktalar, çoğu olgunun asemptomatik seyretmesi ve infeksiyon süresince değişik genotiplerin stabilitesi olmuştur (36).

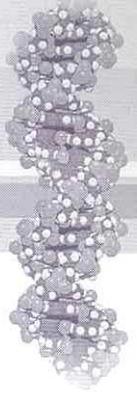
Son zamanlarda popüleritesini arttıran "real-time PCR" yöntemi üç önemli intestinal protozoonu (E. histolytica, Giardia lamblia ve Cryptosporidium parvum) aynı anda saptayabilecek "multipleks real-time PCR" olarak karşımıza çıkmıştır. Bir çalışmada mikroskopik ve spesifik PCR ile E. histolytica olarak konfirme edilmiş 20 hastanın dışkı örneği bu yöntemle %100 duyarlı ve özgül olarak bulunmuştur (37). Kebede ve arkadaşları 213 örnekte ssu-rRNA gen dizisine bağlı real-time PCR analizinde %91.5 inde E. dispar pozitif bulurlarken, hiç E. histolytica saptanamamış olması ilginçtir (38). Mikroskopi gibi geleneksel tanı yöntemleri her zaman doğru olmayabilir, öyle ki hematofagus trofozoit olduğuna inanılan 108 dışkı örneğin ssu-rRNA real-time PCR analizi sonucu sadece birinin E. histolytica, 77 sinin E. dispar, geri kalan 30 örneğin de negatif olduğu bulunmuştur (39). Bu nedenle rutin tanıda E. dispar'ın her zaman E. histolytica'dan ayırt edilemeyeceği, dolayısıyla tedaviyi yanlış yönlendirebileceği unutulmamalıdır.

PCR yönteminin en önemli dezavantajları olası çapraz-kontaminasyon nedeniyle yalancı pozitif sonuçlara yol açması ve de zaman alıcı olmasıdır. Son zamanlarda kapatılmış tüplerde "real-time PCR"ın bu sorunları aştığı iddia edilmektedir. Bu yöntemde amplikon PCR süresince floresan ile işaretli bir ya da iki proba bağlanmasıyla spesifik olarak saptanır. Kapalı tüp uygulaması kontaminasyon riskini azaltmaktadır. Vietnam ve Güney Afrika'daki amebiasis için endemik alanlardan elde edilen dışkı örneklerinde real-time PCR yöntemi, gerek mikroskopi gerekse de kültür-zimodem yöntemlerinden daha yüksek oranda duyarlı ve özgül olarak bulunmuştur. Bu yöntemin her iki amip türünün (E. histolytica ve E. dispar) ayırımında da oldukça başarılı olduğu ifade edilmekte, ticari bir ekipman ile donatılan bir laboratuvarında dışkıdan DNA izolasyonu ve PCR uygulaması için kullanılan reagent maliyetinin 7 ABD doları civarında olması da bir avantaj olarak gösterilmektedir (40).

Genetik farklılıkları ortaya koyan çalışmalar

Riboprinting (ribotyping) yöntemi, subunit ribosomal RNA (rDNA) gen bölgelerinin amplifikasyonunu takiben restriksiyon endonükleaz enzimleri yardımıyla kesilmeleri sonucu ortaya çıkan restriksiyon fragman polimorfizmlerinin analizi ile farklı Entamoeba türlerini değerlendirmesi için uygulanan bir yöntemdir. E. histolytica riboprintleri, diğer amiplerden özellikle E. dispar dan ayrılmasında XbaI, RsaI, TaqI, Sau 96I, and DdeI restriksiyon enzimlerinin kullanılması oldukça başarılıdır (41-45).

RFLP yöntemi genel olarak epidemiyolojik olarak ilişkisiz kökenlerin ayırt edilmesinde yeterli bir ayırım sağlayabilirken, orta ilişkili kökenlerin "cluster" analizleri için başarılı değildir. Bu eksiklik, ilave olarak uygun hibridizasyon problemlerinin kullanılması ile aşılabilir ve değerlendirilebilir profiller oluşturulur. Ancak her şeye rağmen, ökaryotik ribozomal sistronların yığın olarak bulunması, ökaryotlarda bakterilerdekenden çok daha basit prob paternlerinin oluşumuna neden olur ve etkin ayırt edicilik sağlayamaz ve geniş epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmaz. Bahttacharya ve ark, rDNA'nın RFLP analizi ile beş E. histolytica, dört E. moshkovskii, bir E. invadens, bir E. terrapinae'yi içeren suşların EcoRI ve DraI ile ayırt edilebildiklerini rapor etmişlerdir (46). Mukhopadhyay ve arkadaşları, 15 klinik amebiasisli olgudan elde ettikleri E. histolytica ssu-rRNA geni Sau3A RFLP analizinin, E. dispar'dan ayırım noktası olabileceğini ve etkili antiamebik tedaviyi karar vermede riboprinting'in büyük avantaj sağladığını bildirmişlerdir (47).



Amebiasis araştırmalarında en önemli sorularından birisi olan- *E. histolytica* ve / veya *E. dispar* ile infekte bireyler arasında gözlenen klinik tablonun geniş spektrumunu için temelini ne olduğu- henüz yanıt bulamamıştır. Bu nedenle, aynı hastada parazitin her iki türü ve farklı suşların varlığı klinik tabloyu etkileyebilmektedir. Türe spesifik belirteçlerin uygulanabilirliği, her iki parazitin bulaş paternlerinin araştırılması, hastalığın sonucunda parazitin varyasyonunun rolünün belirlenmesi tür içi polimorfizmlerin saptanabilmesi ile mümkün olacaktır. Bu konuda Graham Clark'ın ve arkadaşlarının uzun süredir seviyeli araştırmaları ve yayınları bizlere yeni bilgilerin öğrenilmesine yardımcı olmaktadır.

Genetik farklılıkları ortaya koymada diğer bir yöntem de RAPD (random amplified polymorphic DNA) dir. Genetik farklılıklar konağa, parazite ya da çalışılan koşula bağlı olarak değişiklikler gösterir. Epidemiyolojik tiplendirme amacıyla en çok başvurulan yöntemlerden biri olan RAPD tekniğinde, yaklaşık 10 bazlık primerler ile amplifikasyon gerçekleştirilir. Primer seçimi tiplendirilecek mikroorganizmanın genom bilgisine gereksinim olmaksızın tamamen rastgele olabildiği gibi, genom içersindeki belirli bölgelere yönelik, örneğin çeşitli rDNA genlerine uygun ve bilinçli olarak da seçilebilir. RAPD yönteminin laboratuvar içi stabilitesinin bile bir çok faktörden etkilenebileceği her zaman göz önünde tutulmalıdır. Gomes ve arkadaşları, 11 *E. histolytica*, iki *E. moshkovskii*, bir *E. invadens* içeren suşların RAPD analizinde, FIC suşunun (*E. moshkovskii*) Laredo suşuyla benzerlik göstermesi sonucu Laredo suşunun *E. moshkovskii*'nin bir formu olabileceği kanaatini uyandırdığını belirtmişlerdir (48).

Paris-Pasteur Enstitüsü, Mayıs 2003'deki Avrupa Moleküler Mikrobiyoloji Organizasyonu, "Pathogenesis of amoebiasis: from genomics to disease" başlıklı üç günlük toplantılarında *E. histolytica* ile beraber *E. invadens*, *E. moshkovskii*, *E. dispar* ve *E. terrapinae*'nin genom sekanslarının Sanger Enstitüsü ve TIGR tarafından yapıldığını, *E. histolytica* ile *E. dispar*'ın genetik farklılıklarını gösterebilmek için DNA mikroarray geliştirmeye çalıştıklarını, bunun için de Ariel1 ve CP1 genlerinin *E. dispar*'da bulunmayışını array yönteminde tanımladıklarını da içeren yeni yaklaşımlardan ve çalışmalarından söz etmişlerdir (49).

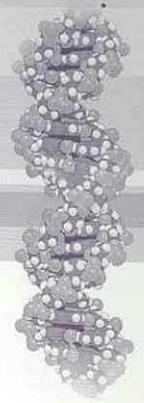
Sonuçta, 1873'de Lösch'den beri bilinen ve günümüzde birçok yeniliklerle her zaman yeni bilgiler öğrendiğimiz eski ancak önemli bir hastalık olan amebiasisin tanısı, günümüzde sıklıkla mikroskopi ve seroloji ile konmaktadır. Ancak gelişmiş teknoloji ürünü olarak PCR gibi moleküler yöntemleri kullanmak tanıyı kolaylaştıracak, sağlıklı epidemiyolojik verilerin eldesinde, tedaviyi yönlendirmede, patogenezin anlaşılmasında, yeni tanı kitleri ve aşı çalışmalarının yürütülmesinde bizlere çok önemli bilgiler verecektir (50).

KAYNAKLAR

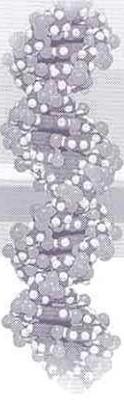
1. Bern C, Martinez J, de Zoysa I, Glass RI. 1992. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. *Bull World Health Organ* 70:705-714.
2. Petri WA, Jr, Haque R, Lyerly D, Vines RR. 2000. Estimating the impact of amebiasis on health. *Parasitol Today* 16:320-321.
3. Sargeant PG and Williams JE. 1979. Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amoebae of man. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73:225-227.
4. Strachan WD, Chiodini PL, Spice WM, Moody AH, Ackers JP. 1988. Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Lancet* 1:561-563.
5. Tannich E, Horstmann RD, Knobloch J, Arnold HH. 1989. Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5118-5122.
6. Beck DL, Tanyuksel M, Mackey AJ, Haque R, Trapaidze N, Pearson WR, Loftus B, Petri WA, Jr. 2002. *Entamoeba histolytica*: Sequence conservation of the GalNAc lektin from clinical isolates. *Exp Parasitol* 101:157-163.
7. Shenai BR, Komalam BL, Arvind AS, Krishnaswamy PR, Rao PV. 1996. Recombinant antigen-based avidin-biotin microtiter enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of invasive amebiasis. *J Clin Microbiol* 34:828-833.
8. Zhang Y, Li E, Jackson TF, Zhang T, Gathiram V, Stanley SL, Jr. 1992. Use of a recombinant 170-kilodalton surface antigen of *Entamoeba histolytica* for serodiagnosis of amebiasis and identification of immunodominant domains of the native molecule. *J Clin Microbiol* 30:2788-2792.
9. Soong CJ, Kain KC, Abd-Alla M, Jackson TF, Ravdin JI. 1995. A recombinant cysteine-rich section of the *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable lektin is efficacious as a subunit vaccine in the gerbil model of amebic liver abscess. *J Infect Dis* 171:645-651.



10. Lotter H, Mannweiler E, Schreiber M, Tannich E. 1992. Sensitive and specific serodiagnosis of invasive amebiasis by using a recombinant surface protein of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* 30:3163-3167.
11. Kimura A, Hara Y, Kimoto T, Okuno Y, Minekawa Y, Nakabayashi T. 1996. Cloning and expression of a putative alcohol dehydrogenase gene of *Entamoeba histolytica* and its application to immunological examination. *Clin Diagn Lab Immunol* 3:270-274.
12. Stanley SL, Jr., Jackson TF, Reed SL, Calderon J, Kunz-Jenkins C, Gathiram V, Li E. 1991. Serodiagnosis of invasive amebiasis using a recombinant *Entamoeba histolytica* protein. *JAMA* 266:1984-1986.
13. Soong CJ, Torian BE, Abd-Alla M, Jackson TF, Gathiram V, Ravdin JI. 1995. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with recombinant *Entamoeba histolytica* 29-kilodalton antigen. *Infect Immun* 63:472-477.
14. Tachibana H, Cheng X-J, Masuda G, Horiki N, Takeuchi T. 2004. Evaluation of recombinant fragments of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin intermediate subunit for serodiagnosis of amebiasis. *J Clin Microbiol* 42:1069-1074.
15. Haque R, Mollah NU, Ali IKM, Alam K, Eubanks A, Lylerly DM, Petri WA, Jr. 2000. Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. *J Clin Microbiol* 38:3235-3239.
16. Rivera WL, Tachibana H, Kanbara H. 1999. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in the epidemiology of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections. *Tokai J Exp Clin Med* 23:413-415.
17. Sanuki J, Asai T, Okuzawa E, Kobayashi S, Takeuchi T. 1997. Identification of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* cysts in stool by polymerase chain reaction. *Parasitol Res* 83:96-98.
18. Haque R, Ali IKM, Akhter S, Petri WA, Jr. 1998. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Microbiol* 36:449-452.
19. Acuña-Soto R, Samuelson J, De Girolami P, Zarate L, Millan-Velasco F, Schoolnick G, Wirth D. 1993. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg* 48:58-70.
20. Britten D, Wilson SM, McNerney R, Moody AH, Chiodini PL, Ackers JP. 1997. An improved colorimetric PCR-based method for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in feces. *J Clin Microbiol* 35:1108-1111.
21. Britten D, Wilson SM, McNerney R, Moody AH, Chiodini PL, Ackers JP. 1997. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* using an improved colorimetric polymerase chain reaction method. *Arch Med Res* 28:S279-S281.
22. Mirelman D, Nuchamowitz Y, Stolarsky T. 1997. Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *J Clin Microbiol* 35:2405-2407.
23. Rivera WL, Tachibana H, Kanbara H. 1999. Application of the Polymerase Chain Reaction (PCR) in the epidemiology of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections. *Tokai J Exp Clin Med* 23:413-415.
24. Rivera WL, Tachibana H, Silva-Tahat MRA, Uenura H, Kanbara H. 1996. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* DNA from cysts present in stool specimens by polymerase chain reaction: its field application in the Philippines. *Parasitol Res* 82:585-589.
25. Sanuki J, Asai T, Okuzawa E, Kobayashi S, Takeuchi T. 1997. Identification of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* cysts in stool by polymerase chain reaction. *Parasitol Res* 83:96-98.
26. Verweij JJ, Blotkamp J, Brienen EAT, Aguirre A, Polderman AM. 2000. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* cysts using polymerase chain reaction on DNA isolated from faeces with spin columns. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19:358-361.
27. Zaman S, Khoo J, Ng SW, Ahmed R, Khan MA, Hussain R, Zaman V. 2000. Direct amplification of *Entamoeba histolytica* DNA from amoebic liver abscess pus using polymerase chain reaction. *Parasitol Res* 86:724-728.
28. Kätzwinkel-Wladarsch S, Loscher T, Rinder H. 1994. Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from stool specimens. *Am J Trop Med Hyg* 51:115-118.
29. Ramos F, Zurabian R, Morán P, Ramiro M, Gómez A, Clark CG, Melendro EI, García G, Ximénez C. 1999. The effect of formalin fixation on the polymerase chain reaction characterisation of *Entamoeba histolytica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93:335-336.



30. Prakash A, Chakraborti A, Mahajan RC, Ganguly NK. 2000. *Entamoeba histolytica* : Rapid detection of Indian isolates by cysteine proteinase gene-specific polymerase chain reaction. *Exp Parasitol* 95:285-287.
31. Linder E, Isagulians M, Olsson M, Lundin L, Zindrou S, Corrales E, Tellez A, Leiva B, Morales W, Rivera T, Cabrera JM. 1997. Amebiasis in Leon, Nicaragua : *Entamoebae* in stool examination and identification of amebic liver abscess cases by serology and PCR. *Arc Med Res* 28:S314-S316.
32. Nuñez YO, Fernandez MA, Torres-Nuñez D, Silva JA, Montano I, Maestre JL, Fonte L. 2001. Multiplex polymerase chain reaction amplification and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* DNA from stool samples. *Am J Trop Med Hyg* 64:293-297.
33. Evangelopoulos A, Spanakos G, Patsoula E, Vakalis N, Legakis N. 2000. A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces. *Ann Trop Med Parasitol* 94:233-240.
34. Troll H, Marti H, Weiss N. 1997. Simple differential detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fresh stool specimens by sodium acetate-acetic acid-formalin concentration and PCR. *J Clin Microbiol* 35:1701-1705.
35. Gonin P, Trudel L. 2003. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 41:237-41.
36. Blessmann J, Ali IK, Nu PA, Dinh BT, Viet TQ, Van AL, Clark CG, Tannich E. 2003. Longitudinal study of intestinal *Entamoeba histolytica* infections in asymptomatic adult carriers. *J Clin Microbiol* 41:4745-4750.
37. Verweij JJ, Blange RA, Templeton K, Schinkel J, Brienen EA, van Rooyen MA, van Lieshout L, Polderman AM. 2004. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol* 42:1220-1223.
38. Kebede A, Verweij JJ, Endeshaw T, Messele T, Tasew G, Petros B, Polderman AM. 2004. The use of real-time PCR to identify *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* infections in prisoners and primary-school children in Ethiopia. *Ann Trop Med Parasitol* 98:43-48.
39. Kebede A, Verweij JJ, Petros B, Polderman AM. 2004. Short communication: Misleading microscopy in amoebiasis. *Trop Med Int Health* 9:651-652.
40. Blessmann J, Buss H, Nu, PAT, Dinh BT, Ngo QT, Van AL, Alla MD, Jackson TF, Ravdin JI, Tannich E. 2002. Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. *J Clin Microbiol* 40: 4413-4417.
41. Clark CG. 1993. PCR detection of pathogenic *Entamoeba histolytica* and differentiation from other intestinal protozoa by riboprinting, p. 468-474. In Persing D H, Smith TF, Tenover FC, White TJ. (ed.), *Diagnostic molecular microbiology. principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
42. Clark CG. 1997. Riboprinting: A tool for the study of genetic diversity in microorganisms. *J Eukaryot Microbiol* 44:277-283.
43. Clark CG, Diamond LS. 1991. Ribosomal RNA genes of 'pathogenic' and 'nonpathogenic' *Entamoeba histolytica* are distinct. *Mol Biochem Parasitol* 49:297-302.
44. Clark CG, Diamond LS. 1992. Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* from other intestinal protozoa by riboprinting. *Arch Med Res* 23:15-16.
45. Clark CG, Diamond LS. 1997. Intraspecific variation and phylogenetic relationships in the genus *Entamoeba* as revealed by riboprinting. *J Eukaryot Microbiol* 44:142-154
46. Bhattacharya S, Bhattacharya A, Diamond LS. 1992. *Entamoeba histolytica* extrachromosomal circular ribosomal DNA: analysis of clonal variation in a hypervariable region. *Exp Parasitol* 74:200-204.
47. Mukhopadhyay A, Chakraborti A, Mahajan RC, Ganguly NK. 2002. *Entamoeba histolytica*: rapid identification and differentiation of Indian isolates by riboprinting. *Exp Parasitol* 102:109-112.
48. Gomes MA, Melo MN, Macedo AM, Furst C, Silva EF. 2000. RAPD in the analysis of isolates of *Entamoeba histolytica*. *Acta Tropica* 75:71-77.
49. EMBO workshop on "Pathogenesis of amoebiasis: from genomics to disease", Pasteur Institut, Paris, France, May 19-21 2003, Abstract Book.
50. Tanyüksel M, Petri WA, Jr. 2003. Laboratory diagnosis of amoebiasis. *Clin Microbiol Rev* 16:713-729.



LEISHMANIASISDE MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN YERİ

Seray ÖZENSOY TÖZ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir

Leishmaniasis, Leishmania cinsine dahil olan değişik türlerin deri, mukoza ve iç organlarda oluşturduğu bir grup enfeksiyon hastalığını kapsamaktadır. Parazitin türüne göre hastalık antroponotik veya zoonotik olabilmekte, vektör Phlebotomus'larla bulaşmaktadır.

Leishmania paraziti, günümüzde immunoloji ve moleküler biyoloji alanında bir enfeksiyon modeli olarak geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Moleküler yöntemler insan ve köpeklerde leishmaniasis tanısında, elde edilen izolatların tür identifikasyonunda, bir bölgeden toplanan izolatların genotiplendirilmesinde, DNA aşısı hazırlanmasında, vektör Phlebotomus'larda parazitin saptanması için sıklıkla kullanılmaktadır. Son yıllarda, farklı Leishmania türlerinin promastigotlarına bir plazmid vektör transfer edilerek hazırlanan bir DNA aşısının in vitro denemeleri tamamlanarak uygulanabilme aşamasına gelmiştir.

Ülkemizde Leishmania tropica'nın neden olduğu antroponotik kutanöz leishmaniasisin (şark çibani) yayılımı önceleri Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerimizle sınırlı iken son yıllarda başta Ege Bölgesi'nde olmak üzere diğer yerlerde yeni odaklar oluşmaya başlamıştır. Leishmania infantum'un etken olduğu zoonotik visseral leishmaniasis ise Ege, Akdeniz kıyı bölgeleri ve İç Anadolu bölgesi başta olmak üzere hemen hemen tüm bölgelerimizde insanlarda sporadik olarak saptanmaktadır. Zoonotik visceral leishmaniasiste köpekler en önemli rezervuar olup, hastaların bulunduğu köylerde köpeklerin % 5-20 oranında enfekte olduğu saptanmıştır. Visseral leishmaniasis daha çok çocuklarda görülmekte birlikte yetişkinlerde de hastalık oluşabilmekte, bu nedenle benzer bulguları oluşturan hastalıkların ayırıcı tanısında düşünülmesi önem taşımaktadır. Hastalığın olduğu diğer önemli bir grup da immun yetmezlikli kişilerdir. Başta Güney Avrupa olmak üzere diğer Akdeniz Ülkelerinde HIV + Visseral leishmaniasis olguları sıklıkla görülürken ülkemizde henüz bildiri mi yapılmamıştır.

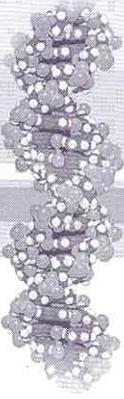
Kutanöz leishmaniasisde deri lezyonundan alınan, visseral leishmaniasisde ise kemik iliği aspirasyon ile alınan örnekten hazırlanan yayma preparat boyanarak veya NNN besiyerine ekim yapılarak parazitolojik tanı konulmaktadır. Visseral leishmaniasis tanısında serolojik yöntemler ile antikor araştırılması hassasiyeti artırmaktadır. Son yıllarda "rK39" rekombinant antijenin kullanıldığı hızlı tanı testi ile ülkemizde de gerek insanlarda gerekse rezervuar olan köpeklerde visseral leishmaniasis tanısında %100 oranında başarı elde edilmiş ve rutin uygulamada kullanılmaya başlamıştır.

Ülkemizde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) leishmaniasis tanısında araştırma amaçlı kullanılmakta olup, Leishmania kinetoplast DNA'sında bulunan bir bölgeden türetilen 13A ve 13B primer çifti kutanöz leishmaniasis hastaları ve visseral leishmaniasisli insan ve köpeklerde tanıda başarılı bulunmuştur. Ancak direkt parazitolojik incelemede olduğu gibi yetersiz örnek alımında yanlış negatif sonuç verebileceği düşünülerek diğer yöntemlerle birlikte uygulanmasının doğru olacağı belirtilmiştir. İlk tedavi kürü sonucunda kemik iliğinde parazitin tamamen kaybolmasa da çok azaldığı için direkt mikroskopide saptanmasının güçleştiği, serolojik olarak takip içinse hastanın tedavi öncesi ve sonrası kontrol serumlarının paralel çalışılarak antikor titresindeki düşüşün gösterilmesi gerektiği belirtilmiştir. Hasta serumlarının tüm laboratuvarlarımızda henüz düzenli olarak saklanamaması nedeniyle tedavinin izleminde klinik bulgular ile birlikte PCR uygulamasının yararlı olacağı belirtilmiştir. PCR yönteminin ileride ülkemizdeki HIV+ hastalarda visseral leishmaniasis araştırılmasında da yararlı olacağı kanısındayız. Tüm bu yararlarına rağmen PCR uygulamasındaki standardizasyonun gerekli olması ve kontaminasyon olasılığına karşın laboratuvar uygulamasındaki disiplinin göz ardı edilmemesi ve bu konuda ülke genelinde koordinasyon sağlanarak çalışılmasının daha hızlı gelişmelere yol açacağını düşünmekteyiz.



Türkiye'deki kutanöz ve visseral leishmaniasis hastaları ile köpeklerden elde edilen 57 *Leishmania* izolatu "multi-site DNA polymorphism" analizi ile 5 farklı genotipik gruba ayrılmıştır. Bu 5 genotipin taksonomik değerlendirilmesi ve filogenetik ilişkilerinin analizi amacıyla -1.4 kb'lik iyi korunan tek kopya bir gen olan "acetylglucosamine-1-phosphate transferase (NAGT)" geninin referans suşlarla dizi farklılıkları araştırılmıştır. İzolatların çoğu daha önce tanımlanan bilgilere uyumlu olarak *L. tropica* ve *L. infantum* olarak bulunmuştur. Ancak daha önce varlığı kanıtlanmayan *L. major* ve 1 ila 4 bazdaki farklılık nedeniyle de "varyant" olarak tanımlanan "*L. major* var.1" ve "*L. major* var.4" gruplarının da bulunduğu bildirilmiştir. Bu konuda daha fazla izolatla ve farklı bir gen bölgesi ile çalışmalara gereksinim bulunmaktadır.

Leishmaniasisde dünyadaki en önemli ve son gelişme ise *Leishmania major* genom projesinin tamamlandığı ve 2004 yılı ortalarında bütün araştırmacıların kullanımına açılacağı bildirilmesidir.



SITMA TANISINDA MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN YERİ

Dilek TURGUT-BALIK

Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Elazığ

1. GİRİŞ

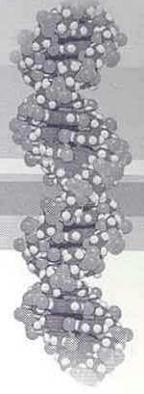
Sıtmayı ortadan kaldırmak için yüzyıldan daha fazla bir süre çaba harcanmış olmasına rağmen, hastalık dünyanın tropikal ve subtropikal ülkelerinin halk sağlığını ve ekonomik gelişmesini tehdit eden bir faktör olmaya devam etmektedir. Her yıl 300-500 milyon sıtma vakasının olduğu ve 2.7 milyon ölümün gerçekleştiği tahmin edilmektedir. Ölüm oranı, toplam ölümlerin yaklaşık olarak % 90'ının 5 yaşın altındaki çocuklarda görüldüğü Sub-Saharan Afrika'da en fazladır. İnsan sıtması anofel sivrisinekleri tarafından taşınan ve hücre içi paraziti olan Plasmodium genusu ile enfeksiyon sonucunda oluşmaktadır (Gardner et. al, 2002). Antimalarial ilaçlara ve insektisidlere karşı olan direnç, halk sağlığı altyapısının bozulması, populasyon hareketleri ve çevresel değişimler sıtmanın yayılmasına katkıda bulunmaktadır. Yapılan son çalışmalar, yeni kontrol metodları geliştirilip uygulanmadığı taktirde sıtma vakalarının önümüzdeki 20 yıl içinde iki katına çıkabileceğini göstermektedir. Ancak problemin büyümesine paralel olarak sıtma ile ilgili moleküler yöntemlerin de hızla ilerlemesi, Plasmodium'ların genom projelerinin de katkısıyla sıtma konusunda yapılan moleküler düzeydeki çalışmalara yeni ufuklar açmıştır.

2. SITMA TANISINDA KULLANILAN GELENEKSEL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Sıtmanın kesin tanısı sıtma parazitlerinin kanda tespit edilmesi esasına dayanmaktadır (Gascoyne et al., 2004). Tablo I, genel olarak uygulanabilir bir sıtma tanı yönteminin ideal özelliklerinin neler olabileceğini göstermektedir.

Tablo I. Sıtmanın tanısında kullanılacak genel amaçlı teknoloji için ideal özellikler (Gascoyne et al., 2004).

| Parametre | İdeal karakteristik |
|-------------------------------|---|
| Özgüllük | Tür ve, ideal olarak, soy belirleme, bütün sıtma tiplerini tanıma: vivax vd. |
| Doğruluk | Hatalı negatif yok, birkaç hatalı pozitif olabilir |
| Operasyon hızı | 30 dakikanın altında sonuç verme |
| Yanıtıcı faktörlerin olmaması | Doğruluk önceki enfeksiyonlar yada diğer hasta karakteristikleri tarafından etkilenmemeli |
| Taşınilabilirlik | Bateri gücüyle çalışabilme, 2 kg'dan düşük ağırlıklı olma |
| Kullanım kolaylığı | İşlemek için minimum uzmanlık gerektirme |
| Maliyet | Başlangıç yatırımının bir mikroskobun maliyetinden, işleme fiyatının ise test başına 30 cent'den düşük olması |
| Uyarlanabilirlik | Tespit edildikçe yeni genomik markırların avantajını alabilme |



İdeal olarak, bir sıtma tanı testi 1 ml kandaki bir paraziti tespit edebilmeli, iyi bir duyarlılık ve özgüllüğe sahip olmalı ve enfeksiyona hangi insan sıtma parazitinin sebep olduğunu belirleyebilmeli, hatalı negatif sonuç vermemelidir (belki çok düşük oranda hatalı pozitif sonuç verebilir). Test ideal olarak 20 dakika ya da daha düşük sürede sonuç vermelidir. Testin, en azından *P. falciparum*'da, önceki enfeksiyonlardan etkilenmeden parazitemi oranını belirlemesi istenen bir özelliktir. Ayrıca, sıtma az gelişmiş bölgelerde meydana geldiği için, altyapıdan yoksun bölgelerde kolaylıkla uygulanabilmeli, kullanılacak olan test ekipmanı veya gerekli olan diğer malzemeler taşınabilir ve son derece ucuz olmalıdır (Gascoyne et al., 2004; Hänscheid and Grobusch, 2002).

Sıtmanın tanısında kullanılan bazı yöntemler; kültür yöntemi (Yera et al., 2003), mikroskopi (Gascoyne et al., 2004; Hermsen et al., 2001), immunolojik yöntemler (Gascoyne et al., 2004; Peruski and Peruski, 2003; Hermsen et al., 2001), flow sitometri (Gascoyne et al., 2004), gen amplifikasyonu (PCR), TaqMan ve gen/protein çipleri gibi uygulamaları içeren moleküler yöntemler (Gascoyne et al., 2004; Peruski and Peruski 2003; Rathod et al., 2002; Weiss, 1995) olup burada özellikle moleküler yöntemler tartışılacak ve altın standart olarak kabul edilen mikroskopinin ve ayrıca immunolojik yöntemlerin moleküler yöntemlere göre avantaj ve dezavantajları tartışılacaktır .

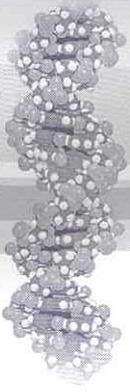
2.1 Mikroskopi

Mikroskopi "altın standart" olarak kabul edilmekte olup, 100 yıldan daha uzun bir süreden beri kanda parazit ile enfekte olmuş eritrositleri tanımlamada kullanılmaktadır. Hem ince yayma hem de kalın damla kan preparatları incelenerek uygulanan mikroskopik yöntem patoloğlar ya da teknisyenler tarafından gerçekleştirilen ve en yaygın olarak uygulanan tanı yöntemidir. Uzman bir teknisyen, örnekleri hızlı bir şekilde analiz edebilir ve 1 ml kan örneğindeki 4-5 parazit kadar az bir sayıyı tespit ederek tür tanısını yapabilir. Yöntem, günümüzde var olan çoğu tanı teknikleri ile yarışmacı özellikte olup az gelişmiş bölgelerde diğer bütün yöntemlerinden daha ucuzdur. Bununla beraber bu yöntemin bazı dezavantajları vardır. Mikroskopları birçok uzak bölgeye taşımak zordur ve dikkate değer bir ölçüde duyarlılık limitini başarmak için yetenek ve zaman gerektirir. Düşük enfeksiyon düzeylerinde ve karışık enfeksiyonlarda tanıma güçlük yaşanabilir ve bu durum deneyimli bir mikroskopist gerektirir. Ayrıca şüphe durumunda türler çoğunlukla moleküler yöntemler kullanılıp ileri derecede karakterize edilerek tanının onaylanması gerekebilmektedir (Gascoyne et al., 2004; Peruski and Peruski, 2003; Hänscheid and Grobusch, 2002).

2.2 İmmunolojik Yöntemler

Antimalarial antikorların teşhisi için immunolojik yöntemler geliştirilmiş olup, yaygın olarak sıtma parazitine karşı antikorların ölçümünde kullanılmaktadır. Bu serolojik yöntemler sıtma enfeksiyonuna maruz kalma ile ilgili kullanışlı bilgiler vermekte olup yeni ve eski enfeksiyonları birbirinden ayırtma yeteneğine sahip değildir. Bu sebeple antikor tanısına dayanan yöntemler sıtmanın tanısında sınırlı bir kullanım alanına sahip olup daha çok sıtma ile ilgili seroepidemiolojik çalışmalarda kullanışlıdır (Kaushal and Kaushal, 1997). Tablo II'de Plasmodium için spesifik olan antikorları tanıyan immunolojik testler verilmiştir.

İmmunolojik yöntemler klinik tanıları onaylamak için düzenli olarak uygulanmakla beraber, bu testler genellikle kültür ve gen amplifikasyon tekniklerinden daha az duyarlı ve daha az özgüldür (Peruski and Peruski, 2003). Analizden önce örneği konsantre etmeksizin, çoğu immunolojik test tahmin edilen enfekte dozun yaklaşık 100-1000 katı üzerinde bir duyarlılık eşiğine sahiptir. Bu durum bu gruba giren testlerin kullanımını sınırlamaktadır. Ayrıca bu testler gerekli özgüllükten de yoksun olabilirler. Bununla beraber neredeyse bütün immunolojik testler diğer metodlarla onay gerektirse de ELISA, IFAT gibi testler çok fazla miktarda örneğin hızla taranmasında kullanılan etkili testlerdir (Peruski and Peruski, 2003).



Tablo II. Plasmodium için spesifik olan antikörleri tanıyan immunolojik testler (Gilles 1993 ve Peruski and Peruski, 2003'den uyarlanmıştır).

| Test | Uygulama Alanı | Not |
|---|--|--|
| İndirekt immunofloresans (IFAT) | İnfeksiyonun tanısı Epidemiyolojik çalışmalar | Orta derecede duyarlılık ve özgüllük Uzman personel gerektirme Standardizasyon güçlüğü |
| İndirekt haemoaglutinasyon (IHA) | Epidemiyolojik araştırmalar | Düşük duyarlılık ve özgüllük Alan çalışmasına uygunluk |
| Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) | İnfeksiyonun tanısı Epidemiyolojik çalışmalar | Orta derecede özgüllük Alan şartlarında yeterli duyarlılık sağlanmaktadır |
| Radioimmunoassay (RAI) | Araştırma çalışmaları | Pahalı Belirli aletlerin kullanımını gerektirir |
| İmmunopresipitasyon | Araştırma çalışmaları | Test oldukça duyarlıdır Tanıdan çok araştırma amaçlı kullanılmaktadır |

Antikorların varlığının aksine parazite spesifik antijenlerin varlığının tespiti sıtmanın tanısı için daha iyi bir alternatif olarak görülmektedir (Kaushal and Kaushal, 1997). Bu amaçla bazı kullanışlı immunokromatografik dipstik metodları sıtmanın tanısı için geliştirilmiştir. Bu test metodlarının kullanımı teknik imkanların olmadığı ortamlarda bile son derece kolaydır. Malarial histidin-zengin protein (HRP II) (Wolday et al., 2001; Birku et al., 1999) ve laktat dehidrogenaz (pLDH) (Makler et al., 1993-a) gibi Plasmodium proteinlerinin antijenik tespitine dayanan testler ticari olarak mevcuttur. Proteinler, parazitize olmuş hücreler tarafından konağının kanına bırakıldığı için bu metod ile sözkonusu proteinlerin tespiti, kesin olarak parazitin kendisini değil, kanda sıtma aktivitesinin varlığını gösterir. Testler proteinlerdeki immunojenik farklılıklar aracılığıyla temel sıtma türlerini ayırtma yeteneğine sahiptir. Bununla beraber, testlerin duyarlılığı (çoğu 100 parazit/ml'nin üzerinde güvenilir hale gelir) mikroskopik metodun duyarlılığından daha düşüktür ve teste cevapların gücü ile infeksiyonun derecesi arasındaki oransallık hastadan hastaya çeşitlilik gösterir (Gascoyne et al., 2004). Sıtma proteinlerinin varlığı infeksiyon azaldıkça oldukça hızlı bir şekilde düşer. Böylece bu metodlar tekrar meydana gelen infeksiyonların tanısında kullanışlı fakat kemoterapiye verilen hızlı yanıtın takibi için kullanışlı değildir. Yine bu metodlar karışık infeksiyonlarda da türlerden biri belirgin olarak düşük bir parazitemi oranında bulunursa bu türü tanımada yetersizdir. Dipstik testlerinin kullanılışı kolaydır ve 30 dakika dolaylarında sonuç vermektedir. Bununla beraber bu testler pahalı olup infeksiyon oranı yüksek olan bölgelerde mikroskopik metoda göre belirgin bir avantajı yoktur. Ancak mikroskopik metodun uygulanmadığı bölgelerde uygulanabilecek en iyi methodur (Gascoyne et al., 2004).

2.3 Moleküler Yöntemler

Moleküler biyoloji yöntemlerinin parazitik protozoanın tanısında kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır. Son 10 yılda gerçekleşen DNA ekstraksiyonunun kolaylaşması, otomatikleştirilmiş prosedürler ve polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) geliştirilmesi gibi teknik ilerlemeler, moleküler yöntemlerin kullanımını teşvik etmiştir (Yera et al., 2003) ve bu teknikler genellikle insanda bulunan bütün parazitik protozoanın teşhisinde veya bunlarla ilgili diğer çalışmalarda kullanılmaktadır. Moleküler yöntemlerin tanı amacıyla gerçekleştirilmesi kültür, mikroskopik ve immünolojik metodlar ile karşılaştırıldığı zaman kesinlikle temel bir adımdır. Moleküler tanı yöntemlerinin temel avantajları patojeni tespit etmedeki duyarlılığı, özgüllüğü, bir organizmanın tanısını yapmadaki hızı ve çok fazla miktarda biyolojik örnek gerektirmemesidir (Weiss, 1995; Yera et al., 2003; Peruski and Peruski, 2003). Doğrudan mikroskopi yöntemi, parazit



sayısı yeterince fazla ise parazitlerin morfolojik olarak araştırılması ve tür identifikasyonunda yeterlidir. Nükleik asit tabanlı teknoloji çok sayıda örneğin otomatizasyonla bir arada incelenmesi dışında bir avantaj sağlamamaktadır. Ancak parazitlerin az sayıda bulunduğu örneklerde nükleik asitlere dayalı yöntemler yüksek duyarlılıkları ile hassas bir tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır (Weiss, 1995; Alkan, 1997).

2.3.1 DNA ve RNA Probları

Canlılar deoksiribonükleik asit (DNA) içeren genlere sahiptirler. Çift iplikli DNA sarmalını oluşturan genomik DNA'nın bazı dizileri belirli bir türe özgüdür ve eğer bunlar ilgili organizmadan izole edilir ve güvenilir bir şekilde tespit edilirse tür tanısı için hatasız bir sistem sağlar (Gilles, 1993). Bunun gerçekleştirilebildiği teknoloji DNA probu (nükleik asit zincirlerinin belirli bir bölümündeki nükleotidleri karşılayabilecek şekilde uygun bir sırada dizilmiş, iki ucu yeni bir nükleotidin bağlanmasına uygun olmayan çeşitli uzunluklardaki DNA veya RNA gibi bir moleküldür) olarak bilinmekte olup DNA'nın hibridizasyonu (probların nükleik asit zincirinde spesifik olduğu dizisine bağlanması) esasına dayanır. İlk olarak DNA sarmalının iki ipliği kimyasal olarak ya da ısı uygulamasıyla denatüre edilerek birbirinden ayrılır ve ayrı ayrı katı bir yüzeye bağlanır. Bu ayrılan DNA iplikleri DNA probu ile etkileşmeye bırakılır (hibridizasyon). Problar, örneğin Plasmodium falciparum'a özgü olan bir tekrar bölgesinin yüzlerce kopyasını oluşturmak için ya rekombinant DNA teknikleriyle ya da sentetik olarak üretilirler.

Örneğin ilk defa Franzen et al. (1984) tarafından tanımlanan ve Plasmodium falciparum genomunda bulunan 21 baz çiftlik bir tekrar dizisinin homoloğu olan problar hazırlanmış ve çalışmalarda kullanılmıştır. Hazırlanan bu problar diğer üç insan sıtma paraziti DNA'sı ya da insan DNA'sı ile hibridize olmamıştır. Genel olarak bu testlerin özgüllüğü mükemmel olmakla beraber duyarlılığı mikroskopik metod ile karşılaştırıldığı zaman özellikle düşük parazitemi oranlarında yetersiz kalmaktadır. Yapılan bir çalışmada radyoizotop ile işaretlenmiş ya da alkalin fosfataza konjuge edilmiş 21 nükleotidlik tekrar bölgesine komplementer olan sentetik bir prob direkt olarak filtrelelere uygulanmış birçok kan örneği üzerinde test edilmiştir (Weiss, 1995; Sethabutr, et al., 1988). Çalışmanın sonucunda probların oldukça spesifik olduğu fakat düşük parazitemi oranında (<500 parazitemi) tanıyamadığı gözlemlenmiştir. Alkalin fosfataza konjuge edilmiş sentetik prob kullanıldığı ve protokol optimize edildiği zaman testlerin duyarlılığı % 84'den % 95'e yükselmiş, özgüllük ise mikroskopik metod ile karşılaştırıldığı zaman en iyi dereceye ulaşmıştır.

RNA problemlerinin de Plasmodium'ların tanısında kullanılması mümkündür. RNA problemleri kullanılarak parazitemi oranının düşük olduğu hastalarda teşhisin yapılmasının mümkün olduğu ve belirli oranda parazitemi oranının tespit edilebileceği bildirilmiştir (Weiss, 1995; Gilles, 1993). Ancak PCR metodlarındaki ilerlemeler ve duyarlılığın daha yüksek olması, birçok araştırmacıyı DNA ve RNA prob testlerinden bu metodu kullanmaya yöneltmiştir. Ayrıca ayrı bir başlık altında incelenecek olan gen çipleri de bu metodlara büyük bir alternatiftir.

2.3.2 Gen/ Protein Çipleri

Gen çipleri veya mikroarrayler son yıllarda PCR temelli metodların hız ve duyarlılığını koruyarak ortaya çıkan ilgi çekici bir ilerleme olup (Peruski and Peruski, 2003) diagnostik veya prognostik markırların tespit edilmesinde kullanılan bir teknolojidir (Gascoyne et al., 2004). Gen çiplerinde, hedef gen dizisine komplementer olan çoklu oligonükleotid problar bir substrat üzerine uzaysal olarak dizilmiştir (Gascoyne et al., 2004; Ganesan et al., 2002; Rathod et al.; 2002). Bunlar boyanmış ve floresan ile tespit edilmiş kısa çift iplikli DNA segmentini oluşturmak için array üzerinde bulunan ve herhangi bir prob ile hibridize olan örnek nükleik aside eş zamanlı olarak maruz bırakılır. İhtiyaç duyulan nispeten büyük miktardaki hedef DNA'yı sağlamak için, düşük miktardaki infekte hücrelerden DNA'nın "shotgun PCR" ile amplifiye edilmesi gerekmektedir. Çip analizi için gerekli olan örnek hazırlama basamağı dolayısıyla bu işlem, PCR için uygulanan işlemden daha kompleks hale gelir. Ayrıca eğer sonuçların savunulmasında kullanılacaksa, gen çipleri veri okuyucu ve analiz edicilerin de özellikle detaylandırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Gen çiplerinin bir diğer dezavantajı yeniden kullanılamamalarıdır. Dolayısıyla yakın bir gelecekte, teknik ve maddi imkanların kısıtlı olduğu bölgelerde, bu metodun kullanımı zordur ve rutin tanı için pahalıdır. Kompleks olma ve maliyet yüksekliği proteomik analizler için de geçerlidir (Florens et al., 2002; Gascoyne et al., 2004). Böylece gen ve protein çipleri tarafından sağlanan ayırım paralel olmadığı için yakın gelecekte bu metodlar sıtmayı daha detaylı olarak araştırmada kullanacak olan araştırma laboratuvarı bazlı teknolojiler olarak kalacaktır (Gascoyne et al., 2004).



2.3.3 Gen Amplifikasyonu (PCR)

Sıtmanın tanısında kullanılan bir diğer yaklaşım sıtma parazitinin genetik özelliklerinin tanıdığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu'dur (PCR) (Peruski and Peruski 2003, Gascoyne et al., 2004, Felger et al., 2003). PCR, hedef nükleik asit dizisine komplementer olan iki primer kullanarak istenen DNA bölgelerini denatürasyon, primer bağlanması ve DNA polimeraza bağlı DNA sentezi döngüleriyle çoğaltan bir yöntemdir. PCR, hücreden arındırılmış bir yöntem olarak, DNA klonlamasını kolaylaştırarak, rekombinant DNA araştırmalarının güçlü bir tekniği olmuştur ve pek çok durumda, konakçı hücrelerin kullanıldığı klonlamanın yerini almıştır (Öner, 2003).

PCR, DNA molekülleri topluluğunda, özgül hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılmasına dayanır ve bu yöntemin uygulanabilmesi için, yok denecek kadar az miktardaki DNA bile yeterlidir. PCR ile belirli bir bölgeyi çoğaltabilmek için, hedef DNA'nın nükleotid dizisi hakkında bazı bilgiler gerekir. Bu bilgi, tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanacak olan iki oligonükleotid primerin sentezi için kullanılır. Bu primerler, çoğaltılacak tek zincirli DNA molekülündeki tamamlayıcı dizilerle hibridize olur. Isıya dayanıklı bir DNA polimeraz çalışılan DNA'daki hedef bölgenin sentezini sağlar. PCR'da üç temel basamak vardır ve çoğaltılmış ürünün miktarı teorik olarak, bu üç adımın tekrarlanma sayısına bağlıdır.

1. Denatürasyon: Bu adımda, çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. Bu DNA, temiz olmak zorunda değildir ve genomik DNA, kurumuş kan ya da uzun süre saklanmış tıbbi örnekler gibi birçok değişik kaynaklardan elde edilebilir. Çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelinceye kadar ısıtılır (90-95°C de, yaklaşık 5 dakika süreyle).
2. Bağlanma (annealing): Sıcaklık 50-70°C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler yapay oligonükleotidlerdir (15-30 nükleotid uzunluğunda) ve çoğaltılacak DNA kısmının uçlarındaki tamamlayıcı dizilere özgül olarak bağlanır. Bu primerler, kalıp DNA'nın sentezi için, başlangıç noktası olarak görev yaparlar.
3. Uzama (extension): DNA polimerazın ısıya dayanıklı bir şekli (sıcak su kaynaklarında yaşayan bir bakteriden elde edilen enzim, Taq polimeraz) reaksiyon karışımına ilave edilir ve DNA sentezi 70-75°C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleşir. Polimeraz enzimi, nükleotitleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur .

Bu üç basamaktan oluşan bir reaksiyon seti, çift zincirli ürünün tek zincirli hale getirilmesi (denaturation), primerlerin bağlanması (annealing) ve polimeraz enzimi ile zincirin uzaması (extension) bir döngü olarak ifade edilir. PCR bir zincir reaksiyonudur. Çünkü, yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Bir döngü ortalama 4-5 dakika sürer ve pek çok kez tekrar edilir. 25-30 döngü sonunda, DNA miktarında yaklaşık 1,000,000 kez artma olur. İşlem, thermocycler (ısı döngücüsü) denilen makinelerde, önceden döngü sayısı ve sıcaklıkları belirtilen programlarla otomatik olarak gerçekleştirilir. Bu yöntem ile; klonlama, dizi analizi, klinik tanı ve genetik taramalar gibi diğer işlemlerde kullanmak üzere bol miktarlarda hedef DNA fragmentleri elde edilir.

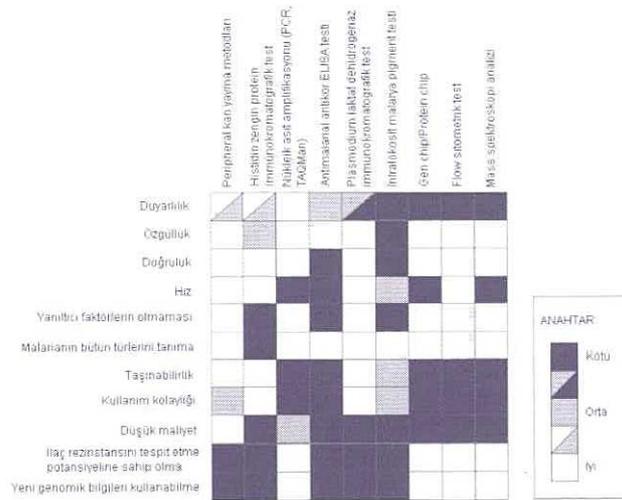
PCR sıtmanın tanısında sık kullanılan bir metottur (Postigo et al., 1998; Laoboonchai et al., 2001; Farcas et al., 2004). Prensipte olarak, bu amplifikasyon metodu sıtma enfeksiyonunun seviyesini yansıtan kantitatif sinyaller ve sınırsız duyarlılık sağlar. Ayrıca genetik özelliklerden yararlanılarak tür tanısı yapılır. PCR duyarlılık ve özgüllük bakımından mikroskopik analizi göze çarpar bir şekilde geride bırakan ilk metottur (Ohrt et al., 2002). Örneğin PCR uygulanması ile karışık enfeksiyonların tanısında mikroskopik metodun kabul edilenden daha fazla oranda başarısız olduğu gösterilmiştir (Gascoyne et al., 2004). Bununla beraber, kantitatif amaçla kullanılacak olursa, gen amplifikasyon yöntemleri amplifikasyon inhibitörlerini uzaklaştırmak için kanın çok dikkatlice hazırlanmasını gerektirmektedir. Buna rağmen gen amplifikasyon teknikleri çok cazip teknolojiler olarak karşımıza çıkmaktadır ve türlerin veya soyların ileri derecede tanısını ve ilave olarak hastalık karakteristiklerinin tanımlanmasını sağlamaktadır. Örneğin *P. falciparum*'un genomunun dizi analizi son zamanlarda tamamlanmış (Gardner et al., 2002) ve ilaç direncinden sorumlu olan genotipik markırlar, diğer önemli diagnostik ve prognostik tanımlayıcılar belirlenmiştir (Gascoyne et al., 2004). PCR, mikroskopik metod ile tekrarlanan negatiflerin kontrolünde kullanılabilir.



Bütün bu avantajlara rağmen, PCR'ın sıtmanın tanısında rutin bir test olarak kullanımını sınırlayan bazı konular vardır (Peruski and Peruski, 2003; Gascoyne et al., 2004; Hänscheid and Grobusch, 2002); PCR en özgül ve en duyarlı metod olmasına rağmen uzun bir reaksiyondur. Özelleşmiş ve pahalı cihazlar ile genellikle alan çalışmalarında sağlanamayan laboratuvar şartlarını gerektirir (WHO, 2000). Bu da yüksek sıtma transmisyonunun olduğu bölgelerdeki limitli parasal kaynağı olan çoğu ülkede PCR'ın bir tanı testi olarak kullanımını sınırlamaktadır. Ayrıca örneklerin toplanması ve laboratuvar ortamına geri getirilip bunlar üzerinde çalışılması tanının gecikmesine sebep olabilmektedir. Son zamanlarda "Lightcycler" ve "Smart Cycler" gibi hızlı ısı döngücüler ve Plasmodium türlerin tanısını yapmak için çeşitli ısı dönüştürücülerle kullanılabilen ticari kitler kullanıma sunulmuştur. Özellikle Smart Cycler taşınabilir bir alet olup bir laptop ve aksesuarlarını temin etmek mümkündür. Ancak hem ısı dönüştürücüler hem de kitler oldukça pahalıdır.

3. SONUÇ

Şekil 1'de sıtma tanısında kullanılan tanı metodları özetlenmiştir. İki özellik sıtmanın tanısı üzerinde temel bir etkiye sahip olabilir: Bunlar ilaç rezistansını tanıma ve tanı ile ilgili bir markır olarak ilave edilen yeni genetik bilgileri kullanabilme yeteneğidir. Bu kriterler temel alındığı zaman, tablodan, sıtmanın pahalı olmayan alan tanılarında şu anda var olan yöntemler içinde mikroskopik yöntemin en etkin metod olma özelliğini sürdürdüğü görülmektedir. Bununla beraber gen amplifikasyonu en iyi duyarlılığı, tür ayrımını, genetik varyantların tanısını sunan yöntemdir. Diğer her bir metod arzu edilen bir ya da birkaç tanı teknolojisi kriterinde yetersiz kalmaktadır (Gascoyne et al., 2004).

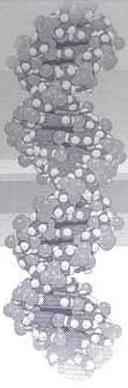


Şekil 1. Sıtmanın tanısında kullanılan bazı temel metodların görsel olarak temsili (Gascoyne et al., 2004'den uyarlanmıştır).

4- Sıtmanın Tedavisinde Moleküler Yaklaşımlar

Plasmodium türlerinin antimalaryal ilaçlara karşı direnci tüm dünyada giderek ciddi boyutlara ulaşmaktadır. Sıtma ile mücadelede mevcut antimalaryal ilaçların etkinliğini zamanla kaybetmesi yeni antimalaryal ilaçların geliştirilmesini gerekli kılmıştır.

Sindirim vakuolünde meydana gelen hemoglobinin sindirimi, hemozoin oluşumu, redoks işlemleri, serbest radikal oluşumu gibi işlemler, ilaçların taşınması gibi membran işlerinden sorumlu olan proteinler ve makromoleküler ve metabolit sentezinden sorumlu olan enzimler sıtmanın tedavisinde kullanılacak bir antimalaryalin tespitinde yararlanılabilecek potansiyel kemoterapötik hedeflerden bazılarıdır.



Plasmodium'un izole edilen glikolitik enzimleri hem yeni antimalaryal ilaçlar için hedef moleküller olarak hem de hastalığın teşhisinde birer indikatör olarak tanımlanmıştır (Roth et al., 1988; Klenerman and Dickson 1992; Makler and Hinrichs, 1993-b). Glikolitik enzimlerden çoğu izole edilmiş, klonlanmış ve tamamen nükleotid dizileri belirlenmiştir (Read et al., 1994).

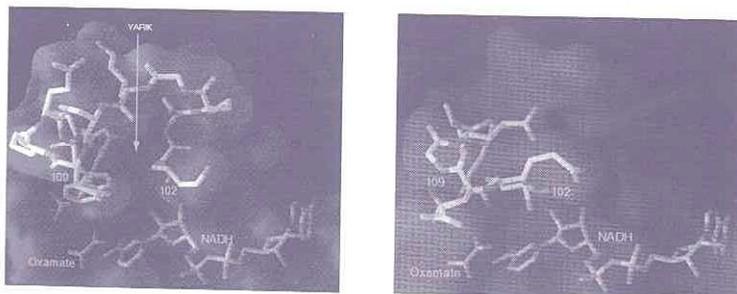
Yapmış olduğumuz çalışmalarda Plasmodium'ların laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan gen (pLDH) yeni antimalaryal ilaçların geliştirilmesini sağlamak için hedef gen olarak belirlenmiştir.

Sıtma parazitleri sitrik asit döngüsü ve aktif bir mitokondriden yoksun olduklarından (Roth et al., 1988; Trager, 1986) metabolizmaları için gerekli olan ATP ihtiyacını glikoliz ile sağlarlar. Parazit, bu metabolik yolda laktat dehidrogenaz enzimini kullanarak son ürün olan pirüvik asidi dönüştürümlü bir reaksiyonla laktik aside çevirmektedir. Yapılan çalışmalar bu enzimin aktivitesinin engellenmesinin parazitin yaşamının sonlandırılmasını sağladığını göstermektedir (Royer et al., 1986). Ancak aynı enzim hem insanda hem de parazitte bulunduğu için insan LDH'ının etkilenmeden kalması gerekmektedir. Yapılan çalışmalar pLDH'ın elektroforetik, kinetik ve yapısal olarak insan LDH'ından farklı olduğunu göstermiştir:

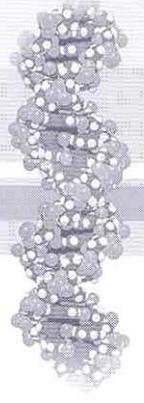
- I. İnsan LDH'ından farklı olarak pLDH yüksek pirüvat konsantrasyonunda inhibe olmamaktadır (Vander-Jagt et al., 1981).
- II. İnsan M4-LDH'ından farklı olarak, pLDH 3-asetilpiridin adenin dinükleotit (APAD+) adlı koenzimi 0,5 M laktat konsantrasyonunda daha hızlı kullanabilme yeteğine sahiptir (Makler and Hinrichs, 1993-b).
- III. pLDH'nın gossilik nitril diasetat ve türevleri tarafından inhibisyona insan LDH'ından daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Royer et al., 1986).
- IV. İnsan M4-LDH'ından farklı olarak pLDH, aktif bölge halkasında 5 ilave amino asit (DKEWN) içermektedir (Bzik et al., 1993; Turgut-Balik and Holbrook, 2001).

Plasmodium falciparum'un LDH (PfLDH) geni ilk olarak 1993 yılında Bzik ve Fox tarafından Honduras I soyundan izole edilmiştir (Bzik et al., 1993). Daha sonra aynı gen K1 (Tayland) ve PF FCBR (Kolombiya) soylarından izole edilmiş ve klonlanmıştır (Turgut-Balik and Holbrook, 2001). Yapılan karşılaştırmalar neticesinde izole edilen tüm bu soyların LDH geninin nükleotid dizilerinin aynı olduğu belirlenmiştir. Üç soy itibarıyla yapılan bu değerlendirmenin tüm soylar için genellenemeyeceği de bir gerçektir.

PfLDH, amino asit dizisi bilinen diğer türlerin LDH'ları ile karşılaştırılmış ve BsLDH ile %29, köpek balığı LDH'ı ile %29, insan M4-LDH'ı ile %31, domuz LDH'ı ile %33, insan H4-LDH'ı ile %29 (Turgut-Balik and Holbrook, 2001) oranında amino asit düzeyinde benzerlik görüldüğü belirlenmiştir. PfLDH'da iki pozisyonda amino asit eksikliği ve iki pozisyonda da amino asit fazlalığının varlığı belirlenmiştir. Glutamat-48 ve glisin-217 eksik olan iki amino asittir. Alanin-73 ve serin-74 arasında ilave bir tirozin bulunmaktadır. Diğer LDH'larla karşılaştırıldığında gözlenen en önemli farklılık PfLDH'ın serin-108 ve arjinin-109 arasında ilave 5 amino asit içermesidir (Bzik et al., 1993; Turgut-Balik and Holbrook, 2001). X ışını kristalografisi çalışmaları ile bu 5 amino asit ilavesinin enzimin katalitik halkasına yakın yüzeyinde çok belirgin bir yarı oluşturduğu (Şekil 2-a), fakat insandaki eşdeğeri olan LDH'da ise aynı bölgede hiçbir ilave amino asit olmadığı için söz konusu yarığın olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 2-b) (Dunn et al., 1996).



Şekil 2. PfLDH ve memeli LDH'ında substrat bağlanma bölgesi ve substrat spesifik halkaya bitişik yarığın varlığının gösterilmesi.



- a. PFLDH'nin 108. ve 109. amino asitleri arasındaki ilave 5 amino asidin oluşturduğu yarık.
- b. Memeli LDH'ında aynı pozisyonda ilave 5 amino asit bulunmadığı için enzim yüzeyinde bir yarık bulunmamaktadır (Dunn et al., 1996).

Bu yapıya dayandırılarak yapılan moleküler modelleme çalışmaları gossipol türevi olan gossilik nitril-1,1' diasetat'ın malarial LDH'nin belirlenen bu açıklığında barındırılabilceğini fakat memeli LDH'larında bu açıklık bulunmadığı için bu inhibitörün LDH'nin yapısına kabul edilmeyeceğini göstermiştir (Sessions et al., 1997). İnsan LDH'ından farklı olarak PFLDH'a özgü olan bu bölge, çeşitli enzim inhibitörlerini barındırma ve dolayısıyla enzim aktivitesini durdurarak parazitin insan kanı içerisinde ölümüne sebep olma potansiyeline sahip olduğu için ilaç tasarımı çalışmalarında hedef bölge olarak kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar, PFLDH yapısında bulunan ilave 5 amino asidin oluşturduğu yarığın klorokin ile bir kompleks meydana getirdiğini göstermiş ve klorokinin enzim üzerine olan inhibitör etkisi belirlenmiştir (Read et al., 1999). *P. falciparum*'a karşı etkin olacak olan yeni bir antimalaryal geliştirme programı Glaxo Wellcome Smith Kline Beecham ve London School of Tropical Medicine and Hygiene (Turgut-Balik et al., 2001) ortaklığı ile yürütülmektedir.

Aynı çalışma Türkiye'de ve dünyada en yaygın Plasmodium türü olan Plasmodium vivax LDH'ına da (PvLDH) uygulanmaya başlanmış (Turgut-Balik et al., 2004, yayına kabul edildi) ve ilgili gen Plasmodium vivax Belem soyu (Fransa) genomik DNA'sından klonlanmış ve dizi analizi yapılmıştır. PvLDH geni günümüze kadar klonlanan ikinci insan malaryal laktat dehidrogenazıdır. DNA dizisinin analizi, PvLDH'nin da PFLDH gibi 316 amino asitlik bir proteini kodlayan 951 baz çifti açık okuma çerçevesini içerdiğini göstermiştir. PvLDH'nin PFLDH ve bilinen diğer bazı LDH'lar ile amino asit dizinin kıyaslaması, PvLDH'nin sırası ile PFLDH ile %90,1, Plasmodium berghei LDH'ı ile %90,8, Plasmodium yoelii LDH'ı ile %90,5, insan-M4 LDH'ı ile %26, insan-H4 LDH'ı ile %25 benzer olduğunu göstermiştir. Ayrıca PvLDH'nin da PFLDH gibi aktif bölge halkasında 5 amino asit ilavesini bulundurduğu tespit edilmiştir. Önceden PFLDH'dan elde edilen yüksek çözünürlüklü X ışını yapısı, PvLDH'nin da bulundurduğu bu 5 ilave aminoasitin enzim yüzeyinde oluşturacağı bölgenin enzim inhibitörleri için cazip bir hedef olabileceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

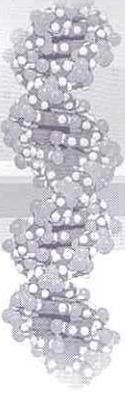
1. Alkan, Z., Özbel, Y., Özensoy, S., Atambay, M., Moleküler Biyolojik Yöntemler, Parazit Hastalıklarında Tanı, Editörler: Özcel, M.A., Altıntaş, N., Türkiye Parazitoloji Derneği, Yayın No:15, İzmir, 1997,373-411.
2. Birku, Y., Wolday, D., Ayele, D., Shepherd, A., Rapid Diagnosis of Severe Malaria Based on The Detection of Pf-Hrp-2 Antigen, Ethiop. Med. J., 1999, 37 (3):173-179.
3. Bzik D.J., Fox, B.A. and Gonyer, K., Expression of Plasmodium falciparum Lactate Dehydrogenase in Escherichia coli, Molecular and Biochemical Parasitology, 1993, 59: 155-166.
4. Dunn, C.R., Banfield, M.J., Barker, J.J., Higham, C.W., Moreton, K.M., Turgut-Balik, D., Brady, R.L. and Holbrook, J.J., The Structure of Lactate Dehydrogenase from Plasmodium falciparum Reveals a New Target for Anti-malarial Design, Nature Structure Biology, 1996, 3: 912-915.
5. Farcas GA, Zhong KJY, Mazzulli T, Kain KC , Evaluation of the RealArt Malaria LC real-time PCR Assay for Malaria Diagnosis, Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42 (2): 636-638.
6. Felger, I., Genton, B., Smith, Tom., Taner, M. And Beck, H.P., Molecular Monitoring in Malaria Vaccine Trials, Trends in Parasitology, 2003, 19 (2):60-63.
7. Florens, L., Washburn, M.P., Raine, J.D., Anthony, R.M., Grainger, M., Haynes, J.D., Moch, J.K., Muster, N., Sacci, J.B., Tabb, D.L., Witney, A.A., Wolters, D., Wu, Y., Gardner, M.J., Holder, A.A., Sinden, R.E., Yates, J.R. and Carucci, D.J., A Proteomic View of The Plasmodium falciparum Life Cycle, Nature, 2002, 419 (6906):520-526.
8. Franzen, L., Shabo, R., Perlmann, H., Wigzell, H., Westin, G., Aslund, L., Persson, T., Petterson, U., Analysis of Clinical Specimens By Hibridisation With Probe Containing Repetitive DNA From Plasmodium falciparum, Lancet, 1984, i:525-528.
9. Ganesan, K., Jiang, L. and Rathod, P.K., Stochastic Versus Stable Transcriptional Differences on Plasmodium falciparum DNA Microarrays, Int. J. Parasitol., 2002, 32(13):1543-1550.
10. Gardner, M.J., et. al., Genome Sequence of the Human Malaria Parasite Plasmodium falciparum, 2002, 419:498-511.



11. Gascoyne, P., Satayavivad, J., Ruchirawat, M., Microfluidic Approaches to malaria detection, *Acta Tropica*, 2004, 89: 357-369.
12. Gilles, H.M., Diagnostic Methods in Malaria, In Bruce-Chwatt's Essential Malariology, 3rd Edition (Gilles, H.M., Warrel, D.A. eds), Edward Arnold, 1993,78-95.
13. Hänscheid, T. and Grobusch, M.P., How useful is PCR in The Diagnosis of Malaria?, *Trends in Parasitology*, 2002,18 (9): 395-398.
14. Hermsen, C.C., et. al., Detection of Plasmodium falciparum Malaria Parasites in vivo by Real-time Quantitative PCR, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2001,118: 247-251.
15. Kaushal, D.C., Kaushal, N.A., Extracted from IndMED, *Journal of Parasitic Diseases*, 1997, 21(1):31-40.
16. Klenerman, P., Dickson, H., Plasma Lactate Dehydrogenase Estimation in the Diagnosis of Malaria, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 1992, 86, 563-565.
17. Klug, W.S., Cummings, M.R., Genetik Kavramlar, 6. Baskıdan Çeviri (Çeviri Editörü: Öner, C.), Palme Yayıncılık, Ankara, 2002, 515-517.
18. Laoboonchai, A, Kawamoto, F., Thanosingha, N., Kojima, S., Miller, R.R.S., Kain, K.C., Wongrichanalai, C., PCR-Based ELISA Technique for Malaria Diagnosis of Specimens from Thailand, *Tropical Medicine&International Health*, 2001, 6 (6):458-463.
19. Makler, M.T., Ries, J.M., Williams, J.A., Bancroft, J.E., Piper, R.C., Gibbins, B.L. and Hinrichs, D.J., Parasite Lactate Dehydrogenase As An Assay for Plasmodium falciparum Drug Sensitivity, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1993-a,48 (6):739-741.
20. Makler, M.T., Hinrichs, D.J., Measurement of the Lactate Dehydrogenase Activity of Plasmodium falciparum as an Assessment of Parasitemia, *Journal of Tropical Medicine and Hygiene.*, 1993-b, 48 (2), 205-210.
21. Ohrt, C., Sutamihardja, M.A., Tang, D.and Kain, K.C., Purnomo, Impact of Microscopy Error On Estimates of Protective Efficacy In Malaria-Prevention Trials., *J. Infect. Dis.*, 2002, 186(4):540-546.
22. Peruski, L.F., Jr and Peruski, A.H., Rapid Diagnostic Assays in The Genomic Biology Era: Detection and Identification of Infectious Disease and Biological Weapon Agents, *BioTechniques*, 2003, 35:840-846.
23. Postigo, M., Mendoza-León, A. And P_rez, H.A., Malaria Diagnosis by The Polymerase Chain Reaction: A Field Study in Southeastern Venezuela, *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1998, 92 (5):509-511.
24. Rathod, P.K., Ganesan, K., Hayward, R.E., Bozdech, Z. And DeRisi, J.L., DNA Microarrays for Malaria, *Trends in Parasitology*, 2002, 18 (1):39-45.
25. Read, M., Hicks, K.E., Sims, P.F.G. and Hyde, E., Molecular Characterisation of the Enolase Gene from the Human Malaria Parasite Plasmodium falciparum, *European Journal of Biochemistry*, 1994, 220, 513-520.
26. Read, J.A., Wilkinson, K.W., Tranter, R., Sessions, R.B. and Brady, R.L., Chloroquine Binds in the Cofactor Binding Site of Plasmodium falciparum Lactate Dehydrogenase, *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274, 10213-10218.
27. Roth, E.F. JR, Calvin, M.C., Max-Audit, I., Rosa, J. and Rosa, R., The Enzymes of the Glycolytic Pathway in Erythrocytes Infected With Plasmodium falciparum Malaria Parasites, *Blood*, 1988, 72 (6), 1922-1925.
28. Royer, R.E., Deck, L.M., Campos, N.M., Hunsaker, L.A. and Vander Jagt, D.L., Biologically Active Derivatives of Gossypol: Synthesis and Antimalarial Activities of Peri-Acylated Gossylic Nitriles, *Journal of Medicinal Chemistry*, 1986 ,(29): 1799-1801.
29. Sessions, R.B., Dewar, V., Clarke, A.R., Holbrook, J.J., A model of Plasmodium falciparum Lactate Dehydrogenase and its Implications for the Design of Improved Antimalarials and the Enhanced Detection of Parasitaemia, *Protein Engineering*, 1997, 10(4): 301-306.
30. Sethabutr, O., Brown, A.E., Gingrich, J., Webster, H.K., Pooyindee, N., Taylor, D.N., Echeverria, P., A Comparative Field Study of Radiolabeled and Enzyme-Conjugated Synthetic DNA Probes for the Diagnosis for Falciparum Malaria, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1988, 39:227-231.
31. Trager, W., Metabolism: Energy Sources: Respiration, in *Living Together-The Biology of Animal Parasitism*, Plenum, 1986, New York, 169s.



32. Turgut-Balık, D., Holbrook, J. J., Determination of the DNA and Amino Acid Sequences of the Lactate Dehydrogenase Gene from *Plasmodium falciparum* Strains K1 and PF FCBR: A Route to the Design of New Antimalarials, *Turkish Journal of Biology*, 2001, 25: 241-250.
33. Turgut-Balık, D., Shoemark, D.K., Moreton, K.M., Sessions, R.B. & Holbrook, J.J., Over-Production of Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* Opens Route to New Antimalarials, *Biotechnology Letters*, 2001, 23: 917-921.
34. Vander-Jagt, D.L., Hunsaker, L.A. and Heidrich, J.E., Partial Purification and Characterization of Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1981, 4: 255-264.
35. Weiss, J.B., DNA Probes and PCR for Diagnosis of Parasitic Infections, *Clinical Microbiology Reviews*, 1995, 8 (1):113-130.
36. Wolday, D., Balcha, F., Fessehaye, G., Birku, Y., Shepherd, A., Field Trial of The RTM Dipstick Method for The Rapid Diagnosis of Malaria Based on The Detection of *Plasmodium falciparum* HRP-2 Antigen in Whole Blood, *Trop. Doct.*, 2001, 31 (1):19-21.
37. World Health Organization, New Perspectives. Malaria Diagnosis. Report of A Joint WHO/USAID Informal Consultation, 25-27 October 1999, WHO, 2000.
38. Yera, H., Tzen, M., Dupouy-Camet, J., Molecular Biology for Detection and Characterization of Protozoan Infections in Humans, *European Journal of Protistology*, 2003, 39 (4): 435-444.



HELMİNT HASTALIKLARININ TANISINDA MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN YERİ

Metin KORKMAZ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir

Son yıllarda çok hücreli ökaryotik parazitlere yönelik moleküler biyoloji alanındaki araştırmalar parazitolojide parazit-konak-çevre arasındaki ilişkilerin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmuştur. Özellikle çok hücreli ökaryotik bir nematod olan ve tüm genomu belirlenen *Caenorhabditis elegans*'tan elde edilen moleküler ve genetik bilgilerin yardımıyla helmintlerin biyolojisi, genomik organizasyonları, yüzey antijenleri hakkında önemli bilgiler edinilebilmiştir.

Konak ile parazit arasındaki karmaşık ilişkinin gerçekleştiği en önemli yer olan membranların sentezi, yenilenmesi, yüzey tabakasının değiştirilmesi, ayrıca su, iyon ve iyonik olmayan maddelerin geçişinin moleküler biyoloji teknikleri ile araştırılması, helmintlerin konağın bağışık yanıtından nasıl kaçındığını anlamamıza olanak sağlamıştır. Konağın bağışık yanıtı ve ürettiği toksik maddelerin parazite zarar vermesi, membranın lipid ve karbonhidrat yapısındaki değişikliklerle engellenmekte, böylece parazit yaşamını sürdürebilmektedir. Helmintlerin olgunlaşması sırasında gen regülasyonu ve ekspresyonundaki değişiklikler "Differential Display" yöntemi ile saptanabilmektedir. Elde edilen veriler parazitlerin hızlı antijen değişiminde "transsplicing" mekanizmasının rolü olduğunu düşündürmektedir.

Helmint biyokimyasındaki gelişmeler sayesinde bir çok enzimi homojen olarak saflaştırmak, kinetik, antijenik ve benzeri özellikleri üzerinde çalışmak mümkün olmuştur. Moleküler teknikler sayesinde biyokimyasal olaylarda önemli roller üstlenen glutatyon S transferaz, sistein proteinaz gibi bir çok enzimin de klonlanması ve bol miktarda eksprese edilmesi sağlanmıştır. Tubulin gibi enzimatik olmayan proteinlerin biyokimyasal özellikleri de moleküler parazitoloji açısından önem taşımaktadır. Helmintlerdeki b-tubulin genlerindeki farklılık, benzimidazol grubu antihelmintiklerin etki mekanizması ve ilaç direncininin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır.

Hemen hemen tüm ökaryotlar nükleer genom ile işbirliği içinde olan ayrıca bir mitokondriyal (mt) genom içerir. Vertebrallardaki mtDNA çoklu kopyalar bulundurur ve ATP sentezleyen solunum zinciri enzimi komplekslerinin 12-13 proteinini eksprese eden diziler taşır. mtDNA daki farklılıklar populasyon genetiği ve filogenetik çalışmalarda kullanılabilir.

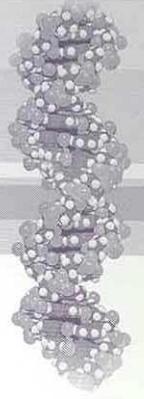
DNA'yı oluşturan nükleotid dizileri başlıca iki grupta toplanabilir;

(i) yalnızca bir tek kopyası olanlar ve (ii) sık tekrarlayan DNA dizileri (Highly Repeated DNA Sequences, HR-DNA). HR-DNA'lar ökaryotik genomunun bir özelliğidir ve genomik DNA'nın yaklaşık %10-60'ında evrimsel değişikliklerin daha hızlı görüldüğü kodlama olmayan genomik bölgelerinde bulunur. DNA hibridizasyonunda HR-DNA'ların genellikle radyoaktif maddelerle işaretlenerek prob olarak kullanılmasıyla, materyalde parazite ait DNA olup olmadığı büyük bir duyarlılıkla saptanabilmektedir. Eğer DNA miktarı az ise bu durumda yöntem PCR ile desteklenebilir.

Moleküler tiplendirme ve filogenetik çalışmalarda ribozomal RNA (rRNA) genlerinin sıklıkla kullanılmasının başlıca nedeni, göreceli olarak daha kolay klonlanabilmesi ve bir veya daha fazla kromozom üzerinde ardışık tekrarların çoklu kopyalarını buldurmalarıdır. rRNA'ların bir ya da iki oldukça sıkı korunmuş bölgesi, az korunmuş ara bölgelerle ayrılmıştır. rRNA 18s, 5.8s, 28s'lik genler içeren ardışık tekrarlı sekans serilerinden oluşan ünitelerden meydana gelir. rDNA tekrarları, evrim derecesine göre üç farklı tiptedir; (a) Kodlama bölgesi: Oldukça sıkı korunmuştur ve hayatın başlangıcı hakkında hipotezler oluşturulmasında kullanılır. (b) Kopyalama aralığı bölgesi (transcribed spacer region- TS): Orta derecede korunmuştur. 50x106 yıl öncesine kadar olan olayların şekillendirilmesinde kullanılır. (c) Kopyalanmayan aralık bölgesi (non-transcribed spacer region- NTS): Türler arasında ve içindeki farklılıklara göre değişen bir bölgedir.

Temel olarak moleküler yöntemlerin kullanılmasının üç ana amacı vardır: (i) Etkenin epidemiyolojik özelliklerini anlayabilmek, (ii) tanı koyabilmek ve (iii) aşılama, kemoterapi gibi kontrol stratejileri geliştirebilmek.

Moleküler Epidemiyoloji: Helmintlerin protozoonlara göre daha büyük ve tanısının göreceli olarak daha kolay olması nedeniyle önceleri tercih edilmeyen moleküler yöntemler, 1990'lerden itibaren parazitoloji alanında da uygulanmaya



başlanmıştır. Moleküler epidemiyolojik araştırmalar; hastalığın bulaş yolu, bulaşma oranı, cins ve türlerle hastalığın kliniği arasındaki ilişki, vektör ve rezervuarların durumu, dağılımı ve hastalığa bağlı salgınlar hakkında bilgi edinmemizi sağlar. Uygun moleküler teknikler kullanarak enfeksiyon ajanlarının sürveyansı ve enfeksiyonun kaynağının bulunması olasıdır. Uygulanacak moleküler teknik genetik farklılığın hangi hiyerarşik seviyede olduğuna ve araştırılacak DNA bölgesinin özelliklerine uygun olarak sečilmelidir. "Dot blot analiz" ve "in situ hibridizasyon" ile gen problemlerinin hibridizasyonu; kesilen parçaların uzunluğunun farklılaşması (Restriction Fragment Length Polymorphisms-RFLP), mitokondriyal ve ribozomal DNA genomlarının özellikleri, DNA sekanslaması, moleküler karyotiplerin analizi, PCR ile DNA polimorfizminin saptanması moleküler epidemiyolojik araştırmalarda sıklıkla kullanılan yöntemlerdir.

Moleküler Tanı: Rekombinant DNA, nükleer hibridizasyon ve monoklonal antikor teknolojileri parazitlerin yüksek özgülük ve duyarlılıkla saptanmasına olanak sağlayabilmektedir. Moleküler tanı yöntemleri üç kategoride sınıflandırılabilir:

1. Biyokimyasal testler: İzoenzim özellikleri genetik olarak kontrol edildiğinden, parazitler farklı bant özellikleri gösterirler. Göreceli olarak basit olması, çok örnek çalışılabilmesi, morfolojik olarak benzer parazitlerin ayrılmasında kullanımı bu yöntemlerin avantajı iken, pahalı aletlere ve çok miktarda örneğe ihtiyaç duyulması, sahada uygulanamaması, hızlı olmaması, enzimlerin denatüre olması nedeniyle yalancı negatiflik verebilmesi dezavantajlarıdır.

2. Serolojik testler: Antijen ya da antikor araştırılmasına dayanır. Kişi ya da kitle taramaları için uygundur.

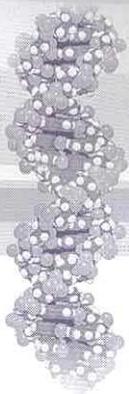
3. DNA bazlı testler: Parazit DNA'sının restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonrası elektroforez ve hibridizasyonla gösterilmesine ya da PCR'a dayanır. PCR için kullanılan nükleik asit dizileri, ribozomal DNA ya da RNA dizileri (duyarlılığı yüksek, özgülüğü düşük), spesifik parazit dizileri (özgülüğü yüksek, duyarlılığı düşük), tesadüfi sekans primer amplifikasyonu (Random Sequence Primer Amplification - RAPD-PCR) (genellikle duyarlı, özgül değil) olabilir. Bu yöntemlerin avantajı duyarlılığının yüksek ve esnek olmasıdır. Bu yöntemlerle bir parazit aranabileceği gibi bir grup parazit de taranabilir. Pahalı olması, özel bir yere ve deneyimli personele gereksinim duyulması ve saptanan DNA'nın ölü ya da canlı parazite ait olduğunun belirlenememesi bu yöntemlerin dezavantajıdır. Örneklerde bulunan inhibitörler ya da kontaminasyona bağlı yalancı negatif ya da pozitif sonuçlar alınabilir.

Helmintlerde DNA bazlı yöntemlerin kullanımı daha çok aşılama, epidemiyoloji ve kemoterapi üzerine yoğunlaşmıştır. Son yıllarda bu yöntemler ELISA yöntemine uyarlanıp tanı amacıyla uygulanmakla birlikte henüz rutin olarak kullanılmaya başlanmamıştır.

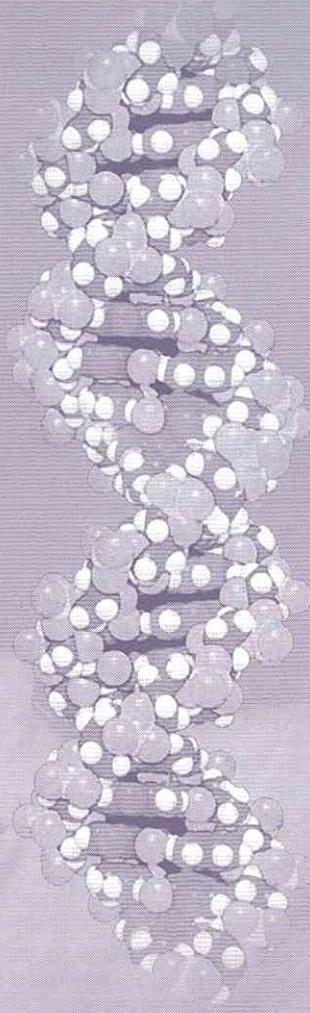
Aşılama: Gerek insan gerekse hayvan sağlığını yakından ilgilendiren helmint aşılarında tüm çabalara karşın halen başarıya ulaşılamamasının nedeni, bu parazitlerin moleküler biyolojisi ile yakından ilgilidir. Helmintler bağışık yanıtta kaçabilme, hatta bağışık yanıtı değiştirebilme potansiyeline ve kompleks antijenlere sahiptir. Ek olarak koruyucu antijenlerinin tanımlanması zordur ve konakta multifokal bağışık yanıt oluşturur. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler rekombinant antijenlerin kolaylıkla üretilebilmesine olanak sağlamakla birlikte üretilen aşıların dezavantajı parazit popülasyonunun polimorfik olması halinde bazı türlere etkisiz kalmasıdır. Moleküler biyoloji bir çok antijenin aday olarak aşılama çalışmalarında kullanılmasına olanak sağlamıştır. Rekombinant DNA teknolojisiyle helmint antijenlerinin sekans bölgelerini saptamak, klonlamak ve bol miktarda üretmek mümkün olmuş, çok sayıda aşi adayları önerilmiştir.

Son yıllarda ortaya çıkan DNA aşıları ile, parazit proteini kodlayan DNA sekansı, ökaryotik promotör ile plazmide klonlanabilmektedir. Genellikle konak kasına enjekte edilen aşi yolu ile, kan akımı yerine hücre içine verilmiş olan bu yabancı protein konak hücresi tarafından eksprese edilir. Böylelikle hem hücresel hem de humoral yanıtın ortaya çıkması sağlanmış olur. Transgenik bitkilerle nematodların bağırsak mukozasından girişinin engellenebildiği bildirilmektedir.

Kemoterapi ve İlaç Direnci: Kemoterapötik ajanların hücrelerde bağlandıkları reseptörler ve etkilerini gösterdiği yolların moleküler yöntemler ile tanımlanması, yeni ilaçların bulunması ve direnç mekanizmalarının anlaşılmasına yardımcı olmaktadır.



**3. ULUSAL
MOLEKÜLER VE
TANISAL MİKROBİYOLOJİ
KONGRESİ**
(Uluslararası Katılımlı)



YUVARLAK MASA

**28 Haziran-1 Temmuz, 2004
Bilkent Otel - ANKARA**



TANISAL MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARINDA KARŞILAŞILAN SORUNLAR

Selda ERENŞOY

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Moleküler biyolojideki gelişmeler, patojen mikroorganizmaların saptanması, tanımlanması ve özelliklerinin belirlenmesinde klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yeni ufuklar açmıştır. Bu teknoloji, hasta tanısı, tedavisi ve yönetiminde birçok alanı etkilemeye başlamıştır. Bu oturumda tanısal mikrobiyoloji laboratuvarlarında nükleik asit testlerinin seçimi, değerlendirilmesi, uygulama sırasında karşılaşılan sorunlar, biyoinformatik kullanımı tartışılacaktır.

TANISAL MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARINDA NÜKLEİK ASİT TESTLERİNİN SEÇİMİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Tüm tanı testlerinde olduğu gibi, nükleik asit (n.a.) testlerinin de tanı laboratuvarlarına yerleştirilmesinde dikkat edilmesi gereken durumlar vardır.

- Kullanılan testin güvenilir ve hasta yönetiminde anlamlı olması gerekir (klinik anlam).
- Yeni bir testi laboratuvara oturturken amaç: i) kullanılmakta olan bir testin yerine geçmek üzere; ii) kullanılmakta olan testlere ek olarak veya iii) yeni bir parametre eklemek olabilir.
- Bu testin kullanılmakta olan diğer testlere üstünlüğü olması gerekir.

1. Hastalık tanısında veya hasta yönetiminde ek bilgi sağlayabilir.
2. Sonuçları daha güvenilir olabilir.
3. Daha hızlı sonuç verebilir.
4. Rutin bir laboratuvar için uygulanması daha kolay olabilir.
5. Maliyeti daha düşük olabilir.

Genellikle bu kriterlerin hepsinin sağlanması zordur. Bu nedenle laboratuvarın koşullarına, hasta popülasyonunun ve örneklerin özelliklerine göre değerlendirerek, testin güvenilirliği ve klinik anlamından ödün vermeden karar vermek gerekir. Sadece bilimsel merak nedeniyle kullanılan testler araştırma amaçlı olmalı, maliyeti hastaya yüklenmemeli, hastanın bilgilendirilmiş onamı olmadan uygulanmamalıdır.

Nükleik asit testlerini

i) kalitatif testler

ii) kantitatif testler olarak sınıflandırabiliriz.

Klinik bir örnekte bir mikroorganizmaya özgü nükleik asit dizisinin saptanması her zaman hastalık etkeni olduğu anlamına gelmez. Özellikle latent infeksiyon yapan mikroorganizmalarda bu durum geçerlidir. Viral aktivasyonu göstermek için özgül mRNA veya dolaşımda serbest viral nükleik asitlerin kantitatif araştırılması gerekebilir. Sitomegalovirus infeksiyonları buna örnektir. Ayrıca transplantasyon sonrası lenfoproliferatif lenfoma etyolojisinde Epstein Barr virus RNA transkriptlerinin biyopsi örneklerinde araştırılması da buna bir örnektir. Antijen-antikor testlerinin veya kültür yöntemlerinin yetersiz kaldığı böyle durumlarda nükleik asit testleri anlamlı olmaktadır.

Nükleik asit testlerinin tanısal mikrobiyoloji laboratuvarlarında en yaygın kullanıldığı alan virolojidir. Kültürü zaman alıcı veya zor olan Mycobacterium ve Legionella gibi bakteri infeksiyonlarında da kullanılmaktadır. Nükleik asit testlerine gereksinimin ilk ve en fazla duyulduğu infeksiyonlar HBV, HIV ve HCV'dir. Bu nedenle standardizasyonu üzerinde en çok çalışılan bu ajanlara ait testlerdir. Ancak bu testlerin sürekli iyileştirilmesinin yanı sıra neredeyse bütün mikroorganizmalara ait nükleik asit testlerinin gerekliliği tartışılmaktadır. Birçok ticari firma çeşitli testler geliştirmekte ve piyasaya sürmektedir. Ayrıca laboratuvarlar da kendi testlerini tasarlamakta ve kullanmaktadırlar. Bu durumda ciddi bir standardizasyon sorunu ortaya çıkmaktadır. Çeşitli laboratuvarlardan çıkan nükleik asit testleri sonuçlarıyla çok sayıda veri birikmekte, değerlendirilmesinde sorun yaşanmaktadır. Dış ve iç kalite kontrol programları, panelleri bulunmakla beraber, her test için yoktur, her laboratuvar bu programlara ulaşamamakta veya kullanmamaktadır.



Bu programlarla ilgili tartışma başka bir oturumun konusudur. Ancak laboratuvarların karşılaştığı birçok sorunun çözümünde faydalı olacağı dikkate alınmalıdır.

Gereksinimi farkedilen moleküler mikrobiyolojik testlerin sayısının giderek artması sonucunda laboratuvarda hepsini karşılayacak primer-prob setlerinin bulunması mümkün değildir. Ancak laboratuvar koşullarına göre test paneli hazırlanabilir. Testi seçtikten sonra yöntem karar verilmesi gerekir. Bu basamakta ister ticari kit olsun, ister laboratuvarın kendi geliştirdiği test olsun, testin sınırlılıklarının değerlendirilerek bildirilmesi önemlidir. Etkinliği ve standardizasyonu çeşitli çalışmalarla rapor edilmiş, sertifikasyon programlarına uyan ticari kitleri değerlendirmek daha kolaydır. Kit formatındaki diğer testleri veya laboratuvarın kendi testlerini ise belli kriterlerle değerlendirmek gerekir.

• Kantitatif nükleik asit testleri: Nükleik asit testlerinin kantitatif olması özellikle virolojide önemlidir; viral yük ile kliniğin ilişkilendirilmesi anlamlıdır. Gelişen teknoloji kantitatif testlerin iyileştirilmesine büyük katkı sağlamıştır. Gerçek zamanlı PCR ve dalı DNA testlerinin yeni versiyonları ile duyarlılığı yüksek, dinamik aralığı geniş testler geliştirilmiştir. Duyarlılığın hangi düzeyde olması gerektiği uzun süre tartışılmıştır. Artık mümkün olan en yüksek duyarlılık tercih edilmektedir. Özellikle reaktivasyonların, tedaviye direncin erken saptanmasında yüksek duyarlılık önemlidir. Bu testlerin kantitatif yapılması pozitifliğin anlamının değerlendirilmesine de yardımcı olmaktadır. Ancak birçok durumda klinik anlamın hangi düzeyde başladığı, yani eşik değeri tartışmalıdır. Bu soruları klinik çalışmalarının sonuçları ile cevaplayabiliriz. HIV ve HCV infeksiyonlarında eşik değerler veya viral yükteki artma, düşme oranlarına ait uzlaşma raporları vardır. Testin doğru kantitasyon yapabildiği aralık da klinik anlam üzerinden değerlendirilmelidir. Hasta izleminde bazal değeri içine alan ve tedavi izleminde anlamlı düşüşü gösterebilen dinamik aralığa sahip, reaktivasyonu erken saptayabilmek için duyarlılığı yüksek bir kantitatif test idealdir.

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarına yerleştirilecek bir testin değerlendirilmesi:

Kullanılan referanslar önemlidir:

- Etkinliği kanıtlanmış bir test varsa bu test ile paralel çalışılan örneklerin sonuçları karşılaştırılabilir. Bu karşılaştırmada dikkat edilmesi gerekenler:
 1. İstenen duyarlılık ve dinamik aralık düzeylerini kapsayan örneklerin test edilmesi.
 2. İstatiksel değerlendirme için yeterli sayıda örnek çalışılması.
 3. Sonuçlar arasındaki standart sapma ve değişkenlik katsayılarının hesaplanması.
 4. İki test sonuçlarının uyumunun regresyon eğrisi ve katsayısı ile değerlendirilmesi ve rapor edilmesi.
 5. Testin özgüllüğünün değerlendirilebilmesi için yeterli sayıda negatif örneğin test edilmesi.
- Referans bir test yoksa, referans standartlarla test değerlendirilebilir. Bu değerlendirmede de duyarlılık ve dinamik aralık gerekli düzeylerdeki standartlarla tekrarlayan çalışmalarla yapılmalıdır. Testin özgüllüğünün değerlendirilmesi unutulmamalıdır.
- Testin farklı genotipleri, özellikle çalışılan popülasyondaki izolatları saptama ve miktar belirlemedeki etkinliğinin bilinmesi de önemlidir. Bu konuda bilgi olmayan veya primer-prob dizileri bilinmeyen testleri değerlendirmek zordur. Mümkünse referans standartları seçerken buna dikkat edilebilir.
- Testin kendi içinde tutarlılığının da bilinmesi gereklidir. Test-içi ve testler arası değişkenliğin araştırılması gerekir. Standartlar ve örnekler belirli sulandırımalarla tekrarlayarak çalışılmalı, regresyon eğrisi ve katsayısı ile değerlendirilmelidir.
- Kullanılmakta olan bir testin yerine yenisi konulacaksa eski test ile karşılaştırılması gerekir. Bu değerlendirmede de iki test karşılaştırması için gerekli kriterler geçerlidir. İki test arasındaki uyum ve fark saptanarak testin sonuçlarını kullanan klinisyenlere bildirilmelidir.
- Kantitatif sonuçlarda kullanılan birimlerin standardizasyonu başka bir sorundur. Bu amaçla HIV, HCV, HBV gibi parametrelerde evrensel birimler geliştirilmektedir. Ancak yaygın olarak kullanılmakta olan DNA/RNA kopya sayısı ile bu birimlerin karşılaştırılmasında tek bir sabit katsayı yoktur. Testler arasında farklılık göstermektedir. Klinisyene sonuç verirken sorun yaşanmaktadır. Bilindiği ölçüde karşılaştırmanın veya değişikliğin raporda yer alması hedeflenmelidir.



NÜKLEİK ASİT TESTLERİNİN UYGULAMASINDA KARŞILAŞILAN SORUNLAR

Arzu SAYINER

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Nükleik asit saptamaya yönelik testler (NAT), bu konuda eğitilmiş personel, özel laboratuvar, kimyasallar ve özel sarf malzemesi kullanımı gerektirmektedir. Nükleik asit saptama temelli bir yöntemi kullanmak isteyen bir laboratuvar, yöntemin kısıtlılıklarını bilmeli ve karşılaşılabilecek sorunlara karşı hazırlıklı olmalıdır. Doğru ve güvenilir sonuç için, bu sorunlara karşı önlemlerin alınması, ortaya çıkması durumunda, zamanında tanınarak çözüm üretilmesi gereklidir. Testlerin standardizasyonu ve kalite kontrol programlarının (internal ve eksternal) düzenli uygulanması, kaliteli bir laboratuvar işleyişini güvence altına almak için başvurulan yöntemlerin başında gelir.

Mikroorganizmaların saptanması amacıyla yapılan testlerde, örnekte, hedef nükleik asitin saptanması, her zaman canlı, çoğalan mikroorganizmanın varlığı anlamını taşımamaktadır. Testin pozitif saptanmasına yol açan diğer nedenler:

- Ölü veya degrade olmuş mikroorganizmaya ait nükleik asitin veya fragmanların bulunmasına bağlı olabilir. Bu nedenle özellikle tedavi başarısı takibinde, nükleik asit temelli testlerin kullanımı sorunludur.
- Herpesviruslarda olduğu gibi, latent enfeksiyona bağlı mikroorganizmaların varlığına bağlı olabilir. Örnekte hedef nükleik asit vardır, test pozitifdir ancak bu sonuç, klinik anlam taşımaz.
- Örnek alımında kullanılan aletlerin (endoskoplar, vb) kontaminasyonu sonucu olabilir.
- Örneğin veya kullanılan alet, solüsyon vb malzemenin aranan mikroorganizma veya hedef nükleik asit fragmanı ile kontaminasyonuna bağlı olabilir.

Örnekte, hedef nükleik asitin saptanmaması, her zaman örneğin veya hastanın söz konusu mikroorganizmayı taşımadığı anlamına gelmemektedir. Testin negatif saptanmasına yol açan nedenler:

- Diğer mikrobiyolojik testlerde olduğu gibi, örneğin cinsi veya zamanlaması uygun olmayabilir. Örnekte nükleik asit bulunmayabilir ancak kişi etken ile infekte olabilir.
- Kullanılan test yönteminin duyarlılığı, nükleik asit varlığını saptamaya yetmeyebilir.
- Örneğin transportu, saklama koşulları, nükleik asitin korunmasına uygun olmayabilir.
- Örnekte bulunan nükleik asit, ekstraksiyon işlemi sırasında kaybedilebilir.
- Primerlerin bağlanması gereken bölgelerde mutasyonlar bulunabilir.
- Örnekte veya kullanılan malzemelerde, testin çalışmasını inhibe eden maddeler bulunabilir.

SORUNLAR

1. Yalancı pozitiflik

Nükleik asit amplifikasyonuna dayalı testlerde, özellikle PCR yönteminde, bir avantaj olan yüksek duyarlılık, yalancı pozitiflik sorununu da birlikte getirmektedir. Üç şekilde oluşabilir:

a. Genel kontaminasyon: Hedef nükleik asidin, solüsyonlara, cihazlara bulaşması sonucu, tüm test edilen örneklerde ve negatif kontrolde, olumlu reaksiyon saptanır. Sıklıkla, bir önceki testte çoğaltılmış hedef bölge kopyalarının (amplikonların), bir sonraki testte kullanılan malzemelere bulaşması sonucudur.

b. Örnek kontaminasyonu: Bir veya birkaç örneğin, hedef nükleik asit ile kontamine olmasıdır. Genellikle, örneklerin test öncesi işlemlerde (santrifüjleme, alikotlama, vb) veya nükleik asit ekstraksiyonu aşamasında kontaminasyonu söz konusudur. Negatif kontroller etkilenmeyebileceği için ancak örneğin yeniden çalışılması veya hastadan alınacak yeni bir örnek ile testin tekrarlanması ile belirlenebilir.



c. **Özgül olmayan ürünlerin saptanması:** Özgüllük sorunu olan primerlerin veya optimize edilmemiş test protokolünün kullanımı sonucu olabilir. Elde edilen amplikon, çoğaltılmak istenen bölgeye ait değildir. Özellikle prob ile saptama yapılmayan yöntemlerde (agaroz jel elektroforezi, vb) sonucun, yanlışlıkla pozitif olarak değerlendirilmesine yol açabilir. Sorun, prob ile hibridizasyon, nested PCR gibi özgüllüğün arttırıldığı bir yöntemin kullanılması veya amplikonun dizi özelliklerinin belirlendiği (dizi analizi, vb) bir metodun kullanılması ile belirlenebilir.

Kontaminasyon riskini en aza indirmek için öneriler:

a. Solüsyonların hazırlanması (nükleik asit içermeyen "temiz oda"), örneklerin hazırlanması, amplifikasyon ve ürünlerin saptanması (çok sayıda amplikon içeren "kirlili oda") farklı mekanlarda, tercihan birbirinden uzak odalarda yapılmalıdır. İş akışı, temizden kirliye doğru olmalı ve odalar arasında malzeme, cihaz alış-verişi yapılmamalıdır. Tüm kimyasallar alikotlanarak kullanılmalıdır. Odalar arası hava akımının, kontaminasyona yol açacak şekilde yapılmamasına dikkat edilmeli, olanak varsa, temiz odada pozitif basınç, kirlili odada negatif basınçlı ortam sağlanmalıdır. Soğutucuların ve dondurucuların kullanımında, nükleik asit içeren ve içermeyen malzemenin teması engellenmelidir. Laboratuvar çalışanları, mekanların ve malzemenin kullanımındaki esaslar yönünden eğitilmeli ve denetlenmelidir. Söz konusu laboratuvarları kullanan personel sayısı kısıtlanmalıdır. Amplifikasyon sonrası tüplerin açılmasını gerektirmeyecek bir saptama yöntemi (real time PCR, vb) tercih edilebilir.

b. Çalışma sırasında aerosol oluşumu önlenmeli, pipetörler ile pipet uçları arasında bariyer bulunmalıdır (filtreli pipet uçları, vb). Kullanılacak solüsyon, kimyasal ve tek kullanımlık malzeme alımında, nükleik asit ve nükleaz içermemesine özen gösterilmelidir. Çöpler, biriktirilmeden ve aerosol oluşmasını önleyecek şekilde laboratuardan uzaklaştırılmalıdır. Laboratuvarların temizliğinde nükleik asitleri etkileyebilecek kimyasallar (HCl, sodyum hipoklorit, vb) ve UV kullanılmalıdır.

c. Her çalışmaya negatif kontrol eklenmelidir. Negatif kontrollerin ekstraksiyon basamağına da dahil edilmesi ve (örnek sayısına göre) birden fazla olması önerilir. Kuvvetli pozitif kontrol kullanımından kaçınılmalıdır. Negatif kontrollerden herhangi birinin pozitif saptanması durumunda, çalışma geçersiz kabul edilir.

d. Amplikonların yol açtığı kontaminasyonu engellemek için dU içeren ürünlerin uracil-N-glikozilaz (UNG) ile işlenmesi (amplifikasyon öncesi) veya isopsoralen - UV ışınlatma (amplifikasyon sonrası) yöntemleri kullanılabilir.

Kontaminasyonun saptanması durumunda, tekrarını engellemek için kaynak ve neden bulunmaya çalışılmalıdır. Genellikle tüm reagentlerin yeniden hazırlanması, odaların ve aletlerin temizlenmesi gereklidir. Bu işlemler, zor ve zaman-emek alıcı olmasının yanı sıra, laboratuvarın bir süre kullanılmamasına ve maddi kayba yol açmaktadır.

2. Yalancı negatiflik

Tüm örnekleri etkileyebilecek ortak bir sorun, pozitif kontrolün çalışmaması ile saptanabilir. Her bir örneğin ekstraksiyon veya amplifikasyon basamağındaki sorunlarını belirlemek için ise, her birine eklenecek internal kontrol kullanımı önerilir. Internal kontrol, örnek içine eklenen ve amplifikasyon sonrası saptanabilen hedef nükleik asitten farklı bir DNA parçasıdır. Amaç, örnekte aranan hedef nükleik asitin geçirdiği aşamaları, internal kontrol yardımıyla izlemektir. Uzunluk ve baz içeriği açısından, hedef nükleik asite benzer olmalı, tercihen aynı primerlerle yakalanmalı ancak ürün saptama aşamasında, farklı bir yönü ile (farklı prob bölgesi, farklı restriksiyon enzim kesim bölgesi, vb) hedeften ayrılabilir. Sentetik diziler yerine, örnekte bulunması mümkün olmayan mikroorganizmalar da internal kontrol olarak kullanılabilir. Internal kontrolün konsantrasyonu, zayıf inhibisyonları da saptayabilmek için, düşük olmalıdır. Internal kontrolün negatif sonuç vermesinin nedenleri:

- Internal kontrol ekstraksiyondan önce eklendiyse, sorun bu basamakta olabilir.
- Tüm örneklerin internal kontrolü çalışmadıysa, kimyasallar veya aletler gibi ortak bir sorun kaynağı aranmalıdır.
- Amplifikasyon inhibisyonu söz konusu olabilir. İnhibitörler örnekten (heparin, hemoglobün, vb) veya örneğin hazırlanması basamaklarından (SDS, etanol, vb) kaynaklanabilir.



d. Hedef amplifiye olup, internal kontrol negatif saptanabilir. Hedef nükleik asit miktarının çok olması, amplifikasyon sırasında iki nükleik asit arasındaki yarışma nedeniyle internal kontrolün baskılanmasına yol açabilir. Hedefin amplifiye olması, internal kontrolü önemsiz kılmaktadır. Ancak, bu durum tek hedefin amplifiye edildiği reaksiyonlarda geçerlidir. Multipleks PCR gibi birden çok hedefin amplifikasyonu söz konusu ise, saptanmayan diğer hedefler, internal kontrol gibi baskılanmış olabilir.

Tek bir örnek için internal kontrolün negatif sonuç vermesi durumunda, çeşitli çözümler denenebilir. Ekstraksiyonun ve/veya testin tekrar edilmesi, farklı bir yöntemle ekstraksiyon, örneğin dilüsyonu (testin duyarlılığını da etkiler) veya yeni bir örnek ile test tekrarı yapılabilir.

3. Diğer

NAT sonuçları, diğer tüm mikrobiyolojik tanı testlerinde olduğu gibi, hastanın kliniği ve diğer laboratuvar sonuçları ile birlikte değerlendirilmelidir. NAT ile saptanan pozitif bir sonucun diğer testlerle desteklenmemesi durumunda iki olasılık vardır:

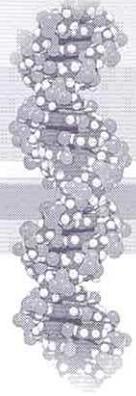
1. Amplifikasyonlu NAT'ın duyarlılığı genellikle diğer testlerden üstündür. Örneğin, HBV, HCV, HIV enfeksiyonlarında olduğu gibi, antijen - antikor saptama testlerinin henüz negatif olduğu dönemlerde, nükleik asit amplifikasyonu, erken tanıyı sağlayabilir. Özellikle hastada bağışıklık sistemi sorunu olması, antikor yanıtının gecikmesine veya hiç oluşmamasına yol açabilir.

2. Yalancı pozitiflik söz konusu olabilir.

Bu durumda test tekrarı, farklı bir yöntem veya farklı bir hedef bölgeye yönelik olarak yeni bir NAT testi veya hastanın izlemi ile diğer testlerin pozitifleşmesinin beklenmesi gibi yollar izlenebilir. Tek bir testin pozitifliği ile tanı koymanın yanıltıcı olabilmesi nedeniyle, karar verme aşamasında tüm parametrelerin değerlendirilmesine özen gösterilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Burkardt H-J. Standardization and quality control of PCR analyses. *Clin Chem Lab Med* 2000;38(2): 87-91
2. Borst A, Box ATA, Fluit AC. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:289-299
3. Stöcher M, Victoria L, Berg J. A convenient approach to the generation of multiple internal control DNA for a panel of real-time PCR assays. *J Virol Methods* 2003;108:1-8
4. Mancini C, Zerbini M, Azzi A, et al. Multicenter Italian study group (MISG) for the standardisation of hepatitis C virus PCR. *J Clin Virol* 2003;27:83-89
5. Mackay IM: Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 190-212.
6. Pembrey L, Newell M-L, Tovo P-A, et al. Inter-laboratory comparison of HCV-RNA assay results: implications for multi-centre research. *J Med Virol* 2003;69:195-201
7. Niesters HGM. Molecular and diagnostic clinical virology in real time. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:5-11
8. Schirm J, van Loon AM, Valentine-Thon E, et al. External quality assesment program for qualitative and quantitative detection of hepatitis C virus RNA in diagnostic virology. *J Clin Virol* 2002;40:2973-2980
9. Valentina-Thon E, van Loon AM, Schirm J, Reid J, Klapper PE, Cleator GM. European proficiency testing program for molecular detection and quantification of hepatitis B virus DNA. *J Clin Microbiol* 2001;39:4407-4412
10. www.wzw.tum.de/gene-quantification/



LABORATUVARDA BİYOİNFORMATİK KULLANIMI

Salih TÜRKOĞLU

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Konunun isminden de anlaşıldığı gibi, ilk görüşte hemen biyoloji ve informatik kelimelerinin bir araya gelmesi ile ilgili bir disiplin olduğunu düşündüğümüz bir alandan söz edeceğiz. Biyoinformatik ile tam olarak neyin kastedildiği, dünyada ve ülkemizde şu anda bulunan noktayı anlamaya çalışacağız. Buna girmeden önce biraz bilgisayarla ilgili kendi serüvenimizi kronolojik olarak anlatmak sanırım yararlı bir giriş olacak. Konu da zaten bilim ve bilgisayarın biyolojideki birlikteliği ve şu anda bundan ne kadar faydalanıyoruz, ne kadar katkımız oluyor (oluyor mu?) ve gelecekte neler olacakla ilgili gerekli soruları kafamızda uyandırabilirse bu giriş amacına ulaşmış olacaktır.

İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki asistanlığımız sırasında, yani 1980'li yılların sonunda tanıştık bilgisayarla, bir MAC'tı. Sekreterlik işlerinde daktilonun yerini mükemmel bir şekilde almıştı bu dahiyane cihaz! Yalnızca o kadar... Sonra, bilim dalımızda kurduğumuz AIDS Savaşım Derneği, onun için alınan bir PC (evet, bu kez bir 'IBM compatible'di cihaz). Üye kayıtları ile ilgili "harika" programlar vardı, işi kolayca çözüyordu bilgisayar. Hasta kayıtlarını da bilgisayarla yapmamız çok gecikmedi; önce MAC'ta, oldukça "manüel" ve amatörce, daha sonra kürsü çapında, profesyoneller(ce)le.. Sonraki süreçte hasta kayıtlarının tutulması/raporlanması bilgisayarlaşmasından ileri bir aşama bile söz konusu oldu, ki bugün dünyada ileri örneklerini büyük fabrikalarda, özellikle otomotiv endüstrisinde gördüğümüz, işlemlerin tüm aşamalarının "otomatize" olduğu bir aşama bile denendi. Bu aşamalar boyunca biz bilgisayarlaştık, bilgisayarlarla donandık, bir yandan da Türkiye'nin her yanına hızla yayılan internet bir ucuyla (bir kablosuyla) otomasyon ağıma (network) bağlandı ve laboratuvarlarda artık yediden yetmişe hepimiz dünyaya açılmış olduk; örneğin herkesin elektronik posta adresleri oldu, çokça haberleşir olduk. Böyle olması verimi arttırdı mı, eksiltti mi hesabı kolay değil, ama rutin faaliyetlerin otomasyonu, kolayca istatistiklere ulaşma gibi kolaylıklar en azından "geliri" arttırdı, bu kesin. Bu sırada moleküler biyolojinin "patlamasına" nerede ise koşul olarak, hatta bunun olmazsa olmaz bir parçası olarak biyolojinin bilgisayarlaştığına tanık olduk. Hergün, her saat üretilen yığınla bilginin depolanması için bilgisayar zaten kaçınılmazdı, ama bu bilgiyi işlemek, hatta ortaya çıkış sürecinde bilgisayar kullanmak kaçınılmaz oldu. Bu bilgi ağırlıkla DNA/amino asit dizi bilgisiydi (bu bilginin devasa bir boyuta hızla ulaşmasında PCR'ın katkısının çok büyük olduğunu da yeri gelmişken anmak gerekir). Örneğin bu bilgiyi elde etmek, milyarlarca diziyi okumak aslında bilgisayarsız zaten imkansızdı. Yıllar öncesinin "manüel" dizileme cihazları yerlerini "optik okuyucu"lu sistemlere bırakır bırakmaz bu bilgi de okunduğu an bilgisayarlara girme imkanı buldu, sonra da "database"lere.. Bunların da işlenmesi için yıllardır birçok bilgisayar programları yazılmış ve bugün de yazılmaktadır.

Bu noktada 'biyoinformatik nedir?' sorusuna ve biyoinformatiğin tanımına yeniden girmekte yarar var. Bugün internette sıkça kullandığımız sayfalardan A.B.D.'nin National Center for Biotechnology Information'ın web sayfasında biyoinformatik şöyle tanımlanmakta: "Biyoinformatik, biyoloji, bilgisayar bilimi ve bilgi teknolojisinin tek bir disiplinde birleştiği bilimsel alandır". Tanım şöyle sürmektedir: "Bu alanın en önemli hedefi ise biyolojide henüz bilinmeyen, anlaşılmayan şeyleri keşfetmek ve biyolojide birleştirici prensipler ortaya çıkaracak global bir perspektif yaratmaktır". Devamında, "genom devriminin" (genomic revolution) başlangıcında, yukarıda bizim de değindiğimiz gibi, biyoinformatiğin esas ilgili olduğu şeyin, nükleotid ve aminoasit dizileri gibi biyolojik bilginin depolanması ve bununla ilgili "database"ler oluşturulması olduğu, ancak zaman içerisinde araştırmacıların bilgilere ulaşmak, bilgi girmek ya da yenilemek için karmaşık arayüzler geliştirdiğini bildirmektedir. Daha öte aşamada ise elde edilen tüm bilgiler bir araya getirilerek "normal hücresel işlevlerin anlaşılabilir bir resmi ortaya çıkacak ve araştırmacılar hastalıklı durumlarda nelerin değişime uğradığını inceleyebileceklerdir". Bunu sağlamak için biyoinformatik alanı gelişmiş ve bugün işlevlerinden en önemlisi nükleotid ve aminoasit dizileri, protein "domain"leri ve protein yapılarını içeren çeşitli tipte bilgileri incelemek ve değerlendirmek olmuştur. Tam bu noktada biyoinformatiğin tanımı ile ilgili başka kaynaklara bakarsak, bir kaynakta şöyle tanımlandığını görüyoruz: "biyoinformatik, bir bilgisayara tam oturacak şekilde dikilmiş ve giydirilmiş, güzel, ölçülü, dört/dörtlük biyolojidir". Bu sevimli tanım şöyle sürmektedir: " biyoinformatik, biyolojik 'database'lerde arama yapmak, dizileri karşılaştırmak, protein yapılanmalarına bakmak, daha genel deyişle, bir bilgisayara biyolojik sorular sormaktır". Hatta, bu kaynakta biyoinformatiğin standart bir kelime olmadığı ve internet sitesinden sitesine



ve yazardan yazara "jargon"un değiştiği belirtilmektedir. Bu yüzden kitabın yazarları okurlara, neyin ne olduğu ile ilgili bir açmaza düştüklerini hissettiklerinde "paniklememelerini", en sonunda sağduyularına en uyan anlamı seçerlerse doğruyu bulmuş olacaklarını tavsiye etmektedirler. Nihayet kitabın sonuna eklenen bir ek sözlük (glossary) çok kullanılan bazı kelimelerin tanımlarına yer vermektedir. Biyoinformatiğin tanımı ve biraz da kendi bilgisayarlaşma tarihimizden böylece söz ettikten sonra, mikrobiyologlar olarak, Türkiye'de çalışan mikrobiyologlar olarak, biyoinformatikle ne kadar ilişkimiz var, sorusu gündeme geliyor. Bir kere, internete ulaşabildiğimiz her an oradaki biyolojik bilgiye de "bedava" ulaşma imkanına sahip oluyoruz. Burada kısa, "anekdotal" bir kısım eklemeyi uygun gördüm. Sanırım 1996 yılı idi. Bir yandan "manüel" dizileme yapıyoruz laboratuvarımızda, bir yandan da kendi "dial-up" hesabımızla telefon kullanarak internete bağlanıyoruz. Ortaya çıkardığımız viral genom dizilerini (hepatit C virusu) genbank'tan (ABD genbankası), bugünkü jargonla, "blastlıyoruz". O zamanki bölüm başkanımıza internetin bu "marifetlerini" gösterdiğimizde tüm bu yaptıklarımızın "bedava" olduğuna inanmayan bir tepki göstermişti. Gerçekten de internette çok sayıda işlemi herhangi bir ücret ödemededen gerçekleştirmek mümkün.

Son yıllarda, yükselen terör ve biyoterörizm tehlikesi ile bunun bilimsel ortamda tartışıldığına da tanık olduk (internet sayesinde eldeki tüm genom bilgilerine bu denli kolayca ulaşılabilmesinin tehlikeleri yok muydu?). Sonuçta internet çok şeyi bize sağlamakta. Bir klinik mikrobiyoloji laboratuvarı bunlardan ne ölçüde yarar sağlayabilir? Bu programlar ya da genel anlamda imkanların rutin işleyişe bir katkısı var mıdır? Konuyu çok uzatmadan ilk bakışta göze çarpan ve tabii ki deneyimimiz ölçüsünde söyleyebileceğimiz belli başlı başlıklara bakarsak, bu kongrede de çok kapsamlı ele alınacak konulardan biri olan primer/prob geliştirilmesi konusunda, moleküler biyoloji altyapısı olan laboratuvarların önemli oranda internetten ve belli bilgisayar programlarından bu konuda faydalanabildiklerini görüyoruz. Yine rutin olarak moleküler biyolojiyi hasta hizmetinde kullanan laboratuvarların, özellikle dizileme yapanların, ki laboratuvarımızda deneyimimizin en yoğun olduğu alandır bu alan, kaçınılmaz olarak internet, buradaki database'ler ve dizileri analiz edebilmek için bir dizi program kullandıklarını görüyoruz. Moleküler epidemiyoloji yapabilmek, yeni diziler bulunmuş olup olmadığını anlamak, karşılaştırmak, direnç paternleri bulmak, bunları karşılaştırmak, hatta belli dizilerin direnç paternleri ve ilaç dirençleri ile ilişkilerinin saptanmasında, hatta hekime/hastaya rapor edilmesinde internet çok önemli kolaylıklar sağlamaktadır; daha doğru deyişle bunların önemli kısmı internet olmazsa yapılamaz şeylerdir. Dizilemeden sonra elde edilen nükleik asit dizilerini analiz etmede birçok bilgisayar programı kullanılmaktadır. Öncelikle doğru dizileme yapılmış olup olmadığını anlamak, histogramları okumak, daha sonra bunları DNA ya da protein olarak dizmek, karşılaştırmak, daha ileri bir aşamada filogenetik analiz yapmak ve filogenetik ağaçlar çizmek için bugün bir kısmı ücretsiz olarak internetten indirilebilen, bir kısmı, ki aslında en "performanslı" ve üstün olanlarının paralı olarak elde edilebildiği bilgisayar programları ile olmaktadır. Bizim de deneyimimiz bir anlamda bununla sınırlanmaktadır. Ancak sırf buraya kadar bile irdelenecek konular, aktarılacak deneyimler, programlar son derece çeşitlidir ve bu yuvarlak masa toplantısında karşılıklı verimli bir şekilde ele alınabilirse yararlı olacağına inanıyorum.

Aslında yukarıda söz ettiğimiz özel jargona daha gelmeden, türkçemize ait sözcükler bile kullanma aşamasında değiliz. Örneğin, yazı içerisinde sıkça ve tırnak içinde kullanmaya gayret ettiğimiz "database", gibi, "domain", "algoritm" gibi en azından bizim türkçe karşılıkları olmadığını düşündüğümüz sözcüklere karşılık aranmasında başlarsak alınacak epey yolumuz olduğunu görüyoruz. Kaldı ki, "multiple sequence alignment", "filogenetik analiz ve ağaçlar" gibi, saydığımız, ve artık pekçoğumuzun bilgisayar programları sayesinde rahatça yapabildiği işlemler dışında, hele de temel araştırma yapıyorsak daha pek çok analiz yapabilmemizi olanaklı kılan birçok bilgisayar programı var elimizde ve internette. şöyle bir bakarsak, sırf elimizdeki programların menülerinin ne kadarını kullanıyoruz, sorusunu sorduğumuzda bile yanıt, en azından kendi adımıza söyleyebilirim, tamamını değil, hatta azını, diye yanıtlayabiliriz. Yani, şu anda bulunduğumuz noktada bile yapacak, öğrenecek çok şeyimiz bulunmaktadır. Bizim bu toplantıda ele alacağımız konular da başlıca bu çerçevede olacak, önemli database'ler, önemli biyoinformatik yazılımları ve önemli internet adreslerinden söz ederek katılımcıların da katkılarını ve ne gibi paylaşımlar yapabileceğimizi konuşacağız. Hepimiz birer adım daha öne gidebilirsek ve bu da ilerlememizin sürekliliğinde küçük te olsa bir ivme sağlarsa amacımıza bir nebze olsun ulaşacağımızı düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Claverie JM, Notredame C. Bioinformatics for Dummies. Wiley Publishing Inc. 2003
2. NCBI, Just the Facts: A Basic Introduction to the Science Underlying NCBI Resources, Bioinformatics <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/bioinformatics.html>

**3. ULUSAL
MOLEKÜLER VE
TANISAL MİKROBİYOLOJİ
KONGRESİ**
(Uluslararası Katılımlı)



SÖZEL SUNUMLAR

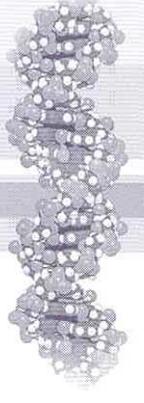
**28 Haziran-1 Temmuz, 2004
Bilkent Otel - ANKARA**



S1 HELICOBACTER PYLORI'DE MAKROLİD DİRENCİNDEN SORUMLU 23S rDNA MUTASYONLARININ MOLEKÜLER "BEACON" İLE SAPTANMASI

Doruk ENGİN, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Meltem Yalınay ÇIRAK, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Sevgi TÜRET, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Selahattin ÜNAL, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı, Ankara
Şükrü DUMLU, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı, Ankara

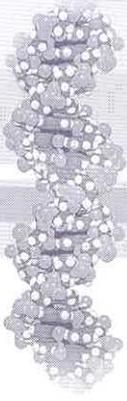
Makrolid direnci, *Helicobacter pylori* infeksiyonunun tedavisinde başarısızlığa neden olan en önemli faktörler arasında yer almaktadır. Bakterinin 23S rDNA'sının peptidil transferazı kodlayan bölgesinde oluşan A2143G, A2144G ve A2143C mutasyonlarının makrolidlerin bağlanmasını azaltarak dirence yol açtığı bildirilmektedir. Bu çalışmada, makrolid direncinden sorumlu mutasyonları saptayarak duyarlı ve dirençli genotipleri ayıran bir dizi moleküler "beacon" geliştirilmiş, elde edilen sonuçların fenotiple uyumluluğu araştırılmıştır. Bu amaçla *H.pylori* 23S rDNA'sının 163 baz çifti uzunluğundaki bir bölümünü çoğaltan PCR primerleri tasarlanmıştır. Duyarlı genotipe özgül moleküler "beacon" HpCl-WT FAM ile, dirençli dizilere özgül HpCl-43 ve HpCl-44 ise JOE ile işaretlenmiştir. Klaritromisin duyarlılık durumları agar dilüyon yöntemi ile saptanmış olan 20 duyarlı ve 10 dirençli *H.pylori* suşundan DNA saflaştırılmıştır. Amplifikasyon ve mutasyon saptanması ABI Prism 7700 cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Klaritromisin duyarlı suşlarda, moleküler "beacon" ile saptanan genotiplerin agar dilüsyon sonuçları ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Agar dilüsyon ile dirençli olduğu saptanan 10 suşun tamamında moleküler "beacon" ile dirençli genotip bulunurken, 2 suşun duyarlı ve dirençli hücrelerin karışımından oluştuğu saptanmıştır. Sonuç olarak, geliştirdiğimiz moleküler "beacon" sistemi *H.pylori*'de makrolid direncinden sorumlu mutasyonların saptanmasında kullanılabilir hızlı ve güvenilir bir sistemdir.



S2 MAKROLİDLERE DİRENÇLİ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE İZOLATLARININ ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI VE DİRENÇ MEKANİZMALARI

Duygu EŞEL, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri
Bülent BOZDOĞAN, Hershey Medical Center, Hershey, PA, USA
Bülent SÜMERKAN, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri
Peter C. APPELBAUM, Hershey Medical Center, Hershey, PA, USA

Bu çalışmada Kayseri yöresinde izole edilen makrolid dirençli pnömokokların antibiyotik duyarlılıklarının ve direnç mekanizmalarının araştırılması amaçlanmıştır. 1998-2003 yılları arasında klinik örneklerden izole edilen 525 *S.pneumoniae* izolatından makrolidlere dirençli olduğu belirlenen 17 (%3.2) suş çalışmaya alınmıştır. Duyarlılık testleri agar dilüsyon yöntemiyle yapılmış, direnç mekanizmaları PCR ve sekans analizi ile, klonal yakınlıkları ise "Pulsed Field" jel elektroforezi (PFGE) kullanılarak araştırılmıştır. İzolatların MİK aralıkları, MİK50 ve MİK90 değerleri (mg/mL) sırasıyla; eritromisin için 0.5->64, 32 ve >64, klaritromisin için 1->64, 8 ve >64, azitromisin 1->64, >64 ve >64, roksitromisin için 4->64, >64 ve >64, klindamisin <0.03-64, 0.5 ve 16, telitromisin için <0.01-0.12, <0.01 ve 0.06 olarak bulunmuştur. Bütün suşların telitromisine duyarlı olduğu gözlenmiştir. Makrolid dirençli 17 suşun 15'i (%88) tetrasikline, biri (%6) kloramfenikole dirençli; 8'i (%47) penisilin G'ye ve biri (%6) levofloksasine orta düzey dirençli olarak saptanmıştır. Suşların 10'unda (%59) ermB, 6'sında (%35) mefA geni varlığı gösterilmiş, bir suşta 23S rRNA'da A2059G mutasyonu bulunmuştur. Bu suşun eritromisin, azitromisin, klaritromisin, roksitromisin, telitromisin ve klindamisin için MİK değerleri sırasıyla 64, >64, 16, >64, 0.03, 2 mg/mL'dir. ermB geni taşıyan 10 suşun 7'si genetik olarak benzer bulunmuştur. Tetrasikline dirençli 15 suşun 11'inde tetM, 3'ünde tetM ve tetK birlikte saptanmış, bir suşta ise tetM veya tetK gösterilememiştir. Kloramfenikole dirençli suşlarda cat geni pozitif bulunmuş, levofloksasine orta düzey dirençli bir suşta gyrA, gyrB, parC veya parE mutasyonu belirlenememiştir. Sonuç olarak çalışmanın bulguları şu şekilde sıralanabilir: i) Kayseri'de *S.pneumoniae* izolatlarında makrolid direnç oranı düşüktür, ii) Ribozomal metilasyon en yaygın makrolid direnç mekanizmasıdır, iii) Bu çalışmada Türkiye'de 23S rRNA'da A2059G mutasyonu saptanan ilk pnömokok suşu bildirilmiştir.



S3 FUNGAL SEPSİS İLE KAYBEDİLEN FEBRİL NÖTROPENİK HASTALARDA MAYA ETKENLERİNİN EPİDEMİYOLOJİK AMAÇLI MOLEKÜLER İNCELEMESİ

Handan AĞIRBAŞLI, Bizim Lösemili Çocuklar Vakfı ve Kemik İliği Nakil Ünitesi, İstanbul Barış OTLU, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya Rıza DURMAZ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya Gündüz GEDİKOĞLU, Bizim Lösemili Çocuklar Vakfı ve Kemik İliği Nakil Ünitesi, İstanbul

Bu çalışmada, fungal sepsis ile kaybedilen hastalar ile febril nötroopenik dönemlerindeki hastaların farklı lokalizasyonlarından izole edilen *Candida*'ların klonal ilişkilerinin saptanması amaçlanmıştır. 01.03.2001 - 15 Ocak 2003 tarihleri arasında, Bizim Lösemili Çocuklar Vakfı Servisi (BLÇV) ve Kemik İliği Transplantasyon Ünitesinde (KİT) yatarak tedavi gören 28'i erkek 19'u kız toplam 47 hastanın, günlük lökosit sayıları ve ateşleri izlenerek prospektif olarak febril nötroopenik (FN) dönemleri belirlenmiştir. Hastaların yaş ortalaması 9.13 ± 4.73 (yaş aralığı: 2-18) yıl olup, 17'si AML, 14'ü ALL, 9'u AA ve 7'si diğer hastalıklara sahiptir. Kırk yedi hastada 156 atak halinde toplam 312 febril nötroopenik gün saptanmıştır. Ataklar sırasında mikrobiyolojik olarak dökümanite edilmiş enfeksiyon oranı %29.2'dir. Etkenlerin %48.1'inin mantar (n:26), %51.8'inin bakteri (n:28) olduğu izlenmiştir. Mantarların %88.4'ü maya (n:23), %11.5'i küf cinsi (n:3) olup, mayaların 9'u (%39) *Candida albicans*, 14'ü (%61) non-*albicans* *Candida* (*C.krusei* 9, *C.glabrata* 2, *C.famata* 1, *C.kefyr* 1, tiplendirilemeyen 1) olarak tanımlanmıştır. Fungal sepsis ile kaybedilen (n:9) ve mikrobiyolojik olarak dökümanite edilmiş enfeksiyonu olan 4 hastanın, febril nötroopenik dönemlerindeki farklı lokalizasyonlarından izole edilen *Candida* türleri arasındaki klonal ilişki "Pulsed-Field" jel elektroforezi (PFGE) yöntemiyle araştırılmıştır. Hastaların burun, boğaz, vajen, anal ve idrar kültürlerinden üretilen *Candida*'ların en az üçte ikisinin aynı PFGE profili gösterdiği saptanmıştır. *C.krusei* sepsisi ile kaybedilen üç hastada, etkenin flukonazol profilaksisinden dolayı patojen hale gelen endojen flora kaynaklı suşlar olduğu düşünülmüştür. Buna paralel olarak, hastaların boğaz veya dışkı kültürlerinden üretilen *C.krusei* suşları ile kan kültür izolatları da aynı DNA profili göstermiştir. Ayrıca ölüm tarihleri arasında birinci olguya göre 2 ve 11 ay olduğu halde, üç hastanın kan kültüründe üretilen *C.krusei*'lerin aynı kökenden geldikleri saptanmıştır. Bu sonuçlar, olgularda gelişen fungal sepsisin, olgular arası olası çapraz bulaş sonucunda ortaya çıktığını düşündürmektedir.



S4 NONTÜBERKÜLOZ MİKOBAKTERİ İZOLATLARININ TANIMLANMASI

Cengiz ÇAVUŞOĞLU, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Yeşer KARACA-DERİCİ, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Yusuf Engin YAYGIN, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Altınay BİLGİÇ, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Mikobakterilerin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanması uygun tedavi seçimine karar vermek için gereklidir. Konvansiyonel yöntemler kullanılarak yapılan tür tanımlaması zaman alıcı ve zahmetlidir. Bu nedenle her geçen gün daha çok sayıda laboratuvar, tür tanımlaması için moleküler yöntemlerden yararlanmaktadır. Sunulan çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen mikobakteri türlerinin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmasında hsp65 geninin parsiyel dizi analizi ve INNO-LiPA-MYCOBACTERIA v2'nin etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'nda 1997 ile 2004 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden soyutlanan ve daha önce Accu-Probe rRNA hibridizasyonu, INNO-LiPA-MYCOBACTERIA ya da fenotipik klasifikasyonla (üreme hızı-pigment oluşumu) tanımlanan toplam 25 adet mikobakteri izolatu değerlendirilmiştir. LiPA-MYCOBACTERIA v2 deneyi test üreticisinin önerdiği şekilde, hsp65 dizi analizi ise literatürde tanımlandığı şekilde yapılmıştır. Çalışmada bulunan yeni DNA dizileri EMBL'de AY379072, AY379073, AY379074, AY379075, AY379076, AY379077 ve AY536637 "accession" numaraları ile saklanmıştır. Çalışmada incelenen tüm mikobakteri izolatları LiPA-MYCOBACTERIA v2 testindeki Mycobacterium genus probu ile hibridize olmuştur. Buna karşın LiPA-MYCOBACTERIA v2 ile beş izolat tür düzeyinde tanımlanamamıştır. Bu beş izolatu birisi hsp65 dizi analizi ile Mycobacterium mucogenicum olarak tanımlanırken, dört izolat tür düzeyinde tanımlanamamıştır. Yirmi adet mikobakteri izolatu hsp65 geninin parsiyel dizi analizi ile tanımlanmış, bunların tümü LiPA-MYCOBACTERIA v2 ile de beklenen türe özgül problarla hibridize olmuştur. Sonuç olarak, 16S-23S rRNA "spacer" bölgesini hedef alan LiPA-MYCOBACTERIA v2 testi ile hsp65 genini hedefleyen DNA dizi analizi arasında tür tanımlamasında tam bir uyum saptanmış ve özellikle DNA dizi analizi yapamayan laboratuvarlar için LiPA-MYCOBACTERIA v2'nin tür tanımlamasında yararlı bir yöntem olduğuna karar verilmiştir.



S5 PRİMER ANTI-TÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DİRENÇLİ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SUŞLARINDA MOLEKÜLER YÖNTEMLE MUTASYONLARIN ARAŞTIRILMASI

C. Elif ÖZTÜRK, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Düzce
Ahmet SANIÇ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun
Demet KAYA, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Düzce
İsmail CEYHAN, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara

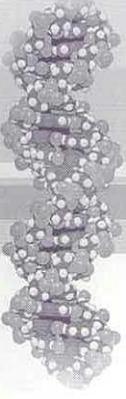
Geçmişte insanlığın en önemli problemlerinden biri olan tüberküloz hastalığı günümüzde antibiyotiklere dirençli bir şekilde tekrar önemli bir sorun olmaya başlamıştır. Bu hastalıkta erken teşhis ve direncin erken saptanabilmesi çok önemlidir. Son yıllarda moleküler biyolojinin gelişmesiyle kısa sürede sonuca gidilebilmektedir. Isoniazid (INH), rifampin (RIF), streptomisin (STR) ve ethambutol (ETH) tüberküloz tedavisinde kullanılan birincil ilaçlardır. Bu ilaçlara fenotipik olarak dirençli bulunan suşlarda aynı zamanda mutasyonlar saptanmıştır. INH dirençli suşların %90'ında katG, inhA, ahpC genlerinde, RIF dirençli suşların %97'sinde rpoB geninde, STR dirençli suşların %70'inde rpsL veya rrs genlerinde, ETH dirençli suşların %47-65'inde embB geninde mutasyonlar gösterilmiştir. Çalışmamızda, AİBÜ Düzce Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 2000-2003 yılları arasında gelen 2163 farklı hasta örneğinden izole edilen 52 M.tuberculosis suşundan antibiyotiklere dirençli bulunanlarda mutasyon genlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Antibiyotik duyarlılık testleri sonunda 4 INH, 3 RIF ve 5 STR dirençli suş saptanmış, tüm suşlar ETH'e duyarlı bulunmuştur. Çalışmada en sık rastlanan mutasyon genleri "cycle sequencing" analizi ile araştırılmıştır. INH dirençli 4 suşta katG ve inhA genleri araştırılmış ve hepsinde kodon 315'de katG geninde mutasyon bulunmuştur. INH dirençli 4 suşun 3'ünde AGC_ACC (Ser_Thr), birinde ACC_CCC (Thr_Pro) mutasyonları saptanmıştır. INH dirençli suşların hiç birisinde inhA geninde mutasyon belirlenmemiştir. RIF dirençli 3 suşun 2'sinde kodon 516'da rpoB geninde GAC_GTC (Asp_Val) ve diğer RIF dirençli suşta kodon 531'de rpoB geninde TCG_TTG (Ser_Leu) mutasyonları bulunmuştur. Bu RIF dirençli 3 suşun hepsi aynı zamanda INH'a da dirençlidir (çoklu ilaca dirençli). STR dirençli 5 suşun hepsinde kodon 43'de rpsL geninde AAG_AGG (Lys_Arg) mutasyonları belirlenmiştir. Sonuç olarak çalışmamızda, Düzce'de antibiyotiklere dirençli bulunan tüm suşlarda sık rastlanan mutasyon genleri saptanmış, ancak INH dirençli olan bir suşta saptadığımız ACC_CCC (Thr_Pro) mutasyonu ile ilgili bilgiye literatürde rastlanamamıştır.



S6 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KLİNİK İZOLATLARINDA rpoB MUTASYONLARI VE RİFAMİSİN ÇAPRAZ DİRENCİNİN TANIMLANMASI

Zeynep SARIBAŞ, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Alpaslan ALP, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Ahmet SANIÇ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun
Melike ATASEVER, Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara
Şemsettin USTAÇELEBİ, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Rifampin, tüberküloz tedavisinde kullanılan birinci sıra ilaçlardandır. Rifampine dirençli *M.tuberculosis* suşlarının ortaya çıkması, diğer rifamisin türevlerinin antimikobakteriyel etkinliğinin araştırılmasını zorunlu kılmıştır. Rifamisin direnci, DNA-bağımlı RNA polimeraz enziminin beta alt ünitesini kodlayan rpoB geninin 81 baz çiftlik bölgesindeki mutasyonlara bağlı olarak gelişmektedir. Bu çalışmaya, farklı hastalardan izole edilen 26 rifampin dirençli *M.tuberculosis* izolatı alınmıştır. Bu izolatların diğer rifamisin türevlerine (rifapentin, rifabutin, rifalazil) direnci, agar dilüsyon (orantı) yöntemiyle saptanmıştır. Tüm izolatlardan kaynatma yöntemiyle DNA ekstraksiyonu yapılmış ve rpoB geninin "rifampin direncini belirleyen bölgesi" DNA sekans analizi ile incelenmiştir. Onbir klinik izolatta kodon 531 (SerÆLeu) mutasyonu saptanmıştır. Bu izolatlar, dört rifamisin türevine de dirençlidir. Kodon 516 (n:5) ve 533 (n:2) mutasyonları rifampin ve rifapentin direncine neden olmaktadır. Kodon 526 mutasyonları (n:5) aminoasit değişikliğine göre farklı direnç paternlerine neden olmaktadır. Tüm rifamisinlere dirençli bir izolatta 522. kodon mutasyonu belirlenmiştir. Kodon 513 (GlnÆLeu) mutasyonu saptanan bir izolat dört rifamisin türevine direnç gösterirken, 513 (GlnÆLys) mutasyonu gözlenen diğer bir izolat sadece rifampin ve rifapentine dirençli bulunmuştur. Sonuç olarak, rpoB genindeki mutasyonların belirlenmesi, etkin rifamisin türevinin kullanılmasına yardımcı olacaktır. (Bu çalışmanın sekans analizi kısmı DPT'nin 2002K120500 no'lu projesi ile desteklenmiştir)



S7 TÜRK HASTALARDAN SOYUTLANAN GENOTİP I HEPATİT DELTA VİRUS (HDV) KÖKENLERİNDE GENETİK ÇEŞİTLİLİK

Sibel ÖZSU CAYMAZ, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Y. Hakan ABACIOĞLU, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

A. Arzu SAYINER, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Bu çalışmada, ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile çoğaltılmış HDV dizilerine filogenetik ve restriksiyon enzim analizi uygulanması ve bu suretle Türkiye'deki HDV genotip çalışma sonuçlarının genişletilmesi amaçlanmıştır. Tüm genotipleri yakalayabilen bir öncül çifti seçimi için literatürde kullanılmış olan öncüller, hizalanmış dizilerle karşılaştırılarak tüm genotiplerin saptanabilirliği araştırılmıştır. Çalışmaya anti-HBc ve total delta antikoru pozitif olan 80 serum örneği alınmıştır. Ekstrakte edilen HDV dizileri 889-912 nükleotitler arasındaki ön öncül ve bu çalışmada tanımlanan 1268-1291 nükleotitler arasındaki ters öncül kullanılarak RT-PCR ile çoğaltılmıştır. Genotiplerin ayrımını sağlayan uygun bir restriksiyon enzimi seçimi için "Webcutter 2.0." programı kullanılarak hedef dizinin genotip düzeyinde ayırt edilebilmesine olanak tanıyan SmaI restriksiyon enzimi seçilmiştir. Oluşan 403 baz çiftlik ürün SmaI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Restriksiyon enzim analizi (REA) ile belirlenen genotip sonuçlarının doğrulanması için; genotip paternleri saptanmış örneklerden rastgele seçilen 24 tanesine nükleotid dizi analizi uygulanmış ve diziler evrimsel yakınlıkları açısından incelenmiştir. Sonuç olarak, 60 (%75) örnek HDV RNA pozitif, 20 (%25) örnek HDV RNA negatif olarak saptanmıştır. HDV RNA'sı pozitifliği bulunan tüm örneklerin REA ile genotip I olduğu gösterilmiştir. Nükleotid dizilerinin karşılaştırılması için, hepatit delta antijen geninin 283 nükleotitlik bir bölümü kullanılmıştır. Dizi analizi yapılan bütün örnekler bilinen HDV genotip I izolatları ile birlikte kümelenecek, ancak bunların homojen bir küme oluşturmadıkları, birbirlerinden nükleotid düzeyinde %7 oranında farklı oldukları belirlenmiştir. Bu çalışmanın filogenetik analiz sonuçları, Türkiye'de HDV genotip I'e ait farklı subtiplerin hakim olduğunu göstermektedir. Ayrıca, bu çalışmada bilinen tüm genotipleri aynı duyarlılıkla saptayabileceğini ön gördüğümüz yeni bir öncül çifti tanımlanmıştır. Ancak bu öncüllerin performanslarının genotip II ve III HDV dizileri ile test edilmesi gerekmektedir.



58 ALT SOLUNUM YOLU İNFEKSİYONU YAKINMASI OLAN ÇOCUKLARDAN İZOLE EDİLEN SOLUNUM SİNSİTYAL VİRUSLARININ MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİK İNCELENMESİ

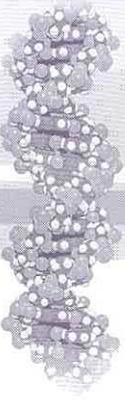
Kenan MİDİLLİ, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Gülden YILMAZ, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Salih TÜRKOĞLU, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Ahmet Mert KUŞKUCU, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Barnisa İSKONOVA, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Işık YALÇIN, İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul

Kemal ALTAŞ, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Gelişmekte olan ülkelerde izole edilen solunum sinsityal viruslarının (Respiratory Syncytial Virus, RSV) moleküler epidemiyolojileri ile ilgili veriler son derece sınırlıdır. Bu çalışmada birbirini takip eden 2001-2002 ve 2002-2003 yıllarında İstanbul'da Üniversite Hastanesi Kliniklerine alt solunum yolu enfeksiyonu ile başvuran 5 yaş altındaki çocuklardan izole edilen 29 RSV suşunun alt grup ve genotip tayininin yapılması amaçlanmıştır. Ters transkripsiyon aşamasından sonra, F164, G267, G32 ile GB52, G238A ve F1 primerlerinin kullanıldığı multipleks nested PCR yöntemi kültür izolatlarına uygulanmıştır. Alt grup ayrımı, ürünlerin moleküler ağırlıklarına göre yapılmıştır. ABI 310 sequencer (Perkin-Elmer Applied Biosystems) kullanılarak dizi analizi uygulanmış ve analiz için DNASTAR, Bioedit ve MEGA-2 programları kullanılmıştır. Sonuç olarak, 24 izolattan 21'nin A, 3'ünün B alt grubunda olduğu saptanmıştır. Filogenetik inceleme sonucunda da, A alt grubundaki 21 virustan 20'sinin A5, birinin A2, B alt grubundaki 3 virustan 2'sinin SAB3 ve birinin SAB1 genotipi ile kümelendiği gözlenmiştir. (Bu çalışma, Ö-1184/2712201 numara ile İstanbul Üniversitesi Araştırma fonu tarafından desteklenmiştir)



S9 ELEKTROKİMYASAL DNA BİYOSENSÖRLERİYLE HERPES SİMPLEX (HSV) TİP 1 ve TİP 2 VİRÜSLERİNİN TAYİNİ VE BİRBİRİNDEN AYIRIMI

M. OZSÖZ, Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD, İzmir
A. ZEYTİNOĞLU, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD, İzmir
A. ERDEM, Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD, İzmir
P. KARA, Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD, İzmir
D. OZKAN, Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD, İzmir
H. KARADENİZ, Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD, İzmir
B. KARAŞAHİN, Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD, İzmir

Amaç

Herpes Simplex Virüsünün (HSV) DNA dizisinin tanısı ve HSV Tip I ve Tip II lerin birbirinden ayırt edilmesi Elektrokimyasal DNA Biyosensör yöntemiyle yapılması amaçlanmıştır.

Yöntem

Kan örneklerinden izole edilen DNA, uygun primerler kullanarak PCR ile çoğaltılırlar. PCR dizi haritasından primerlerin dışında 22 bazlık uygun prob dizileri seçilir ve bu sentetik diziler hibridizasyonun gerçekleşeceği elektrot yüzeyine tutturulur. Prob dizileri tutturulmuş algılama yüzeyi elektrot daha sonra hibridizasyonun oluşabilmesi için kandan izole edilen ve çoğaltılan PCR ürünleri 95 oC de 5 dakika su banyosunda ısıtılıp, hemen ardından buz içinde 2 dakika tutulduktan sonra elde edilen tek sarmalın (ssDNA) içine daldırılır. Hibritleşmenin olup olmadığı baz çiftleri arasına giren, düzlemsel yapıya sahip interkaletör bir madde Meldola Blue (MDB) ile saptanır. Hibritleşmenin olması büyük bir sinyalle, olmaması ise küçük bir sinyalle anlaşılır. Interkaletör özelliğine sahip MDB hibritleşme olduğunda baz çiftleri arasında birikir, buna karşın hibritleşme olmadığında yalnız prob olduğunda (negatif gerçek örnekte, mutasyonlu örnekte) MDB birikemez, sonuçta her iki durumda; biriken MDB ölçümleri sinyalleri oluşturmaktadır.

Birbirinden 4 farklı baz içeren Tip I ve Tip II sentetik problemler

Prob 1; HSV Tip I 5'-NH₂-TTG CTG GCC AAG CTG ACG GAC A-3'

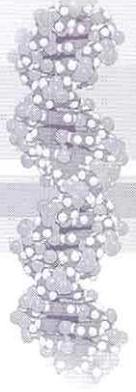
Prob 2; HSV Tip II 5'-NH₂-GTC CTG ACC AAG CTG ACG GAG A-3'

Sonuç ve yorum

Prob, 4 nokta mutasyonlu gerçek örnek, negatif gerçek örnek ve PCR kör çözeltisi aynı düzeylerde MDB sinyali vermiş olup, buna karşın pozitif gerçek örnekler öncekilerin iki katı büyüklüğünde MDB sinyali vermiştir. Pozitif örnek dışında hibritleşmenin olmadığı saptanmış olmaktadır. Tasarlanan biyosensör HSV Tip I ve Tip II yi birbirinden ayırt etmiştir. Geleneksel jel elektroforezi işlemi Biyosensör teknolojisi ile ortadan kaldırılmış olup, ayrıca belirteç olarak kullanılan MDB etidyum bromüre göre daha az toksiktir. Geliştirilen bu yöntem farklı virüs, bakteri hatta kalıtsal hastalıkların tanısında da kullanılabilir.

Hastalık teşhislerinde insan, virüs ve bakteri DNA baz serilerinin tayini gün geçtikçe daha fazla önem kazanmaktadır. Çok sayıda kalıtsal hastalığa sebep olan mutasyonlar artık tespit edilebilmektedir ve bu konu hakkındaki bilgilerimiz insan genom projesi devam ettikçe artmaktadır. Bir redoks aktif hibridizasyon indikatörünün varlığında; indikatörün yükseltgenme ya da indirgenme sinyallerinden yola çıkarak elektrokimyasal DNA biyosensör teknolojisine dayalı bir yöntem geliştirilmiş ve laboratuvarımızdaki çalışmalarımızda bu yöntem ile TTV ve Hepatit B virüslerinin tayini gerçekleştirilmiştir (1-6).

Çalışmada Herpes Simplex Virüs (HSV) tip 1 ve tip 2 virüslerinin tayini ve birbirinden ayırımı elektrokimyasal genosensör ile gerçek hasta örnekleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her iki virüsün genom düzeyleri birbirine çok yakındır. HSV tip 1, genellikle vücudun üst bölgesinde (ağız ve çevresi), HSV tip 2 ise alt bölgesinde (genital) infeksiyonlara neden olur (7, 8).



Çalışmamızda, bu iki tipe ait virüsün polimeraz gen bölgelerini içeren PCR ürünü örnekler E.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü tarafından çoğaltılıp, bu PCR dizisinde 4 noktada baz farklılığı gösteren 22- bp'lik bölge seçilerek prob dizi olarak dizayn edilmiştir (8).

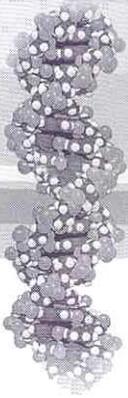
Elektrokimyasal tayin; bu problemlerin kalem elektrot yüzeyine (PGE) kovalent olarak bağlanması ve ardından sentetik hedef ya da denatürasyona uğratılmış PCR ürünü hedef ile hibridizasyona tabi tutulduktan sonra, bir hibridizasyon indikatörü olan Meldola blue (MDB) ile etkileşmesi ve MDB'nin indirgenme sinyalindeki değişimlerin izlenmesine dayanmaktadır.

Bir interkalatör molekül olan MDB; elektrot yüzeyinde yalnızca prob dizi var iken düşük bir sinyal verir (prob 1 ve prob 2), ancak probun kendi karşılığı ile hibridizasyonu sonucu oluşan çift sarmal (prob1 ile tip1 virüsü ve prob 2 ile tip 2 virüsü) içine girip birikeceği için oldukça yüksek bir sinyal gözlenir. Aynı deney karşılığı olan dizi yerine baz farkı içeren dizi ile hibridizasyonu sonucu (prob1 ile tip 2 virüsü ve prob 2 ile tip 1 virüsü) izlenen MDB sinyali ise daha düşüktür (9).

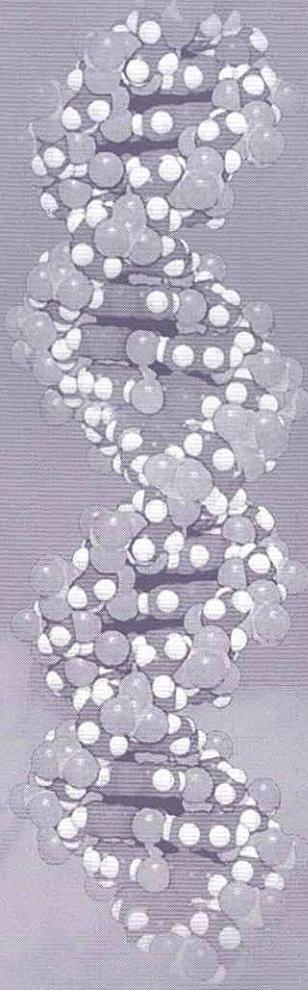
Bu çalışma ile PCR sonrası yapılan elektroforez, sekanslama gibi işlemlere göre daha kolay, ve çok daha ucuz alternatif bir yöntem geliştirilmiştir.

KAYNAKLAR

1. S. R. Mikkelsen, *Electroanal.*, 8, 15, 1996.
2. Erdem A., Kerman K., Meriç B., Ozsoz, M. (2001). Methylene blue as a novel electrochemical hybridization indicator, *Electroanalysis*, 13: No. 3, 219-223.
3. Kerman K., Ozkan, D., Kara, P., Meric, B., Gooding, J.J., Ozsoz, M., (2002), Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes, *Anal. Chim. Acta*, 462: 39-47.
4. P. Kara, K. Kerman, D. Özkan, B. Meriç, A. Erdem, Z. Özkan, M. Özsoz, *Electrochemistry Communications*, 4, 705, 2002.
5. B. Meriç, K. Kerman, D. Özkan, P. Kara, S. Erensoy, U. S. Akarca, M. Mascini, M. Özsoz, *Talanta*, 56, 837, 2002.
6. Erensoy, S., (2003), İnsan Herpes Virusları, E.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ders notları.
7. Lakeman, F.D., Whitley, R.J., National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group, (1995), Diagnosis of Herpes Simplex encephalitis: Application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease, *The Journal of Infectious Diseases*, 171: 857-863.
8. Kara, P., Meric, B., Zeytinoglu, A., Ozsoz, M., (2004), *Anal. Chim. Acta*, in press.
9. Ozkan, D., Kara., Kerman, K., P., Jelen F., Karadeniz H., Ozkan Z., Ozsoz M., (2003), Dna Sensing On Mercury And Carbon Electrodes By Using Meldola Blue As The Electrochemically Active Intercalator, *Turkish Journal Of Chemistry*, basımda.



**3. ULUSAL
MOLEKÜLER VE
TANISAL MİKROBİYOLOJİ
KONGRESİ**
(Uluslararası Katılımlı)



POSTER SUNUMLARI

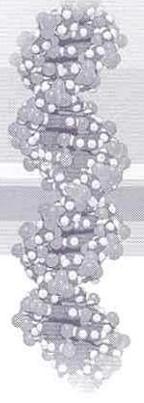
**28 Haziran-1 Temmuz, 2004
Bilkent Otel - ANKARA**



P 1 ENTEROKOKLARIN FEKAL KOLONİZASYONU, AMPİSİLİN, VANKOMİSİN VE YÜKSEK DÜZEY AMİNOGLİKOZİDLERE DİRENCİ VE SUŞLAR ARASINDAKİ KLONAL İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Çiğdem KUZUCU, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Zeynep ÇİZMECİ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Rıza DURMAZ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Bengül DURMAZ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
İ.Hatil ÖZEROL, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

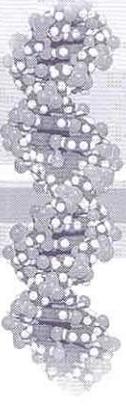
Bu çalışmada, enterokokların fekal kolonizasyonunun, izolatlar arasındaki klonal ilişkinin ve ampisilin, vankomisin, yüksek düzey gentamisin ve streptomisin direncinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, hastanede yatan 150 hasta ile 100 poliklinik hastası alınmıştır. Her bir hastadan alınan gaita veya rektal sürüntü örneği 1 saat içinde uygun besiyerlerine ekilmiş ve enterokok türleri konvansiyonel yöntemler ve API-20 Strep kullanılarak tanımlanmıştır. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Türlerin moleküler tiplendirmesi, "Pulsed Field" jel elektroforezi (PFGE) ve "arbitrarily primed"-polimeraz zincir reaksiyonu (AP-PCR) ile yapılmıştır. Sonuç olarak, yatan hastaların 90'ından (%60) enterokok türleri izole edilmiş, bunların 37'sinin (%41) yüksek düzey gentamisin direncine, 36'sının (%40) yüksek düzey streptomisin direncine ve 50'sinin (%55.6) ampisilin direncine sahip olduğu belirlenmiştir. Poliklinik hastalarının %30'unda fekal kolonizasyon saptanmış, bu hastalarda ampisilin, yüksek düzey streptomisin ve gentamisin direnç oranları sırasıyla; %13, %10 ve %3 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda vankomisin dirençli enterokok türüne rastlanmamıştır. Yatan hastalardan izole edilen enterokok türlerinin 78'ine her iki tiplendirme yöntemi uygulanmış, AP-PCR ile 66 bant paterni saptanırken, PFGE toplam 72 farklı patern göstermiştir. PFGE ve AP-PCR sonuçları, duyarlı ve dirençli türler arasında anlamlı bir fark göstermemiştir. Hastanemizde, ampisilin ve yüksek düzey aminoglikozid direnci gösteren enterokokların yüksek prevalansa sahip olması önemli bir problemdir. Dolayısıyla, moleküler yöntemlerle izolatlar arasındaki klonal ilişki saptanarak daha etkili koruyucu yöntemler geliştirilmelidir.



P 2 HAYVAN KÖKENLİ ENTEROKOKLARDA VANKOMİSİN DİRENÇ GENOTİPLERİ

Serap SAVAŞAN, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın
Alper ÇİFTÇİ, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
K. Serdar DİKER, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Hayvan beslemede yem katkısı olarak kullanılan avoparsinin enterokoklarda vankomisin dirençliliğini uyardığı anlaşıldıktan sonra, hayvansal kaynakların vankomisin dirençli enterokok (VRE) epidemiyolojisindeki rolü önem kazanmıştır. Türkiye’de hayvansal kaynaklarda VRE sıklığını belirlemek için yapılan bu çalışmada, vankomisin direnç genotipleri ve türlere göre dağılımı incelenmiştir. Enterokok izolasyonu için 8 farklı işletmeden 120 tavuk ve 15 farklı kaynaktan 60 köpeğe ait dışkı veya oral kazıntı örnekleri toplanmıştır. Selektif enterokok-M buyyon ve enterokokosel agar kültürlerinde üreyen suşlar fenotipik özelliklerine göre ayrılmış, izole edilen enterokok suşlarının vankomisin ve teikoplanin MİK değerleri agar dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Enterokok suşlarının genetik düzeyde ayrımı için *E.faecalis* ve *E.faecium* 'a özgül primerler ile PCR uygulanmıştır. Vankomisin dirençli suşlarda VanA, VanB ve VanC1 varlığı da PCR ile incelenmiştir. Tavuklarda *E.faecalis*, *E.faecium*, *E.hirae*, *E.gallinarum* ve *E.avium*, köpeklerde *E.faecalis*, *E. faecium*, *E.hirae* ve *E.gallinarum* türleri saptanmıştır. Fenotipik ve genotipik düzeyde, tavuk kökenli 38 *E.faecalis* suşunun 5’inde VanA, 2’sinde VanB, 22 *E.faecium* suşunun 2’sinde ve 22 *E.gallinarum* suşunun tümünde VanC1 ve 1’inde VanA tipi direnç belirlenmiştir. Köpek kökenli 21 *E.faecalis* suşunun 3’ü VanA, 1’i VanB, 14 *E.faecium* suşunun 2’si VanB ve 6 *E.gallinarum* suşunun tümü VanC1 genotipi olarak bulunmuştur. MİK ($\mu\text{g/ml}$) değerleri *E.faecalis* VanA tipinde vankomisin/teikoplanin için 128-1024/8-128, VanB tipinde 64-512/0.5-1, *E.faecium* VanA tipinde 128/16-64, VanB tipinde 256/1 arasında belirlenmiştir. VanA ve VanC genotipindeki bir *E.gallinarum* suşunun vankomisin/teikoplanin MİK değerleri 128/32 $\mu\text{g/ml}$ düzeyinde saptanmıştır. Yüksek düzeyde vankomisin dirençliliği saptanan tavukçuluk işletmelerinin daha önce avoparsin kullandıkları, köpek barınaklarında ise çığ tavuk yedirildiği öğrenilmiştir. Sonuç olarak, Türkiye’de hayvanlarda dikkate değer düzeyde VRE sıklığına rastlanmasının, tavuk beslemede avoparsin kullanımına bağlı olduğu düşünülmüştür.



P 3 BİR ÇOCUK HASTANESİNDE VanA GENİ İÇEREN ENTEROCOCCUS FAECIUM SALGINININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Abdullah KILIÇ, GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Tayfur DEMİRAY, SSK Dışkapı Eğitim Hastanesi, Ankara
M. Ali SARAÇLI, GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Gül BAHAR, SSK Dışkapı Eğitim Hastanesi, Ankara
Hakan AYDOĞAN, GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Mehmet BAYSALLAR, GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Levent DOĞANCI, GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Vankomisine dirençli *Enterococcus* (VRE) türleri bakteremi, üriner sistem infeksiyonu ve endokardit gibi hastane infeksiyonlarına neden olan önemli mikroorganizmalardandır. 1980'li yılların başında ilk olarak izole edildiklerinden beri tüm dünyada VRE'nin neden olduğu infeksiyonlar hızla artmaktadır. Avrupa'da *E. faecium*, Amerika Birleşik Devletleri'nde ise *E. faecalis* kaynaklı infeksiyonlar daha sıklıkla bildirilirken, *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* nadir olarak infeksiyonlara neden olmaktadır. Enterokoklarda yedi farklı glikopeptid direnç fenotipi (VanA, VanB, VanC1, VanC2/3, VanD, VanE, VanG) gösterilmiştir. VanA ve VanB tipi daha sıklıkla tanımlanmış direnç fenotipleridir. Bu çalışmada, çocuk hastanesinde salgına neden olan 25 *E. faecium* izolatının E-test yöntemi ile çeşitli antibiyotiklere olan duyarlılıklarının saptanması, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile direnç genlerinin tespit edilmesi ve "Pulsed Field" jel elektroforezi (PFGE) ile genotiplendirilmesi amaçlanmıştır. E-test yöntemi ile izolatların hepsinin, hem vankomisin hem de teikoplanine yüksek düzeyde dirençli, PCR yöntemiyle de VanA tipi direnç genine sahip oldukları görülmüştür. PFGE yöntemiyle, büyüklükleri yaklaşık 26 ile 248 kb arasında değişen, en az 17 en fazla 21 bant oluşturdukları ve 25 *E. faecium* kökeninin 1-4 izolat içeren 11 farklı pulstipe ayrıldıkları saptanmıştır. Sonuç olarak, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de VanA tipi direncin sorun oluşturabileceği ve plazmid ile aktarılabilmesi nedeniyle VanA tipi direnç gösteren VRE nedenli infeksiyonların öneminin artabileceği düşünülmektedir.



P 4 ENTEROKOK İZOLATLARINDA GLİKOPEPTİD DİRENCİ VE SUŞLAR ARASINDAKİ KLONAL İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ

Yasemin ERSOY, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Zeynep ÇİZMECİ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Mehmet FIRAT, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Rıza DURMAZ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

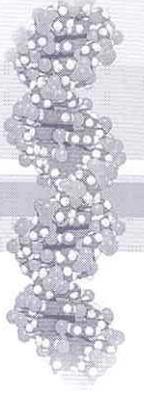
Vankomisin dirençli enterokok (VRE) suşlarının prevalansı giderek artmaktadır. Son beş yılda ülkemizde de birçok hastaneden VRE izolasyonu bildirilmiştir. Ancak ülkemizde, enterokoklar arasında glikopeptid direnç insidansı ve direnç genotipik ayrıntıları bilinmemektedir. Bu çalışmada, enterokok izolatları arasındaki glikopeptid direnci ve direnç genotiplerinin belirlenmesinin yanı sıra, suşlar arasındaki klonal ilişkinin ortaya konması amaçlanmıştır. Ağustos 2003-Mart 2004 tarihleri arasında İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi'nde klinik örneklerden izole edilen 102 ve yoğun bakım hastalarından rektal sürüntü taraması ile tespit edilen 51 enterokok suşu çalışmaya alınmıştır. Agar dilüsyon metodu ile vankomisin ve teikoplanin için minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri saptanmıştır. Teikoplanine dirençli suşa rastlanmazken, vankomisine düşük düzey direnç gösteren ($2\mu\text{g}/\text{ml}$ MİK $\leq 16\mu\text{g}/\text{ml}$) 21 suş tespit edilmiştir. VanC1 ve VanC2-3 primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile suşların genotipik direnç analizi yapılmıştır. Üç suşta VanC1 geni ve bir suşta VanC2-3 geni belirlenmiştir. MİK değeri $\geq 2\mu\text{g}/\text{ml}$ olan 21 enterokok suşu "Arbitrarily Primed" PCR ile tiplendirilmiş, izolatların 9'unda aynı, 2'sinde yakın ilişkili, 6'sında muhtemel ilişkili ve 4'ünde farklı bant profili saptanmıştır. VanC1 genine sahip 3 suştan 2'si klonal yönden ilişkili, diğeri bu izolatlarla ilişkisiz bulunmuştur. Sonuç olarak, hastanemizde epidemiyolojik öneme sahip olmayan VanC geni taşıyan VRE suşları dışında henüz glikopeptid direncine rastlanmamıştır. Ancak, VanC1 ve VanC2-3 geni taşıyan suşların tespit edilmesi ve bu izolatlar arasında yakın klonal ilişki gözlenmesi nedeniyle, aralıklı sürveyans çalışmaları ile direnç paternindeki değişikliklerin takibi, olası VRE gelişimi veya salgınının önlenmesinde yol gösterici olacaktır.



P 5 STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARINDA POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE METİSİLİN DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI

Seyhan ULUSOY, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta
Gülgün TINAZ, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta
Abbas TANER, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta
Fatma Filiz COŞKUN-ARI, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta

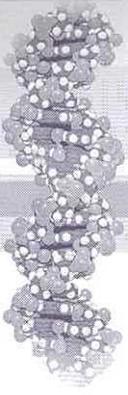
Stafilokoklar, bir çok sağlıklı insan cildinde bulunan Gram pozitif, fırsatçı patojen bakterilerdir. Ayrıca bu bakteriler, tedavi edilmediği zaman dünya genelinde yüksek oranda ölümlere neden olan nozokomiyal infeksiyonların da sebebi durumundadırlar. Stafilokokların sebep olduğu önemli hastalıklar arasında fronkül, karbonkül, impetigo, pnömoni, haşlanmış deri sendromu, besin zehirlenmesi, osteomyelit ve bakteremi sayılabilir. Staphylococcus aureus enfeksiyonlarına karşı, metisilin kullanılmasıyla birlikte, metisiline dirençli S.aureus (MRSA) suşları dünya genelinde yayılarak, nozokomiyal hastalıkların en önemli sebeplerinden biri haline gelmiştir. Metisilin direncine sahip stafilokokların, bilinen penisilin bağlayan proteine (PBP) ek olarak yeni bir PBP2a ürettikleri tespit edilmiştir. Bu protein, stafilokokların metisilin dahil birçok beta-laktam türevi antibiyotige karşı dirençli olmasını sağlar. PBP2a, mecA adlı bir gen tarafından kodlanır ve metisiline duyarlı suşlarda bulunmaz. Dünya genelinde metisilin direncinin giderek artması, klinik laboratuvarlarda acil olarak MRSA'nın hızlı, basit ve doğru metotlarla tespitini gerektirmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, çeşitli hastanelerden toplanan S.aureus suşlarının metisilin direncini ortaya koymak için, mecA geninin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır. Analiz sırasında, koloni PCR metodu uygulanmış ve 533 baz çiftlik mecA gen bölgesinin çoğaltılması için bu bölgeye özgül primerler kullanılmıştır. Ayrıca bu suşların okzasiline duyarlılıkları, klasik fenotipik tiplendirme metotlarından disk difüzyon ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) Epsilometre testi (E-test) ile de çalışılmıştır. Sonuç olarak bulgularımız, PCR'nun MRSA tespitinde özgül ve duyarlı bir metod olduğunu ve referans yöntem olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.



P 6 KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN METİSİLİNE DİRENÇLİ STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARI ARASINDAKİ KLONAL İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Bengül DURMAZ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Malatya
Gülay YETKİN, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Malatya
Çiğdem KUZUCU, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Malatya
Latife İŞERİ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Malatya
Zeynep ÇİZMECİ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Malatya
Rıza DURMAZ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Malatya

Staphylococcus aureus, nozokomiyal bakteriyemilerin en sık nedenlerinden biridir. *S. aureus* suşları arasında metisilin direnci giderek artan öneme sahiptir. Bu çalışma, İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi'nde 2003 yılı boyunca kan kültürlerinde etken olarak üretilen metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatları arasındaki epidemiyolojik ilişkiyi ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. İzolatlarda metisilin direnci oksasilin disk difüzyon testi ile saptanmış ve *MecA* geni araştırılarak doğrulanmıştır. M13 primeriyle "Arbitrary Primed" polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanılarak izolatlar arasındaki klonal ilişki saptanmıştır. Tiplendirmeye alınan 38 suş içinde 21 genotip belirlenmiş, suşların 10 tanesi aynı, 9 tanesi yakın ilişkili, 6 tanesi muhtemel ilişkili bulunmuştur. Genel olarak değerlendirildiğinde, toplam 25 suşun epidemiyolojik olarak ilişkili olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, izolatların yarısından fazlasının epidemiyolojik olarak ilişkili bulunması, hastanemizdeki MRSA çapraz infeksiyon oranının dikkat çekici boyutlarda olduğunu göstermektedir.



P 7 STAFİLOKOKAL HASTANE İZOLATLARINDA METİSİLİN DİRENÇ VE AMİNOGLİKOZİD MODİFİYE EDİCİ ENZİM GENLERİNİN MULTİPLEX-PCR İLE ARAŞTIRILMASI

Mustafa ÖZYURT, GATA Haydarpaşa Eği. Hast. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul
Barış SAREYYÜPOĞLU, GATA Haydarpaşa Eği. Hast. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul

Nurittin ARDIÇ, GATA Haydarpaşa Eği. Hast. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul
Uğur İLGA, GATA Haydarpaşa Eği. Hast. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul
Ali ERDEMOĞLU, GATA Haydarpaşa Eği. Hast. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul
Tunçer HAZNEDAROĞLU, GATA Haydarpaşa Eği. Hast. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul

Bu çalışmada, yatan hastalara ait çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilokoklarda metisilin ve aminoglikozid direncinin fenotipik olarak disk difüzyon yöntemi ve genotipik olarak multiplex-PCR tekniği ile araştırılması amaçlanmıştır. Aminoglikozid modifiye edici enzim (AME)'leri kodlayan *aac(6')*/*aph(2')*, *aph(3')*-IIIa ve *ant(4')*-Ia genlerinin yanısıra metisilin direnç geni *mecA*, multiplex-PCR tekniği ile araştırılmıştır. Çalışmada 19'u *S.aureus* ve 30'u koagülaz negatif stafilokok (KNS) olmak üzere toplam 49 izolat incelenmiş, disk difüzyon yöntemiyle 34'ü (%69.4) metisiline dirençli olarak saptanan izolatların 33'ünde (%97) *mecA* geni pozitif bulunmuştur. Metisilin direnci ile *mecA* geni varlığı arasındaki ilişkinin *S.aureus*'larda %100 (11/11), KNS'larda ise %95.7 (22/23) oranında olduğu gözlenmiştir. Toplam izolatların 22'sinde (%44.9) *aac(6')*/*aph(2')*, 7'sinde (%14.3) *ant(4')*-Ia ve 2'sinde (%4.1) *aph(3')*-IIIa geni pozitif olarak saptanmıştır. Çalışmada, genotipik olarak *mecA* pozitif 33 izolatın 24'ünde (%72.7) AME gen birlikteliği gözlenmiştir.



P 8 ÇOCUKLUK ÇAĞI PARAPNÖMONİK PLEVRAL EFÜZYONLARDA PCR İLE STAPHYLOCOCCUS AUREUS, STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE VE HAEMOPHILUS INFLUENZAE ARAŞTIRILMASI

Ahmet PINAR, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ADı, Ankara
Dilek MENEMENLİOĞLU, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

G.Eda UTİNE, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara
Burçin ŞENER, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Uğur ÖZÇELİK, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara

Ebru Güneş YALÇIN, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara

Deniz DOĞRU, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara
Deniz GÜR, H.Ü İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı

Ayşe ASLAN, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara
Nural KİPER, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara

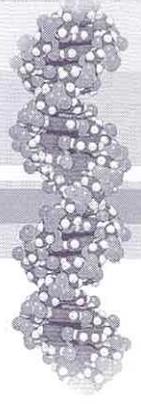
Parapnömonik plevral efüzyonlar ve ampiyem, hem çocuk hem erişkin hastalarda önemli bir morbidite ve mortalite sebebi olmaya devam etmektedir. Ampiyemlerde %18-30 oranında kültürle, %35-45 oranında da Gram yayma ile etken mikroorganizma gösterilememektedir. Plevral sıvıda PCR yöntemi ile bakteriyel etken saptanmasına yönelik çok az sayıda çalışma yapılmış olup etkenlerin hangi oranda saptanabildiği henüz tam olarak belirlenmemiştir. Çalışmamız plevral efüzyonla başvuran çocuk hastalarda PCR yönteminin enfeksiyon etkenini tespit etmekteki yerini incelemek amacıyla yapılmıştır. Çalışmaya HÜTF Çocuk Hastanesi'nde iki yıllık süre içinde parapnömonik plevral efüzyon tanısı alan 28 hasta katılmıştır. Toplanan plevral sıvı örnekleri Gram boyası ile boyanarak mikroorganizma ve hücre varlığı açısından incelenmiş; kanlı agar, çikolata agar ve MacConkey agara ekilmiş ve eş zamanlı kan kültürleri de yapılmıştır. Plevral sıvıda *Staphylococcus aureus*'un Sa442 geninin 190 bazçiftlik bölgesini, *Streptococcus pneumoniae*'nin ply geninin 731 bazçiftlik bölgesini ve *Hemophilus influenzae*'nin bexA geninin 100 bazçiftlik bölgesini hedef alan PCR uygulanmıştır. Mikroskopisinde Gram pozitif diplokok görülen 4 hastadan birisinde hem kültür hem PCR sonucu *S.pneumoniae* için pozitif bulunmuş, 2 hastanın kültürlerinde ise *S.pneumoniae* üretilmemiş ancak *S.pneumoniae* PCR pozitifliği saptanmış, bir hastada ise hem kültür hem PCR sonucu negatif bulunmuştur. Mikroskopisinde Gram pozitif kok görülen 3 hastanın hiçbirisinde kültür ve PCR pozitifliği saptanmamıştır. Gram yaymasında mikroorganizma görülmeyen toplam 21 hastadan birinin kültüründe *S.pneumoniae* üretilmiş ve PCR *S.pneumoniae* için pozitif bulunmuş, birinin kan kültüründe *S.hominis* üretilmiş ve PCR *H.influenzae* için pozitif olarak saptanmıştır. Kan kültürlerinde sırasıyla *S.pyogenes* ve *S.pneumoniae* izole edilen ve önceden almış iki hastanın PCR sonuçları negatif olarak tespit edilirken, hiçbir kültüründe üreme olmayan 5 hastadan ikisinde *S.pneumoniae* diğerlerinde *S.aureus*, *H.influenzae* ve *H.influenzae*+*S.aureus* için PCR pozitifliği elde edilmiştir. Sonuç olarak, plevral sıvıda PCR yöntemiyle plevral enfeksiyon etkeni olan mikroorganizmanın gösterilebileceği; plevral sıvıda PCR yönteminin özellikle önceden antibiyotik tedavisi almış hastalarda etken mikroorganizmayı göstermede kültür ve yaymadan daha duyarlı bir yöntem olduğu bulunmuştur.



P 9 ARŞİV DOKU YAYMALARINDA POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE BRUCELLA TANISI

K. Serdar DİKER, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Alper ÇİFTÇİ, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Tuba İÇA, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Serap SAVAŞAN, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı moleküler tanı yöntemlerinin en önemli avantajlarından birisi, hedef DNA'nın bulunabileceği her türlü arşiv materyalinin kullanılabilmesidir. Brucella infeksiyonlarının geçmişe yönelik tanısında, arşiv materyalde PCR amplifikasyonu ile ilgili literatüre rastlanmamıştır. Bu çalışmada, klinik veya nekropsi materyallerinden hazırlanmış Giemsa boyalı yaymalarda Brucella tanısı için PCR optimizasyonu yapılmış ve tekniğin geçmişe yönelik duyarlılığı değerlendirilmiştir. PCR optimizasyonu için B.melitensis suşunun 104-108 cfu/ml sulandırılmaları koyun kanına eklenmiştir. İnoküle kanlardan ve bakteri sulandırılmalarından hazırlanan yaymalar bir hafta oda ısısında bekletildikten sonra, lam üzerinden kazınarak distile su içinde toplanmıştır. Örneklerden DNA ekstraksiyonu "DNeasy Tissue Kit" (DTK) (Qiagen), fenol-kloroform-isoamilalkol (FKİ) protokolü ve bunun çeşitli modifikasyonları ile yapılmıştır. Arşiv materyalden inceleme amacıyla, 1983-1990 yılları arasında Brucella tanısı konulan aborte koyun fetuslarından hazırlanmış Giemsa boyalı 46 yayma preparatı kullanılmıştır. Bu örneklerden DNA ekstraksiyonu DTK ve optimize FKİ prosedürü ile gerçekleştirilmiştir. Hedef örnekler, Brucella cinsine özgül primerler kullanılarak optimize koşullarda PCR ile amplifiye edilmiştir. Saf bakteri sulandırılmaları ve inoküle edilmiş kanla yapılan optimizasyon çalışmalarında, Giemsa solüsyonunda PCR için inhibitör madde bulunmadığı ve DTK'in FKİ protokolüne göre daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. DTK kullanıldığında 46 arşiv preparatının 41'inde, FKİ protokolü kullanıldığında ise 35'inde Brucella yönünden pozitif sonuç alınmıştır. Brucella cinsine özgül primerler ile amplifikasyonu sağlanan yaymaların yıllara göre dağılımı incelendiğinde; 1983'de 11/14, 1984'de 8/10, 1985'de 10/10, 1987'de 6/6 ve 1990'da 6/6 olduğu görülmüştür. Uygun ekstraksiyon yöntemi kullanıldığında, özel koşullarda saklanmamış 21 yıllık boyalı yayma preparatların, infeksiyonların geçmişe yönelik değerlendirilmesinde kullanılabileceği ve bunun özellikle teknolojik veya laboratuvar yetersizliği nedeniyle geçmişte tanısı konulamayan infeksiyonlar açısından önem taşıdığı kanısına varılmıştır.



P 10 BALGAM ÖRNEKLERİNDEN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE BURKHOLDERIA CEPACIA İZOLASYONU

Güven URAZ, Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara

Nejat AKAR, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Kliniği Pediatrik Moleküler Genetik Laboratuvarı
Ankara

D.Hande BINNET, Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara

Son yıllarda akciğer infeksiyonlarında sıklıkla adından söz ettiren *Burkholderia cepacia*'nın izolasyonu ve tanımlanması büyük önem taşımaktadır. *B.cepacia*'nın biyokimyasal yöntemlerle tanımlanması zaman alıcıdır. Bu nedenle *B.cepacia* tanısında hızlı moleküler yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, uygulaması kolay ve kısa zamanda sonuç veren PCR yöntemi, *B.cepacia* tanısında seçilerek kullanılmıştır. Yirmi hastanın balgam kültüründen elde edilen çeşitli izolatlar PCR ile *B.cepacia* yönünden araştırılmıştır. Bakterilerin DNA izolasyonu klasik fenol-kloroform yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Suşlardan elde edilen DNA'lar PC480-PC1250 primer çifti kullanılarak çoğaltılmıştır. Bu çoğaltma sonucunda 770 baz çift (bp)'lik 16S rDNA bölgesinin varlığı %1 agaroz jelde görüntülenmiştir. Sonuç olarak, 20 hasta izolatının 4'ünde *B.cepacia*'ya ait 770bp'lik bant tespit edilmiştir. Geriye kalan 16 örnekte ise PC480-PC1250 primer çiftinin oluşturduğu bant varlığı saptanmamıştır.



P11 REAL TIME POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE BRUSELLOZ TANISI

Feryal ÖZTÜRK, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya

Cemal ÇİFTÇİ, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Antalya

Dilara ÖĞÜNÇ, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya

Gözde ÖNGÜT, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya

Latife MAMIKOĞLU, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Antalya

Serdar TUNCER, Metis Biyoteknoloji, Ankara

Meral GÜLTEKİN, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya

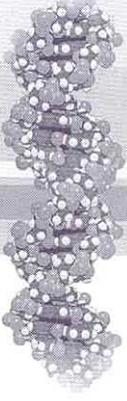
Ülkemizde endemik olarak görülen bruselloz, dünyanın birçok ülkesinde de yaygın olarak görülen, ciddi ekonomik kayıplara yol açan ve pek çok ülke için önemli bir halk sağlığı sorunu olan zoonotik bir hastalıktır. Brusellozun kesin tanısı bakterinin kan, kemik iliği veya doku biyopsi örneklerinden izolasyonu ile konmaktadır. Bakterinin kültürden izolasyonu, hastalığın evresi, bakterinin kanda intermittan olarak bulunması, hastanın önceden tedavi almış olması gibi faktörlere ek olarak bakterinin zor ve yavaş üreme özelliği nedeniyle her zaman mümkün olmamaktadır. Serolojik testlerin yorumu da, endemik bölgelerde yaşayanların büyük bir kısmında Brucella türlerine karşı antikor varlığı ve infeksiyonun seyrinin özelliği nedeniyle çoğunlukla güçtür. Çalışmamızda, bruselloz tanısındaki sıkıntıları aşabilmek amacıyla, LightCycler real time PCR yöntemi ile Brucella BCSP31 genine özgül 350 baz çifti uzunluğundaki bölgenin çoğaltılması hedeflenmiştir. Kan kültüründe üreme ve klinik bulguların eşliğinde Rose Bengal, standart tüp aglütinasyon testi pozitifliğiyle tanı alan 60 hasta ve hikaye, semptom, bulgu ile rutin laboratuvar testleri açısından klinik şüpheli 20 olgunun tam kan örneğinde Brucella real-time PCR çalışılmıştır. DNA izolasyonu için 3 farklı yöntem uygulanmış ve biri semi-nested real time PCR yöntemi olmak üzere 2 farklı amplifikasyon protokolü kullanılmıştır. Testin analitik duyarlılığı 1-15 bakteri hücresi olarak bulunmuştur. Kültürde üreyen 36 Brucella izolatının tümünde real time PCR yöntemiyle özgül ürün elde edilmiş, ancak hasta örneklerinden negatif sonuç alınmıştır. Bruselloz tanısında PCR yöntemi henüz standardize edilmemiş ve bu nedenle yalancı pozitiflik ve negatiflikleri sık görülen bir testtir. Örneklerin alınma, transport ve saklanma koşullarından başlanarak nükleik asit izolasyonu ve saflaştırılması, amplifikasyon ve sonuçların gözlenmesinde kullanılacak yöntemlerin belirlenmesi gerekmektedir. Bruselloz tanısında real time PCR yönteminin standardizasyonu için ileri çalışmalara gerek vardır.



P12 YOĞUN BAKIM ÜNİTESİNDEN İZOLE EDİLEN PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARINDA "N-ACYL HOMOSERINE LACTONE" (AHL) ÜRETİMİ

Gülgün TINAZ, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta
Seyhan ULUSOY, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta
Buket ARIDOĞAN, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta
Fusun EROĞLU, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta
Selçuk KAYA, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta

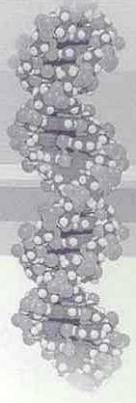
Pseudomonas aeruginosa, kistik fibrozis, AIDS ve kanserli hastalar gibi immün sistemi baskılanmış bireylerde veya yanıklar ile cilt bütünlüğü bozulmuş, sonda ve kateter takılmış hastalarda fırsatçı infeksiyonlara sebep olan önemli bir insan patojenidir. *P.aeruginosa* tarafından sentezlenen elastaz, proteaz, hemolizinler, ekzotoksin A, ramnolipid biyosümfaktanlar ve fosfolipazlar gibi çok çeşitli ekzoenzimler patojenitede çok önemli rol oynarlar. Bu ekzoenzimleri kodlayan genlerin regülasyonu ise "çevreyi algılama = quorum sensing" adı verilen ve bir çok Gram negatif bakteri tarafından biyoluminesans, antibiyotik biyosentezi, konjugasyon ve biyofilm oluşumu gibi çeşitli fizyolojik işlevlerde kullanılan bir sistemle kontrol edilir. Çevreyi algılama sistemi, bakteriye kendi hücre popülasyon yoğunluğunu izleme ve buna bağlı olarak davranışlarını düzenlenme olanağı verir. Bu sistem, yalnızca hücre sayısı konağın savunma sisteminin başa çıkamayacağı bir düzeye ulaştığında, bakterinin virülans faktörlerini kodlayan genlerinin ifade edilerek başarılı bir şekilde infeksiyon oluşturmasını sağlar. Hücreler arası haberleşmeyi sağlayan çevreyi algılama sistemi, "autoinducer" veya feromon olarak adlandırılan sinyal moleküllerinin üretimine bağımlıdır. Gram negatif bakterilerde en yaygın olarak bulunan sinyal molekülleri "N-acyl homoserine lactone" türevleridir (AHLs). *P. aeruginosa* tarafından da BHL ve OdDHL olmak üzere iki ana AHL türevi molekül üretildiği bilinmektedir. Bu çalışmada, S.D.Ü. Tıp Fakültesi yoğun bakım ünitesinden izole edilen 50 *P.aeruginosa* suşunda AHL üretimi *Chromobacterium violaceum* CV026 ve *Agrobacterium tumefaciens* NT1 indikatör suşları kullanılarak araştırılmıştır. Test edilen *P.aeruginosa* suşlarının tamamında OdDHL üretimi tespit edilmiş, ancak literatürde mevcut bilgilerin aksine bu suşların BHL üretmediği gözlenmiştir. Bu bulgunun nedeni moleküler analizlerle detaylı olarak araştırılmaktadır.



P13 SAĞLIKLI İLKOKUL ÖĞRENCİLERİNİN NAZOFARENKSLERİNDEN İZOLE EDİLEN STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE İZOLATLARI ARASINDAKİ EPİDEMİYOLOJİK İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Rıza DURMAZ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Zeynep ÇİZMECİ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Elif AKTAŞ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Mehmet Refik BAYRAKTAR, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Bengül DURMAZ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Mahmut Tayyar KALCIOĞLU, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, Malatya

Streptococcus pneumoniae sağlıklı çocukların nazofarenkslerinde kolonize olmaktadır. Kolonize kişiler toplumsal infeksiyonlar için kaynak olma yanında, infeksiyonun yayılmasında da önemli rol oynamaktadır. Bu çalışma, sağlıklı taşıyıcıların nazofarenks sürüntülerinden üretilen *S.pneumoniae* izolatları arasındaki epidemiyolojik ilişkiyi ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Sağlıklı 909 ilkokul öğrencisinin nazofarenks sürüntülerinden 172'sinde (%18) *S.pneumoniae* üretilmiş, bu izolatların 145'ine "Arbitrary Primed" polimeraz zincir reaksiyonu (AP-PCR) ve 57'sine "Pulsed Field" jel elektroforezi (PFGE) uygulanarak suşlar arasındaki klonal ilişki araştırılmıştır. AP-PCR çalışılan toplam 145 izolatın 112'sinin bant profili değerlendirilebilmiş ve bu yöntemle toplam 58 genotip saptanmıştır. İzolatların 27'si aynı, 31'i yakın ilişkili ve 21'i muhtemel ilişkili olarak bulunmuştur. Genel olarak değerlendirildiğinde, toplam 79 (%70.5) izolatın epidemiyolojik olarak ilişkili, 33 izolatın ise ilişkisiz olduğu saptanmıştır. PFGE uygulanan 57 izolatın 47'sinde değerlendirilebilir bant profili elde edilmiş ve bu şekilde 35 genotip saptanmıştır. İzolatların 8'i aynı, 2'si yakın ilişkili, 11'i muhtemel ilişkili bulunurken, 26 izolat epidemiyolojik olarak ilişkisiz bulunmuştur. Epidemiyolojik olarak ilişkili olabilecek suşların oranı %44.6 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak tiplendirme yöntemleri, çocukların nazofarenksinde kolonize *S.pneumoniae* suşlarının yüksek oranda ilişkili olduğunu göstermektedir.



P 14 GRUP C ve G STREPTOKOKLARDA MLS DİRENÇ GENOTİPLERİ

Şule ÇOLAKOĞLU, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Serpil ERCİS, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Alper ERGİN, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Ankara

Gülşen HASÇELİK, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

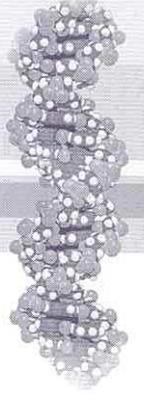
Bu çalışma, çeşitli klinik örneklerden izole edilen eritromisin dirençli grup C ve G streptokoklarda MLS genotiplerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. 1995-2004 yılları arasında, boğaz sürüntüsü, balgam, bronkoalveolar lavaj, idrar, kan ve yara örneklerinden elde edilen 79 adet grup C ve 40 adet grup G olmak üzere toplam 119 streptokok suşu çalışma kapsamına alınmıştır. Eritromisin dirençli suşların genotipleri, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), fenotipleri ise çift disk (eritromisin-klindamisin) yöntemiyle değerlendirilmiştir. Eritromisin direnci gösteren 9 izolatin (8 grup G, 1 grup C) %55.6'sında indüklenebilen (iMLS), %44.4'ünde M fenotipi direnç gözlenmiştir. İndüklebilen (iMLS) fenotip gözlenen izolatların üçünde ermTR, birinde ermB genotipi saptanırken, bir izolatta araştırılan gen bölgelerinden hiçbiri bulunmamıştır. M fenotipi gözlenen bütün izolatlarda (n:4) mefA/E genotipi tespit edilmiştir. Grup C ve G streptokoklarda MLS direnç fenotiplendirmesi, sadece tedaviyi yönlendirmesi bakımından önemlidir. Bu grup streptokoklarda MLS direnç genotip dağılımını bilmek, hem epidemiyolojik hem de tedavi seçeneklerinin daha iyi değerlendirilmesi bakımından önem taşımaktadır.



P15 HASTANE İNFEKSİYONLARINDAN İZOLE EDİLEN GRAM NEGATİF BAKTERİLERİN ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİKLERE DUYARLILIKLARININ VE BETA-LAKTAMAZ ÜRETİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

A. Yasemin ÖZTOP, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sivas
Sesin KOCAGÖZ, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Mehmet BAKIR, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Sivas
M. Zahir BAKICI, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sivas

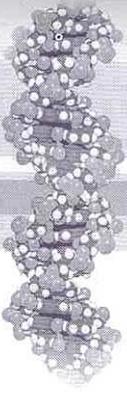
Çalışmamızda, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesindeki 16 farklı klinikten izole edilen ve hastane kontrol komitesi tarafından hastane infeksiyonu etkeni olarak bildirilen 52 *Escherichia coli*, 36 *Pseudomonas aeruginosa* ve 22 *Klebsiella* suşunun çeşitli antibiyotiklere direnç durumları, beta-laktamaz yapımının belirlenmesi ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların (GSBL) tiplendirilmesi amaçlanmıştır. Suşların antibiyotiklere direnç durumları Sceptor yöntemiyle belirlenmiş, GSBL'lar çift disk sinerji testi ve indüklenabilir beta-laktamazlar (IBL) disk yaklaşım tekniği ile saptanmıştır. Ayrıca GSBL'lar izoelektrik odaklama yöntemiyle tiplendirilmiştir. Tüm suşların %97.2'sinin amikasine, %74.5'inin siprofloksasine duyarlı, %79.0'unun ampisiline dirençli olduğu bulunmuş, imipeneme sadece *P.aeruginosa*'ların %8.3'ünde direnç olduğu saptanmıştır. *E.coli* suşlarının 6'sında (%11.5), *Klebsiella* suşlarının 7'sinde (%31.8), *P. aeruginosa* suşlarının 2'sinde (%9.0) GSBL, *Klebsiella*'ların 2'sinde (%9.0) ve *P. aeruginosa*'ların 23'ünde (% 63.8) ise IBL saptanmıştır. Çift disk sinerji testi ile GSBL saptanmış olan bu izolatların beta-laktamaz enzimleri saflaştırılarak izoelektrik odaklama yöntemi ile tanımlanmaları sonunda, suşların tümünde TEM-1 (pI: 5.4) ve SHV-2-6 pI (pI: 7.6) benzeri enzimler saptanmıştır. Ayrıca *Klebsiella* suşlarının 3'ünde bunlara ek olarak TEM-4, 7, 8 (pI: 5.9) benzeri enzim bulunurken, *P.aeruginosa* suşlarının ise birinde SHV-14, OXA-21, 22 (pI: 7.0) benzeri enzimler tanımlanmıştır. Sonuç olarak, hastanemizde imipeneme dirençli suşların bulunması önemlidir. Hastane infeksiyonu etkenlerinin beta-laktamaz varlığı yönünden araştırılması, direnç profillerinin belirlenerek, doğru antibiyotik kullanımının uygulanması gerekmektedir.



P16 BİR EĞİTİM HASTANESİNİN YOĞUN BAKIM ÜNİTESİNDE TEK KLON ACINETOBACTER BAUMANNII'NİN YAYILIMI

Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van
Görkem YAMAN, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van
Rıza DURMAZ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Zeynep ÇİZMECİ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Anabilim Dalı, Malatya
Mustafa BERKTAŞ, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van

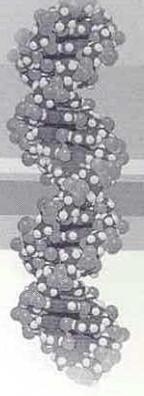
Acinetobacter baumannii, özellikle yoğun bakım ünitesinde yatan hastalar ile immün yetersizliği olan kişilerde en sık rastlanan oportunistik nozokomiyal patojendir. Hastanemiz yoğun bakım ünitesinden gelen çeşitli bronşiyal aspirat örneklerinde *A.baumannii*'nin üremesi üzerine, bir salgın olabileceğinden şüphelenilmiş ve bu üniteye salgına yönelik tarama yapılmasına karar verilmiştir. Yoğun bakım ünitesinde, 11'i klinik örneklerden ve 15'i çevreden olmak üzere izole edilen toplam 26 *A.baumannii* izolatını tiplendirebilmek için antibiyogram, "Pulsed Field" jel elektroforezi (PFGE) ve "Arbitrarily Primed" polimeraz zincir reaksiyonu (AP-PCR) uygulanmıştır. Antibiyotiplendirmeye göre 26 izolatın 24'ü epidemiyolojik olarak ilişkili, ikisi ise ayrı birer grup olarak değerlendirilirken, AP-PCR' a göre suşların 21'i aynı grupta geriye kalan 5 izolat ise diğer grupta toplanmıştır. PFGE'ye göre ise tüm suşlar aynı bant profilini göstermişlerdir. Sonuç olarak, referans yöntem olarak kabul ettiğimiz PFGE'e göre, yoğun bakım ünitesinde meydana gelen salgında izole edilen tüm *A.baumannii* suşlarının tek tip kökenden kaynaklandığı kanısına varılmıştır.



P17 ERİŞKİN VE ÇOCUK İSHALLERİNDE ENTEROTOKSİJENİK BACTEROIDES FRAGILIS'İN ÖNEMİ

Mehmet DALGALAR, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Bengül DURMAZ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

Son 20 yıldan beri *Bacteroides fragilis*'in enterotoksin salgılayan suşlarının hayvanlarda olduğu gibi, insanlarda da ishal ve kronik barsak hastalıkları ile ilişkisi olduğuna dair çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışma, yöremizde çocuk ve erişkin ishalleri ile enterotoksijenik *B. fragilis* (ETBF)'in ilişkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır. İshal şikayeti olan 221 hasta ve sağlıklı kontrol olarak 197 kişiden alınan dışkı örneklerinde nested-polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile *B. fragilis*'in enterotoksin geni (bft) araştırılmıştır. Hastaların 22'sinde (%9.9) ve sağlıklı kontrollerin 23'ünde (%11.6) ETBF pozitifliği saptanmıştır. Enterotoksijenik *B. fragilis*; 0-12 aylık hasta grubunda 1 (%2.2), 1-5 yaş grubunda 11 (%25), 6-16 yaş grubunda 1 (%3.6) ve 16 yaşından büyük grupta 9 (%8.7) hastada pozitif olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda ise aynı yaş gruplarında ETBF dağılımının sırasıyla; 1 (%2.4), 4 (%9.5), 3 (%15.8) ve 15 (%15.8) olduğu izlenmiştir. Sonuç olarak, ishal vakalarında 1-5 yaş arası çocuklarda ETBF, hem diğer yaş gruplarındaki ishal şikayeti olanlara göre, hem de aynı yaş grubundaki sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek oranda saptanmıştır ($p < 0.001$ ve $p < 0.05$).



P18 CHRYSEOBACTERIUM INDOLOGENES SEPSİSİ OLAN BİR VAKADA KAYNAĞIN MOLEKÜLER YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI

Mehmet Refik BAYRAKTAR, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Elif AKTAŞ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Yasemin ERSOY, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Malatya
Rıza DURMAZ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Ayşegül ÇİÇEK, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

Chryseobacterium spp. su kaynaklarında ve hastane ortamında yaşayabilen Gram negatif bakterilerdir. Yenidoğan ünitelerinde nadiren enfeksiyona ve salgınlara yol açabilmektedirler. Bu çalışmada, *C.indologenes* sepsisi olan Down sendromlu bir vakadan izole edilen suş ile kaynak araştırması sırasında elde edilen suşlar arasındaki klonal ilişkinin saptanması amacıyla moleküler tiplendirme yapılmıştır. Down sendromlu, atrial septal defekti olan beş aylık bir erkek çocuk, diafragma herniasi nedeniyle çocuk cerrahisi kliniğinde opere edilmiştir. Postoperatif 7. gün gelişen akciğer enfeksiyonu dolayısıyla entübe edilen hastanın, entübasyonun 6. günü alınan kan kültüründe *C.indologenes* üretilmiştir. Bunun üzerine teikoplanin ve amfoterisin B almakta olan hastanın tedavisi, vankomisin ve siprofloksasine değiştirilmiştir. Enfeksiyon kontrol komitesinin katkısı ile yapılan kaynak taramasında; hastanın kan kültürü, besleme biberonu, beslenme solüsyonunun hazırlanmasında kullanılan distile su, servisin diğer noktalarında kullanılan distile su ile hasta odasının musluğu, servis musluğu ve nazogastrik beslenme torbasında *C.indologenes* üretilmiştir. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon metodu ile belirlenmiş, kan kültürü izolatlarının seftazidim, amikasin, gentamisin, piperasilin, teikoplanin, sefoperazon-sulbaktam, sefepim, oflaksasin ve vankomisine duyarlı; seftizoksime az duyarlı; meropenem, imipenem, seftriakson, tobramisin ve aztreonama dirençli olduğu saptanmıştır. Distile suların imha edilmesi ve dezenfeksiyon işlemlerinin yeniden düzenlenmesi sonucu, üniteye yeni vakaların ortaya çıkması önlenmiştir. Ancak vaka tedavinin 9. günü kaybedilmiştir. Hastanın üç kan izolatu ve kaynak taraması sırasında elde edilen altı suşun "Arbitrarily Primed" polimeraz zincir reaksiyonu (AP-PCR) ile yapılan moleküler tiplendirmesinde; besleme biberonu ve beslenme solüsyonunun hazırlanmasında kullanılan distile sudan izole edilen iki suşun kan kültürü suşu ile aynı olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bu vakada moleküler tiplendirme ile etkenin distile su kaynağından bulaştığı ve diğer suşların vaka ile bağlantısız olduğu tespit edilmiştir.



P19 EFÜZYONLU OTİTİS MEDIA'LI ÇOCUKLARDA BAZI HERPESVİRUSLAR ve BAKTERİYEL ETKENLERİN VARLIĞI

Yasemin BULUT, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ

Turgut KARLIDAĞ, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, Elazığ

Aykut ÖZDARENDELİ, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ

Zülal AŞÇI TORAMAN, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ

Erol KELEŞ, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, Elazığ

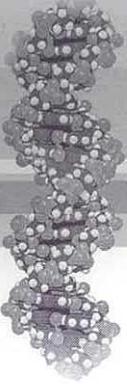
Bu çalışmada, efüzyonlu otitis media'lı çocuklarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile bazı herpesvirusların ve bakteriyel etkenlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya Haziran-Aralık 2003 tarihleri arasında Fırat Üniversitesi, Fırat Tıp Merkezi Kulak Burun Boğaz polikliniğine başvuran ve efüzyonu olan otitis media'lı (OME) toplam 38 çocuk dahil edilmiştir. Bu hastalardan Myringotomi operasyonu ile alınan toplam 55 örneğin tamamında DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bunlara herpesvirus [Herpes simplex virus (HSV), Cytomegalovirus (CMV), Varicella-Zoster virus (VZV) ve Epstein-Barr virus (EBV)] ve bakteri [H.influenza, S.pneumonia ve M.catarrhalis] genomlarına özgül primerler kullanılarak PCR uygulanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri %3'lük agaroz jelde etidyum bromür boyama ile gösterilmiştir. PCR sonuçlarına göre, yaşları 2-12 arasında değişen 38 çocuktan alınan toplam 55 örnekten 9'unda (%16.3) EBV, 5'inde (%9.09) HSV, 4'ünde (%7.2) CMV ve 2'sinde (%3.6) VZV olmak üzere toplam 20 (%36.3) örnekte herpesvirus varlığı belirlenmiştir. Aynı örneklerin bakteriyel yönden değerlendirilmesiyle de; 16'sında (%29) S.pneumonia, 15'inde (%27) H.influenza ve 8'inde (%14) M.catarrhalis pozitifliği saptanmıştır. Çalışmamızın verilerine göre, OME'li hastalarda yüksek oranda bakteriyel patojenler ve herpesviruslar tespit edilmiştir. OME'li hastalarda immün sistemin zayıflaması ile aktive olan bu latent herpesvirusların bakteriyel etkenlerle birlikteliğinin hastaların iyileşme ve tedavi sürecini etkilediği dikkate alındığında, elde edilen sonuçlar önemli bulunmuştur.



P20 AORTA-İLİAK TIKAYICI DAMAR HASTALIĞI OLAN BİREYLERDEN ELDE EDİLEN ATEROSKLEROTİK PLAKLARDA CHLAMYDIA PNEUMONIAE VE HELICOBACTER PYLORI VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

İslam KAKLIKKAYA, K.T.Ü. Tıp Fakültesi Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, Trabzon
Faruk AYDIN, K.T.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon
Neşe KAKLIKKAYA, K.T.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon
Kurtuluş BURUK, K.T.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon
İlknur TOSUN, K.T.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon
Metin SANCAKTAR, K.T.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon
Didem TIĞDAŞ, K.T.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon
Uğur DİNÇ, K.T.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon

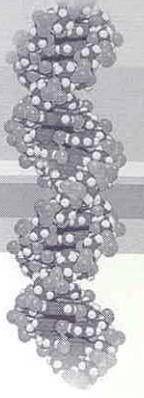
Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda kronik enfeksiyonların aterosklerozun başlaması ve ilerlemesi üzerine etkili olduğunu düşündüren çeşitli bulgular dikkati çekmektedir. Elde edilen verilerin çoğu koroner arter hastalığı ile ilgilidir. Bu çalışmanın amacı, kronik enfeksiyon etkenlerinden olan Chlamydia pneumoniae ve Helicobacter pylori'nin aorta-iliak, aterosklerotik tıkaçıcı damar hastalıkları oluşumunda risk faktörü olup olmadığının araştırılmasıdır. Aorta-iliak tıkaçıcı damar hastalığı nedeniyle opere edilen 21 hastadan (19 erkek, 2 kadın), operasyon esnasında, steril şartlar altında aterosklerotik plaklar alınmış, aynı hastalardan operasyondan hemen önce kan örnekleri toplanmıştır. Herbir aterosklerotik plakta C.pneumoniae ve H.pylori DNA'sının varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır. Tüm aterosklerotik plaklarda ticari bir ELISA kiti kullanılarak gruba özgül klamidyal lipopolisakkarit (LPS) antijenlerinin varlığı da test edilmiştir. Hastalardan elde edilen serum örneklerinde klamidyal LPS'e karşı oluşan IgG antikorları, ticari bir ELISA kiti ile, H. pylori'ye karşı oluşan IgG antikorları ise in-house ELISA sistemi ile araştırılmıştır. Toplam 21 aterosklerotik plağın 6'sında C.pneumoniae DNA'sı tespit edilirken, hiçbir örnekte H.pylori DNA'sına rastlanmamıştır. Beş aterosklerotik plakta klamidyal LPS antijen varlığı belirlenmiş, bu örneklerin 4'ünde C.pneumoniae DNA'sının da pozitif olduğu izlenmiştir. C. pneumoniae DNA'sı tespit edilen tüm hastalarda klamidyal LPS IgG antikorları pozitif bulunmuştur.



P21 NOZOKOMİYAL ENTEROBACTER SUŞLARININ PLAZMİD VE ERIC-PCR PATERNLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Osman Birol ÖZGÜMÜŞ, K.T.Ü. Rize Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Rize
Metin SANCAKTAR, K.T.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon
Kurtuluş BURUK, K.T.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon
Neşe KAKLIKKAYA, K.T.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikr obiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon
İlknur TOSUN, K.T.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon
Faruk AYDIN, K.T.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon
Yelda YAZICI, K.T.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon
Kemalettin AYDIN, K.T.Ü. Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları Kliniği, Trabzon

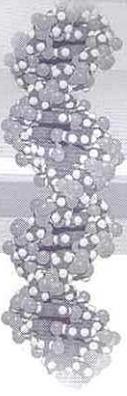
Barsak florasında bulunan Gram negatif enterik bakterilerin bir elemanı olan *Enterobacter* türleri, günümüzde eski yıllara oranla hastane infeksiyonu etkeni olarak daha fazla karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada K.T.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Nisan 2002 - Nisan 2003 tarihleri arasında hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen 77 *Enterobacter* izolatının moleküler epidemiyolojisi araştırılmıştır. İzole edilen *Enterobacter* türleri ve izolat dağılımı şu şekildedir: *E.cloacae* 41, *E.aerogenes* 29, *E.sakazakii* 4, *E.agglomerans* 2 ve *E.bergoviae* 1. Alkali lizis yöntemi kullanılarak 77 izolatın 33'ünden plazmid izolasyonu yapılmış ve bunların dağılımının *E.cloacae* 16, *E.aerogenes* 13, *E.sakazakii* 1, *E.agglomerans* 2 ve *E.bergoviae* 1 olduğu belirlenmiştir. *E.cloacae* izolatlarından plazmid izole edilen 16 izolatın bant paternleri incelendiğinde; benzer suşlar ikişerli olmak üzere 4 grup oluşurken 8 tanesi gruplandırılmamıştır. Diğer türlerde benzer plazmid paternleri gözlenmemiştir. Çalışmaya alınan 77 izolatın ERIC-PCR sonuçları incelendiğinde, *E.cloacae*'da 41 izolatın 19 tanesi 7 grupta toplanmıştır. Gruplarda benzer paternler gösteren 2-4 suş vardır. *E. aerogenes*'de herbiri ikişer suş içeren 5 grup oluşmuştur. *E.sakazakii* ve *E.agglomerans* suşlarının ERIC-PCR paternlerinde benzerlikler saptanamamıştır. Plazmid grupları ve ERIC-PCR grupları karşılaştırıldığında, *E.cloacae*'da oluşan gruplardan ikisinde izolatların benzer plazmid paterni gösterdiği saptanmıştır. *E.aerogenes* suşlarının ERIC-PCR ile oluşan grupları incelendiğinde I. ve II. gruptaki izolatların kendi içinde aynı servislerden gelen izolatlar olduğu görülmüştür. Hastanemizde enterobakter türleri ile oluşan önemli bir salgın saptanamamıştır.



P 22 DNA DİZİ ANALİZİ İLE KLİNİK ENTEROBACTERIACEAE İZOLATLARINDA GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU SHV-2, SHV-5 VE SHV-12 BETA LAKTAMAZLARININ GÖSTERİLMESİ

Hüseyin TAŞLI, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Bilim Dalı, İzmir
İ. Hakkı BAHAR, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL), her geçen gün artan sayılarıyla sorun oluşturmaya devam etmektedirler. Türkiye’de bu enzimlerin moleküler tipleri ile ilgili veriler sınırlıdır. Bu çalışmada, DNA dizi analizi ile TEM ve SHV ailelerine ait GSBL’lerin spesifik tiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için, Dokuz Eylül Üniversite Hastanesinde klinik örneklerden soyutlanan toplam 28 GSBL pozitif Enterobacteriaceae izolatu çalışmaya alınmıştır. PCR ve PCR-restriksiyon analizi yöntemleri kullanılarak SHV-GSBL varlığı belirlenmiş olan SHV taşıyan 16, SHV ve TEM taşıyan 12 olmak üzere 28 izolatu DNA dizi analizi yapılmıştır. Çift yönlü dizileme sonucunda 4 suşta SHV-2, 14 suşta SHV-5 ve 10 suşta SHV-12 saptanmıştır. TEM enzimlerinin ise tamamının TEM-1 olduğu görülmüştür. Önceki çalışmalarımız da göz önüne alındığında, hastanemiz Enterobacteriaceae izolatlarında SHV tipi GSBL’lerden sadece SHV-2, SHV-5 ve SHV-12’nin yaygın olduğu sonucuna varılmıştır.



P23 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU YÖNTEMİYLE SAPTANAN BORDETELLA PERTUSSIS İNFEKSİYONU OLGULARI

Kenan MİDİLLİ, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Yücel TAŞTAN, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul

Melda ÖZDAMAR, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Gökhan AYGÜN, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Kemal ALTAŞ, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

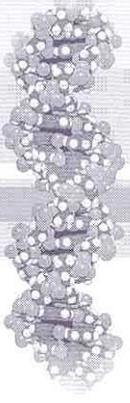
Bordetella pertussis uzun yıllardır çocukluk çağı rutin aşı programında yer almasına rağmen toplumda hala varlığını sürdürmektedir. Son yıllarda erişkinlerde tipik boğmaca kliniği dışında uzamış öksürüğe neden olduğuna ilişkin pek çok çalışma vardır. Adölesan ve yaşlılar arasında salgınlar da bildirilmektedir. B.pertussis infeksiyonları aşılanmış büyük çocuklarda da görülebilmektedir. Bu yaş gruplarındaki infeksiyonlar süt çocukları için risk oluşturmaktadır. Her ne kadar laboratuvar tanısında kabul edilmiş standart bir yöntem olmasa da, nazofarenks sürüntü örneklerinde B.pertussis DNA'sının saptanmasında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi oldukça duyarlı ve özgüldür. Bu çalışmada, Temmuz- Eylül 2003 tarihleri arasında laboratuvarımıza uzamış öksürük nedeniyle gönderilen 12 hastaya ait nazofarenks sürüntü örneğinde B. pertussis DNA'sının PCR yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır. Hastaların yaş aralığı <1-76 yıl olup, yaş ortalaması 15.64'dür. Beşi erkek, 7'si kadın olan hastaların ikisi kardeştir. Sonuç olarak 4 hastada B.pertussis DNA'sı pozitif bulunmuş, bunların sırasıyla 6, 4, 30 ve 2 yaşlarında olduğu belirlenmiştir. Hasta sayısı kısıtlı olmakla birlikte elde edilen bu sonuçlar, uzamış öksürük yakınması olan kişilerde B.pertussis'in gözardı edilmemesini ve bu açıdan tanıya yönelik incelemelerin gerekli olduğunu işaret etmektedir.



P24 ARTRİTLİ HASTALARIN EKLEM SIVILARINDA MYCOPLASMA FERMENTANS SIKLIĞININ NESTED PCR YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Ali ALBAY, GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Abdullah KILIÇ, GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Ahmet ÖZGÜL, GATA Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, Ankara
Özgül KISA, GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

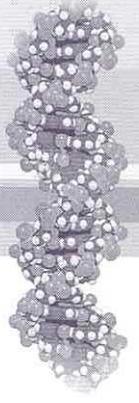
İnflamatuvar romatizmal hastaların, özellikle de romatoid artrit nede ni tam olarak bilinmemekle birlikte, bakteriyel faktörleri de içine alan bazı çevresel faktörlerin tetiklemesi ile oluştuğu düşünölmektedir. Mikoplazmalar, hayvanlardaki artritlerin en önemli nedenlerinden birini oluşturmakta, insanlarda da artrit ile ilişkili olduğuna dair yirmi yıldan beri görüşler bulunmaktadır. Özellikle immünkompromize hastalarda mikoplazma artrit i sık olarak ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmanın amacı, artritli değişik hasta gruplarından (6 reaktif artrit, 3 osteoartrit, 2 seronegatif artrit, bir romatoid artrit) steril şartlarda alınan eklem sıvılarında M.fermentans sıklığının araştırılmasıdır. Çalışmamızda artritli toplam 48 hastanın 12'sinin (%25) eklem sıvısında nested PCR yöntemi ile M.fermentans varlığı saptanmıştır. Bulgularımız, artritli hastalarda M.fermentans'ın birlikte bulunabileceği görüşünü desteklemektedir.



P25 MİDE BİYOPSİ ÖRNEKLERİNDE HELICOBACTER PYLORI KLARİTROMİSİN DİRENCİNİN MOLEKÜLER "BEACON" İLE SAPTANMASI

Meltem Yalınay ÇIRAK, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Doruk ENGİN, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Özgür DOĞAN, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Tarkan KARAKAN, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı, Ankara
Selahattin ÜNAL, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı, Ankara
Sevgi TÜRET, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Şükrü DUMLU, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı, Ankara

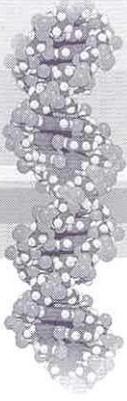
Klaritromisin, *Helicobacter pylori* eradikasyon tedavisinde en sık kullanılan ilaçlardan biridir. Bu ilaca direnç, tedavide başarısızlığın en önemli nedenleri arasında sayılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, mide biyopsi materyallerinde *H.pylori* varlığını ve makrolid direncinden sorumlu tutulan 23S rDNA mutasyonlarını moleküler "beacon" kullanarak hızlı ve güvenilir olarak saptamaktır. Bu amaçla, dispeptik yakınmaları olan 103 hastadan üst gastrointestinal endoskopi ile alınan mide biyopsi örneklerinden ticari kit kullanılarak DNA saflaştırılmıştır. Örneklerde *H.pylori* DNA'sı varlığı ve klaritromisin direncinden sorumlu mutasyonlar, grubumuzca geliştirilen moleküler "beacon" sistemi ile ABI Prism 7700 cihazı kullanılarak araştırılmıştır. Test edilen 103 örnekten 75'inde (%72.8) *H.pylori* DNA'sı saptanmıştır. Bunlardan 64'ü (%85.3) klaritromisine duyarlı genotipte bulunurken, 11'inde (%14.7) dirençle ilişkili mutasyonların varlığı tespit edilmiştir. Dirençli *H.pylori* saptanan 11 örnekten üçünde klaritromisine dirençli ve duyarlı hücrelerin bir arada olduğu saptanmıştır. Moleküler "beacon" sistemi mide biyopsi örneklerinde *H.pylori* varlığının araştırılması ve klaritromisin direnciyle ilişkili mutasyonların saptanması için hızlı ve güvenilir bir yöntemdir.



P26 ÇOCUK HASTALARDA HELICOBACTER PYLORI KLARİTROMİSİN DİRENCİNİN SAPTANMASI

Yakut AKYÖN YILMAZ, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Serdar TUNCER, Metis Biyoteknoloji Ltd, Ankara
Hülya DEMİR, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı Gastroenteroloji Ünitesi, Ankara
Müge MISIRLIOĞLU, Metis Biyoteknoloji Ltd, Ankara
Yusuf USTA, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı Gastroenteroloji Ünitesi, Ankara

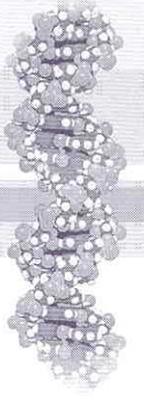
Helicobacter pylori'nin özellikle ülkemizde ve diğer gelişmekte olan ülkelerde çocukluk çağında bulaştığı, bu nedenle de çocukluk çağı hastalığı olduğu söylenebilir. Çocuk hastalarda *H.pylori* tedavisinde ilk seçenek antibiyotiklerden birisi klaritromisindir. Nokta mutasyonlarına bağlı olarak gelişen klaritromisin direnci varlığında tedavi başarısızlığı ve zaman kaybı oluşmaktadır. Bu çalışmanın amacı, *H.pylori* varlığını ve klaritromisin direncini direk biyopsi örneğinden bir aşamalı test kullanarak hızlı saptayabilmek ve klaritromisin direncinin çocuk hasta grubundaki oranını belirlemektir. Çalışmaya, toplam 34 *H.pylori* suşu ve 179 biyopsi örneği dahil edilmiştir. Biyopsi örneklerinin kültür ve hızlı üreaz testleri yapılmıştır. İzole edilen bakterilerde agar dilüsyon veya E-test yöntemleri ile fenotipik klaritromisin direnci belirlenmiştir. Biyopsi örneklerinden elde edilen DNA'lar *H.pylori* klaritromisin direncinden sorumlu mutasyonları içeren 23S rRNA bölgesine özgül primerler ve mutasyonlara özgül floresan işaretli probalar kullanılarak LightCycler (Roche Diagnostics, Almanya) real time polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) cihazında amplifiye edilmiş ve PCR-erime eğrisi sonuçları LC Versiyon 3.5.3 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuç olarak, 34 suşun 14'ünde (%41.2) klaritromisin direnci saptanmış, elde edilen sonuç agar dilüsyon ve E-test sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. *H.pylori*, toplam 179 biyopsi örneğinin 150'sinde PCR ile, 102'sinde ise kültür ile pozitif olarak saptanmıştır. Hızlı üreaz testi ile PCR sonuçları uyumlu bulunmuştur. Yüzelli örneğin 41'inde (%27.3) klaritromisin direnci saptanmıştır. *H.pylori* suşlarında yüksek oranda saptanan yüksek direncin nedeni, klaritromisin dirençli suşların daha fazla seçilmesinden kaynaklanmakta olup, gerçek direnç oranıyla ilgisi olduğu düşünülmemiştir. Hasta grubumuzda saptanan direnç, diğer sonuçlarla uyumlu bulunmuştur. Dolayısıyla, geliştirilen bu testin *H.pylori*'nin tanısında ve klaritromisin direncinin saptanmasında hızlı ve güvenilir bir test olduğu ve özellikle çocukluk çağı *H.pylori* enfeksiyonunun tedavisinden önce uygulanarak doğru tedavinin seçilmesini sağlaması açısından yararlı bir test olduğu söylenebilir.



P27 KORONER ARTER HASTALARININ ATEROSKLEROTİK PLAKLARINDA VE MONONÜKLEER KAN HÜCRELERİNDE CHLAMYDIA PNEUMONIAE DNA'SININ NESTED PCR İLE GÖSTERİLMESİ

Meltem Yalınay ÇIRAK, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Erkan İRİZ, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, Ankara
Özgür DOĞAN, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Doruk ENGİN, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Hakan ZOR, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, Ankara
Sevgi TÜRET, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Son yıllarda aterosklerotik hastalıkların gelişiminde kronik infeksiyonların rolü üzerinde durulmaktadır. İnflamasyonun aterosklerotik olaylara neden olduğu ve aterosklerozun makrofajların rol oynadığı kronik inflamatuvar bir hastalık olduğu düşünülmektedir. Alt ve üst solunum yolu infeksiyonlarına yol açan zorunlu bir hücre içi mikroorganizma olan Chlamydia pneumoniae kronik infeksiyonlara neden olmaktadır. Yapılan birçok çalışma C.pneumoniae ile aterosklerotik kalp hastalıkları arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. Bu çalışmada, koroner kalp hastalarındaki C.pneumoniae DNA'sının koroner arter aterosklerotik plaklarında ve mononükleer kan hücrelerinde nested PCR (nPCR) yöntemi ile gösterilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya 42 hastanın kan, aterosklerotik koroner arter plakları ve sağlıklı damar dokuları dahil edilmiştir. Kan ve doku örneklerinden DNA eldesinden sonra, nPCR C.pneumoniae major dış membran proteinlerinden elde edilen primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kırk iki hastanın kan mononükleer hücre örneklerinin 4'ünde (%9.5), aterosklerotik koroner arter plaklarının 5'inde (%11,9) C.pneumoniae DNA pozitifliği saptanmıştır. Pozitif saptanan bu hastaların sadece 2'sinde hem kan mononükleer hücre örneklerinde hem de aterosklerotik koroner arter plaklarında aynı anda C.pneumoniae DNA pozitifliği (%4.7) bulunmuştur. Sağlam dokuların hiçbirinde pozitiflik saptanmamıştır. C.pneumoniae'nin mononükleer kan hücrelerinde nPCR ile gösterilmesi koroner kalp hastalığı açısından risk altında olan bireylerde duyarlı sonuç alınabileceğini ortaya koymaktadır. Ancak elde edilen sonuçlar aterosklerotik koroner arter plakları örnekleri ile birlikte değerlendirme yapmanın daha doğru olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra mononükleer kan hücrelerinde C.pneumoniae DNA pozitifliği saptanan risk grubundaki hastaların izlenmesi gerektiği de düşünülmektedir.



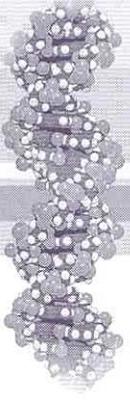
P28 LABORATUVARIMIZDAKİ ÇAPRAZ KONTAMİNASYONA BAĞLI YALANCI KÜLTÜR POZİTİFLİKLERİNİN OUT-PCR YÖNTEMİ İLE DOĞRULANMASI

Gülnur TARHAN, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara

İsmail CEYHAN, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara

Fatih OCAK, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara

Laboratuvar işlemleri sırasında oluşan çapraz kontaminasyonlar, yalancı kültür pozitifliğinin en önemli nedenlerinden biridir. Çapraz kontaminasyonların hızlı ve güvenilir bir şekilde belirlenmesi, klinik olarak aktif tüberküloz düşünülmeyen hastalarda gereksiz yere tedavi uygulanmasını ve tedaviye bağlı olarak gelişebilecek komplikasyonları önleyebilir. Mycobacterium tuberculosis suşlarının genotiplendirilmesinde kullanılan moleküler yöntemler (IS 6110 RFLP, spoligotyping, VNR), laboratuvar çapraz kontaminasyonlarının belirlenmesinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu testlerin maliyetlerinin yüksek olması, uzun zaman alması, ileri düzeyde laboratuvar donanımı ve deneyim gerektirmesi gibi nedenlerle pratik laboratuvar uygulamalarında kullanımları sınırlıdır. Dolayısıyla pratik ve daha kısa sürede sonuç veren yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, laboratuvarımızda üç ayrı dönemde ortaya çıkan çapraz kontaminasyon şüpheli üç grup örnek serisi (toplam 19 M.tuberculosis suşu) OUT-PCR yöntemi ile değerlendirilmiştir. İki örnek grubunun çevresel kontaminasyon, bir örnek grubunun ise laboratuvar uygulamaları sırasında pozitif örnekten kontamine olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, OUT-PCR yönteminin laboratuvar kaynaklı çapraz kontaminasyonları belirlemede kullanılabilir hızlı ve uygulanması pratik bir yöntem olduğu görüşüne varılmıştır.



P29 SALMONELLA TYPHIMURIUM SUŞLARININ ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK TESTLERİ VE MOLEKÜLER METOTLAR İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Belkis LEVENT, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ankara

Fügen DURLU ÖZKAYA, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ankara

Revasiye KAYALI, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ankara

Eşe Aslan BAŞBULUT, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ankara

Berrin ESEN, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ankara

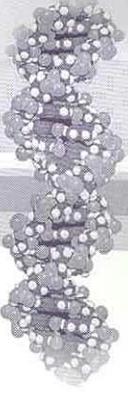
Salmonella enterica serotip Typhimurium (*S. Typhimurium*) ülkemizde ve dünyada yaygın olarak izole edilen Salmonella serotiplerinden biri olup, sıklıkla çoklu ilaç direnci göstermesi nedeniyle halk sağlığı açısından önem taşımaktadır. Bu çalışmada, farklı dönemlerde çeşitli kaynaklardan izole edilen *S. Typhimurium* suşlarının fenotipik ve genotipik metotlar kullanılarak tiplendirilmeleri amaçlanmıştır. Enterik Patojenler Laboratuvarı'nda izole edilen ve tanımlanan 13 suş ile Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu'nda yer alan 3 adet *S. Typhimurium* suşu (10'u insan, 2'si hayvan ve 4'ü gıda kaynaklı) tiplendirmeye alınmıştır. Antimikrobiyal duyarlılık testi disk difüzyon metodu ile ampisilin, kloramfenikol, gentamisin, kanamisin, streptomisin, amikasin, tetrasiklin, trimetoprim, trimetoprim/sülfametoksazol, siprofloksasin, nalidiksik asid, sefalotin, sefuroksim, sefoperazon, seftizoksim ve sefotaksim için uygulanmış ve sonuçlar NCCLS kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Plazmid DNA, Kado ve Liu metoduna göre izole edilmiş, genomik DNA "Pulsed Field Gel Electrophoresis" (PFGE) için standart prosedürlere göre hazırlanmıştır. Tek bant farklılığının değişik bir PFGE paternini gösterdiği kabul edilerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, tüm suşların 3'ü test edilen antibiyotiklerin tümüne duyarlı iken, 11'inin dört ya da üzerinde antibiyotiğe çoklu ilaç direnci gösterdiği saptanmış, kinolonlara karşı direnç bulunmamıştır. PFGE yöntemiyle, 9 plazmid ve 11 pulslu alan tipi belirlenmiştir. *S. Typhimurium* suşlarının tiplendirilmesinde PFGE metodu ile birlikte antimikrobiyal duyarlılık testleri ve plazmid profil tiplendirmesi gibi kolay uygulanabilir fenotipik ve genotipik metotların kullanılması, değişik suşların epidemiyolojik amaçlarla ayırımında yarar sağlamaktadır. *S. Typhimurium* suşlarındaki antimikrobiyal direnç, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli sorunlardan birini teşkil ettiğinden, ülkemizin değişik bölgelerinden ve değişik kaynaklardan izole edilen suşların karşılaştırılarak tiplendirilmeleri, bu ajanın ülkemizdeki durumuna ışık tutmak açısından büyük önem taşımaktadır.



P30 FARKLI BAKTERİ VE MANTAR TÜRLERİNİN ALT TIPLENDİRİLMESİ İÇİN ORTAK BİR "ARBITRARILY PRIMED" POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU PROTOKOLÜ

Barış OTLU, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Rıza DURMAZ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Elif AKTAŞ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Zeynep ÇİZMECİ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

Etken organizmanın bulaş kaynağının tespiti ve hastalıkların epidemiyolojik olarak ilişkilerinin belirlenmesinde kullanılan moleküler tiplendirme yöntemlerinin sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Bu yöntemler arasından hangisinin seçileceği; yöntemin ayırım gücü, tekrarlanabilirliği, kullanım kolaylığı, maliyeti, testin süresi ve yorumlama kolaylığı gibi bazı kriterler göz önüne alınarak karar verilir. Çoğu mikroorganizma için, bu özelliklerin tamamını karşılayan ideal bir tiplendirme yöntemi henüz yoktur. Epidemiyolojik tiplendirme amacıyla en sık başvurulan yöntemlerden biri olan "Arbitrarily Primed" polimeraz zincir reaksiyonu (AP-PCR) ile, DNA baz diziliminin bilinmesine bağlı olmadan seçilen bir veya daha fazla primerle DNA çoğaltılır ve ortaya çıkan patern farklılıkları değerlendirilir. Bu yöntemin özgüllük ve duyarlılığı, kullanılan primerler, amplifikasyon karışımının içeriği, ısı döngüleri, elektroforez koşulları ve sonuçların yorumlanmasında kullanılan kriterlerden önemli ölçüde etkilenmektedir. Bu sorunlar optimize edilmiş bir protokolün izlenmesiyle giderilebilir. Bu amaçla, M13 primeri (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3'), tek bir amplifikasyon karışımı ve amplifikasyon programında farklı mikroorganizmalar için denenmiştir. Çalışmada, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cryobacterium meningosepticum*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus spp.* ve *Candida spp.* tiplendirilmiş ve DNA eldeleri, her mikroorganizmaya özgü yöntemlerle yapılmıştır. Amplifikasyon başına; 100 ng DNA, 1X amplifikasyon tamponu, 0.4 mM dNTP karışımı, 4 mM MgCl₂ ve 2.5 U Taq DNA polimeraz enzimi kullanılmıştır. Amplifikasyon programı; ilk 2 döngü için sırasıyla 94oC, 40oC ve 72oC'de beşer dakika, sonraki 40 döngü için; 94oC'de 1 dakika, 40oC'de 1 dakika ve 72oC'de 2 dakika halinde uygulanmıştır. Elektroforezde her mikroorganizma için tiplendirmeyi sağlayacak sayıda (5-21) DNA bandı elde edilmiştir. Salgın izolatlarında AP-PCR sonuçları ile "Pulsed Field" jel elektroforezi sonuçları arasında yüksek oranda paralellik belirlenmiştir. Sonuç olarak uygulanan bu protokol, özellikle salgın izolatlarının klonal ilişkisini ortaya koymada başarılı, uygulaması kolay, maliyeti düşük ve kısa sürede sonuç veren bir protokol olarak belirlenmiştir.



P31 İÇME SULARINDAN İZOLE EDİLEN AEROMONAS SUŞLARININ "ARBITRARILY PRIMED" POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

- G. EMEKDAŞ, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin
G. ASLAN, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin
S. TEZCAN, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin
Ç. YILDIZ, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin
H. ÖZTURHAN, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin
R. DURMAZ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

Aeromonas'lar, toprak, tatlı ve hafif tuzlu sular, lağım ve atık suları gibi doğal ortamlarda yaygın olarak bulunmaktadır. *A. hydrophila*, insanlarda enterit, ekstraintestinal ve yara infeksiyonlarının etkeni olarak karşımıza çıkabilir. *Aeromonas* türlerinin neden olduğu su kaynaklı olduğu düşünülen salgınlar bildirilmektedir. Ancak insanlarda su kaynaklı *Aeromonas* infeksiyonlarının gelişimi halen tartışmalıdır. Bu çalışmada, Mersin ili su dağıtım sistemlerinde *Aeromonas* cinsi bakterilerin dağılımı ve genotipik benzerliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, ilimizin çeşitli semtlerden toplanan 148 musluk suyu örneği dahil edilmiş, örnekler usulüne uygun olarak alınmış ve laboratuvara ulaştırılmıştır. *Aeromonas* ve *Vibrio* türleri açısından incelenmek üzere alkalen peptonlu su (pH 8.6) besiyerinde 35-37°C'de 24 saatlik inkübasyonu takiben, 10 µg/ml ampisilin içeren kanlı agara ve TCBS (thiosulphate, citrate, bile, sucrose) agar besiyerine pasaj yapılmıştır. 35-37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra üreyen kolonilerden Gram negatif, hemoliz yapan, oksidaz ve katalaz pozitif olanlar değerlendirilmiştir. Tanımlama için, klasik biyokimyasal testlerle birlikte API ID 20E paneli (BioMerieux, France) de kullanılmıştır. Klasik yöntemle, *Aeromonas* şüpheli 6 izolatın 5'i *A. hydrophila*, biri ise *Vibrio fluvialis* olarak tiplendirilirken, API 20E panelinde izolatların hepsi *A. hydrophila* olarak sonuç vermiştir. Bu suşların epidemiyolojik ilişkileri "Arbitrarily Primed" polimeraz zincir reaksiyonu (AP-PCR) ile araştırılmıştır. Sonuç olarak, 148 musluk suyu örneğinin 6'sında (%4) saptanan *Aeromonas* cinsi bakterilerin, birbirine yakın bölgelerden alınan örneklerden izole edilmiş olması benzer genotipe sahip olacaklarını düşündürmüştü, ancak AP-PCR ile izolatlar arasında genotipik benzerliğin olmadığı görülmüştür.



P32 MORAXELLA CATARRHALIS TAŞIYICISI OLAN ÇOCUKLARDA BRO BETA LAKTAMAZLARIN MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ

Özgen KÖSEOĞLU, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Alper ERGİN, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Ankara
N.Gürkan AYDIN, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Gülşen HASÇELİK, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Moraxella catarrhalis'in nazofarenkste kolonize olması üst solunum yolu infeksiyonları ve otitis media açısından bir risk faktörüdür. Bu çalışmada, solunum yolu yakınması olmayan sağlıklı 64 çocuktan izole edilen M.catarrhalis suşlarında BRO beta-laktamazların moleküler tanımlanması amaçlanmıştır. M.catarrhalis seçici besiyerinde üreyen Gram negatif diplokok şeklinde olan bakterilerden katalaz, oksidaz, DNaz, nitrat redüksiyonu pozitif ve glukoz, maltoz, sükröz, laktoz fermentasyonu negatif koloniler M.catarrhalis olarak tanımlanmıştır. BRO beta-laktamazlar PCR-restriksiyon endonükleaz enzim analizi ile belirlenmiştir. M.catarrhalis izolatlarının %89.1'inde BRO beta-laktamaz varlığı gösterilmiş ve bu suşların %85.9'u BRO-1 (n:55), %14.1'i BRO-2 (n:9) olarak tespit edilmiştir. Nitrosefin disk testi (Remel, USA) ile izole edilen suşların %89.1'inde beta-laktamaz varlığı saptanmıştır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında nitrosefin disk testi ile beta-laktamaz varlığının tespiti daha çok tercih edilen bir yöntem olmasına rağmen, restriksiyon endonükleaz analizi ile BRO beta-laktamazların karakterizasyonu kolay ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılabilir. M.catarrhalis taşıyıcılığı yüksek olan çocuklarda bu bakteriye bağlı üst solunum yolu infeksiyonlarına daha sık rastlanıldığı için, bu çocuklarda M.catarrhalis suşlarının BRO-1 ve BRO-2 beta-laktamaz karakterizasyonu önem taşımaktadır. BRO beta-laktamazların tanımlanması, taşıyıcı çocuklarda bu bakteriye bağlı gelişecek solunum yolu infeksiyonlarının tedavisinde yol gösterici olacaktır.

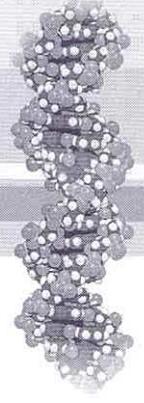


P33 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SUŞLARINDA RİFAMPİN DİRENÇ MUTASYONLARININ DNA DİZİ ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ ESNASINDA KARŞILAŞILAN HETEROREZİSTANSA BAĞLI BİR PROBLEMİN ENZİMLE KESİM YÖNTEMİ İLE ÇÖZÜMÜ

Zeynep Ceren KARAHAN, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağ. ve Hast. Anabilim Dalı Moleküler Genetik Bölümü, Ankara

Nejat AKAR, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağ. ve Hast. Anabilim Dalı Moleküler Genetik Bölümü, Ankara

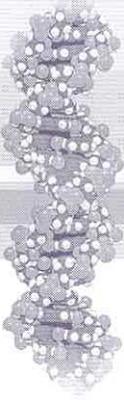
Mycobacterium tuberculosis suşlarında rifampin direncinden, RNA polimeraz geninin beta alt ünitesini kodlayan *rpoB* geninde yer alan mutasyonlar sorumludur. Bu mutasyonların tanımlanmasında en geçerli yöntem DNA dizi analizidir. Aynı kültürde duyarlı ve dirençli popülasyonların bir arada bulunması olarak tanımlanan "heterorezistans", *M. tuberculosis* kültürlerinin %10-20'sinde görülebilmekte ve DNA dizi analizinde yalancı negatif veya kontaminasyon nedeniyle değerlendirilemeyecek sonuçların alınmasına neden olabilmektedir. *rpoB* geni mutasyonları açısından değerlendirilen bir *M. tuberculosis* suşunda DNA dizi analizi, kodon 516'dan önce bir delesyon varlığını düşündürmekle beraber, heterorezistans nedeniyle mutasyon tanımlanması mümkün olmamıştır. Çalışmada, heterorezistans tespit edilen örnekten DNA izolasyonu, cam boncuk kullanılarak hücre duvarının parçalanması ile yapılmıştır. *rpoB* geninde mutasyonları taşıyan bölge uygun primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. Pürifikasyon işlemi takiben DNA dizi analizi CEQ2000XL (Beckman Coulter, ABD) cihazında gerçekleştirilmiştir. Enzimle kesim için, kodon 513 ve 514 (CAA TTC)'ü tanıyan Tsp509I (_AATT) enzimi kullanılmıştır. Kesim ürünleri jelden tekrar elde edilerek PCR ve DNA dizi analizi işlemleri tekrarlanmıştır. Sonuç olarak, çalışılan suşun hem enzimle kesim noktası taşıyan normal, hem de kesilmeyen mutant popülasyonlar bulundurduğu anlaşılmıştır. Kesilmemiş bandı oluşturan PCR ürünü, jelden ekstrakte edilerek DNA dizi analizi tekrarlanmıştır. Sonuçta, bu örneğin iki "mis-sense" (Asn494His ve Ser512Arg) mutasyon yanı sıra, 513-515. kodonları kapsayan 9bç'lik bir delesyon taşıdığı da tespit edilmiştir. Dolayısıyla, *M. tuberculosis* izolatlarında DNA dizi analizinden sonuç alınamıyor ve bir başka dizi ile kontaminasyondan şüpheleniliyorsa heterorezistans akla gelmelidir. Tahmin edilen mutasyon bölgesi bir enzimle kesim noktası oluşturuyor veya bir kesim noktasını ortadan kaldırıyorsa, aynı kültürde yer alan farklı suşları tanımlama ve mutasyonlarını belirlemede enzimle kesim yönteminden yararlanılabilir. (Bu çalışma Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Tarafından 51 proje numarası ile desteklenmiştir)



P34 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KLİNİK SUŞLARINDAKİ İZONİAZİD VE RİFAMPİN DİRENCİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE SAPTANMASI

Elif AKTAŞ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Rıza DURMAZ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Dong YANG, Department of Epidemiology, School of Public Health
Zhenhua YANG, Department of Epidemiology, School of Public Health

Mycobacterium tuberculosis'in rifampin (RIF) ve izoniiazid (INH) direnci tüberküloz kontrolü için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. İlaça dirençli tüberkülozun kontrolü, dirençli vakaların hızlı ve uygun tedavisine dayanır. Farklı kaynaklardan elde edilen INH ve RIF dirençli *M. tuberculosis* suşlarındaki direncin moleküler analizi, hızlı moleküler tanı metodlarının geliştirilmesinde yararlı bilgiler sağlayabilir. Bu çalışmada, Malatya bölgesinde toplanan dirençli 29 klinik izolat arasından INH ve RIF direncine neden olan iki gen, otomatize DNA dizi analizi ve multipleks alel spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (MAS-PCR) yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. İzolatların 19'u çoklu ilaç dirençli, ikisi yalnızca RIF dirençli ve sekizi yalnızca INH dirençli izolatlardır. RIF direncinin analizi için, direncin göstergesi olarak bilinen 81 baz çift (bç)'lik bölgeyi de içeren, *rpoB* geninin 250 bç'lik merkezi bölgesinin dizi analizi yapılmıştır. MAS-PCR'da kodon 516, 526 ve 531 hedef alınmıştır. INH direnci için *katG* geninin 435 bç'lik bölgesinin dizi analizi yapılmıştır. MAS-PCR'de kodon 315'teki mutasyonların tespiti hedeflenmiştir. DNA dizi analizi ile RIF dirençli 21 izolatın 10'unda (%47.6) *rpoB* genindeki kodon 531'de, 5'inde (%23.8) kodon 516'da, 3'ünde (%14.2) kodon 526'da ve yine 3'ünde (%14.2) kodon 513'te mutasyon tespit edilmiştir. Kodon 516'da mutasyona sahip olan 5 izolatın 3'ü aynı zamanda kodon 527'de ve biri kodon 572'de mutasyona sahiptir. INH dirençli 27 izolatın 17'sinde (%62.9) *katG* kodon 315'te mutasyon gözlenmiştir. Bu 17 mutasyonun 14'ü Ser 315 Thr ve 3'ü Ser 315 Asn değişikliği şeklindedir. Dizi analizi ile MAS-PCR arasındaki korelasyon, *katG* geni için %94, *rpoB* genindeki 531 ve 516. kodonlar için %100 olarak saptanmıştır. Bulgularımız, MAS-PCR'nun, özellikle kaynakları sınırlı olan gelişmekte olan ülkelerde, INH ve RIF direncinin hızlı tespitinde DNA dizi analizinin yerine kullanılabilceğini desteklemektedir.



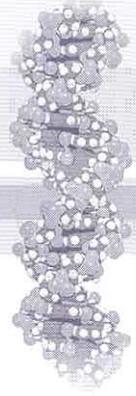
P35 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS İZOLATLARINDA FOSFOLİPAZ C GEN BÖLGELERİNDEKİ GENETİK DEĞİŞİMİN ARAŞTIRILMASI

Sarah E. TALARICO, University of Michigan Ann Arbor MI, USA

Rıza DURMAZ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

Zhenhua YANG, University of Michigan Ann Arbor MI, USA

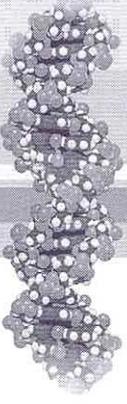
Mycobacterium tuberculosis'in fosfolipaz C (PLC) genleri üzerinde yapılan yeni çalışmalar, PLC mutantlarının farelerde çoğalma için atenüye hale geldiklerini ve patogeneze bu genin potansiyel rolünün olabileceğini düşündürmektedir. *M. tuberculosis* suşlarında patogeneze katılan ve dizilim varyasyonu gösteren genlerin incelenmesi, klinik izolatlar arasındaki virülans farklılıklarını açıklamaya yardımcı olabilir. Bu çalışmada, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve DNA dizi analizi kullanılarak, Malatya'daki tüberküloz hastalarından bir yıl içinde üretilen 106 *M. tuberculosis* izolatında dört PLC genindeki (*plcA*, *plcB*, *plcC* ve *plcD*) baz dizilim değişiklikleri araştırılmıştır. *M. tuberculosis* H37Rv ve CDC1551 suşları kontrol olarak kullanılmıştır. İncelenen 106 izolatın 66'sında (%62.3) *plcD* geni tam, 40'ında (%37.7) ise mutasyon içermektedir. Mutant *plcD* genine sahip 40 izolatın 17'si (%42.5) *plcD* geninde herhangi bir delesyon olmadan bir IS6110 insersiyonu içermekte, 2'si (%5%) delesyonla birlikte IS6110 insersiyonu ve 13'ü (%32.5%) IS6110 insersiyonu ile birlikte "downstream" bölgesinin yakınında bir delesyon bulundurmaktadır. *plcA*, *plcB* ve *plcC* bölgelerinde mutasyon bulunduran izolatların oranı sırasıyla; %3.8, %1.9 ve %3.8 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak bu çalışma, *M. tuberculosis* izolatlarındaki PLC genlerinde en fazla değişimin *plcD* geninde olduğunu, bu konudaki ilave araştırmaların ve onların klinik uygulamalarının *plcD* geni üzerinde yoğunlaşması gerektiğini ortaya koymaktadır.



P36 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON SİSTEMİNİN (ROCHE AMPLICOR) TÜBERKÜLOZUN TANISINDAKİ YERİ

Elif AKTAŞ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Şahin DİRKEL, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Selami GÜNAL, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Rıza DURMAZ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

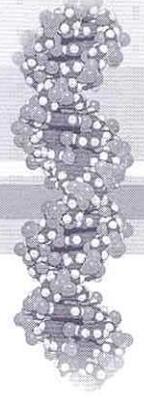
Bu çalışmada, bir yıllık sürede laboratuvarımıza tüberküloz şüphesi ile gönderilen örneklerin mikroskopi, kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sonuçları değerlendirilmiştir. Homojenizasyon, dekontaminasyon ve yoğunlaştırma işlemlerinden sonra hazırlanan preparatlar Ziehl-Neelsen tekniği ile boyanmış, kültür için Löwenstein-Jensen ve otomatize BACTEC 460 TB besiyerlerine ekim yapılmıştır. PCR çalışmaları için Roche Amplicor ticari kiti kullanılmış ve toplam 652 örnek değerlendirilmiştir. Değerlendirilen 158 solunum yolu örneğinden mikroskopi ile 6'sı, kültür ile 16'sı ve PCR ile 21'i pozitif bulunmuştur. Yüzyetmişyedi idrar örneğinin 2'si yayma ile, 7'si kültür ile ve 13'ü PCR ile pozitif sonuç vermiştir. Elliyebeş beyin omurilik sıvısı örneği için mikroskopi ve PCR ile pozitif sonuç alınmazken, kültür ile 2 örnek pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bunların dışında kalan, asit mayi, plevral mayi, açlık mide suyu, doku kesiti, parasentez mayi, perikard mayi, kemik iliği aspirasyon mayi, kan, lenf nodu aspirasyon mayi, trakeal aspirasyon mayi ve apsedan oluşan toplam 260 örnekten mikroskopi ile 3, kültür ile 20 ve PCR ile 19 pozitif sonuç alınmıştır. PCR ile pozitif bulunan 53 örneğin 11'i mikroskopi, 22'si kültür ile uyumludur. Mikroskopisi pozitif PCR sonucu negatif olan örneğe rastlanmazken, kültür pozitif 23 örnek PCR ile negatif sonuç vermiştir. Genel olarak 652 örneğin 11'inde (%1.68) mikroskopi, 45'inde (%6.9) kültür, 53'ünde (%8.12) PCR pozitif bulunmuştur. Pozitiflik oranı kültür ve PCR'de mikroskopiye göre anlamlı olarak yüksek ($p < 0.001$) iken, kültür ve PCR arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p = 0.04$). Kültüre göre PCR'nin duyarlılığı %48.8 ve özgüllüğü %94.8 olarak belirlenmiştir. Kültür negatif PCR pozitif olan 31 örneğin 21'i, PCR negatif kültür pozitif olan 23 örneğin ise 19'u balgam dışı örneklerdir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, Roche Amplicor sisteminin, FDA tarafından belirtildiği gibi mikroskopisi pozitif olan solunum yolu örnekleri ile sınırlandırılması gerektiği ortaya çıkmıştır.



P37 MARMARA BÖLGESİNDE YAŞAYAN HASTALARDAN İZOLE EDİLEN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX İZOLATLARINDA rpoB ve katG MUTASYONLARI

Ahmet SANIÇ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Samsun
Engin SEBER, Taksim Verem Savaş Bölge Laboratuvarı, İstanbul
Adil KARADAĞ, Göğüs Hastalıkları Hastanesi, Samsun
Özlem TANSEL, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Edirne
Murat GÜNAYDIN, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Samsun
İlker URUK, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Samsun
Birsen DURMAZ, Şişli Eftal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul
Elif ÖZTÜRK, İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Düzce
Erol GÜNDÜZ, Taksim Verem Savaş Bölge Laboratuvarı, İstanbul
Hakan LEBLEBİCİOĞLU, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Samsun

M.tuberculosis complex'in (MTBC) antitüberküloz ilaç direncinin belirlenmesinde rutin antitüberküloz duyarlılık testlerinin yanı sıra, ilgili gen bölgelerindeki mutasyonların saptanmasından da yararlanılabilir. Çalışmamızda, Marmara Bölgesi'nde yaşayan tüberküloz hastalarından izole edilen rifampisin dirençli suşlarda RNA polimeraz enziminin beta alt ünitesinde (rpoB) ve izoniazid dirençli suşların katG geninde mutasyonların sıklığının ve çeşitliliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, izoniazid ve/veya rifampisin dirençli 108 MTBC izolatu dahil edilmiştir. Bu suşların 81'i hem izoniazid hem de rifampisin'e dirençlidir. Çalışmaya alınan suşların direnç paternleri ayrı ayrı değerlendirildiğinde ise, 99'unun rifampisine, 90'ının izoniazide dirençli olduğu saptanmıştır. Rifampisin dirençli 99 MTBC suşunun rpoB gen bölgesi ve izoniazid dirençli 90 MTBC'nin katG bölgesinin Dizi Analiz Cihazı (ABI 310 Genetic Analyzer Perkin Elmer) ile nükleotid dizilimi belirlenmiştir. Sonuç olarak, analizi yapılan MTBC suşlarının rpoB ve katG gen bölgelerinde saptanan mutasyonlar incelendiğinde, en sık rpoB geninin 531. kodonunda (52/99, %52.5), katG geninin ise 315. kodonunda (59/90, %65.6) mutasyon gözlenmiş olup, rpoB geninin pek çok kodonunda farklı mutasyonlar saptanmıştır. (Bu çalışma DPT'nin 2002K 120500 no'lu projesi ile desteklenmiştir)



P38 MİKOBAKTERİ TÜRLERİNİN PCR-RESTRIKSİYON ENZİM ANALİZİ İLE TANIMLANMASINDA MYCOTYPE-ALL KİTİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Alpaslan ALP, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

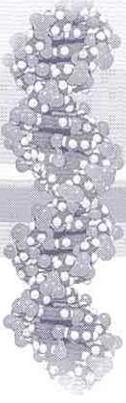
Dolunay GÜLMEZ, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Şule ÇOLAKOĞLU, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Zeynep SARIBAŞ, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Gülşen HAŞÇELİK, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Tüberküloz tanısında ilk basamak, aside dirençli boyama yöntemlerinin uygulanmasıdır. Ancak, *M. tuberculosis* dışındaki mikobakterilerin (MOTT: *Mycobacteria other than M. tuberculosis*; atipik mikobakteriler) mikroskopik inceleme ile ayırt edilmesi mümkün olmadığından, MOTT ile enfekte hastalarda tedavi etkisiz kalabilmektedir. Bu nedenle tedaviye başlanmadan önce mikobakteri türlerinin hızlı bir şekilde belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan restriksiyon enzim analizi yöntemi, hem standart λ X174 moleküler ağırlık standardı ile, hem de iki farklı moleküler ağırlık standardı içeren Mycotype-All kiti (Salubris AŞ) ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, klinik örneklerden izole edilmiş olan 40 MOTT izolatu ve 30 standart MOTT suşu kullanılmıştır. Tüm suşlara PCR-restriksiyon enzim analizi yöntemi uygulanmış, bu amaçla iki özgül primer kullanılarak 65 kDa ağırlığındaki "heat shock protein" geni (*hsp65*) çoğaltılmıştır. Çoğaltılan ürünler, *Bst*II ve *Hae*III restriksiyon enzimleri ile kesilmiş, poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrıştırılmış ve λ X174 moleküler ağırlık standardı kullanılarak değerlendirme yapılmıştır. MycoType-All kiti ile restriksiyon enzim analizi üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda yapılmış, sonuçların değerlendirilmesi, kit içeriğinde bulunan iki farklı moleküler ağırlık standardı ile yapılmıştır. İki yöntemle yapılan MOTT tanımlamaları karşılaştırıldığında, suşların 58'inde MOTT isimlendirmelerinin aynı olduğu, ancak birbirine çok yakın bant şekilleri elde edilen türlerde isimlendirmenin, Mycotype-All kiti ile daha kolay yapılabildiği gözlenmiştir. Oniki MOTT türünde ise iki yöntemle yapılan tanımlamalarda farklı sonuçlara ulaşılmıştır. Bu suşların tanımlanması için DNA dizi analizi uygulanmıştır. Çalışmamızda, tür düzeyinde mikobakteri tanımlaması yapan laboratuvarlarda Mycotype-All kitinin rutin olarak kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır.



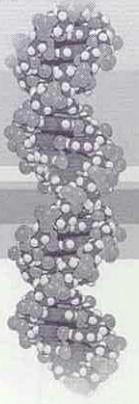
P39 KLİNİK ÖRNEKLERDEN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SAPTANMASINDA COBAS AMPLICOR SİSTEMİ VE MİKROSKOBİK İNCELEME YÖNTEMLERİNİN, BACTEC RADYOMETRİK YÖNTEMİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI

Alpaslan ALP, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Ahmet PINAR, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Gülşen HASÇELİK, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Tüberküloz tüm dünya çapında çok önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmekte ve büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Tüberkülozun bulaş kaynağı özellikle basil çıkaran hastalar olduğu için toplum sağlığı açısından, hastaların başkalarına hastalığı bulaştırmadan önce saptanması ve hızla tedavisi esastır. Bu nedenle duyarlılık ve özgüllüğü yüksek, güvenilir laboratuvar tanı yöntemlerinin kullanılması gerekmektedir. Bu araştırmada, Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Temmuz 2002 ile Şubat 2004 tarihleri arasında BACTEC radyometrik kültür sistemi (Becton Dickinson, USA) referans alınarak, Ehrlich-Ziehl-Neelsen boyama yöntemi (EZN) ve Cobas Amplicor sistemi (Roche Diagnostics, Germany) değerlendirilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, BACTEC radyometrik kültür sistemiyle toplam 2056 klinik örnek çalışılmış ve bu örneklerden 103'ünde (%5) *M.tuberculosis* saptanmıştır. EZN için özgüllük %96.4, duyarlılık %46.5, pozitif prediktif değer %32.0, negatif prediktif değer %98.0 olarak bulunmuştur. Cobas Amplicor sistemi için ise, özgüllük %97.5, duyarlılık %76.8, pozitif prediktif değer %45.7 ve negatif prediktif değer %99.3'dir. Bu değerler, literatürde bildirilmiş olan değerlerle uyumludur. Sonuç olarak, tüberkülozun laboratuvar tanısında EZN ve nükleik asit çoğaltma yöntemlerinin mutlaka kültür yöntemleriyle birlikte çalışılması ve değerlendirmelerin buna göre yapılması gerekmektedir. Ayrıca bu yöntemleri kullanan rutin mikrobiyoloji laboratuvarları, yöntemlerin performansını her yıl gözden geçirmeli ve kendi laboratuvar standartlarını belirlemelidirler.



P40 AKCİĞER VE AKCİĞER DIŞI KLİNİK ÖRNEKLERDE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKSİNİN HIZLI TANISINDA COBAS AMPLICOR M.TUBERCULOSIS (MTB) TESTİNİN RETROSPEKTİF DEĞERLENDİRİLMESİ

Gölnur TARHAN, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara

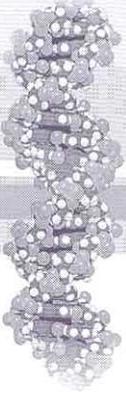
Mehmet Bakır SAYGAN, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başk. Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara

Salih CESUR, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara

Fatih OCAK, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara

İsmail CEYHAN, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara

Çalışmamızda, Haziran 2002- Temmuz 2003 tarihleri arasında merkezimize tüberküloz ön tanısı ile gönderilen 158 akciğer (balgam, BAL) ve 779 akciğer dışı (açlık mide suyu, abse, asit sıvısı, aspirasyon sıvısı, biyopsi, BOS, ejakulat, idrar, kan, perikard sıvısı, plevra sıvısı, pü, sinovyal sıvı) örnek olmak üzere toplam 937 örnek, Cobas Amplicor MTB testi ile retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirmede költür referans yöntem olarak kabul edilmiştir. Költürde kontaminasyonun olduğu 48 örnek ile inhibitör saptanan 7 örnek değerlendirmeye alınmamıştır. İncelenen toplam 882 örneğin (akciğer ve akciğer dışı örnekler), 53'ünde (%6) költür pozitif, 829'unda (%94) költür negatif sonuç vrmıştir. Költür pozitif olan 53 örneğin 34'ünde (%64.15) COBAS Amplicor MTB pozitif, költür negatif 829 örneğin 794'ünde (%95.77) COBAS Amplicor MTB negatif bulunmuştur. Bu testin duyarlılık, özgülük, pozitif ve negatif belirleyicilik değerleri, akciğer örnekleri için sırasıyla; %89, %88, %54 ve %98, akciğer dışı örnekler için sırasıyla; %50, %97, %44 ve %97 olarak belirlenmiştir. Mikroskopi pozitif örneklerde testin duyarlılığı akciğer ve akciğer dışı örneklerde %100 iken, mikroskopi negatif örneklerde bu oran akciğer örnekleri için %75 ve akciğer dışı örneklerde %29 olarak saptanmıştır. Testteki genel inhibisyon oranı %5.6 olarak belirlenmiştir. Cobas Amplicor MTB testi, rutin çalışmalarda akciğer örnekleri için standardize edilmiş bir yöntem olup, en önemli avantajı örnekteki inhibitör maddeleri saptamak için internal kontrol sisteminin bulunmasıdır. Amplifikasyon ve tanı işlemlerinin tam otomatize olması, iş yükünü azaltmaktadır. Bu nedenle, rutin tanıda költür ve mikroskopi yöntemleri ile birlikte kullanılması tanıyı destekleyicidir. COBAS Amplicor MTB testi, özellikle akciğer tüberkülozunun tanısında kullanılabilecek hızlı ve pratik bir yöntemdir.

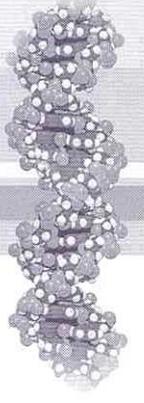


P41 DEĞİŞİK KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN MYCOBACTERIUM BOVIS SUŞLARININ MOLEKÜLER TIPLENDİRİLMESİ

İsmail CEYHAN, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara

Hakan YARDIMCI, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Gülnur TARHAN, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara

"Sığır tüberkülozu"na neden olan *Mycobacterium bovis*, uygulanmakta olan kontrol programlarına rağmen bir çok ülkede sığırlarda hastalık etkeni olarak önemini korumaktadır. Enfekte hayvanlarda epidemiyolojik tip tayinine yönelik sınırlı sayıda veri bulunmaktadır. Son yıllarda kullanıma giren moleküler tiplendirme yöntemleri ile infeksiyon kaynakları ve filogenetik temelleri hakkında daha net bilgi edinilmeye başlanmıştır. Bunlar arasında PCR tabanlı yöntemler ucuz olmaları, kolay uygulanabilirliği ve yeterli ayırım sağlama yeteneği açısından hem *M.tuberculosis* hem de *M.bovis*'in tiplendirme çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu çalışmada, değişik kaynaklardan izole edilen *M.bovis* suşlarının genotiplendirilmesinde iki farklı "Random Amplified Polymorphic DNA" (RAPD) moleküler tiplendirme yönteminin (OUT-PCR ve ERIC-PCR) rutin kullanımdaki yeri ve önemi araştırılmıştır. Bu amaçla, Ankara merkezi ve ilçelerindeki mezbahalardan toplanan tüberküloz şüpheli örneklerde, kültür pozitifliği saptanan ve biyokimyasal testler ile tiplendirilen 21 *M.bovis* suşu her iki yöntemle karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences) yöntemiyle, agaroz jel elektroforezinde 2-3 bant paterni ve poliakrilamid jel elektroforezinde ise 6-7 bant paterni elde edilmiştir. Her iki yöntemle suşlar 2 grupta toplanmıştır. Ancak, bu yöntemle oluşan gruplar, suşlar arası ayırımın yapılmasında yeterli olmamıştır. OUT-PCR yöntemi ile 4 ana grup ve gruplandırılmayan ancak birbirleriyle belli ölçülerde ilişkileri olan 8 özel suş saptanmıştır. Birbirleriyle genotipik olarak %100 uyumlu olanlar aynı grup içerisinde toplanmıştır. Gruplar, bilinen epidemiyolojik verileri ile birlikte değerlendirildiğinde; ERIC-PCR yönteminin standardizasyonu zor ve yeterli ayırım yapamadığı, OUT-PCR yönteminin ise kolay uygulanabildiği ve yeterli ayırım gücüne sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak, her iki tiplendirme yönteminin geniş çaplı epidemiyolojik analiz çalışmalarında tek başına kullanılmasının uygun olmadığı düşüncesindeyiz.



P42 LASER IN-SITU KERATOMILEUSIS (LASİK) SONRASI MİKOBAKTERİ KERATİTİ ŞÜPHEİ OLAN BİR OLGUNUN INNO-LIPA YÖNTEMİ İLE HIZLI TANISI VE TIPLENDİRİLMESİ

İsmail CEYHAN, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara

Gülnur TARHAN, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara

Salih CESUR, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara

Feyzullah GÜMÜŞLÜ, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başk. Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara

Laser in-situ keratomileusis (LASİK) sonrasında, korneal infeksiyon oldukça nadir görülen bir durumdur. Atipik mikobakterilere bağlı olarak gelişen keratit, artan sıklıkta bildirilmektedir. Atipik mikobakterilerin neden olduğu keratitlerden sıklıkla iki tür sorumlu tutulmaktadır. Bunlar, *Mycobacterium chelonae* ve *Mycobacterium fortuitum*'dur. Atipik mikobakterilerin mikroskopi ve kültür ile tanısı ve biyokimyasal testler ile tiplendirilmesi oldukça güç ve zaman alıcıdır. Uygun tedavinin başlatılmasında etkenin kısa sürede tanımlanması büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, LASİK sonrası keratit gelişen ve atipik mikobakteri şüphesi olan bir hastada *M.chelonae* suşu, INNO-LIPA yöntemi ile tanımlanmış ve tiplendirilmiştir. Otuz yaşındaki kadın hastanın LASİK sonrası enfekte korneasından alınan materyalin kanlı agar besiyerinde üreyen kolonilerinde, atipik mikobakteri veya *Nocardia* ayırımı için yapılması amacıyla laboratuvarımıza başvurulmuştur. Kolonilerden hazırlanan bakteri süspansiyonundan sırasıyla Gram ve Erlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama, aynı süspansiyondan kanlı agar, Lowenstein-Jensen (LJ) ve "Mycobacterium Growth Indicator Tube" (MGIT) besiyerlerine ekim yapılmıştır. Gram boyamada *Nocardia* benzeri dallanma gösteren Gram pozitif basiller, EZN boyamada ise atipik görünümlü asido-rezistan basiller görülmüştür. Kanlı agar besiyerinde inkübasyonun ikinci günü, MGIT besiyerinde ise beşinci günü üreme saptanmıştır. Bakteri süspansiyonundan tiplendirme amacı ile McConkey Agar besiyerine ekim ile nitrat redüksiyon testi yapılmıştır. Moleküler tiplendirme amacı ile INNO-LIPA testi uygulanmıştır. Test sonucunda etkenin kesin olarak mikobakteri olduğu ve sonraki aşamalarda *M.chelonae* complex (grup III, *M.abcessus*) ile uyumlu bant paterni gösterdiği saptanmıştır. LJ besiyerinde ise inkübasyonun ancak dördüncü haftasında üreme görülmüştür. Sonuç olarak konvansiyonel yöntemler, atipik mikobakterilerin tiplendirilmesinde yetersiz kalmakta ve kesin tanımlama mümkün olmamaktadır. INNO-LIPA testinin, mikobakterilerin tanı ve tiplendirilmesinde kullanılabilecek hızlı ve pratik bir yöntem olduğu düşüncesindeyiz.



P43 ÜLKEMİZDE ÇOK İLACA DİRENÇLİ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS İZOLATLARININ MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ: ÖN RAPOR

Rıza DURMAZ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Ahmet SANIÇ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun
Selami GÜNAL, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Engin SEBER, Taksim Verem Savaş Dispanseri, İstanbul
Vildan Aykan OĞUZ, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hast. Anabilim Dalı, İzmir
Akgün YAMAN, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana

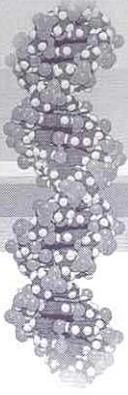
Bu çalışmanın amacı, tüberküloz insidansı ve anti-tüberküloz ilaçlara direncin yüksek olduğu ülkemizde, çok ilaca dirençli (MDR) Mycobacterium tuberculosis suşlarının ülke genelindeki transmisyon dinamiğini belirlemektir. Bu ön raporda, İstanbul'dan toplanan 40, İzmir'den 9, Adana'dan 1 ve Malatya'dan 5 olmak üzere toplam 55 MDR M. tuberculosis suşu ile aynı illerden toplanan MDR dışı direnç gösteren 39 suşun IS6110 "fingerprinting" yöntemiyle yapılan moleküler tiplene sonuçları sunulmuştur. IS6110 kopya sayısı MDR suşlarında 2-16 (ortalama: 7.45), MDR dışı dirençli suşlarda 2-14 (ortalama: 7.35) arasında belirlenmiştir. IS6110 "fingerprinting" sonuçlarına göre, kopya sayısı altı ve üzerinde olan suşların hiçbirinde kümeleşme saptanamamıştır. Kopya sayısı altıdan az olan 19 MDR suşun 8'i üç ayrı grup içinde, MDR dışı dirençe sahip 18 suşun 3'ü bir grup içinde yer almıştır. Kopya sayısı altıdan az olan izolatlarda IS6110 "fingerprinting" yöntemiyle bulunan gruplamaların ikinci bir yöntemle doğrulanması gerekmektedir. Bu nedenle düşük kopyalı suşlardaki gruplaşma oranları ihtiyatla değerlendirilmelidir. Bu ön çalışmanın verileri, ilginç olarak ülkemizdeki MDR suşlarındaki transmisyon dinamiğinin oldukça düşük olduğunu göstermektedir.



P44 SOLUNUM YOLU ÖRNEKLERİNDEN KLASİK YÖNTEMLERLE SAPTANAN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS İZOLATLARININ OTOMATİZE PCR YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI

Ayşen BAYRAM, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep
Canan KORKMAZ, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep
Tekin KARSLIĞIL, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep
İclal BALCI, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep

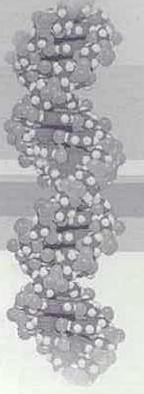
Bu çalışmada solunum yolu örneklerinden klasik yöntemlerle tanımlanan Mycobacterium tuberculosis complex izolatlarının, son yıllarda moleküler tanıda sıklıkla kullanılmakta olan otomatize bir polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır. Mikobakteriyoloji Laboratuvarımıza 2002-2003 yılları arasında tüberküloz ön tanısı ile gönderilen solunum yollarına ait örnekler, standart NALC-NaOH yöntemiyle dekontaminasyon ve homojenizasyon işlemlerinden sonra gliserinli Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerine ve Middlebrook 7H12 sıvı besiyeri içeren Bactec B12 şişelerine ekilmiştir. LJ besiyerinde tipik kolonileri üreyen 41 örnek ile radyometrik Bactec sisteminde (Becton Dickinson, USA) M.tuberculosis complex olarak tanımlanan 127 örnek çalışma grubunu oluşturmuştur. Aynı süreçte gelen ve her iki yöntemle de üreme saptanmayan 46 örnek ise kontrol grubu olarak çalışmaya alınmıştır. LJ besiyerinde üreme saptanan örneklerden 32'sinde (%78.1) Cobas Amplicor MTB (Roche Diagnostic Systems, USA) PCR yöntemiyle pozitiflik saptanırken, Bactec sisteminde üreyen örneklerin 86'sı (%67.8) Cobas Amplicor MTB PCR ile pozitif bulunmuştur. Klasik yöntemlerle üreme saptanmayan 46 örneğin tümünde PCR sonuçları negatif olarak saptanmıştır. Her iki grupta örneklerle birlikte internal kontrol çalışılmış, internal kontrolü negatif bulunan örnekler çalışmaya dahil edilmemiştir. Sonuç olarak, solunum yolu örneklerinden M.tuberculosis complex izolatlarının tespitinde kısa sürede tanıya gidilebilmesine rağmen, Cobas Amplicor MTB PCR yönteminin klasik yöntemlere oranla daha az duyarlı olduğu kanısına varılmıştır.



P45 CANDIDA TÜRLERİNİN GENOTİPLENDİRİLMESİNDE M13 PRİMERLERİ İLE UYGULANAN "ARBITRARILY PRIMED" POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU YÖNTEMİNİN ETKİNLİĞİ VE HIZLI BİR EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ

Barış OTLU, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Rıza DURMAZ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

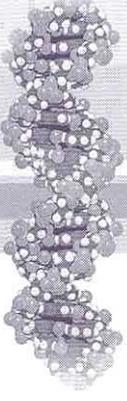
C. albicans için ideal bir tiplendirme yöntemi henüz yoktur. Kullanılan yöntemlerin avantajları ve dezavantajları vardır. Kullanılan tiplendirme yönteminin başarısı, tekrarlanabilirliğine ve ayırım gücünün yüksek olmasına bağlıdır. "Arbitrarily Primed" polimeraz zincir reaksiyonu (AP-PCR) yönteminin temel prensibi, rasgele seçilmiş kısa primerler kullanılarak genomik DNA'daki benzer bölgelerin amplifikasyonunun sağlanmasıdır. AP-PCR ile tiplendirmede, yöntemin ayırım gücü kullanılan primerlere göre değişmektedir. Bu çalışmada, birçok bakterinin tiplendirilmesinde ayırım gücü yüksek olarak bildirilen M13 primerinin, *Candida* suşları arasındaki klonal ilişkiyi belirlemede uygulanabilirliği araştırılmıştır. AP-PCR uygulaması için gerekli DNA eldesinde Lyticase ve Proteinaz K gibi enzimler kullanılmakta, bu da hem süreyi hem de maliyeti artırmaktadır. Çalışmamızda, Akada ve arkadaşlarının mantarların PCR'ı için kullandıkları %0.25'lik SDS yerine %1'lik SDS, buna ek olarak DNA saflaştırması için fenol-kloroform, çöktürme ve yıkama için etanol kullanılmıştır. Herhangi bir enzim kullanılmadığı için yöntemin uygulama süresi kısa ve maliyeti oldukça düşüktür. Buna ilaveten ekstraksiyondan sonra ölçülen DNA miktarları AP-PCR uygulaması için yeterli düzeyde (500-1000 ng/ml) bulunmuştur. *Candida*'ların tiplendirilmesi için M13 primerleri ile yapılan çalışmalarda 10-16 arasında bant elde edilmiştir. Saptanan bant sayısı suşları tiplendirmek için yeterli bulunmuş ve yöntemin ayırım gücünün yüksek olduğu belirlenmiştir.



P46 NÖTROPENİK HASTALARDAN İZOLE EDİLEN CANDIDA ALBICANS SUŞLARININ MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ

Barış OTLU, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Semra KUŞTİMUR, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Esin ŞENOL, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara
Rıza DURMAZ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Ayşe KALKANCI, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Özlem GÜZEL, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara

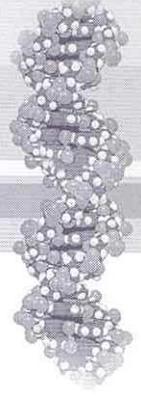
Mantar infeksiyonlarının klinik önemi bilinmesine rağmen, infeksiyonun patogenezi, geçiş şekli ve epidemiyolojisi hakkında bilinenler oldukça sınırlıdır. Moleküler tiplendirme yöntemleri Candida infeksiyonlarının epidemiyolojisine önemli katkılar sağlamaktadır. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji-Onkoloji servisinde Mart 2000-Aralık 2002 tarihleri arasında toplam 43 hastadan *C.albicans* suşu izole edilmiştir. İzolasyon yapılan örneklerin 17'si ağız içi plak, 11'i balgam, 8'i idrar, 5'i gaita, 2'si bronkoalveoler lavaj, 3'ü yara ve birer örnek olmak üzere endotrakeal aspirat, kateter ucu, sonda, protez ve intra-abdominal mayidir. *C.albicans* izolatlarının genotiplendirilmesinde "Arbitrarily Primed" polimeraz zincir reaksiyonu (AP-PCR) ve elektroforetik karyotiplendirme (EK) metodları kullanılmıştır. Ellibir izolat EK yöntemi ile 45, AP-PCR ile 24 farklı genotipe ayrılmıştır. Çalışmamızda baskın bir genotip tespit edilmemiştir. Sonuç olarak, infeksiyonların çoğunun endojen kaynaklı olduğu, ancak düşük oranda da olsa çapraz geçişin de olabileceği kanısına varılmıştır.



P47 YOĞUN BAKIM HASTALARINDAN İZOLE EDİLEN CANDIDA ALBICANS SUŞLARININ MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ

Barış OTLU, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Semra KUŞTİMUR, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Rıza DURMAZ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Ayşe KALKANCI, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

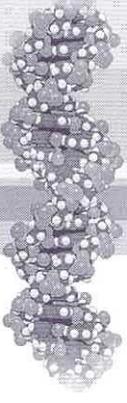
Çalışmamızda, üç aylık dönemde Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde erişkin hastaların takip edildiği yoğun bakım ünitelerinde yatan tüm hastaların ağız, burun, cilt, perine, kateter olmak üzere farklı vücut bölgelerinden ve varsa idrar sondasından, yara yüzeyinden sürüntü örnekleri alınmıştır. Aynı dönemde hastaların çevresinden ve klinikteki sağlık personelinin ağız, el ve burunlarından *C.albicans* taraması için örnek toplanmıştır. Yirmibir hastanın farklı vücut bölgelerinden alınan toplam 105 örneğin 32'sinde *C.albicans* üretilmiş, ancak sağlık çalışanlarından ve hastaların çevrelerinden alınan örneklerden *C.albicans* izolasyonu yapılamamıştır. *C.albicans*'ın genotiplendirilmesinde, M13 primerleri kullanılarak "Arbitrarily Primed" polimeraz zincir reaksiyonu (AP-PCR) ve elektroforetik karyotiplendirme (EK) yöntemleri uygulanmıştır. AP-PCR ile 16, EK ile 28 farklı genotip saptanmıştır. Suşların arasında klonal olarak ilişkili baskın bir genotip bulunamamıştır. Bulgularımız, *C. albicans* infeksiyonlarının endojen kaynaklı olabileceği gibi çapraz geçişe bağlı olarak da gelişebileceğini göstermiştir.



P48 RASTLANTISAL cDNA KLONLAMASINDAN YARARLANILARAK ASPERGILLUS FUMIGATUS İÇİN ÖZGÜL TANI YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Alper SÖYLER, Orta Doğu Teknik Üniversitesi
Zümrüt B. ÖGEL, Orta Doğu Teknik Üniversitesi
Ufuk BAKIR, Orta Doğu Teknik Üniversitesi
Ceyda PEMBEÇİ, TÜBİTAK MAM

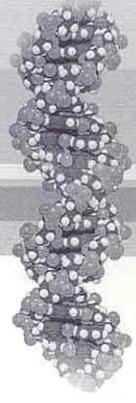
Aspergillus fumigatus gıda ve hava ile bulaşan bir insan patojenidir. Ayrıca gliotoksin, helvolik asit, fumigallin, fumigaklavin gibi mikotoksinler üretir. *A.fumigatus*'un en sık sebep olduğu hastalık olan aspergilloz, genellikle öldürücüdür ve özellikle immün sistemi baskılanmış, AIDS, kanser ve organ nakli hastalarında görülür. Bu çalışmada, *A.fumigatus*'un cDNA kütüphanesinden rastlantısal cDNA klonlaması yapılmıştır. Elde edilen fajlar, fajmid kurtarılması ve plazmid izolasyonuna tabi tutulmuştur. cDNA'ların boyutlarının incelenmesi için plazmidlere restriksiyon enzim kesimi ve PCR analizi yapılmıştır. Elde edilen cDNA klonlarının DNA dizilim analizi yapıldıktan sonra, gen bankası ve ilgili yazılımlarla, karşılaştırma ve veri analizleri yapılmıştır. Karşılaştırma sonucunda elde edilen bilgiler, cDNA'ların hangi proteinleri kodladıklarının bulunması ve aynı zamanda *A.fumigatus* DNA'sına özgü 3 çift primerin tasarlanması amacıyla kullanılmıştır. Bu çalışmada ayrıca, çoklu dizilim karşılaştırmalarında farklılık gösteren bölgelerin rahatlıkla ayırt edilebilmesini sağlayan bir yazılım geliştirilmiştir. Tasarlanan primerler, değişik *Aspergillus* türlerinde PCR yardımıyla denenmiş ve sadece *A.fumigatus* DNA'sına karşılık tek ve özgül bir DNA bandı elde edilmiştir. Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında, geliştirilen PCR bazlı yöntemin, *A.fumigatus*'un gıdalardan ve havadaki spordardan hızlı bir şekilde tayininde kullanılması tasarlanmaktadır.



P49 KANDAN MANTAR DNA İZOLASYONU İÇİN ÖNERİLEN HIZLI BİR TİCARİ YÖNTEMİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Sibel AYDOĞAN, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Ayşe EREN, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Ayşe KALKANCI, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Doruk ENGİN, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Semra KUŞTİMUR, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

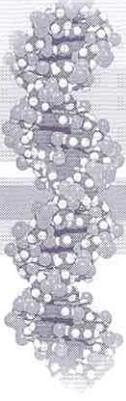
Hızlı tanı konulması gereken mantar infeksiyonlarının moleküler tanısında DNA eldesi problemlidir. Bizim laboratuvarımızda, kendi geliştirdiğimiz uzun bir protokol kullanılmaktadır. Bu çalışmada, daha hızlı sonuç alabilmek için *Candida* ve *Aspergillus* türlerine ait DNA izolasyonunda filtrasyon temeline dayalı ticari bir kitin kullanılabilirliği ve duyarlılık üzerine etkisi değerlendirilmiştir. 105, 103, 102, 101 hücre/ml *Candida albicans* içeren 3 ml kan örneği ve 105, 103, 102, 101 hücre/ml *Aspergillus niger* içeren 3 ml kan örneği olmak üzere toplam sekiz örnek, 10 mM Tris (pH 7.6), 5mM MgCl₂, 10mM NaCl içeren eritrosit parçalama tamponu, 10 mM Tris (pH 7.6), 5mM MgCl₂, 10mM NaCl, 200µg/ml Proteinaz K içeren lökosit parçalama tamponu ve 10U/ml litikaz, 50mM Tris (pH 7.6), 10mM EDTA, 28 mM beta- merkaptotanol içeren sferoblast oluşturma tamponu ile muamele edildikten sonra "QIA mp" DNA Mini Kit" (QIAGEN, USA) doku protokolüne göre çalışılmıştır. Ayrıca, 106 *C.albicans* ve 106 *A.niger* içeren birer kan örneği de, direkt olarak kitin içeriğinde belirtilen kan protokolüne uygun olarak çalışılmıştır. Kandan DNA izolasyonu için gerekli süre yaklaşık üç buçuk saat olarak belirlenmiştir. Elde edilen DNA'lar ITS (Internal Transcribed Spacers) 1 ve 4 primerleri kullanılarak çoğaltılmış ve %2 agaroz jelde görüntülenmiştir. Eritrosit ve lökosit parçalama tamponu ve sferoblast oluşturma tamponu kullanıldığında, 105 hücre/ml'lik maya süspansiyonu ekstraterinden çoğalma ürünü elde edilmiştir. Ön işleme alınmadan çalışılan kan örneğinde ise 106 maya hücresi PCR ile saptanmıştır. Ancak *A.niger* içeren örneklerin hiçbirinden ürün elde edilememiştir. Protokolün geliştirilmesi ile ilgili çalışmalarımız devam etmektedir.



P50 VİSERAL LEISHMANIA TANISINDA KEMİK İLİĞİ KÜLTÜRÜ VE RK39 DİPSTİK TESTİNİN SENSİTİVİTESİ

Gülnaz ÇULHA, Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı,
Soner UZUN, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilim Dalı, Adana
Yeşim TAŞOVA, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Adana
Kadri ÖZCAN, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana
K.P. CHANG, Chicago Medical School Microbiology Immunology Department, USA

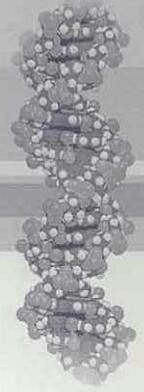
Bu çalışma, 1997-2001 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi ve Hatay'daki bazı kliniklerden gönderilen örneklerde ve viseral Leishmania şüphesi taşıyan hastalarda yapılmıştır. Toplam 53 viseral Leishmania şüphesi taşıyan hastadan kemik iliği ve serum örnekleri alınmıştır. Yapılan direk mikroskopik incelemede 12 hasta pozitif olarak değerlendirilmiş, bu hastalardan 10'una ait kemik iliği örneğinde parazit üremesi saptanmıştır. Yapılan RK39 (dipstick) testinde ise 12 hasta pozitif olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, kültür ve RK39 (dipstick) testlerinin duyarlılıkları sırasıyla, % 83 ve % 100 olarak tespit edilmiştir. RK39 (dipstick) testinin diğer iki yöntemle göre daha kolay, hızlı ve pratik bir yöntem olduğu ancak geliştirilmesi gerektiği kanısına varılmıştır.



P51 ÇEVRE ÖRNEKLERİNDE T2, T3, T4 VE T7 GENOTİPLERİNE AİT ACANTHAMOEBA İZOLASYONU

Abdullah KILIÇ, GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Mehmet TANYÜKSEL, GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Engin ARAZ, GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
James SISSONS, Londra Üniversitesi, Birkbeck Koleji,
Samantha JAYASEKERA, Londra Üniversitesi, Birkbeck Koleji,
Naveed Ahmed KHAN, Londra Üniversitesi, Birkbeck Koleji,
Levent DOĞANCI, GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

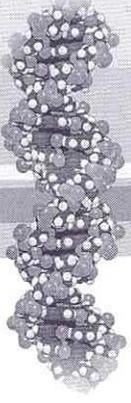
Acanthamoeba, kontakt lens kullanan kişilerde keratit ve immünkompromize kişilerde fatal granülomatöz amibik ensefaliti de içeren ciddi infeksiyonlara neden olan fırsatçı bir protozoondur. Acanthamoeba infeksiyonlarının erken tanısı, tedavide başarıyı artırmaktadır. Acanthamoeba cinsi, patojen ve non-patojen türleri içermekte olup, son yıllarda T1-T12 ve T14 olmak üzere 13 farklı genotipi olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmaya, Ankara'dan değişik toprak ve Afyon'dan termal su örneklerinden izole edilen Acanthamoeba suşları dahil edilmiştir. İzolatların patojenite potansiyellerinin belirlenmesi için, ozmotolerans / ısı tolerans yöntemi (1M mannitol içeren K.aerogenes ile kaplanmış non-nutrient agarlı besiyerlerinde Acanthamoeba'nın 37°C'de 96 saat inkübasyonu sonrası mikroskopik olarak amiplerin büyümesinin izlenmesi) ve in vitro sitotoksosite yöntemi (korneal epitelyal hücreler kullanılarak laktat dehidrogenaz salınımının ölçülmesi) uygulanmıştır. Sonuç olarak, ribozomal DNA dizileri çıkarıldığında, T3 ve T4 izolatlarının en patojen karakteri sergilediği, T7 izolatlarının herhangi bir patojenite özelliği göstermediği ve non-patojen kabul edildiği ve çevresel örneklerden izole edilen Acanthamoeba'ların üçte ikisinin potansiyel patojen olabilecekleri kanısına varılmıştır. Gelecekte farklı kaynak ve coğrafi bölgelerden elde edilecek daha geniş çevresel örneklerin çalışılmasıyla, parazitin dağılımının belirlenmesi, patojen genotiplerinin saptanması ve hatta yeni genotiplerin tanımlanması mümkün olabilecektir.



P52 HEPATİT B VİRUSU (HBV) SEROLOJİK GÖSTERGELERİ İLE HBV DNA ARASINDAKİ İLİŞKİ

Aslı Gamze ŞENER, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İzmir
Zafer BUYRAÇ, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İzmir
Serdar GÜNGÖR, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İzmir
Metin TÜRKER, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İzmir
Belkıs ÜNSAL, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İzmir

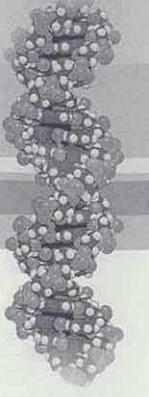
Hepatit B virusu (HBV) kronik karaciğer hastalığının en önemli nedenlerinden biri olup, tüm dünyada büyük morbidite ve mortaliteye sahiptir. HBV enfeksiyonunun tanı ve izleminde, ELISA ile serolojik göstergelerin belirlenmesi yanında, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi moleküler yöntemler de kullanılmaktadır. Bu çalışmada, önemli bir replikasyon göstergesi olan HBV DNA ile HBsAg, HBeAg, antiHBe ve total antiHBc arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, hastanemiz PCR laboratuvarına gönderilen 175 hasta serumu alınmıştır. HBV DNA, eş zamanlı PCR yöntemi (Abi Prism 7700, Perkin Elmer) ile çalışılmış ve 156 hastada (%90.8) pozitif bulunmuştur. HBV DNA pozitif hastaların EIA (Beckman Coulter) yöntemi ile 143'ünde (%91.6) HBsAg, 110'unda (%70.5) HBeAg, 43'ünde (%27.5) antiHBe ve 122'sinde (%78.2) total antiHBc pozitif olarak saptanmıştır. HBV DNA negatif 19 hastanın (%10.8) tümünde HBsAg negatif bulunmuştur. Sonuç olarak, HBV enfeksiyonunun tanı ve izleminde, özellikle replikasyonun değerlendirilmesinde, EIA yöntemi ile araştırılan göstergelerin, HBV DNA sonuçlarıyla birlikte değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmıştır.



P53 HEPATİT C VİRUSU (HCV) İNFEKSİYONUNUN TANISINDA HCV RNA SAPTANMASININ ÖNEMİ

Aslı Gamze ŞENER, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir
Serdar GÜNGÖR, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir
Zafer BUYRAÇ, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı, İzmir
Meral TÜRK, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir
Belkıs ÜNSAL, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı, İzmir
Metin TÜRKER, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Hepatit C virusu (HCV) kronik karaciğer hastalığının en önemli nedenlerinden biridir. İnfeksiyonun erken evrelerinde hastaların seronegatif olması veya bazı olgularda serokonversiyonun uzun sürede gerçekleşmesi gibi nedenler serolojik testler yanında moleküler biyolojik yöntemlerle HCV RNA saptanmasını da zorunlu kılmaktadır. Bu çalışmada, kronik hepatitli hasta serumlarındaki HCV RNA ve anti HCV sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, hastanemiz klinik mikrobiyoloji polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) laboratuvarına gönderilen 126 hasta serumu alınmıştır. Anti HCV EIA (Beckman Coulter), HCV RNA ise eş zamanlı PCR (Abi Prism 7700, Perkin Elmer) yöntemi ile araştırılmıştır. Hastaların 72'sinde (%57.1) anti HCV pozitifliği belirlenmiştir. HCV RNA bu hastaların 66'sında (%91.6) pozitif, altısında (%8.3) negatif bulunmuştur. Anti HCV'si negatif olan 54 (%42.8) hastanın ise dokuzunda (%16.6) HCV RNA pozitif bulunmuştur. Sonuç olarak, HCV enfeksiyonunun laboratuvar tanısında EIA ile anti HCV saptanması önemli olmakla birlikte, özellikle seronegatif evrede tek başına yeterli olmadığı görülmektedir. Bu nedenle HCV RNA varlığının araştırılması ve viral genom sayısının belirlenmesi, kronik hepatitin tanı ve izlemi açısından önemlidir.



P54 HEPATİT C VİRUS İNFEKSİYONU TANISINDA ENZİM İMMÜN YÖNTEMİ İLE POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONUNUN KARŞILAŞTIRILMASI

Tuncer ÖZEKİNCİ, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır
Selahattin ATMACA, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır
Nezahat AKPOLAT, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır
Hakan TEMİZ, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır
Eralp ARIKAN, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır

Hepatit C virusu (HCV) tüm dünyada yaygın olarak görülen, insidansı giderek artan bir virustur. Akut hepatitlerin %20'si, kronik hepatitlerin ise %70'den HCV sorumlu tutulmaktadır. HCV infeksiyonlarının tanısının, enzim immün yöntemi (EIA) ile tek başına anti HCV saptanarak güvenilir bir şekilde yapılması, her zaman mümkün olmamaktadır. Anti HCV antikörlerinin varlığı, bireyin HCV ile karşılaşmış olduğunu göstermekteyse de, tek başına akut bir infeksiyon varlığını göstermekte yetersiz kalmaktadır. Erken dönemde vireminin saptanmasında en önemli yöntem polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'dur. Bu çalışmada, laboratuvarımıza gönderilen 255 hastaya ait kan örneği EIA ve PCR ile değerlendirilmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Hastaların 108'inde (%42.4) anti HCV ve HCV RNA pozitif, 62'sinde (%24.3) anti HCV ve HCV RNA negatif, 70'inde (%27.4) anti HCV pozitif HCV RNA negatif, 15'inde (%5.9) anti HCV negatif HCV RNA pozitif olarak saptanmıştır. Sonuçlar farklı bir şekilde yorumlandığında; hastaların 178'inde (%69.8) anti HCV pozitif bulunmuş, ancak bu hastaların 108'inde(%60.7) HCV RNA tespit edilebilmiştir. Buna karşın anti HCV negatif 77 hastanın 15'inde (%19.5) HCV RNA tespit edilmiştir. Sonuç olarak, anti HCV pozitif hastalarda HCV RNA'nın araştırılması takip ve tedavi açısından gereklidir. Anti HCV negatif viremik hastaların saptanmasında, özellikle şüpheli ve serokonversiyon gelişmeyen olguların aydınlatılmasında ya da uygulanacak tedavi etkinliğinin izlenmesinde, PCR rutin olarak kullanılması gereken bir yöntemdir.

P55 HEPATİT D VİRUS (HDV) IgG ve IgM ANTİKORLARININ HDV RNA İLE KORELASYONU

Tuncer ÖZEKİNCİ, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır

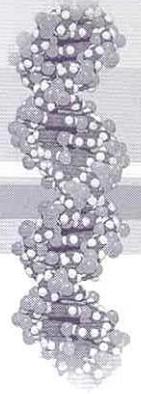
Selahattin ATMACA, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır

Nezahat AKPOLAT, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır

Hakan TEMİZ, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır

Eralp ARIKAN, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır

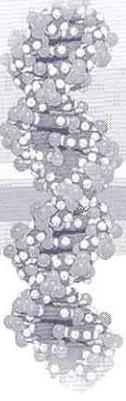
Hepatit D virusu (HDV) tek başına patojen olmayan defektif bir RNA virusudur. Replike olabilmek için HBsAg'ye gereksinim duyar. HDV RNA pozitifliği, devam eden HDV infeksiyonunun en iyi göstergesidir ve saptanmasında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) en duyarlı yöntemdir. Ancak maliyetinin yüksek olması rutin kullanımını sınırlamaktadır. Çalışmanın amacı, RT-PCR ile tespit edilen HDV viremisi ile HDV IgG ve IgM pozitifliği arasındaki korelasyonun değerlendirilmesidir. Çalışmada, laboratuvarımıza gönderilen 153 kan örneği enzim immün yöntemi (EIA) ve PCR ile değerlendirilmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. HDV IgG pozitif olan 75 hastanın 23'ünde (%30.6) ve HDV IgM pozitif olan 51 hastanın 27'sinde (%52.9) HDV RNA varlığı saptanmıştır. HDV RNA pozitif hastaların 4'ünde sadece HDV IgG, 8'inde sadece HDV IgM, 19'unda ise her ikisi de pozitif olarak belirlenmiştir. HDV IgG ve IgM'nin beraber negatif olduğu 67 hastanın 2'sinde (%2.9) HDV RNA'nın pozitif olduğu görülmüştür. Serum ALT düzeyleri, HDV RNA pozitif olan 33 hastanın 28'inde yüksek olarak saptanırken, HDV IgG ve IgM pozitif, HDV RNA negatif örneklerin 6'sında (%10.9) yüksek bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, HDV IgM pozitif 51 hastanın %52.9'unda, buna karşın HDV IgG ve IgM'nin birlikte negatif olduğu hastaların ise %2.9'unda vireminin olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, endemik bölgelerde viremisi olan hastaların saptanmasında, PCR rutin kullanılması gereken bir yöntemdir.



P56 HEMODİYALİZ HASTALARINDA TT VİRUS PREVALANSI

Sinem AKÇALI, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa
Tamer ŞANLIDAĞ, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa
Beril ÖZBAKKALOĞLU, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa

Bu çalışmada, hemodiyaliz hastalarında TT virus (TTV) sıklığının gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real time PCR) yöntemiyle saptanması ve TTV enfeksiyonunun, hepatit B (HBV), hepatit C (HCV), hepatit D (HDV) ve hepatit G (HGV) viruslarıyla koinfeksiyonunun araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Anabilim Dalımız seroloji laboratuvarına Manisa bölgesindeki çeşitli hemodiyaliz merkezlerinden gönderilen 38 serum örneği alınmıştır. HBsAg, anti HBs, anti HBc, HBeAg, anti HBe, HDV Ag, anti HDV (Organon Teknika, Boxtel, NL) ve anti HCV (UBI HCV EIA, United Biologicals, Inc., New York) mikro ELISA yöntemiyle, TTV DNA ve HGV RNA floresanlık real time PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Hemodiyaliz hastalarının 27'sinde (%71) TTV DNA varlığı saptanmış, bunların birinde HBV, 10'unda HCV ve 6'sında HGV ile birlikte pozitiflik belirlenmiştir. TTV DNA negatif bulunan 11 hastanın 4'ünde HBV, 2'sinde HCV ve birinde HGV pozitifliği bulunmuştur. Her iki grupta da HDV pozitifliği saptanmamıştır. Sonuç olarak, hemodiyaliz hastalarında TTV prevalansının oldukça yüksek olduğu ve TTV pozitif olan hastalarda HCV ve HGV koinfeksiyonuna sık olarak rastlandığı kanısına varılmıştır.



P57 FARKLI GRUPLARDA HEPATİT G VİRUS PREVALANSI

Sinem AKÇALI, Celal Bayar Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa
Tamer ŞANLIDAĞ, Celal Bayar Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa
Beril ÖZBAKKALOĞLU, Celal Bayar Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Manisa

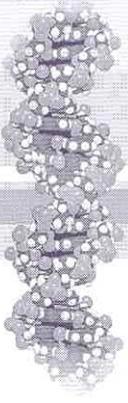
Son yıllarda, transfüzyon ile ilişkili hepatit etkenlerinden birisi olarak tanımlanan hepatit G virusu (HGV), genomik yapı olarak hepatit C virusu (HCV)'na kısmen benzerlik gösteren bir RNA virusudur. Bu çalışmada kan kaynaklı bir virus olan HGV prevalansının hemodiyaliz hastaları, kronik hepatit B virus (HBV) hastaları, kronik HCV hastaları ve sağlıklı bireylerde araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada 4 grup oluşturulmuş ve kronik HBV hastaları (n:48) grup I; kronik HCV hastaları (n:45) grup II; hemodiyaliz hastaları (n:50) grup III ve sağlıklı bireyler (n:30) grup IV olarak tanımlanmıştır. HGV RNA, flojenik gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real time PCR) (ABI Prism 7700; Applied Biosystems, Foster City, CA) ile araştırılmış, istatistiksel analizlerde Max Likelihood Chi-square yöntemi kullanılmıştır. Çalışılan 173 örneğin 23'ünde (%13) HGV RNA pozitif olarak saptanmıştır. HGV RNA pozitifliği; grup I'de %25 (12/48), grup II'de %7 (3/45), grup III'de %14 (7/59) ve grup IV'de %3 (1/30) olarak belirlenmiştir. Sağlıklı bireylerde saptanan HGV pozitifliği ile diğer 3 grupta saptanan değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (p=0.027). Sonuç olarak çalışmamızda, HGV için risk grubunu oluşturan başta kronik hepatit B hastaları olmak üzere hemodiyaliz ve kronik hepatit C hastalarında HGV'nin yaygın olarak gözleendiği kanısına varılmıştır.



P58 ISPARTA KAN DONÖRLERİNDE HEPATİT G VİRUS PREVALANSI

Selçuk KAYA, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta
Buket Cicioğlu ARIDOĞAN, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta
Mustafa DEMİRCİ, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta

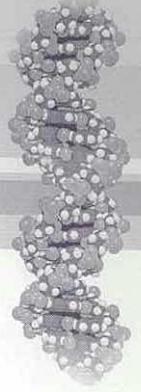
GB virus C/hepatit G virus (GBV-C/HGV) hepatit yaptığı düşünülen, yeni keşfedilmiş bir flavivirusdur. Bu çalışmada, 60 kan donöründe HGV RNA ve geçirilmiş infeksiyon belirleyicisi olan E2 zarf proteinine karşı oluşan antikorların prevalansı araştırılmıştır. Bu amaçla serum örnekleri, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile HGV RNA ve ticari ELISA ile HGV E2 antikorlarının varlığı açısından test edilmiştir. Kan donörlerinin serumlarında GBV-C/HGV RNA pozitifliği %1.66 ve HGV E2 antikor pozitifliği %6.66 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak, kan transfüzyon hikayesi olmamasına rağmen, bizim bölgemizin kan donörlerinde geçirilmiş ve geçirilmekte olan infeksiyon (viremi ve/veya HGV antikor) belirleyicilerinin yüksek oranda (%8.33) olduğu görülmüştür. Dolayısıyla sonuçlarımız, HGV infeksiyonunun sadece kan transfüzyonu ile değil, aile içi ilişki ya da seksüel geçiş gibi diğer bulaş yolları ile de geçebileceğini düşündürmektedir.



P59 HEPATİT B VİRUS DNA'SININ SAPTANMASINDA SIVI HİBRİDİZASYON VE REAL-TIME PCR YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Sinem AKÇALI, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa
Tamer ŞANLIDAĞ, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa
Beril ÖZBAKKALOĞLU, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa

Bu çalışmada HBV DNA saptanmasında kullanılan iki yöntem olan sıvı hibridizasyon ile real time PCR yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Seroloji laboratuvarına rutin tarama amacıyla gönderilen ve hepatit B serolojik belirleyicileri (HBsAg, anti-HBc total) mikro ELISA (Organon Teknika, Boxtel, NL) ile pozitif olarak saptanan 55 serum örneği çalışmaya alınmıştır. Sıvı hibridizasyon yönteminde serum örnekleri, Digene Hybrid Capture System (Digene Diagnostics, Inc., Beltsville, MD) ile, kit prosedürüne uygun olarak çalışılmış ve sonuçlar luminometre ile okutulmuştur. Nükleik asit miktarları ölçülerek, mililitrede 5 pikogram (1.4×10^6 kopya) ve üzerindeki değerler pozitif olarak değerlendirilmiştir. Real time PCR yönteminde aynı serum örneklerinden 200 μ l alınarak Nucleospin Virus Kit" (Biogene, Kimbolton, UK) ile DNA ekstraksiyonu yapılmış ve örnekler "TaqMan PCR Core Reagents" (Applied Biosystems) kullanılarak hazırlanan PCR karışımı içerisinde ABI Prism 7700 sekans tarama cihazında (Applied Biosystems, Foster City, CA) amplifikasyona tabi tutulmuştur. Değerlendirme Max Likelihood Chi-square yöntemi ile yapılmıştır. Sonuç olarak sıvı hibridizasyon yöntemiyle 55 örneğin 31'i (%56), real time PCR yöntemiyle ise 50'si (%90) pozitif olarak saptanmıştır. Ancak real time PCR yöntemiyle pozitif olarak saptanan 20 örneğin HBV DNA düzeyleri, hibridizasyon yönteminin yakalama sınırı olan 1.4×10^6 kopyanın altında bulunmuştur. Buna karşılık real time PCR ile negatif olarak saptanan 2 örnek, hibridizasyon yöntemiyle pozitif olarak değerlendirilmiştir. Yapılan istatistiksel analizde, iki yöntem arasındaki korelasyon 0.754 olarak hesaplanmıştır ($p < 0.0001$). Her iki yöntemle saptanan sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığından, real time PCR'in geniş bir dinamik aralığa sahip olması ve hibridizasyon yönteminin saptayamadığı miktarları tesbit edebilme avantajları göz önüne alınarak, HBV DNA'nın saptanmasında duyarlı ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.



P60 SAĞLIKLI ÇOCUKLARDA TTV, SIMIAN TTV ve SEN VİRUSLARIN PREVALANSI ve ÖNEMLİ GEN KISIMLARININ KLONLANMASI

Yasemin BULUT, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ

Aykut ÖZDARENDELİ, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ

Ahmet KALKAN, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Elazığ

Mehmet KILIÇ, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Elazığ

Zülal Aşçı TORAMAN, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ

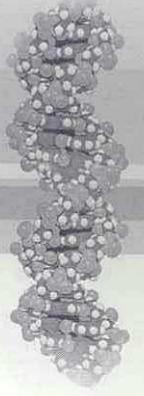
Transfüzyon transmitted virus (TTV), Simian transfüzyon transmitted virus (s-TTV) ve SEN virus (SENV) tek sarmallı, sirküler DNA'ya sahip Circoviridae ailesinin üyeleridirler. Bunlardan TTV ve SENV, post-transfüzyon hepatitlerden sorumlu tutulmaktadır. s-TTV'nin ise primatlardan insanlara geçtiği son yıllarda belirlenmiş olup, virusun insanlardaki patogenezi ile ilgili fazla bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada, TTV, s-TTV ve SEN viruslarının tiplendirilmesi ve teşhisinde önemli olan gen bölgelerine özgül primerlerle gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak, önce sağlıklı çocuklarda bu virusların prevalansının belirlenmesi daha sonra ise çoğaltılan bu gen bölgelerinin genetik klonlanması amaçlanmıştır. Çalışmaya 0-15 yaş grubunda toplam 180 sağlıklı çocuktan alınan serum örneği dahil edilmiştir. Çalışmada ilk olarak, çocukların serum örneklerinden elde edilen DNA'lar ile virüslara özgül primerler kullanılarak PCR uygulanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülenerek virüslerin varlığı tespit edilmiştir. Daha sonraki aşamada ise her virus için seçilen ikişer amplikonun P-target klonlama vektöründe klonlanması ve doğrulama deneyleri gerçekleştirilmiştir. PCR sonuçlarına göre, sağlıklı çocukların 45'inde (%25) TTV, 3'ünde (%1.6) s-TTV, 25'inde (%14) SENV-D ve 15'inde (%8.3) SENV-H pozitifliği belirlenmiştir. Amplikonların P-target vektörde klonlanmasıyla elde edilen rekombinant vektörler içinde özgül gen bölgelerinin varlığı, PCR ve restriksiyon enzim analizi metotlarıyla doğrulanmıştır. Sonuç olarak, çalışmamızda sağlıklı çocuklarda da yüksek oranda TTV ve SENV varlığının belirlenmesi, bu virüslerin yalnızca parenteral yolla değil parenteral olmayan yollarla da bulaşabildiğine işaret etmektedir. Ayrıca bu çalışmada elde edilen genetik klonlar, bu gen kısımlarının eksprese edilmesi ve bu virüslerin filojenik analizi çalışmalarında kullanılabilir olacaktır.



P61 SİTOMEGALOVİRUS (CMV) SEROPOZİTİF SAĞLIKLI KİŞİLERİN PERİFERİK KAN LÖKOSİTLERİ VE PLAZMASINDA CMV DNA'SININ ARAŞTIRILMASI

Kenan MİDİLLİ, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Sevgi ERGİN, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Melda ÖZDAMAR, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Mert KUŞKUCU, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Kemal ALTAŞ, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

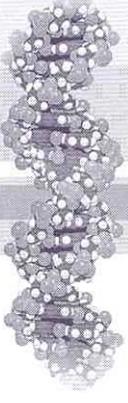
Sağlıklı CMV seropozitif kişiler arasında CMV DNA pozitifliği ile ilgili çalışmalarda çelişkili sonuçlar bildirilmektedir. Çalışmamızda, sağlıklı kişilerin ardışık kan örneklerinde CMV DNA pozitifliğinin saptanması ve fiziksel ve ruhsal stres ile ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Sekiz haftalık çalışma dönemi boyunca, 24-53 yaş arası CMV IgG pozitif 17 kişiden haftalık kan örnekleri toplanmış, plazma ve periferik kan lökositleri ayrılarak -80°C'de saklanmıştır. Her bir denek fiziksel ve ruhsal stres durumunu, 1-5 arası derecelendirilmiş bir görsel analog skala üzerinde değerlendirmiş ve aynı zamanda alkol tüketimleri ile sağlık durumlarında fark ettikleri herhangi bir değişiklik olup olmadığını bildirmiştir. CMV DNA, hem plazma hem de periferik kan lökositlerinde CMV'nin MIE geninin hedeflendiği primerler kullanılarak nested PCR ile araştırılmıştır. Sonuç olarak, incelenen toplam 272 örnekten (136 plazma ve 136 periferik kan lökosit) sadece tek bir periferik kan lökosit örneğinde, çalışmanın 2. haftasında CMV DNA saptanmıştır. Bu örnek çalışmanın en yaşlı kişisine aittir. Bulgularımız, sağlıklı CMV seropozitif kişiler arasında CMV DNA pozitifleşmesinin nadiren ortaya çıktığını vurgulamaktadır.



P62 LENFOSİTOZİSLİ HAYVANLARDA BOVINE LEUKEMIA VİRUS VARLIĞININ PCR İLE ARAŞTIRILMASI

İrem GÜLAÇTI, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, Elazığ
Şükrü TONBAK, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, Elazığ
Hakan BULUT, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, Elazığ
Yusuf BOLAT, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, Elazığ

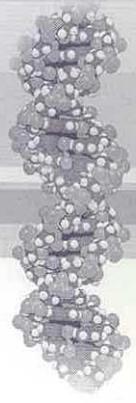
Bu çalışmada enzootic bovine leukemia virus (BLV) yönünden enzim immün yöntemi (ELISA) ile seronegatif olan fakat lenfositosis tespit edilen 37 hayvan BLV nükleik asit varlığı yönünden nested-polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır. Bu hayvanlardan alınan kan örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapılarak enzootic BLV'un 444 baz çiftlik (bp) "env" gen kısmı nested-PCR ile çoğaltılmış ve hayvanların 3'ünde özgül 444 bp'lik amplifikasyon ürününün varlığı belirlenmiştir. Bu bulgular ışığında, BLV insidansının yüksek olduğu sürülerde ELISA'nın tek test olarak kullanılmasından ziyade, sürünün gerekirse hematolojik yönden taranması ve hematolojik yönden şüpheli hayvanların PCR ile de test edilmesini önermekteyiz.



P63 HEMODİYALİZ HASTALARINDA SEN-D ve SEN-H VİRUS PREVALANSI

Zülal Aşçı TORAMAN, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ
Yasemin BULUT, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ
Aziz AKSOY, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ
Aykut ÖZDARENDELİ, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ
Adnan SEYREK, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ

Tek sarmallı sirküler bir DNA içeren SEN virus (SENV), ilk olarak 1999 yılında tanımlanmış olup, son yıllarda insanlarda post-transfüzyon hepatite sebep olan etkenlerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu virusun filogenetik analizi sonucu 9 farklı genotipi olduğu bildirilmiştir. Bu genotiplerden özellikle 2 tanesi, SENV-D ve SENV-H, post-transfüzyon hepatitlerden sorumlu tutulmaktadır. Bu çalışmanın amacı, hemodiyaliz hastalarında SENV-D ve SENV-H DNA'larının semi-nested PCR ile belirlenmesidir. Fırat Tıp Merkezi ve Elazığ Devlet Hastanesindeki 89 hemodiyaliz hastası ile 50 sağlıklı bireyin SENV yönünden araştırılması için serum örneklerinden DNA ekstraksiyonları yapılmış ve SENV-D ve SENV-H için uygun primerler kullanılarak semi-nested PCR yöntemi uygulanmıştır. Sonuçta, 89 kronik hemodiyaliz hastasının 9'unda (%10.1) SENV-D, 15'inde (%16.8) SENV-H ve 2'sinde (%2.2) hem SENV-D hem de SENV-H virus varlığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada kontrol grubu olarak seçilen 50 sağlıklı bireyin ise 3'ünde (%6) SENV-D ve 4'ünde (%8) SENV-H pozitifliği saptanmıştır. Ayrıca, SENV pozitifliği saptanan ve saptanmayan hastaların klinik ve biyokimyasal değerlerinin birbirine yakın veya benzer olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın verilerine göre, hemodiyaliz hastalarında SENV-D ve SENV-H pozitifliği yüksek bulunmuş, ancak pozitif olan hastalarda virusun klinik ve biyokimyasal olarak hepatite yol açması ile ilgili bir bulguya rastlanmamıştır.



P64 HEPATİT B VİRUS (HBV) DNA KANTİTASYONUNDA DIGENE HİBRİD YAKALAMA YÖNTEMİ İLE ROBOGENE HBV REAL-TIME PCR KANTİTASYON KİTİ SONUÇLARININ UYGUNLUĞUNUN ARAŞTIRILMASI

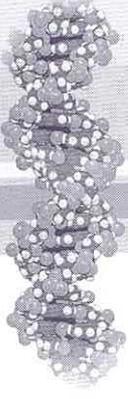
Rüçhan YAZAN SERTÖZ, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Ayşın ZEYTİNOĞLU, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Tijen ÖZACAR, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Selda ERENŞOY, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

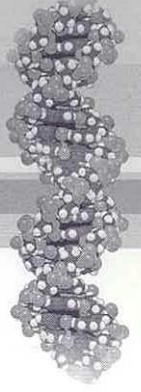
Bu çalışmada hepatit B virus (HBV) DNA'sının kantitasyonunda yaygın olarak kullanılan Digene Hybrid Capture System HBV DNA testi (Digene Corporation, ABD) ile gerçek zamanlı PCR prensibi ile çalışan Robogene HBV kantitasyon kiti (Roboscreen, Almanya) sonuçlarının birbirine uygunluğunun araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya alınan 74 kronik hepatit B'li hastanın serumu Digene hibrid yakalama yöntemiyle ve Robogene gerçek zamanlı PCR kiti ile ABI Prism 7000 sekans saptama cihazında (PE Biosystems) çalışılmıştır. Robogene PCR testi için nükleik asit izolasyonu RTP DNA/RNA Virus Minikit (Invitex, Almanya) ile yapılmıştır. Digene testinin dinamik aralığı 5-2000 pg/ml (1.425×10^6 kopya/ml); Robogene testinin ise $10^3 - 2 \times 10^8$ kopya/ml (HBV DNA Viral Quality Control-VQC panele göre) olarak kabul edilmiştir. Yetmiş dört örneğin 20'si her iki test ile de negatif bulunmuştur. Digene testinde HBV DNA negatif Robogene pozitif olan 31 örneğin 9'unda 1000 kopya/ml'nin altında, 22'sinde $1.2 \times 10^3 - 3.2 \times 10^6$ kopya/ml arasında HBV DNA pozitifliği saptanmıştır. Her iki test ile kantitatif sonuç verilen 23 örneğin Digene ve Robogene sonuçları arasında 0.11 - 2.95 log₁₀ fark belirlenmiştir (median: 0.37, mean: 0.54) Değerlerin karşılaştırılmasında, iki testten elde edilen sonuçların uyumsuz olduğu görülmüştür ($r^2: 0.58$, Spearman korelasyon katsayısı: 0.858). Sonuç olarak, farklı test sonuçları arasındaki logaritmik anlamlı fark nedeniyle hasta izleminde farklı testlerle elde edilen sonuçların birbirine çevrilmesi uygun olmayıp, hasta izleminin aynı yöntemle yapılması gereklidir. Kronik hepatit B'li hastaların izleminde gerçek zamanlı PCR yöntemi, duyarlılığı ve dinamik aralığın genişliği nedeniyle avantajlıdır.



P65 NORMAL POPÜLASYONDA İNSAN HERPES VİRUS 6 ve 7 DNA SIKLIĞI

Metin SANCAKTAR, K.T.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon
Cavit BOZ, K.T.Ü. Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, Trabzon
Neşe KAKLIKKAYA, K.T.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon
İlknur TOSUN, K.T.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon
Kurtuluş BURUK, K.T.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon
Yelda YAZICI, K.T.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon
Faruk AYDIN, K.T.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon

Tüm dünyada insanların çoğu lenfotropik b herpes grubu üyesi olan insan herpesvirus 6 (HHV-6) ve 7 (HHV-7) ile çocukluk çağında karşılaşmakta ve virüsleri hayat boyu taşımaktadır. HHV-6 ve 7, ekzantem subitum (ES) etkeni olmakla birlikte günümüzde multipl skleroz, mononükleoz benzeri sendrom, sarkoidoz, hepatit, febril konvülsiyon, kronik yorgunluk sendromu ve malignensi gibi pek çok durum ile ilişkilendirilmektedirler. Önemi gittikçe artan HHV-6 ve 7'nin etyopatogenik rolünün belirlenmesi amacıyla pek çok çalışma yürütülmektedir. Bu çalışmada, HHV-6 ve 7 DNA sıklığının belirlenmesi amacıyla 50 sağlıklı erişkinden periferik kan örneği alınmış ve ficoll density gradient yöntemiyle mononükleer hücreler toplanmıştır. İzole edilen total DNA'da nested PCR yöntemiyle 5 örnekte (%10) HHV-6, 14 örnekte (%28) HHV-7 DNA'sı tespit edilmiştir. Ülkelerin gelişmişlik düzeyine göre HHV-6 ve 7 sıklığı yaklaşık %4 ile %90 arasında olduğu bildirilirken, ülkemizdeki durum bilinmemektedir. Bu çalışma konu ile ilgili veri tabanı oluşturacaktır.



P66 HEPATİT B VİRUS DNA KANTİTASYONUNDA ABI PRISM 7000 VE 7700 SEKANS SAPTAMA CİHAZLARI İLE ALINAN SONUÇLARIN UYGUNLUĞUNUN ARAŞTIRILMASI

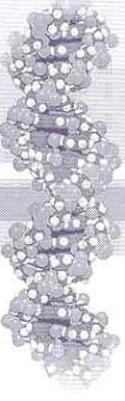
Selda ERENŞOY, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Rüçhan YAZAN SERTÖZ, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Suzan PAS, Erasmus Üniversitesi Moleküler Biyoloji Bölümü,

Hubert NİESTERS, Erasmus Üniversitesi Moleküler Biyoloji Bölümü,

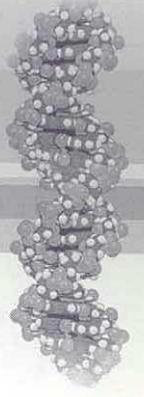
Tanısal viroloji laboratuvarlarında klinik anlamlılığı nedeniyle önemli olan kantitatif hepatit B virus (HBV) DNA testinde kullanılan çeşitli yöntemlerin ve sistemlerin değerlendirilmesi, sonuçların güvenilirliği açısından gereklidir. Gerçek zamanlı PCR, kullanım kolaylığı ve geniş dinamik aralık gibi avantajları nedeniyle tanısal viroloji laboratuvarlarında klasik PCR'ın yerini almak üzeredir. Farklı sistemlerden elde edilen sonuçların değerlendirilmesi için karşılaştırmalı çalışmalar yapılmalıdır. Bu çalışma, gerçek zamanlı PCR sistemlerinden ABI Prism 7000 ile 7700 cihazlarından (PE Biosystems) elde edilen sonuçların karşılaştırılması amacıyla planlanmıştır. Kronik hepatit B'li 168 hastanın serumu çalışmaya alınmış, nükleik asit izolasyonu MagnaPure LC izolasyon istasyonunda (Roche Applied Science, Penzberg, Almanya) yapılmıştır. ABI Prism 7000 ve 7700 cihazlarında, daha önce ABI Prism 7700 cihazı için tanımlanan ve dinamik aralığı 373-1010 kopya/ml olan gerçek zamanlı HBV DNA PCR protokolü uygulanmıştır. Test edilen 168 örneğin biri her iki cihazla 1010 kopya/ml 'nin üstünde, 6 örnek sadece 7700 ile 1010 kopya/ml 'nin üstünde saptanmıştır. Otuz örnek her iki cihazla negatif iken, ABI 7000 ile 320-1220 kopya/ml arasında pozitif olan 7 örnek ABI Prism 7700 ile negatif bulunmuştur. Dinamik aralık sınırları içinde olan 124 örneğin iki cihazdan elde edilen sonuçları karşılaştırıldığında, logaritmik farkın 0.00 ile 1.22 (median: 0.22, mean:0.32) arasında değiştiği gözlenmiştir. Değerlerin karşılaştırılmasında, sonuçlar birbirleriyle uyumlu bulunmuştur (regresyon katsayısı: 0.97; Spearman korelasyon katsayısı: 0.988). Sonuç olarak, ABI Prism 7700 cihazında standardize edilen HBV DNA protokolü aynı firmanın farklı bir cihazı olan ABI Prism 7000 cihazı ile çalışmaya uygundur. Aynı protokolle ABI 7000 ve 7700 cihazlarından elde edilen kantitatif HBV DNA sonuçları uyumludur.



P67 HERPESVİRUSLARIN TESPİTİ VE TÜR TANIMLAMASI İÇİN "IN-HOUSE" POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONUNUN KULLANIMI

Elif AKTAŞ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Rıza DURMAZ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Yaşar BAYINDIR, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Malatya
Atilla ÖZCAN, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı, Malatya
Hülya SAĞLAM, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı, Malatya

Bu çalışmanın amacı, herpesviruslarının tespiti ve tür tanımlaması için denenmiş olan "in-house" polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) metodunun optimizasyonunu sağlamak ve bu metodun klinik örneklerde kullanılabilirliğini araştırmaktır. Çalışmada, guanidin tiyosiyanat metodu ile ekstraksiyon sonrası, bilinen bütün insan herpesvirus DNA'larının amplifikasyonuna olanak sağlayan iki çift primer kullanılmıştır. Bu primer çiftlerinin birincisi Herpes simplex virus-1 (HSV-1), HSV-2, Epstein-Barr virus, Cytomegalovirus ve insan herpes virusu (HHV)-8 DNA'sının; ikincisi ise Varisella-Zoster virus (VZV), HHV-6 ve HHV-7 DNA'sının amplifikasyonunu sağlamaktadır. Tür tanımlaması, amplifikasyon ürünlerinin, her bir herpesvirus için karakteristik büyüklükte restriksiyon parçaları oluşturan BamHI ve BstUI enzimleri ile kesimi sonrasında yapılmıştır. Çalışmaya dermatoloji hastalarından alınan HSV şüpheli 28 örnek, VZV şüpheli 9 örnek ve çeşitli servislerden gelen menenjit-ensefalit dışı 25, tüberküloz menenjitli 8, pürülan menenjitli 8 ve ensefalit şüpheli 9 olmak üzere toplam 50 beyin omurilik sıvısı (BOS) örneği alınmıştır. Yöntemin saptayabileceği alt limiti tespit için, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi'nden alınan hücre kültüründe üretilmiş HSV-1'in seri dilüsyonları yapılmıştır. Seri dilüsyonlar sonucu, bu yöntemle örnekteki 103 TSID50/ml HSV-1'in tespit edilebildiği görülmüştür. Uçuk ve vücuttaki veziküler döküntülerden HSV-1 şüphesi ile gönderilen 28 örneğin 21'i HSV-1 açısından pozitif, zona ön tanısı olan veya vücuttaki variselliform döküntüleri olan hastalardan gönderilen 9 örneğin 6'sı VZV açısından pozitif bulunmuştur. HSV-1 negatif 7 örneğin 5'inin kurutlu lezyonlardan veya tedavi sonrası alındığı, VZV negatif 3 örneğin 2'sinde daha sonra varisella tanısından uzaklaşıldığı belirlenmiştir. Menenjit-ensefalit olmayan hastalardan alınan 25 BOS örneği ile bakteriyel menenjitli 16 BOS örneğinin hepsi bu yöntem ile negatif bulunmuştur. Viral menenjit veya ensefalit şüpheli 9 BOS örneğinde ise herpesvirus tespit edilmemiştir. Sonuç olarak, hızlı, kolay, ucuz ve "in-house" uygulanabilme avantajları olan bu yöntemin, özellikle dermatolojik örneklerde ve viral etkenden şüphelenilen santral sinir sistemi infeksiyonlarında herpesvirusların tespiti ve tür tanımında yararlı olacağı kanısındayız.



P68 ÜST SOLUNUM YOLU KANSERLERİ İLE HERPES SIMPLEX VİRUS İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayla ÖZCAN, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir
Fırat DEMİRTAŞOĞLU, Atatürk Araştırma ve Eğitim Hastanesi 3. K.B.B Kliniği, İzmir
İ. Mehmet Ali ÖKTEM, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir
Semih ÖNCEL, Atatürk Araştırma ve Eğitim Hastanesi 3. K.B.B Kliniği, İzmir

Herpes simplex virusların (HSV) latent infeksiyon yaparak onkojenik süreçleri başlatabilme potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir. Özellikle serviks ve larinks kanserleri ile HSV ilişkisi günümüzde bazı araştırmalara konu olmuştur. Bu çalışmanın amacı, ağız tabanı, dudak, larinks ve dil gibi farklı üst solunum yolları kanserlerine ait doku örneklerinde HSV nükleik asit varlığının araştırılmasıdır. Çalışmaya, larinks, dudak, ağız tabanı, dil ve hipofarinks kanseri tanısı ile opere edilen sırası ile 28, 17, 7, 4 ve 1 olguda (toplam 57 olgu) operasyon sırasında saptanan lezyon alanlarından elde edilen biyopsi örnekleri alınmıştır. Kontrol grubu olarak, üst solunum yolu kanseri olmayan 20 kadavradan gerekli izinler alınarak elde edilen biyopsi materyalleri kullanılmıştır. Bu örnekler steril PBS içeren taşıma ortamları kullanılarak aynı gün içinde laboratuvara ulaştırılmış, doku örneklerinin ekstraksiyonu ve DNA eldesi, "Nucleospin tissue kit" (Macherey Nagel) DNA izolasyon kiti kullanılarak yapılmıştır. Hem HSV-1 hem de HSV-2'yi saptayabilen primerler kullanılarak (Sense 5'- ATC AAC TTC GAC TGG CCC TTC -3', antisense 5'-CCG TAC ATG TCG ATG TTC ACC -3') 179 baz çiftlik hedef bölge çoğaltılmış ve PCR döngüleri şu şekilde uygulanmıştır: 95°C 7 dk. ön denatürasyon, 94°C 45 sn. denatürasyon, 64°C 45 sn. bağlanma, 72°C 1 dk. uzama, 35 döngü 72°C 5 dk. son uzama. Sonuç olarak PCR metoduyla 57 olgudan 3'ünde (%5.2) HSV 1-2 DNA varlığı saptanmıştır. Pozitif örneklerin tümü larinks kanserli vakalardan elde edilen dokulardır (%10.7). Diğer üst solunum yolu kanseri olgularında ve kontrol grubunda HSV1-2 DNA varlığı saptanamamıştır.



P69 İNFLUENZA SALGIN DÖNEMİNDE PCR İLE ELDE EDİLEN SONUÇLAR

Güliden YILMAZ, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Kenan MİDİLLİ, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Ayşe İSTANBULLU, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Salih TÜRKOĞLU, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Kemal ALTAŞ, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

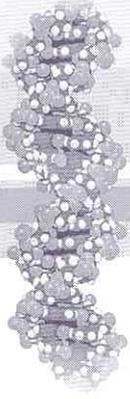
İnfluenza virus enfeksiyonu, kolaylıkla yayılabilen ve bu nedenle her yıl önemli morbidite ve mortaliteye neden olan son derece bulaşıcı bir solunum yolu enfeksiyonudur. İnfluenza virusu ile enfeksiyonların hızlı ve duyarlı tanısının önemi büyüktür. Klinik materyale direkt olarak uygulanan moleküler yöntemler, influenza viruslarının tanısında ve süveyansında giderek artan sıklıkta kullanılmaktadır. Bu çalışmada, grip ön tanılı hastalarda PCR yöntemi ile influenza A virusu araştırılmıştır. 30/12/2003-9/5/2004 tarihleri arasında grip ön tanılı, yaş ortalaması 29.8 ± 16 olan 72 hastadan (35 erkek, 37 kadın) alınan boğaz salgısı/yıkantı sularında influenza virusu RNA'sı RT-PCR ile araştırılmıştır. Virus RNA izolasyonunda "Qiaamp MinElute Virus Spin" (Qiagen, Almanya) ekstraksiyon kiti kullanılmıştır. Revers transkripsiyon aşamasından sonra influenza A virus RNA'sı matris proteinlerine özgü primerler kullanılarak nested RT-PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Sonuç olarak, hastaların 27'sinde (%37.5) influenza A virus RNA'sı saptanmış ve 19/4/2004 tarihinden sonra gelen örneklerde influenza A pozitifliği belirlenmemiştir.



P70 İSTANBUL'DA SAPTANAN HIV-1 ALT TIPLERİ

Emine ÖZKAN, İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Zübeyir BAYRAKTAROĞLU, İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Ahmet Mert KUŞKUCU, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Salih TÜRKOĞLU, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Kenan MİDİLLİ, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Gülden YILMAZ, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Leman ATASEVER, İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Semra ÇALANGU, İstanbul Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları, İstanbul
Kemal ALTAŞ, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Bu çalışmada, İstanbul'da saptanan HIV-1 suşlarının moleküler epidemiyolojik incelenmesi amacıyla 27 HIV/AIDS hastasına ait suş incelenmiştir. env geninin gp41 kısmının polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmasını takiben 310 DNA sequencer (Perkin-Elmer Applied Biosystems) kullanılarak dizisi belirlenmiş, elde edilen diziler Genestudio paketi kullanılarak analiz edilmiştir. Yirmi yedi hastanın 26'sı erişkin, biri yenidoğandır. Yirmi iki hastada bulaşma heteroseksüel ilişki, 2 hastada ise kan yolu iledir. Alt tip dağılımı şu şekilde bulunmuştur: 4 A alt tipi, 19 B alt tipi, 1 C alt tipi, 1 D alt tipi ve 2 F1 alt tipi. Sonuçlarımıza göre, olgu sayısının sınırlı olmasına karşın B alt tipinin en sık karşılaşılan tip olduğu görülmüştür. (Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma fonu tarafından desteklenmiştir)



P71 AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ DÖRT ÇOCUK HASTADA PARVOVİRUS B19 VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Orhan Cem AKTEPE, Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyon
Sevgi YETKİN, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji Ünitesi, Ankara
Namık ÖZBEK, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji Ünitesi, Ankara
Lale OLCAY, Onkoloji Hastanesi Çocuk Hematoloji Kliniği, Ankara

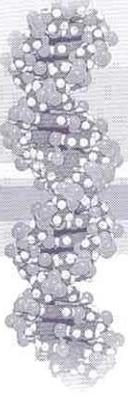
Parvovirus B19 çocukluk çağı döküntülü hastalıklarından eritema infeksiyozum etkeni olmasının yanısıra birçok hematolojik hastalıkla birliktelik göstermektedir. İmmün baskılanmış bireylerde ise virusun kronik infeksiyonlara yol açtığı bildirilmektedir. Bu çalışma kapsamında, akut lenfoblastik lösemi (ALL) tanısıyla Hacettepe Çocuk Hastanesi Pediatrik Hematoloji Ünitesi tarafından izlenen 4 çocuk hastanın kan örneklerinde parvovirus B19 varlığı araştırılmıştır. Viral DNA saptanmasında nested-PCR yöntemi kullanılmış ve eş zamanlı olarak parvovirus B19 IgM ve IgG varlığı da ELISA kitleriyle araştırılmıştır. İncelenen 4 hastanın 2'sinde viral DNA pozitif bulunurken, parvovirus B19 IgM varlığı sadece DNA negatif olguların birinde gösterilebilmiştir. Bu olguda IgM ve IgG'nin birarada bulunması kronik bir infeksiyonu işaret etmektedir. Ayrıca DNA pozitif olguların birinde de parvovirus B19 IgG varlığı saptanmıştır. Parvovirus B19 açısından araştırılan tüm parametreler birarada değerlendirildiğinde, 4 olgudan 3'ünde viral infeksiyonun saptanmış olması, ALL tanısı almış hastalarda bu etkenin dikkate alınması gerektiğini vurgulamaktadır. Bu tip olgularda virusa karşı antikor cevabının her zaman gelişemeyebileceği göz önüne alınarak, süphelenilen durumlarda viral genom da mutlaka aranmalıdır. (Bu çalışma TÜBİTAK-SBAG tarafından desteklenmiştir)



P72 PEDIATRİK YAŞ GRUBUNDA REAL TIME PCR İLE SİTOMEGALOVİRUS DNA'SININ SAPTANMASI

Seyyal ROTA, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Gülendam BOZDAYI, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Aytül DEMİRAĞ, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Bora DOĞAN, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Bedia DİNÇ, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Sitomegalovirus (CMV) en sık görülen konjenital enfeksiyon etkeni olması yanında, immün süprese hastalarda fatal enfeksiyona neden olabilmektedir. CMV enfeksiyonunun tanısında PCR ile DNA saptanması oldukça güvenilir bir yöntemdir. Bu çalışmada, laboratuvarımıza pediatri bölümünün çeşitli ünitelerinden gelen örneklerde real time PCR ile CMV DNA'sının araştırılması ve pozitif çıkan olguların viral yük tayininin yapılarak takip edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, 81 kan, 22 idrar, 5 BOS ve birer olmak üzere bronkoalveolar lavaj (BAL), perikard sıvısı ve balgam örnekleri dahil edilmiştir. Örneklerden CMV DNA'sı "High Pure Viral Nucleic Acid" (Roche) kiti ile saflaştırılarak "LightCycler" cihazıyla (Roche) real time PCR uygulanmıştır. Alt saptama sınırı 200 kopya/ml olarak belirlenmiştir. Çalışılan 111 örneğin 34'ünde (%30.6) CMV DNA pozitif bulunmuştur. Bunların 5'inin yenidoğan, 11'inin nefroloji ve 18'inin diğer servislerden gelen örnekler olduğu belirlenmiştir. Pozitif örneklerin 19'u kan, 14'ü idrar, 1'i BOS'dur. Renal transplantasyon yapılan bir hastada CMV DNA pozitif olarak tespit edildikten sonra yapılan aylık takiplerde viral yük azalarak 5 ay sonunda negatifleşmiştir. CMV enfeksiyonlarının erken tanısı etkilediği hasta grubu açısından önem taşımaktadır. Günümüzde kısa sürede sonuç veren real time PCR, çeşitli örneklerden CMV DNA'sının saptanması ve viral yükün tespit edilmesi açısından önem taşımaktadır. Viral yük, terapötik yaklaşımların belirlenmesi ve tedavinin takibinde yararlıdır. Bizim çalışmamızda da CMV DNA'sı pozitif olan bir hastanın yapılan aylık takiplerinde viral yükün azalarak negatife döndüğü bulunmuştur.



P73 TRANSPLANTASYON HASTALARINDA REAL TIME PCR İLE SİTOMEGALOVİRUS DNA'SININ SAPTANMASI

Seyyal ROTA, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Gülendam BOZDAYI, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Aytül DEMİRAĞ, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Bedia DİNÇ, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Bora DOĞAN, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Sitomegalovirus (CMV) immün süpresif hastalarda morbidite ve mortalitenin başlıca nedenidir. Tedavi ve profilakside kullanılan antivirallerin yan etkileri önemli olduğundan bu hastaların erken tanı ve tedavi için takip edilmeleri gereklidir. Real time PCR yöntemi viral yükü tespit edebildiği için tedavinin takibinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada, laboratuvarımıza transplantasyon ve kök hücre nakli bölümlerinden gelen örneklerde CMV DNA'sının real time PCR ile araştırılması ve pozitif bulunan olgularda viral yük takibinin yapılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, transplantasyon ünitesinden gönderilen 25 kan ve 2 bronkoalveolar lavaj (BAL) örneği ile kök hücre nakli ünitesinden gönderilen 13 kan ve 1 BAL örneği dahil edilmiştir. Toplam 41 hastaya ait örnekler "High Pure Viral Nucleic Acid" (Roche) kiti ile saflaştırılmış ve "LightCycler" (Roche) cihazıyla real time PCR uygulanmıştır. Alt saptama sınırı 200 kopya/ml olarak kabul edilmiştir. Sonuç olarak örneklerin 10'u pozitif bulunmuş, pozitif örneklerin 9'unun kan, 1'inin BAL örneği olduğu izlenmiştir. Pozitif örneklerin 7'si transplantasyon, 3'ü kök hücre nakli bölümlerinden gönderilen örneklerdir. Daha önce CMV DNA'sı negatif olarak saptanan 2 hasta takip sırasında pozitifleşmiş, daha önce CMV DNA'sı pozitif olan 3 hasta ise takip sırasında negatifleşmiştir. Transplantasyon hastalarında kanda ve diğer örneklerde real time PCR ile CMV viral yükünün tespit edilmesi CMV infeksiyonunun hızlı tanısını sağlar. Bu yöntem, elektroforeze gerek kalmadan kısa sürede kantitatif sonuç vermektedir. Viral yük takibinin tedavi için yol gösterici olması, tedavi süresinin doğru uygulanmasına ve böylece antiviral ilaçların yan etkilerinin azalmasına yardımcı olur. Çalışmamızda, transplantasyon yapıldıktan sonra takip edilen CMV DNA'sı negatif 2 hastada pozitifleşmenin, CMV DNA'sı pozitif 3 hastada ise negatifleşmenin saptanması, hastalığın tanısı ve tedavinin takibinde klinisyenlere yardımcı olmuştur.



P74 KLİNİK ÖRNEKLERDEN KANTİTATİF OLARAK HCV RNA SAPTANMASINDA COBAS AMPLICOR VE COBAS TAQMAN SİSTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Alpaslan ALP, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Gülşen HASÇELİK, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

HCV enfeksiyonlarının tanısında ve tanı konmuş hastaların takibinde, hızlı ve güvenilir sonuç veren yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla kullanılmakta olan moleküler yöntemlerde, hem viral nükleik asit izolasyonunun, hem de elde edilen nükleik asitlerin çoğaltılarak saptanmasının hızlı bir şekilde yapılması hedeflenmektedir. Bu çalışma, HCV enfeksiyonunun tanısında klinik örneklerden kantitatif olarak HCV RNA saptanmasında, Cobas Amplicor sistemi (Roche Diagnostics) ile Cobas Taqman sistemini (Roche Diagnostics) karşılaştırmak amacıyla yapılmıştır. Çalışmaya Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na HCV tanısı amacıyla gönderilen 84 serum örneği alınmıştır. Cobas Amplicor sistemi için HCV RNA izolasyonu "Magna Pure" otomatize izolasyon sistemi (Roche Diagnostics) ile yapılmıştır. Cobas Taqman sistemi için ise "High Pure System Viral Nucleic Acid" kiti (Roche Diagnostics) kullanılmıştır. Her iki sistemle elde edilen viral nükleik asit miktarları karşılaştırılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 84 örneğin 52'sinde iki yöntemle de pozitif sonuç elde edilirken, 32 örnekte iki yöntemle de HCV RNA saptanamamıştır. İki yöntem arasında uyumsuz sonuç çıkmamıştır. Pozitif sonuç elde edilen örnekler incelendiğinde, Cobas Amplicor sistemiyle ortalama 822.452 kopya/ml HCV RNA elde edilirken, Cobas Taqman sistemiyle ortalama 3.069.984 kopya/ml HCV RNA elde edildiği görülmüştür. Çalışma sonucunda, Cobas Taqman sistemiyle elde edilen HCV RNA kopya sayısının, Cobas Amplicor sistemi ile elde edilen kopya sayısının yaklaşık olarak 3.7 katı olması nedeniyle, Cobas Taqman sisteminin HCV enfeksiyonlarının moleküler tanısında güvenle kullanılabilir, duyarlılığı yüksek bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.



P75 BATI NİL VİRUSU'NUN REAL TIME PCR YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI

Koray ERGÜNAY, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Şemsettin USTAÇELEBİ, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Nurdan ÖZER, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Ekoloji Anabilim Dalı, Ankara

Müge MISIRLIOĞLU, Metis Biyoteknoloji, Ankara

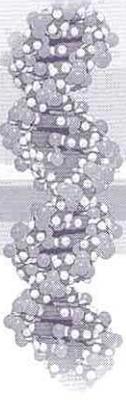
Batı Nil virusu, artropod kaynaklı zarflı bir virustur ve Flaviviridae ailesinde sınıflandırılmaktadır. Viral genom yaklaşık 12.000 nükleotitten oluşan pozitif iplikli RNA'dan oluşmaktadır. Viral yaşam döngüsü başta Culex cinsi olmak üzere sivrisinekler ve kanatlılar arasında sürmektedir. Endemik bölgelerde virüsle infeksiyon sıktır ve çoğunlukla hafif veya subklinik olarak izlenmektedir. Ancak infeksiyon, ensefalit, menenjit, kalıcı nörolojik bozukluklar ve mortaliteye de neden olmaktadır. Bu çalışmada, Batı Nil virusunun saptanması için kullanılacak duyarlı bir real time PCR yönteminin geliştirilmesi planlanmıştır. Bu amaçla, Lanciotti ve arkadaşları tarafından geliştirilen 5' ekzonükleaz (TaqMan®) yöntemine dayalı real time PCR sisteminde kullanılan viral 3'-protein kodlamayan bölgeye ait primerler temel alınmış ve saptama sistemi LightCycler® sistemine adapte edilmiştir. Sistemin duyarlılığını artırmak amacıyla real time PCR ile hedeflenen bölgeyi kapsayacak bir ürün oluşturan iki yeni primer dizayn edilerek, viral RNA'nın DNA dönüştürülmesi aşamasında RT-PCR yönteminde kullanılmıştır. Geliştirilen bu sistem Vero hücre kültürlerinde üretilmiş Batı Nil virusu lizatlarında RNA saflaştırılması sonrasında uygulanmış ve hedef viral RNA'nın amplifikasyonu sağlanmıştır. Ülkemizde Batı Nil virusunun prevalansı konusunda çok sınırlı düzeyde bilgi bulunmaktadır. Geliştirilen real time PCR sistemi ile, sahadan elde edilmiş sivrisinekler, kanatlılar ve şüpheli örneklerde viral RNA saptanarak bu konuda yeterli veri elde edilmesi mümkün olacaktır. (Bir bölümünü bu çalışmanın oluşturduğu proje TÜBİTAK tarafından SBAG-2629 NO ile desteklenmektedir)



P76 ÜÇÜNCÜ VE DÖRDÜNCÜ JENERASYON İKİ ANTİ HCV ELISA KİTİNİN PERFORMANSININ HCV RNA SONUÇLARI İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

İbrahim Hakkı ÖZEROL, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Rıza DURMAZ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Şahin DİREKEL, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

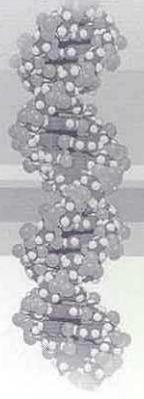
Rutin olarak anti HCV taraması yapılan laboratuvarlarda, duyarlılık ve özgüllükleri yüksek olan testlerin kullanılması arzu edilmektedir. Bu çalışma, laboratuvarımızda kullanılan üçüncü jenerasyon ELISA kiti (Biokit, Bioelisa HCV, Barcelona, Spain) sonuçlarının beklenenden fazla pozitif sonuç vermesi nedeniyle, bu sonuçların dördüncü jenerasyon ELISA kiti (Murex anti HCV, v4.0, Abbott Diagnostics, UK) ile kontrol edilmesi ve her iki kitin sonuçlarının HCV RNA (COBAS AmpliCor HCV Monitor Test, v2.0, Roche Molecular Systems) verileri ile karşılaştırılması amacıyla yapılmıştır. Biokit ile taranan 4330 serum örneğinden pozitif sonuç veren 111'i (%2.6) ve negatif sonuç alınan 86'sı olmak üzere toplam 197 serum, Murex kiti ile yeniden test edilmiş ve HCV RNA sonuçları ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel analiz, Ki kare testi ile yapılmıştır. Sonuç olarak, Biokit ile anti HCV pozitif olan 78 serumun 62'si Murex kiti ile pozitif bulunmuş ve bunların 44'ünde HCV RNA varlığı saptanmıştır. Anti HCV negatif serum sayısı ise Biokit ile 26, Murex ile 42 olarak belirlenmiş ve bunların da hepsinde HCV RNA negatifliği saptanmıştır. Buna karşın Biokit ile negatif olan bir serum Murex ile pozitif bulunmuştur. Murex kiti baz alındığında, Biokit'in duyarlılığı %98.5, özgüllüğü %65.4, pozitif prediktif değeri %59.5 ve negatif prediktif değeri %98.8 olarak hesaplanmıştır. HCV RNA negatif örneklerden 17'si her iki test ile, 17'si sadece Biokit ve biri Murex ile pozitif sonuç vermiştir. HCV RNA sonucuna göre, ELISA testlerinin duyarlılığı tam olmasına rağmen, özgüllükleri Biokit için %43 ve Murex için %70 olarak saptanmıştır (p=0.003). Murex'in pozitif prediktif değeri (%70), Biokit'ten (%56) daha yüksek bulunmuştur. Bulgularımız, anti HCV taramalarında dördüncü jenerasyon ELISA kitlerinin tercih edilmesinin uygun olacağını göstermektedir.



P77 VİRAL MENİNGOENSEFALİT ŞÜPHELİ VAKALARIN BEYİN OMURİLİK SIVISI ÖRNEKLERİNDE HERPES SİMPEKS VİRUS ARAŞTIRILMASI

A. AKÇALI, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Viroloji Laboratuvar Şefliği, Ankara
E. ÖZKAYA, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Viroloji Laboratuvar Şefliği, Ankara
D.YILMAZ, Sami Ulus Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji Kliniği, Ankara

Viral meningoensefalit etkenleri arasında morbidite ve mortalitesi yüksek olan herpes simpleks viruslarının erken tanısı tedavinin düzenlenmesi için önem taşımaktadır. Bu çalışmada, Temmuz 2003 - Nisan 2004 tarihleri arasında viral meningoensefalit ön tanılı 17 hastada etken olarak herpes simpleks virusun (HSV) araştırılması amaçlanmıştır. BOS örnekleri Vero (yeşil maymun böbrek hücresi) hücre kültürüne ekilmiş ve aynı zamanda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile HSV tip 1 ve HSV tip 2 nükleik asitleri aranmıştır. Serolojik olarak hastaların eş zamanlı alınan BOS ve serum örneklerinde ELISA yöntemi ile HSV tip 1+2 antikorları araştırılmış ve HSV 1+2 IgG Antikor İndeksi (AI) hesaplanarak $AI \geq 1.5$ olan örnekler intratekal HSV antikor sentezi için pozitif kabul edilmiştir. Örneklerin birinde hücre kültüründen HSV izole edilmiş, PCR ile HSV tip 2 nükleik asidi saptanmış ve HSV IgG AI < 1.5 bulunmuştur. İki hastada ise HSV 1+2 IgG AI ≥ 1.5 olarak saptanmış, bu hastaların BOS örneklerinde hücre kültürü ve PCR ile HSV negatif bulunmuştur. Hücre kültüründe ve PCR ile HSV saptanan hastanın nörolojik semptomlarının 1 hafta önce başladığı, AI pozitif saptanan 2 hastanın ise 3 haftadan fazla bir süredir semptomlarının devam ettiği öğrenilmiştir. Literatürde HSV'nin nörolojik semptomların başlangıcından sonraki 10-12 gün içinde BOS'da PCR yöntemi ile saptanabildiği, farklı literatürlerde değişik süreler verilmekle birlikte genellikle 1 haftadan itibaren intratekal antikor sentezinin başladığı bildirilmektedir. Bu çalışmamızda da, hastalığın erken döneminde PCR'ın tanı için uygun bir yöntem olduğu, sonraki dönemlerde ve PCR negatif örneklerde AI bakılmasının değerli olduğu gözlenmiştir.



P78 VİRAL KONJUNKTİVİT ETKENİ OLARAK ADENOVİRUS VE HERPES SİMPLKS VİRUS ARAŞTIRILMASI VE ADENOVİRUSLARIN MOLEKÜLER TİP TAYİNİ

E. ÖZKAYA, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Viroloji Laboratuvar Şefliği, Ankara

H. ISHIKO, Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories Inc, Japan

R. YAĞCI, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Birinci Göz Kliniği, Ankara

H. KARADEMİRTOK, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Viroloji Laboratuvar Şefliği, Ankara

A.AKÇALI, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Viroloji Laboratuvar Şefliği, Ankara

Adenovirus ve herpes viruslar viral konjunktivitlerin başlıca etkenleridir. Çalışmamızda, Temmuz 2003 ile Mart 2004 tarihleri arasında Ankara'daki hastanelerden laboratuvarımıza viral konjunktivit ön tanılı 34 hastadan gönderilen göz sürüntüsü örneklerinde adenovirus ve herpes simpleks virus (HSV) tip 1 ve 2'nin aranması ve varlığı saptanan adenovirusların tip tayinleri amaçlanmıştır. Örnekler adenovirus izolasyonu için HEp-2 (human epitelyoma) ve herpes viruslar için ise Vero (yeşil maymun böbrek hücresi) hücre kültürlerine ekilmiştir. Göz sürüntüsü örneklerinden adenovirus ve herpes simpleks virus (HSV) tip 1 ve 2'nin viral nükleik asitlerinin saptanması amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılmıştır. PCR yöntemi ile elde edilen adenovirus nükleik asitlerinin gen dizilerinin filogenetik analizleri ile tip tayinleri yapılmıştır. Hücre kültürlerinde, örneklerin 7'sinden adenovirus ve birinden HSV tip 1 izole edilmiştir. PCR ile 9 örnekte adenovirus ve bir örnekte HSV tip 1 pozitifliği saptanmıştır. PCR ile adenovirus pozitif bulunan 9 örnekte 2'sinde hücre kültüründe üreme saptanmamış, geri kalan 7'sinde ise hücre kültüründen virus izolasyonu yapılmıştır. PCR yöntemi ile HSV tip-1 pozitif bulunan örnekte aynı zamanda hücre kültüründe de izolasyon yapılmıştır. Yapılan filogenetik analizde, adenovirusların 4'ü tip 8 (subgrup D), 3'ü tip 3 (subgrup B), biri tip 4 (subgrup E) ve biri de subgrup B olarak tanımlanmıştır. Çalışma döneminde Ankara ilinde birden fazla adenovirus serotipinin viral konjunktivite sebep olduğu saptanmıştır. Bu çalışma ile PCR'in viral konjunktivit tanısında uygun bir yöntem olarak kullanılabileceği gözlenmiş ve ülkemizde ilk kez viral konjunktivitlerin etkeni olarak adenovirus serotipleri rapor edilmiştir.



P79 REANİMASYON İZOLATI PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARININ ARBITRARILY PRIMED POLİMERAZ ZİNCİRLEME REAKSİYON YÖNTEMİYLE DEĞERLENDİRİLMESİ

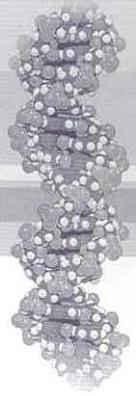
Aslan G, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin
Delialioğlu N, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin
Yıldız Ç, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin
Tezcan S, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin
Emekdaş G, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin
Durmaz R, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Oral U, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Mersin

Pseudomonas türleri sağlıklı kişilerin florasında bulunmakla birlikte immünkompetan bireylerde nadiren enfeksiyon oluşturur. Ancak bağışıklık sistemi bozulmuş, kistik fibrozisli, mekanik ventilasyon uygulanan, nötropenik ve yanıklı hastalarda sıklıkla enfeksiyon oluşturabilen fırsatçı bir patojendir. *Pseudomonas aeruginosa* yoğun bakım ünitelerinde en sık izole edilen etkindir.

Amaç: 5-18 Şubat 2004 tarihleri arasında reanimasyon ünitesi hastalarından izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının genotipik benzerliklerini değerlendirmektir.

Yöntem: İki haftalık periyotta beş reanimasyon hastasında trakeal aspirat ve kan kültür örneklerden beş *P. aeruginosa* suşu izole edilmiştir. Antibiyotik duyarlılık paterni benzer olan suşların arbitrarily primed polimeraz zincirleme (AP-PZR) yöntemiyle epidemiyolojik ilişkileri değerlendirilmiştir.

Sonuç: Hastaların klinik örneklerinden izole edilen beş suştan üçünün AP-PZR bant profillerinin ortak olduğu belirlenmiştir. Bu suşlarla ilgili bulaşı ortaya koyabilecek ekzojen kaynak (ortak kullanılan aletlerle ilgili) bulunamamıştır. Çalışmamız, hastane enfeksiyonları epidemiyolojisinde rutin uygulamaya girmesini amaçladığımız moleküler alt tiplene yöntemler için başlangıç oluşturacağı inancındayız.



P80 TOXOPLASMA GONDII TANISINDA REAL- TIME PCR YÖNTEMİYLE 1.5 YILLIK DENEYİMLERİMİZ

Sibel AYDOĞAN
Funda Doğruman AL
Ayşe EREN
Ayşe KALKANCI
Semra KUŞTİMUR
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

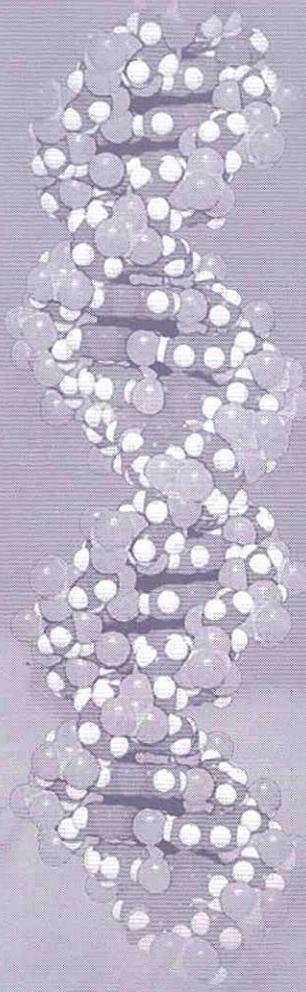
Bu çalışma 01.01.2003-15.04.2004 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden laboratuvarımıza gönderilen değişik örneklerden Toxoplasma gondii DNA'sının Real-Time PCR yöntemiyle araştırılması amacıyla yapılmıştır.

Kadın hastalıkları ve doğum kliniğinden 62, pediatri yenidoğan kliniğinden 14, nöroşirurji kliniğinden iki Sami Ulus Çocuk Hastanesi yenidoğan kliniğinden iki olmak üzere; 54'ü amnion, 17'si kan, altısı beyin omurilik sıvısı (BOS), ikisi doku (akciğer ve beyin biyopsileri), biri idrar olan toplam 80 örnekten Toxoplasma gondii DNA'sı High Pure Viral Nucleic Acid kiti (Roche, Almanya) ile elde edildikten sonra, DNA çoğaltılması Toxoplasma gondii için düzenlenen B1 gen bölgesine spesifik primer ve prob (Metis Biyoteknoloji LTD. Ankara) kullanılarak Light Cycler (Roche, Almanya) cihazında Real-Time PCR yöntemi ile çalışıldı.

Çalışmaya alınan 80 örnekten üç örnekte Toxoplasma gondii DNA'sı pozitif bulundu. Bunlardan ikisi kadın doğum kliniğinden gönderilen amnion sıvısı örneği ile biri yenidoğan kliniğinden gönderilen BOS örneği idi. BOS örneği pozitif olan bu hastanın kan örneğinde Toxoplasma gondii DNA'sı negatifti. Ancak, aynı zamanda hastanın kan örneğinde Cytomegalovirus enfeksiyonu da Real-Time PCR yöntemi ile pozitif olarak saptandı. Diğer 77 hasta örneğinde Toxoplasma gondii DNA'sı negatif bulundu.

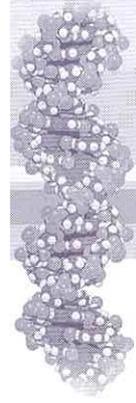
Konjenital toksopazmoz ağır sekellerle giden bir tablodur. Klinik belirtilerle doğan bebeklerin %80'inde mental retardasyon, epilepsi, felçler, %50'sinde ağır görme bozuklukları ve merkezi sinir sistemi tutulumu olan bebeklerinde %5'inde hidrosefali veya mikrosefali görülebilmektedir. Bu nedenle erken ve güvenilir tanı gebeliğin sonlandırılması açısından önem taşımaktadır. Literatürde Real-Time PCR yöntemi, konvansiyonel PCR yöntemlerine göre daha standart ve güvenilir bir yöntem olarak bildirilmektedir.

**3. ULUSAL
MOLEKÜLER VE
TANISAL MİKROBİYOLOJİ
KONGRESİ**
(Uluslararası Katılımlı)



YAZAR İNDEKSİ

**28 Haziran-1 Temmuz, 2004
Bilkent Otel - ANKARA**

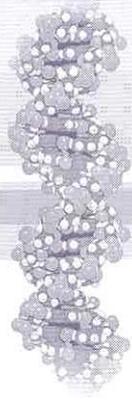


| | |
|-------------------------|------------------------------|
| BAÇIOĞLU, Y. Hakan | 148 |
| ŞAÇFIDAN, Ali | 22 |
| ŞİRBAŞLI, Handan | 144 |
| ŞAR, Nejat | 163, 186 |
| ÇALI, A. | 230, 231 |
| ÇALI, Sinem | 209, 210, 212 |
| ÇOLAT, Nezahat | 207, 208, |
| ÇSOY, Aziz | 216 |
| ÇTAŞ, Elif | 166, 171, 183, 187, 189, 220 |
| ÇTEPE, Orhan Cem | 224 |
| Ç., Funda Doğruman | 233 |
| ÇBAY, Ali | 177 |
| ÇP, Alpaslan | 95, 147, 191, 192, 227 |
| ÇTAŞ, Kemal | 149, 176, 214, 222, 223 |
| ÇPELBAUM, Peter C. | 143 |
| RAZ, Engin | 204 |
| RDIÇ, Nurittin | 160 |
| RIDOĞAN, Buket Cicioğlu | 165, 211 |
| RIKAN, Eralp | 207, 208 |
| ŞLAN, Ayşe | 161 |
| ŞLAN, G. | 184, 232 |
| TASEVER, Leman | 223 |
| TASEVER, Melike | 147 |
| TMACA, Selahattin | 207, 208 |
| YDIN, Faruk | 173, 174, 218 |
| YDIN, Kemalettin | 174 |
| YDIN, N.Gürkan | 185 |
| YDOĞAN, Hakan | 156 |
| YDOĞAN, Sibel | 202, 233 |
| YGÜN, Gökhan | 176 |
| ADUR, Selim | 25 |
| AHAR, İ. Hakkı | 175 |
| AHAR, Gül | 156 |
| AKICI, M. Zahir | 168 |
| AKIR, Mehmet | 168 |
| AKIR, Ufuk | 201 |
| ALCI, İclal | 197 |
| AŞBULUT, Eşe Aslan | 182 |
| AYINDIR, Yaşar | 220 |
| AYRAKTAR, Mehmet Refik | 166, 171 |
| AYRAKTAROĞLU, Zübeyir | 223 |
| AYRAM, Ayşen | 197 |
| AYSALLAR, Mehmet | 156 |
| ERKTAŞ, Mustafa | 169 |
| İLGİÇ, Altınay | 145 |
| İNNET, D.Hande | 163 |
| OLAT, Yusuf | 215 |
| ÖZ, Cavit | 218 |
| ÖZDAYI, Gülendem | 225, 226 |
| ÖZDOĞAN, Bülent | 143 |
| ÖZLUT, Hakan | 215 |
| ÖZLUT, Yasemin | 172, 213, 216 |
| ÖZURUK, Kurtuluş | 173, 174, 218 |
| ÖZUYRAÇ, Zafer | 205, 206 |

| | |
|-------------------------|--|
| CESUR, Salih | 193, 195 |
| CEYHAN, İsmail | 146, 181, 193, 194, 195 |
| CHANG, K.P. | 203 |
| COŞKUN-ARI, Fatma Filiz | 158 |
| ÇALANGU, Semra | 223 |
| ÇAVUŞOĞLU, Cengiz | 145 |
| ÇIRAK, Meltem Yalınay | 142, 178, 180 |
| ÇİÇEK, Ayşegül | 171 |
| ÇİFTÇİ, Alper | 155, 162 |
| ÇİFTÇİ, Cemal | 164 |
| ÇİZMECİ, Zeynep | 154, 157, 159, 166, 169, 183 |
| ÇOLAKOĞLU, Şule | 167, 191 |
| ÇULHA, Gülnaz | 203 |
| DALGALAR, Mehmet | 170 |
| DELİALIOĞLU, N. | 232 |
| DEMİR, Hülya | 179 |
| DEMİRAĞ, Aytül | 225, 226 |
| DEMİRAY, Tayfur | 156 |
| DEMİRCİ, Mustafa | 211 |
| DEMİRTAŞOĞLU, Fırat | 221 |
| DİKER, K. Serdar | 155, 162 |
| DİNÇ, Bedia | 225, 226 |
| DİNÇ, Uğur | 173 |
| DİREKEL, Şahin | 189, 229 |
| DOĞAN, Bora | 225, 226 |
| DOĞAN, Özgür | 178, 180 |
| DOĞANCI, Levent | 156, 204 |
| DOĞRU, Deniz | 161 |
| DUMLU, Şükrü | 142, 178 |
| DURLU ÖZKAYA, Fügen | 182 |
| DURMAZ, Bengül | 91, 154, 159, 166, 170 |
| DURMAZ, Birsen | 190 |
| DURMAZ, Rıza | 52, 144, 154, 157, 159, 166, 169, 171, 183, 184, 187, 188, 189, 196, 198, 199, 200, 220, 229, 232 |
| EMEKDAŞ, G. | 184, 232 |
| ENGİN, Doruk | 142, 178, 180, 202 |
| ERCİS, Serpil | 167 |
| ERDEM, A. | 150 |
| ERDEMOĞLU, Ali | 160 |
| EREN, Ayşe | 202, 233 |
| ERENSOY, Selda | 134, 217, 219 |
| ERGİN, Alper | 167, 185 |
| ERGİN, Sevgi | 214 |
| ERGÜNAY, Koray | 228 |
| EROĞLU, Cafer | 70 |
| EROĞLU, Füsün | 165 |
| ERSOY, Yasemin | 157, 171 |
| ESEN, Berrin | 182 |
| EŞEL, Duygu | 143 |
| FIRAT, Mehmet | 157 |
| GEDİKOĞLU, Gündüz | 144 |
| GÜDÜCÜOĞLU, Hüseyin | 169 |



| | | | |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------------|-------------------------|
| GÜLAÇTI, İrem | 215 | KUŞKUCU, Ahmet Mert | 149, 214, 223 |
| GÜLMEZ, Dolunay | 191 | KUŞTİMUR, Semra | 199, 200, 202, 233 |
| GÜLTEKİN, Meral | 164 | KUZUCU, Çiğdem | 154, 159 |
| GÜMÜŞLÜ, Feyzullah | 195 | LEBLEBİCİOĞLU, Hakan | 190 |
| GÜNAL, Selami | 189, 196 | LEVENT, Belkis | 182 |
| GÜNAYDIN, Murat | 190 | MAMIKOĞLU, Latife | 164 |
| GÜNDÜZ, Erol | 190 | MENEMENLİOĞLU, Dilek | 161 |
| GÜNEY, Çakır | 84 | MISIRLIOĞLU, Müge | 179, 228 |
| GÜNGÖR, Serdar | 205, 206 | MİDİLLİ, Kenan | 149, 176, 214, 222, 223 |
| GÜR, Deniz | 36, 161 | NİESTERS, Hubert | 219 |
| GÜZEL, Özlem | 199 | NORDMANN, Patrice | 19 |
| HASÇELİK, Gülşen | 31, 167, 185, 191, 192, 227 | OCAK, Fatih | 181, 193 |
| HAZNEDAROĞLU, Tunçer | 160 | OĞUZ, Vildan Avkan | 196 |
| HOŞOĞLU, Salih | 60 | OLCAY, Lale | 224 |
| ISHIKO, H. | 231 | ORAL, U. | 232 |
| İÇA, Tuba | 162 | OTLU, Barış | 144, 183, 198, 199, 200 |
| İLGA, Uğur | 160 | ÖGEL, B. Zümürüt | 201 |
| İRİZ, Erkan | 180 | ÖĞÜNÇ, Dilara | 164 |
| İSKONOVA, Barnisa | 149 | ÖKTEM, İ. Mehmet Ali | 221 |
| İSTANBULLU, Ayşe | 222 | ÖNCEL, Semih | 221 |
| İŞERİ, Latife | 159 | ÖNGÜT, Gözde | 164 |
| JAYASEKERA, Samantha | 204 | ÖZACAR, Tijjen | 217 |
| KAKLIKKAYA, İslam | 173 | ÖZBAKKALOĞLU, Beril | 209, 210, 212 |
| KAKLIKKAYA, Neşe | 173, 174, 218 | ÖZBEK, Namık | 224 |
| KALCIOĞLU, Mahmut Tayyar | 166 | ÖZCAN, Atilla | 220 |
| KALKAN, Ahmet | 213 | ÖZCAN, Ayla | 221 |
| KALKANCI, Ayşe | 199, 200, 202, 233 | ÖZCAN, Kadri | 203 |
| KARA, P. | 150 | ÖZÇELİK, Uğur | 161 |
| KARACA-DERİCİ, Yeşer | 145 | ÖZDAMAR, Melda | 176, 214 |
| KARADAĞ, Adil | 190 | ÖZDARENDELİ, Aykut | 172, 213, 216 |
| KARADEMİRTOK, H. | 231 | ÖZEKİNCİ, Tuncer | 207, 208 |
| KARADENİZ, H. | 150 | ÖZENSOY TÖZ, Seray | 118 |
| KARAHAN, Zeynep Ceren | 186 | ÖZER, Nurdan | 228 |
| KARAKAN, Tarkan | 178 | ÖZEROL, İbrahim Hakkı | 229 |
| KARAŞAHİN, B. | 150 | ÖZEROL, İ. Halil | 154 |
| KARLIDAĞ, Turgut | 172 | ÖZGÜL, Ahmet | 177 |
| KARSLIGİL, Tekin | 197 | ÖZGÜMÜŞ, Osman Birol | 174 |
| KAYA, Demet | 146 | ÖZKAN, D. | 150 |
| KAYA, Selçuk | 165, 211 | ÖZKAN, Emine | 223 |
| KAYALI, Revasiye | 182 | ÖZKAYA, E. | 230, 231 |
| KELEŞ, Erol | 172 | ÖZSAN, Murat | 90 |
| KESLER, Harald H. | 18 | ÖZSÖZ, M. | 150 |
| KHAN, Naveed Ahmed | 204 | ÖZSU CAYMAZ, Sibel | 148 |
| KILIÇ, Abdullah | 156, 177, 204 | ÖZTOP, A. Yasemin | 168 |
| KILIÇ, Mehmet | 213 | ÖZTURHAN, H. | 184 |
| KISA, Özgül | 177 | ÖZTÜRK, C. Elif | 146, 190 |
| KİPER, Nural | 161 | ÖZTÜRK, Feryal | 164 |
| KLINGSPOR, Lena | 20 | ÖZYURT, Mustafa | 160 |
| KOCAGÖZ, Sesin | 168 | PAS, Suzan | 219 |
| KORKMAZ, Canan | 197 | PEMBECİ, Ceyda | 201 |
| KORKMAZ, Metin | 130 | PINAR, Ahmet | 161, 192 |
| KÖKSAL, Fatih | 99 | ROTA, Seyyal | 225, 226 |
| KÖSEOĞLU, Özgen | 185 | SAĞLAM, Hülya | 220 |
| KUBAR, Ayhan | 83 | SANCAKTAR, Metin | 173, 174, 218 |



| | |
|------------------------|------------------------|
| İANIÇ, Ahmet | 45, 146, 147, 190, 196 |
| İARAÇLI, M. Ali | 76, 156 |
| İAREYYÜPOĞLU, Barış | 160 |
| İARIBAŞ, Zeynep | 147, 191 |
| İAVAŞAN, Serap | 155, 162 |
| İAYGAN, Mehmet Bakır | 193 |
| İAYINER, A. Arzu | 136, 148 |
| İEBER, Engin | 190, 196 |
| İEYREK, Adnan | 216 |
| İISSONS, James | 204 |
| İÖYLER, Alper | 201 |
| İÜMERKAN, Bülent | 143 |
| İANLIDAĞ, Tamer | 209, 210, 212 |
| İENER, Aslı Gamze | 205, 206 |
| İENER, Burçin | 63, 161 |
| İENOL, Esin | 199 |
| İALARICO, Sarah E. | 188 |
| İANER, Abbas | 158 |
| İANSEL, Özlem | 190 |
| İANYÜKSEL, Mehmet | 112, 204 |
| İARHAN, Gülnur | 181, 193, 194, 195 |
| İAŞLI, Hüseyin | 175 |
| İAŞOVA, Yeşim | 203 |
| İAŞTAN, Yücel | 176 |
| İEMİZ, Hakan | 207, 208 |
| İEZCAN, S. | 184, 232 |
| İİĞDAŞ, Didem | 173 |
| İİNAZ, Gülgün | 158, 165 |
| İONBAK, Şükrü | 215 |
| İORAMAN, Zülal Aşçı | 172, 213, 216 |
| İOSUN, İlknur | 173, 174, 218 |
| İUNCER, Serdar | 164, 179, |
| İURGUT-BALIK, Dilek | 120 |
| İÜRET, Sevgi | 142, 178, 180 |
| İÜRK, Meral | 206 |
| İÜRKER, Metin | 205, 206, |
| İÜRKÖĞLU, Salih | 139, 149, 222, 223 |
| İULUSOY, Seyhan | 158, 165 |
| İURAZ, Güven | 163 |
| İURUK, İlker | 190 |
| İUSTA, Yusuf | 179 |
| İUSTAÇELEBİ, Şemsettin | 147, 228 |
| İUTİNE, G. Eda | 161 |
| İUZUN, Soner | 203 |
| İÜNAL, Selahattin | 142, 178 |
| İÜNSAL, Belkıs | 205, 206 |
| İWALLACE, Paul | 35 |
| İYAĞCI, R. | 231 |
| İYALÇIN, Ebru Güneş | 161 |
| İYALÇIN, Işık | 149 |
| İYAMAN, Akgün | 196 |
| İYAMAN, Görkem | 169 |
| İYANG, Dong | 187 |
| İYANG, Zhenhua | 187, 188 |

| | |
|-----------------------|---------------|
| İYAPAR, Mehmet | 89 |
| İYARDIMCI, Hakan | 194 |
| İYAYGIN, Yusuf Engin | 145 |
| İYAZAN SERTÖZ, Rüçhan | 217, 219 |
| İYAZICI, Yelda | 174, 218 |
| İYETKİN, Gülay | 159 |
| İYETKİN, Sevgi | 224 |
| İYILDIZ, Ç. | 184, 232 |
| İYILMAZ, D. | 230 |
| İYILMAZ, Engin | 33 |
| İYILMAZ, Gülden | 149, 222, 223 |
| İYILMAZ, Yakut Akyön | 42, 179 |
| İZEYTİNOĞLU, Ayşin | 150, 217 |
| İZOR, Hakan | 180 |

Kongreye Katkıda Bulunan Firmalar *

Katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

amd

Abbott Molecular Diagnostics



ATC Sağlık Ürünleri
Sanayi ve Dış Ticaret Ltd. Şti.

artus
the PCR reference



Helping all people
live healthy lives

BiODPC



BIOMÉRIEUX

BİYOTEK MEDİKAL

esmen
İHH ÜRÜNLERİ LTD. ŞTİ.

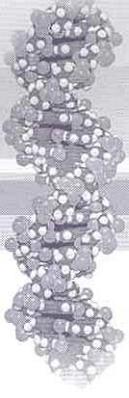
EUROIMMUN

Medizinische
Labordiagnostika
AG



farma

interlab



M|E|D|E|K| 
MEDEK MEDİKAL ÜRÜNLER ve SAĞLIK HİZMETLERİ A.Ş.

MED-KİM
KİMYA SANAYİ ve TİCARET LTD.ŞTİ.

M MEDTEK®



Medikal, Özel Sağlık, Tekstil, Gıda, Spor ve İng. San. Tic. Ltd. Şti



ZENAY
Elektronik - Zeynep Şti

teknomed
Sağlık Gereçleri Ticaret Limited Şirketi



* Firma isimleri alfabetik olarak sıralanmıştır.



TÜBİTAK