

MOLEKÜLER ve TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

25-28 Nisan 2006
Sheraton Hotel & Towers- Ankara

www.molekulermikro2006.org

KONGRE KİTABI



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



4. ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

25 – 28 Eylül 2006
SHERATON OTEL & CONVENTION CENTER
ANKARA

25 – 28 Eylül 2006
SHERATON OTEL & CONVENTION CENTER / ANKARA

KONGRE KİTABI

4. ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ
23,5 TTB-STE KREDİ PUANI İLE KREDİLENDİRİLMİŞTİR

www.molekulermikro2006.org

ANKARA MİKROBİYOLOJİ DERNEĞİ

&

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI



İÇİNDEKİLER

Kongre Başkanının Hoşgeldiniz Mesajı	5
Kongre Kurulları	6
Moleküler Tanı Yöntemleri Kursu	7
Genel Bilgiler	8
Tur Bilgisi	9
Bilimsel Program	10
Konuşma Özetleri	15
Sözel Sunum Özetleri	168
Poster Sunumları	175
Poster İndeksi	226
İndeks	238

4. ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

25 – 28 Eylül 2006
SHERATON OTEL & CONVENTION CENTER
ANKARA

Değerli Meslektaşlarımız,

Yirmibirinci yüzyıla girdiğimiz 2000 yılından bu yana her iki yılda bir düzenlediğimiz Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresinin dördüncüsünü düzenlemekten büyük mutluluk duymaktayız. Her geçen kongrede katılım ve ilginin arttığı, konusunun uzmanı yabancı konuşmacılar yanında çok değerli yerli konuşmacılara da yer verdiğimiz kongremizde sizlerle birlikte olmaktan onur duyacağız.

Mikrobiyoloji bilimi özellikle tanısal ve moleküler yöntemler alanlarında oldukça hızlı bir ilerleme içerisindedir. Dünyadaki son gelişmeleri yakından izlemek, sadece izlemekle kalmayıp uygulamak, ülkemiz bilimadamlarının görevi ve isteğidir. Düzenlediğimiz kongrelerde mikrobiyoloji alanında son gelişmeleri tartışmak ve ulusal / uluslararası düzeyde ülkemizde yapılan bilimsel çalışmaların içeriği konusunda vizyon belirlemek en önemli misyonumuzdur.

Kongremizi, ulaşım kolaylığını da göz önüne alarak yine Ankara'da düzenlemeyi planladık. Başkentimizin en seçkin otellerinden Ankara Sheraton'da yeni hizmete sunulan kongre merkezinin, teknik ve sosyal alt yapısıyla böyle kapsamlı bir organizasyona en iyi şekilde ev sahipliği yapacağına inanıyoruz.

Kongre öncesinde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarları'nda düzenlenecek ve mikrobiyolojide kullanılan moleküler yöntemleri konu alan uygulama kursu ile belirli sayıda genç araştırmacıya ilerdeki çalışmalarında yol göstereceğimiz inancındayız.

Ankara'da görüşmek dileği ile saygı ve sevgilerimizi sunarız.

Saygılarımla,

Kongre Düzenleme Kurulu adına
Prof. Dr. Gülşen Hasçelik
Kongre Başkanı

4. ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

25 – 28 Eylül 2006
SHERATON OTEL & CONVENTION CENTER
ANKARA

KONGRE YÜRÜTME KURULU

ONURSAL BAŞKAN : AYFER GÜNALP
BAŞKAN : GÜLŞEN HAŞÇELİK
GENEL SEKRETER : DÜRDAL US
BİLİMSEL SEKRETER : SEVTAP ARIKAN

DÜZENLEME KURULU

ALPASLAN ALP
SERPİL ERCİS
KORAY ERGÜNAY
SİBEL ERGÜVEN
ÖZGEN ESER
DOLUNAY GÜLMEZ
CUMHUR ÖZKUYUMCU
AHMET PINAR
BANU SANCAK
ZEYNEP SARIBAŞ
BURÇİN ŞENER
FERDA TUNÇKANAT
YAKUT AKYÖN YILMAZ

BİLİMSEL KURUL

HAKAN ABACIOĞLU
YURDANUR AKGÜN
HANDE ARSLAN
SELİM BADUR
MİTHAT BOZDAYI
SELDA ERENŞOY
MURAT ERTÜRK
SUNA GEDİKOĞLU
MERAL GÜLTEKİN
TANIL KOCAGÖZ
METİN KORKMAZ
FATİH KÖKSAL
SEYYAL ROTA
MEHMET ALİ SARAÇLI
GÜNER SÖYLETİR
MEHMET TANYÜKSEL
ALPER TEKELİ
SERDAR TUNCER
EMEL TÜMBAY
ŞEMSETTİN USTAÇELEBİ

4. ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

25 – 28 Eylül 2006
SHERATON OTEL & CONVENTION CENTER
ANKARA

MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİ KURSU

Düzenleyenler : Doç. Dr. Ahmet Pınar
Doç. Dr. Özgen Eser
Yrd. Doç. Dr. Alpaslan Alp
Öğr. Gör. Dr. Koray Ergünay

Yer : Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve
Klinik Mikrobiyoloji AD. Morfoloji Binası 3. Kat Sıhhiye
ANKARA

24 NİSAN 2006 PAZARTESİ

SABAH (TEORİK)

- 1- Hücre parçalama ve nükleik asit saflaştırma yöntemleri
- 2- Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri ve elektroforez
- 3- Mutasyon saptama, tiplendirme ve nükleik asit dizi analizi yöntemleri

ÖĞLEDEN SONRA (PRATİK)

- 1- Manuel ve otomatize nükleik asit ekstraksiyonu
- 2- Agaroz ve poliakrilamit jel elektroforezi
- 3- Real-time nükleik asit saptama (Light Cycler)

25 NİSAN 2006 SALI

SABAH (PRATİK)

- 1- Otomatize DNA dizi analizi
- 2- Amplicor ve Taqman sistemleri

4. ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

25 – 28 Eylül 2006
SHERATON OTEL & CONVENTION CENTER
ANKARA

GENEL BİLGİLER

Önemli Tarihler

Kongre Tarihi	: 25 – 28 Nisan 2006
Kurs Tarihi	: 24 – 25 Nisan 2006
İndirimli Kayıt İçin Son Tarih	: 31 Ocak 2006
Hoşgeldiniz Kokteyli	: 25 Nisan 2006
Gala Yemeği	: 27 Nisan 2006
Beypazarı Gezisi	: 29 Nisan 2006
Bildiri Son Gönderme Tarihi	: 28 Şubat 2006

Kongre Merkezi

Sheraton Otel - ANKARA

Kongre Dili

Kongre resmi dili Türkçe'dir.

İzinler

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

İptaller

Kayıt ve konaklama ücretlerinde, 31 Ocak 2006 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:

25 – 28 Nisan 2006 tarihleri arasında: Saat 08:30-18:00

Yaka Kartları

Tüm katılımcı ve refakatçılara yaka kartı dağıtılacaktır. Yaka kartları katılımcılar, refakatçılar ve ticari katılımcılar için ayrı renkte hazırlanacaktır. Yaka kartı olmayan misafirler kongre aktivitelerine kesinlikle katılamayacaklardır.

Kredilendirme

Toplantılar ve Workshop Türk Tabipler Birliği tarafından 23,5 TTB-STE ile kredilendirilmiştir.

Katılım Sertifikası

Tüm katılımcılara katılım sertifikaları 26 Nisan 2002 tarihinden itibaren dağıtılacaktır. Bu tarihten önce ayrılacakların, adreslerini mutlaka danışma masalarına bildirmeleri veya bir başkasının alabilmesi için yazılı yetki vermeleri rica olunur.

Kongre Kayıtları

Erken Kayıt döneminde, işlemlerinizin doğru bilgiler ile kısa sürede tamamlanabilmesi ve tarafınıza konfirmasyon belgesi gönderilebilmesi için ekte bulunan kayıt formunun eksiksiz doldurularak **31 Ocak 2006 tarihine kadar** Kubaba Turizm adresine gönderilmesi gerekmektedir.

Kongrede yapılacak kayıtlar için, önceden kongre sekreteryası ile temasa geçerek yer durumu için onay alınması kaydı ile kongre merkezinde bulunan kayıt masasında da işlem yapılabilir.

Kongre kayıt ücretlerine; Bilimsel oturumlara katılım, kongre çantası, özet kitabı, yaka kartı, katılım sertifikası, kahve molaları, program dahilindeki öğle yemekleri, açılış kokteyli ve gala yemeği dahildir.

Günlük kayıt ücretlerine; Kayıt yaptırılan günün bilimsel oturumlarına katılım, kongre çantası, özet kitabı, yaka kartı, katılım sertifikası, kayıt gününe ait kahve molaları, kayıt gününe ait öğle yemeği dahildir.

Kongre Yürütme ve Düzenleme Kurulları kararı gereği kongreye günlük katılımlar için, günlük kayıt ücreti (60 USD)'nin ödenmesi zorunludur.

4. ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

25 – 28 Eylül 2006
SHERATON OTEL & CONVENTION CENTER
ANKARA

29 NİSAN 2006 CUMARTESİ BEYPAZARI TUR PROGRAMI

Tur Programı :
Tarih : 29 Nisan 2006 / Cumartesi
Gezi Başlama Saati : 09:00

Gezi Programı :
09:00 Sheraton Oteli'nden yola çıkış
10:30 Beypazarı'na varış
10:30 – 13:00 Hıdırlık Tepesi'ne çıkış, panoramik Beypazarı, atölye ziyareti (halı, kilim, el dokumaları), Beypazarı Müzesi ziyareti – gelin odası, havadanlıklar, hayvan kemikleri ve deniz kabukları-, eski çarşıda alışveriş için serbest zaman (gümüş, dokuma, el sanatları, yerel ürünler)
13:00 – 14:30 Cırcırlar Konağı veya Zindancık'ta öğle yemeği (Tarhana Çorbası, Etlü Yaprak Sarma, Beypazarı Güveci veya Uruş Kapama, Salata, ev baklavası veya hoşmerim)
14:45 Ankara'ya dönmek üzere yola çıkış

Beypazarı gezisi katılım ücreti 40 YTL

* Gezinin gerçekleşebilmesi için minimum 15 katılımcı gerekmektedir.

NOT: Beypazarı gezisine katılacak katılımcılarımızın dönüş uçak biletlerini **29 Nisan 2006 / Cumartesi günü saat 18:00** 'den itibaren yaptırmalarını rica ederiz.

4. ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

25 – 28 Eylül 2006
SHERATON OTEL & CONVENTION CENTER
ANKARA

BİLİMSEL PROGRAM

4. ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

25 – 28 Eylül 2006
SHERATON OTEL & CONVENTION CENTER
ANKARA

BİLİMSEL PROGRAM

24 Nisan 2006 / Pazartesi

Moleküler Tanı Yöntemleri Kursu

25 Nisan 2006 / Salı

09:00 – 12:00 Moleküler Tanı Yöntemleri Kursu

09:00 – 13:00 Kayıt

13:00 – 13:30 **Açılış**
Prof. Dr. Ayfer Günalp
Prof. Dr. Gülşen Hasçelik

13:30 – 14:00 Klasik Müzik Konseri

14:00 – 15:00 **Açılış Konferansı : FİLOGENETİK ANALİZ**
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Ayfer Günalp
Konuşmacı: Prof. Dr. Hakan Abacıoğlu

15:00 – 15:45 **Konferans 2: İNSAN GENOM ARAŞTIRMALARI**
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Seyyal Rota
Konuşmacı: Prof. Dr. O. Şadi Yenen

15:45 -16:15 Kahve Arası

16:15 – 17:15 **Konferans 3: SAVUNMA SİSTEMİNDE HÜCRESEL
MEKANİZMALAR**
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Okan Töre
Konuşmacı: Prof. Dr. Selim Badur

19:00 **Açılış Kokteyli (Anadolu Medeniyetleri Müzesi)**

4. ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

25 – 28 Eylül 2006
SHERATON OTEL & CONVENTION CENTER / ANKARA

26 Nisan 2006 / Çarşamba

- 08:30 – 09:00 Sabah Dinletisi
- 09:00 – 10:15 **Panel 1: RUTİN MOLEKÜLER TANI**
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Meral Gültekin
Moleküler Tanının Rutin Uygulaması
Konuşmacı: Prof. Dr. Meral Gültekin
Klinisyen Yaklaşımı
Konuşmacı: Doç. Dr. Yeşim Çetinkaya Şardan
Laboratuvar Yaklaşımı
Konuşmacı: Doç. Dr. Ahmet Pınar
- 10:15 – 10:45 Kahve Arası
- 10:45 – 11:45 **Panel 2: BAKTERİLERDE DNA SEKANS ANALİZİ**
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Neriman Aydın
Use of DNA Sequencing in Bacterial Diagnosis and Characterization of Resistance Mechanisms
Konuşmacı: Prof. Dr. Roland Leclercq
Bakteri Tanımlanmasında 16S rRNA Sekans Analizi
Konuşmacı: Yrd. Doç. Dr. Bülent Bozdoğan
- 11:45 – 12:30 **Konferans 4: MİKROBİYOLOJİDE PROTEOMİKSLERİN YERİ**
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Ruhi Alaçam
Konuşmacı: Prof. Dr. Mithat Bozdayı
- 12:30 – 14:00 Yemek Arası / **Poster Tartışması** (Başkan: Prof.Dr. Hakan Abacıoğlu)
- 14:00 – 15:00 **DNA'NIN RENGİ**
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Yakut Akyön Yılmaz
Konuşmacı: Metin Yahya Üster
- 15:00 – 16:00 **Panel 3: TÜBERKÜLOZ TANISINDA MOLEKÜLER YÖNTEMLERİ KULLANALIM MI?**
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Gülşen Hasçelik
Konuşmacılar: Doç. Dr. Nuran Esen, Yrd. Doç. Dr. Alpaslan Alp
- 16:00 -16:30 Kahve Arası
- 16:30 – 18:00 **Panel 4: TRANSPLANT HASTALARINDA VİRAL ETKENLERİN SAPTANMASINDA MOLEKÜLER TEKNİKLER**
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Dilek Çolak
Solunum Virusları
Konuşmacı: Prof. Dr. Dilek Çolak
Herpes Viruslar
Konuşmacı: Uzm. Dr. Ayla Özcan
Hepatit Virusları
Konuşmacı: Prof. Dr. Arzu Sayiner
Polyoma Viruslar
Konuşmacı: Doç. Dr. Ayşın Zeytinoğlu
- 18:00 – 19:00 **Sözlü Bildiriler**
Oturum Başkanları: Prof. Dr. Murat Özsan, Doç. Dr. Ahmet Pınar

4. ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

25 – 28 Eylül 2006
SHERATON OTEL & CONVENTION CENTER
ANKARA

27 Nisan 2006 / Perşembe

- 08:30 – 09:00 Sabah Dinletisi
- 09:00 – 10:00 **Konferans 5: ROLE OF BACTERIAL MOBILE DNAs IN THE EMERGING RESISTANCE TO ANTIBIOTICS**
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Ferda Tunçkanat
Konuşmacı: Assoc. Prof. Thierry Naas
- 10:00 – 11:00 **Panel 5: HBV MUTASYONLARININ FONKSİYONEL ANALİZİ**
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Selda Erensoy
- Tam Genom Analizi
Konuşmacı: Prof. Dr. Selda Erensoy
- Antiviral İlaç Direnci
Konuşmacı: Prof. Dr. Mithat Bozdayı
- Mutasyon Analizinin Hasta Yönetiminde Yeri
Konuşmacı: Uzm. Dr. Rüçhan Sertöz
- 11:00 – 11:30 Kahve Arası
- 11:30 – 12:30 **Söyleşi**
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Şemsettin Ustaçelebi
Konuk Konuşmacı: Tayfun Talipoğlu
- 12:30 – 14:00 Yemek Arası / **Poster Tartışması** (Başkan: Prof.Dr. Dilek Çolak)
- 14:00 – 15:00 **Konferans 6: APPLICATION OF MOLECULAR METHODS IN DIAGNOSIS OF DERMATOPHYTOSIS BASED ON THE CURRENT SPECIES CONCEPT**
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Emel Tümbay
Konuşmacı: Dr. Yvonne Graeser
- 15:00 – 15:30 Kahve Arası
- 15:30 – 16:10 **Konferans 7: HIV GENOTİP TAYİNİ VE HIV GENOTİPLERİNİN ÜLKEMİZDEKİ DAĞILIMI**
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Dürdal Us
Konuşmacı: Prof. Dr. Gülden Yılmaz
- 16:10 – 18:10 **Moleküler Tanıda Yeni Sistemler (Firma Sunuları)**
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Burçin Şener
- 20:00 **Gala Yemeği (Sheraton Otel)**

4. ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

25 – 28 Eylül 2006
SHERATON OTEL & CONVENTION CENTER
ANKARA

28 Nisan 2006 / Cuma

- 09:00 – 10:00 **Konferans 8: THE DIAGNOSIS OF PARASITES IN VARIOUS CLINICAL SAMPLES: NEW METHODS**
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Ülgen Zeki Ok
Konuşmacı: Dr. Andrea J. Linscott
- 10:00 – 11:00 **Panel 6: BAKTERİYOLOJİDE MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN RUTİN LABORATUVARDAKİ YERİ**
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Güner Söyletir
Bakteriyel Enfeksiyonların Tanısında Yeni Moleküler Testler
Konuşmacı: Doç. Dr. Tanıl Kocagöz
Bakteriyel Enfeksiyonların Tedavisi ve Takibinde Moleküler Testler
Konuşmacı: Doç. Dr. Ufuk Hasdemir
Enfeksiyon Kontrol Programları ve Moleküler Testler
Konuşmacı: Prof. Dr. Sesin Kocagöz
- 11:00 – 11:30 Kahve Arası
- 11:30 – 12:15 **Konferans 9: "MICROARRAY" TEKNOLOJİSİNDE SON GELİŞMELER**
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Ayhan Kubar
Konuşmacı: Uzm. Dr. Serdar Tuncer
- 12:15 – 13:30 Yemek Arası
Uydu Sempozyumu: Kuş Gribinin Moleküler Tanısı
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Dürdal Us
Konuşmacı: Dr. Olfert Landt
- 13:30 – 14:30 **Panel 7: İNVAZİV MANTAR ENFEKSİYONLARINDA MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN KULLANIMI**
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Sevtap Arıkan
Etken Mantarların Klinik Örnekte Moleküler Yöntemlerle Gösterilmesi ve Tanımlanması
Konuşmacı: Doç. Dr. Ayşe Kalkancı
İnvaziv Mantar Enfeksiyonlarında Moleküler Epidemiyolojinin Yeri
Konuşmacı: Doç. Dr. Mehmet Ali Saraçlı
Antifungal Direncin Moleküler Yöntemlerle Saptanması
Konuşmacı: Doç. Dr. Banu Sancak
- 14:30 – 15:15 **Panel 8: ANTİPARAZİTER İLAÇLARA DİRENÇ**
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Sibel Ergüven
Antiparaziter İlaçlara Karşı Direnç Mekanizmaları
Konuşmacı: Prof. Dr. Mehmet Tanyüksel
Antiparaziter İlaçlara Karşı Direncin Saptanması
Konuşmacı: Prof. Dr. Metin Korkmaz
- 15:15 – 15:45 Kahve Arası
- 15:45 – 16:25 **Konferans 10: BİYOTEKNOLOJİDE ÜNİVERSİTE-SANAYİ İŞBİRLİĞİ**
Oturum Başkanı: Doç. Dr. Tanıl Kocagöz
Konuşmacı: Uzm. Dr. Serdar Tuncer
- 16:25 – 16:45 Kapanış

4. ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

25 – 28 Eylül 2006
SHERATON OTEL & CONVENTION CENTER
ANKARA

KONUŞMA ÖZETLERİ (BİLİMSEL PROGRAM SIRASI İLE)

K-01

FİLOGENETİK ANALİZ

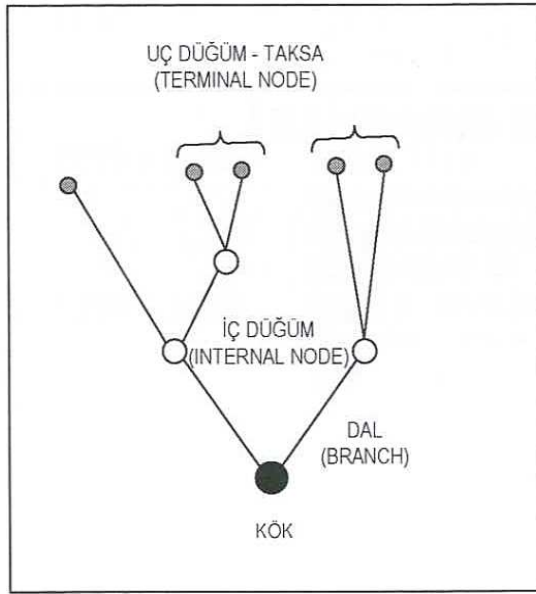
Prof. Dr. Y. Hakan Abacıoğlu

*Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD
İnciraltı 35340 İzmir*

Filogenetik, türlerin evrimsel geçmişini inceleyen bilim dalıdır. Yunanca “phylon” (kök) ve “genesis” (köken ya da yaratılış) sözcüklerinden türetilmiştir. Türlerin morfolojik özelliklerini inceleyen geleneksel yöntemlere, son yıllarda nükleik asit ve aminoasit dizilerinin incelendiği moleküler filogenetik yöntemler eklenmiştir. Filogenetik analiz, filogenetik ağaç oluşturma yöntem ve yaklaşımlarını tanımlar. Bu yazıda, moleküler filogenetik yöntemler ele alınacaktır. Bu bağlamda, önce filogenetik ağaç ve sık kullanılan terimler tanıtılacak, ardından filogenetik analiz basamakları ele alınacaktır.

Filogenetik ağaç ve temel terimler

Filogenetik ağaç, bir kökü, dalları ve yaprakları olan gerçek bir ağaca benzer (Şekil 1).

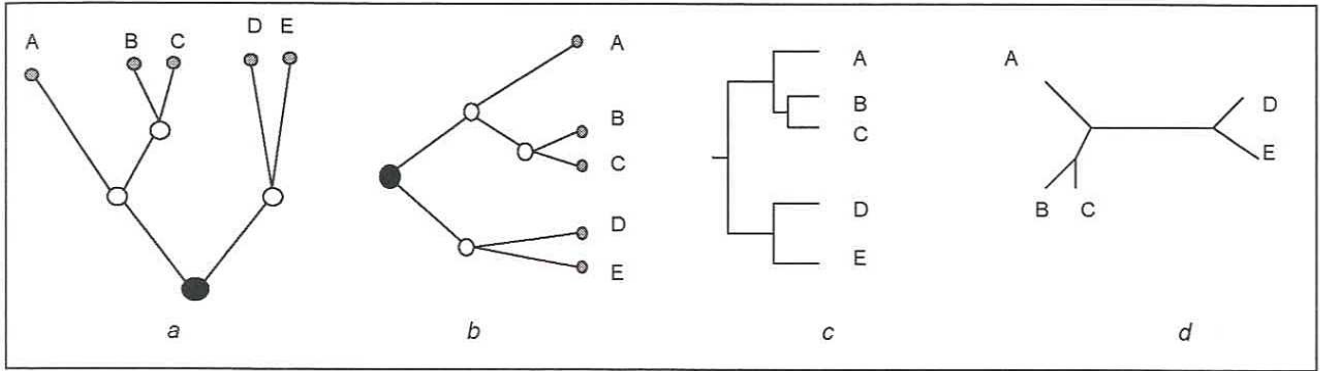


Şekil 1: Filogenetik ağacın temel bileşenleri

Ağacın **kökü** en eski ortak atayı gösterir. **İç düğümler** (internal nodes) son ortak atayı tanımlar. **Dallar** (branch) düğümleri birbirine bağlar; her bir dal bir soyu (lineage) gösterir. Dalların en uç kısmında ağacın yapraklarına karşılık gelen **uç düğüm** (terminal node) bulunur. Bunlara bazı kaynaklarda **OTU** (operational taxonomic unit = işlemsel taksonomik birim) ya da **takson** (taksonomik grup) adları da verilmektedir. Her bir uç düğüm (OTU ya da takson), gerçekte analizde kullanılan bir diziyeye karşılık gelir. Örneğin Şekil 2'deki A, B, C, D ve E birer taksona karşılık gelmektedir. Ağacın bir bütün olarak dallanma paternleri o ağacın topolojisini oluşturur.

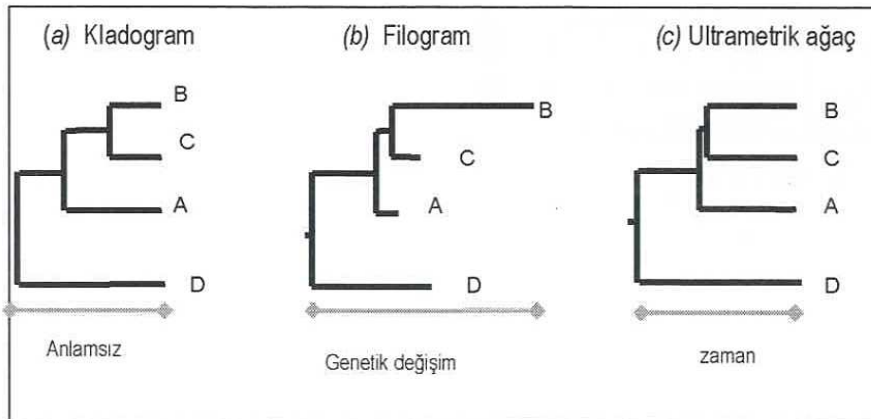
Bir iç düğüm ve bundan türeyen tüm yapılar **monofiletik grup** ya da **“clade”** (Türkçe karşılık olarak *eşköklü* sözcüğünü öneriyorum) olarak adlandırılır. Eğer bu yapılardan bazıları grubun dışında tutulursa o zaman parafiletik gruptan söz edilir. Bunun en tipik örneklerinden biri HIV-1 “clade” leri, diğer bir deyişle genetik subtipleridir. HIV-1 grup M içinde 9 saf “clade” ya da subtip (subtip A-D, F, G, H, J, K) bulunur. Dolayısıyla grup M monofiletik bir grubu tanımlamaktadır. Bu gruptaki üyelerden biri dışarıda (örneğin subtip H) bırakılırsa, geri kalanlar **parafiletik** bir grup oluşturur.

Filogenetik ağaç farklı biçimlerde çizilebilir. Örneğin ağaç Şekil 2b ve 2c de görüldüğü gibi yana çevrilebilir. Bazı filogenetik ağaçlarda ise kök bulunmaz (köksüz= unrooted) (Şekil 2d).



Şekil 2: Farklı ağaç stilleri. Her 4 şekildeki ağaç benzer filogenetik ilişkiyi göstermektedir. “a”, “b” ve “c” köklü ağaçlar olup “d” ise köksüzdür.

Moleküler filogenetik ağaçlarda dalların uzunlukları taksonların evrimsel farklarına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Dolayısıyla dal ne kadar uzunsa, bu dalla ilişkili diziler evrimsel olarak diğerlerinden o kadar farklıdır. Bu tür ağaçlara **filogram** adı verilir (Şekil 3b). Dal uzunluklarının herhangi bir anlam ifade etmediği, yalnızca dallanma paternlerinin gösterildiği ağaçlara ise **kladogram** (Şekil 3a) denir. **Ultrametrik ağaçlarda** ise dal uzunlukları evrimsel değişim için geçen zamana karşılık gelir (Şekil 3c). Moleküler filogenetik analizlerde büyük çoğunlukla filogramlar kullanılır.

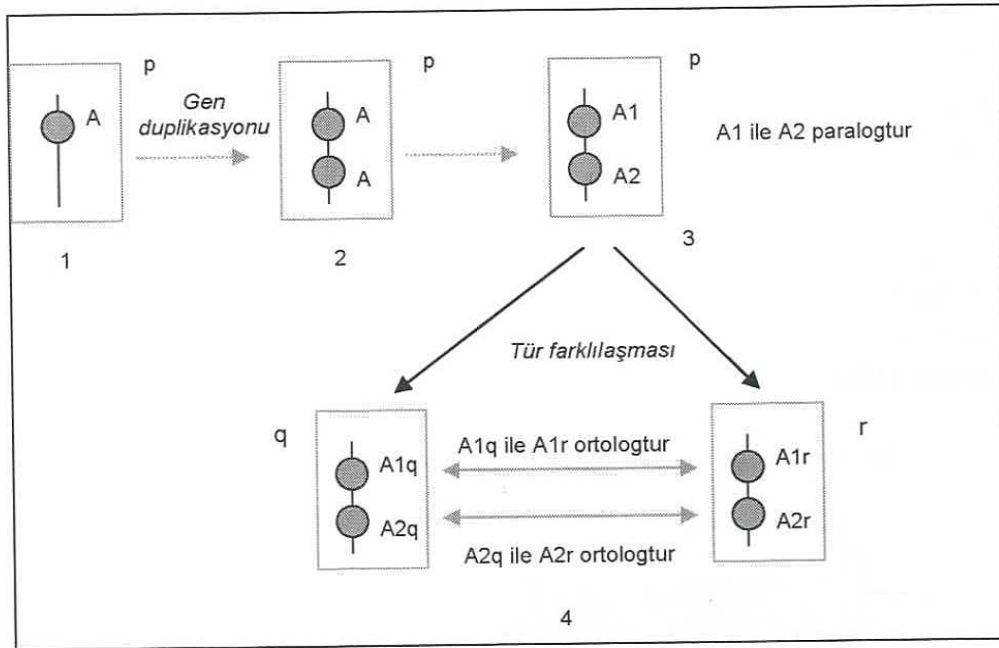


Şekil 3: Ağaç türleri

Homoloji

Filogenetik analizlerin özünü homolog özelliklerin karşılaştırılması oluşturur. **Homoloji**, iki tür (gen, vb) arasında ortak kökenlerinden (atalarından) kaynaklanan benzerliklerdir. Ancak, iki tür arasındaki her benzerliğin homolojiden kaynaklanmayabileceği unutulmamalıdır. Bazen **yakınsak evrim** (convergent evolution) yoluyla farklı türler benzer özellikler geliştirebilir. Buna **analoji** adı verilir. Bu durum farklı türlerin benzer çevresel koşullara uyum sağlama sürecinde benzer özellikleri birbirlerinden bağımsız olarak kazanmaları ile ilişkilidir.

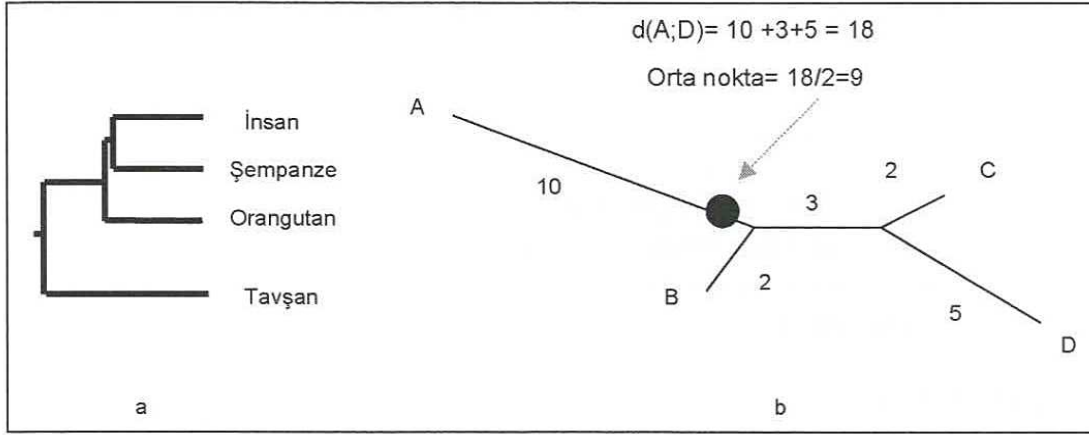
DNA düzeyinde farklı homoloji modlarını tanımlamak üzere 1970 yılında Fitch tarafından **ortoloji** ve **paraloji** kavramları ortaya atılmıştır. Aynı son ortak atadan köken alan iki ayrı türde bulunan homolog genlere **ortolog genler** adı verilir. Bu genler iki türün farklılaşması sürecinde ortak atadan kalıtılmıştır. Diğer bir deyişle, bu genler vertikal olarak bir nesilden diğerine aktarılır. **Paralog genler** ise multigen ailelerinin üyeleri olup, gen duplikasyonu sonucu ortaya çıkan genlerdir (Şekil 4). Paralog genler kullanılarak yapılan ve tür ilişkilerini tanımlamaya yönelik filogenetik analizlerde, gen kopyalarından bazılarının süreç içinde kaybolması durumunda hatalı sonuç alınabileceği unutulmamalıdır. Ancak kopyalar tamamsa, paraloglar birbirlerinin doğal **dış grubu** olarak davranırlar ve ağacın köklendirilmesini sağlarlar.



Şekil 4: Ortoloji ve paraloji. (1) p türünde bir A geni (2) gen duplikasyonu ile çoğalır, (3) çoğalan gen evrimle diğerinden farklılaşır ve A1 ve A2 diye 2 ayrı gen ortaya çıkar. Bu genler paralogtur. (4) p türü q ve r türlerine farklılaşır. Ortak atadan kalıtılan A1 ve A2 genleri, yeni türlerde A1q, A1r, A2q ve A2r olarak adlandırılır. A1q ve A1r ile A2q ve A2r ortolog genlerdir. Tanım gereği A1q-A2q ile A1r-A2r çiftleri paralogtur.

Kök oluşturma

Ağaçta kök oluşturma'nın iki yolu vardır. Bunlardan ilki analizlerde bir "dış grup" (outgroup) kullanmaktır. Dış grup, incelenen grubun doğal üyesi olmayan herhangi bir diziyi tanımlar. Genel bir kural olarak monofiletik grubun dışında bırakılan üyenin dış grup olarak kullanılması doğru değildir. Bir dış grup olmadığında, ağacı köksüz çizmenin hiç bir sakıncası yoktur. İkinci yol ise **moleküler saat** geçerli kabul ederek ortak atadan türeyen tüm soyların aynı hızda evrildiklerini varsaymaktır. Bu durumda birbirine evrimsel olarak en uzak iki takson arasındaki dal(lar)ın orta noktasına kök yerleştirilir (Şekil 5).



Şekil 5: Ağacı köklendirme iki biçimde yapılabilir: (a) bir dış grup (bu örnekte tavşan) kullanılarak ya da (b) moleküler saat hipotezi doğrultusunda orta noktanın hesaplanması.

Filogenetik analiz basamakları

Moleküler filogenetik analiz; (i) karşılaştırılacak verilerin bir araya getirilmesi ve düzenlenmesi, (ii) ağaç oluşturma ve (iii) ağacın güvenilirliğinin sınanması basamaklarından oluşur. Bu basamakları daha ayrıntılı ele almadan önce filogenetik analizlerin doğasında bulunan bazı temel varsayımları gözden geçirelim:

- Tüm türlerin ataları en eski ortak atadan türemiştir. Evrimsel süreçte ortaya çıkan türler son ortak atadan tür farklılaşmaları ile oluşmuştur.
- Filogenetik analizlerde karşılaştırılan diziler homologtur. Yani, bunlar son ortak atadan kalıtılan ortak özelliklere sahiptir.
- Filogenetik ağaçta dallanma gerçekleştikten sonra her dal diğerinden bağımsız olarak evrilmiştir. Ancak, farklı türler arasında rekombinasyon, gen konversiyonu ya da yatay gen aktarımları (transpozisyon, transdüksiyon, vb yollarla) aracılığı ile bu varsayım ihlal edilebilir.

Dolayısıyla, gen filogenileri her zaman tür filogenilerini yansıtmayabilir. Birden çok sayıda genin incelenmesi tür filogenileri açısından daha doğru sonuç vermektedir.

- Analiz için seçilen örneklem, genel popülasyonu yansıtmaktadır.
- Örneklerdeki dizi değişkenliği analiz için yeterli filogenetik sinyal içermektedir. Örneğin, HCV 5'-NCR dizileri ana genotiplerin birbirinden ayrımını sağlayacak filogenetik sinyal içermekle birlikte, subtip ve izolat bazında ayırım yapacak dizi değişkenliğine sahip değildir. Bu nedenle, örneğin nozokomiyal bir HCV salgınına incelemek için 5'-NCR dizileri yeterli olmayabilir. Bu durumda genetik değişkenliği daha fazla olan NS5 bölgesi kullanılabilir.

a. Veri toplama ve düzenleme

Ağaç oluşturmada ilk adım bir veritabanı oluşturmaktır. Bu amaçla kendi dizilerinizi ya da veri bankalarındaki dizileri ya da bunların bir karışımını kullanabilirsiniz. Veri toplama ve inceleme için kullanabileceğiniz bazı kaynaklar aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 1: Biyoinformatik kaynakları *

Veri tabanları	GenBank (ABD): http://www.ncbi.nlm.nih.gov EMBL (AB): http://www.ebi.ac.uk/Databases/ DDBJ (Japonya): http://www.ddbj.nig.ac.jp/
Arama motorları	
<i>Anahtar sözcükle arayanlar</i>	SRS: http://srs.ebi.ac.uk/ Entrez: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez
<i>Benzerliği saptayanlar</i>	BLAST: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
Çoklu dizi hizalama (multiple sequence alignment)	Clustal X: ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/ BioEdit: http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html
Filogenetik analiz	MEGA2: http://www.megasoftware.net/ PHYLIP: http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html Treeview: http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html PAUP: http://paup.csit.fsu.edu/index.html PAML: http://abacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml.html MrBayes: http://morphbank.ebc.uu.se/mrbayes BEAST: http://evolve.zoo.ox.ac.uk/beast

* Tabloda yer alanlar en sık başvurulan kaynaklar arasından seçilmiştir. (2 no'lu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)

Tablo 1'de yer alan 3 veri tabanı bilgileri ortaklaşmaktadır. Dolayısıyla herhangi

birinde yer alan bir bilgi diğerlerinde de yer almaktadır. Ülkemizde de en sık kullanılan veri bankası olan GenBank'te aranılan verilere Entrez ya da BLAST programları aracılığıyla ulaşılabilir. Biyoinformatikte kullanılan yazılımlar nükleotit ya da aminoasit dizilerini ancak belirli bir formatta sunulduklarında tanıyabilmektedir. Örneğin en sık kullanılan formatlardan biri olan FASTA formatı örneği aşağıda yer almaktadır. Bu formatta ilk satır dizinin özelliklerine ilişkin açıklama içerir. Bu satır daima ">" (büyüktür) simgesi ile başlamalıdır. İkinci satırdan itibaren ise diziye ait veriler yer alır.

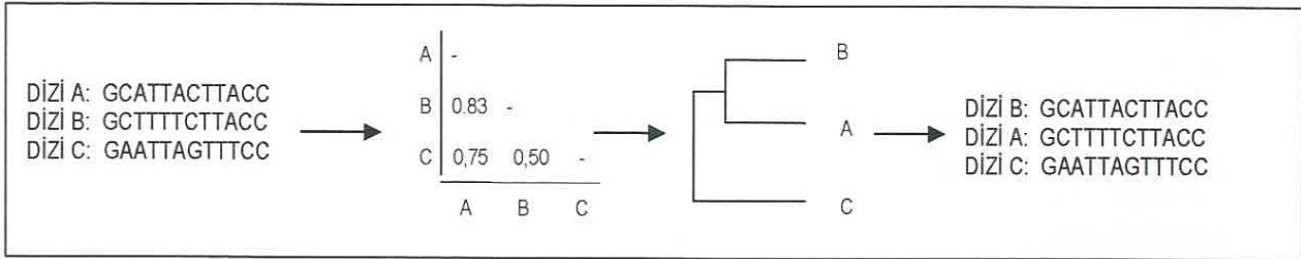
>CPZANT

```
ATGGGAGCGGGGGCGTCTGTTTTGAGGGGAGAGAAGCTAGATACATGGGA
AAGTATCAGGCTTCGGCCCGGTGGCAAGAAAAAGTACATGATAAACATCT
GGTTTGGGCAAGATCGGAGCTGCAGCGTTTTGCGCTCAGCTCCTCCCTT
```

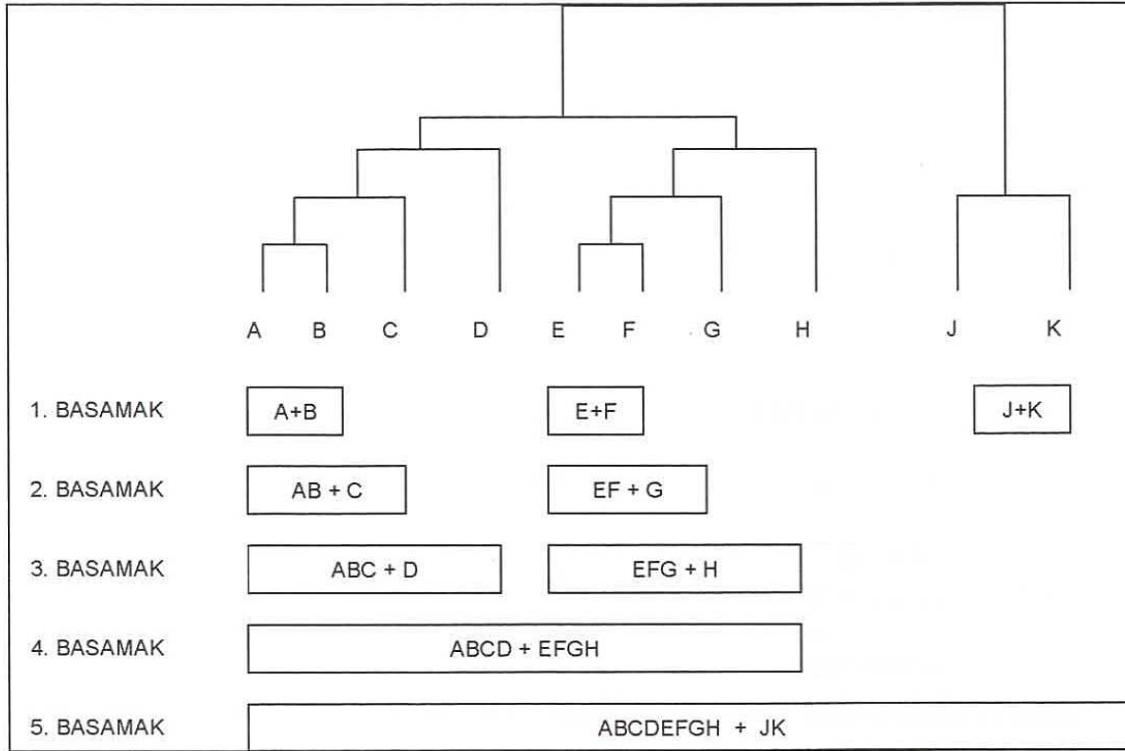
```
CTAGAAACATCAGAAGGTTGTGAAAAGGCTATCCATCAATTGAGCCCTTCCA
TAGAAATAAGATCCCCTGAAATAATATCTTTGTTTAACACCATTTGTG
```

İnternet ortamında birçok sitede (örn. <http://www.ebi.ac.uk/help/formats/frame.html>) bu formatlara ilişkin bilgi yer almaktadır.

İncelenecek homolog diziler belirlendikten sonra, bunların hizalanması (alignment) gerekir. Hizalama, çiftlerarası dizi hizalaması (pairwise sequence alignment) ya da çoklu dizi hizalaması (multiple sequence alignment) yaklaşımları ile gerçekleştirilebilir. Moleküler filogenetik ağaçlarda genellikle çoklu dizi hizalaması kullanılır. Popüler bir hizalama programı olan Clustal, ilerleyici (progressive) çoklu dizi hizalaması yaklaşımını kullanır (Şekil 6 ve 7).



Şekil 6: Çoklu dizi hizalaması: İncelenecek diziler, çiftler halinde kıyaslanarak aralarındaki benzerlik oranları bulunur. Yukarıdaki örnekte A ve B dizileri arasında benzerlik $10/12 = 0.83$, A ve C arasında 0.75 , B ve C arasında ise 0.50 'dir. Bu oranlardan yola çıkılarak bir "kılavuz ağaç" (guide tree) oluşturulur. Bu ağaçta, benzerlikleri en yüksek olduğu için önce A ve B dizileri hizalanır, sonra bu dizilere C dizisi eklenir.



Şekil 7: İlerleyici çoklu dizi hizalama: Hizalamaya eklenecek diziler kılavuz ağaçtaki sıraya göre belirlenir (2 no'lu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)

Hizalamalardaki en kritik noktalardan biri aralıkların (gap) nereye ve hangi miktarda konacağıdır. Aralıklar hizalanan genlerden birindeki delesyona ya da diğer bir gendeki insersiyona bağlı olabilir. Bu nedenle, her iki durumu da kapsayan "indel" terimi kullanılmaktadır. Hizalama programlarında aralık koymamanın bir ceza puanı vardır. Aralığı uzatmanın puanı aralık koymaktan daha düşüktür. Hizalama programlarının aralıklar konusunda hata yapabildiği unutulmamalıdır. Bu nedenle, Clustal ile hizalanan dizilerin BioEdit gibi elle hizalama yapılabilen bir programa aktarılması gerekebilir.

b. Ağaç oluşturma

Hizalamada incelenen dizilerin homolog olması gerektiğinden söz etmiştik. Bu gereklilik aslında hizalanan dizilerde alt alta gelen her karakter (nükleotid ya da aminoasit) için de geçerlidir. Bu karakterlerin son ortak atada aynı pozisyonda yer alan karakterlerden türediği varsayılır. Dolayısıyla, doğru bir filogenetik analiz için doğru bir hizalama olmazsa olmaz koşuldur. Analiz için seçilecek bölgenin olası olduğunca aralık (indel) içermemesi ve benzer sayıda karakter içermesi istenir. Analizlerde dikkat edilmesi gereken ikinci nokta, protein kodlayan gen bölgeleri için dizilerin DNA mı yoksa protein düzeyinde mi inceleneceği kararının verilmesidir. Yakın benzerliği olan diziler için DNA, uzak benzerliği olanlar için ise protein düzeyinde inceleme yapılması uygun olur. Uzak benzerlikler için DNA dizilerindeki kodonların üçüncü pozisyonlarındaki nükleotitler devre dışı bırakılarak inceleme yapılması yeğlenir. Çünkü bu pozisyondaki değişiklikler çok nadiren aminoasit düzeyinde değişikliğe neden olur.

Filogenetik ağaç oluşturmada kullanılan analiz yöntemleri kullandıkları veri türü ve hesaplama yaklaşımına göre sınıflandırılabilir (Tablo 2). Bazı analizler veri olarak evrimsel uzaklıkları (distance) bazıları da karakterleri kullanır. Hesaplama yöntemi olarak bazıları kümeleşme algoritmelerini bazıları da optimalite ölçütlerini kullanır.

Tablo 2: Filogenetik ağaç oluşturma yöntemleri

		<i>Hesaplama yöntemi</i>	
		<i>Optimalite ölçütleri</i>	<i>Kümeleşme algoritmi</i>
<i>Veri türü</i>	<i>Karakter</i>	Maksimum parsimoni (maximum parsimony) Maksimum olabilirlik (maximum likelihood) Bayesian analizler (Bayesian analysis)	
	<i>Uzaklık</i>	Minimum evrim (minimum evolution) En az kareler (least squares)	UPGMA Komşu birleştirme (neighbour-joining)

Kümeleşme algoritmi kullanan yöntemler veri türü olarak evrimsel uzaklığı kullanırlar. Uzaklık (d) en basit olarak iki dizi arasında farklı olan karakterlerin sayısının (n), dizideki toplam karakter sayısına (N) bölünmesi ile bulunur ($d = n/N$). Ancak, bu tür bir hesaplamada iki dizi arasında gözlenen farklılıklar, bunlar arasındaki evrimsel uzaklığı gerçekçi bir biçimde yansıtmaz. Bu nedenle, Jukes-Cantor, Tajima-Nei, vb farklı evrimsel modeller geliştirilmiştir. Kümeleşme yöntemi kullanan yöntemlerin en büyük avantajı, çok sayıda veriyi hızla incelemeye olanak sağlamasıdır. Dezavantajları ise dizilerdeki bilginin sayılara (evrimsel uzaklık) indirgenmesi nedeniyle, bazı filogenetik bilgilerin yitirilmesidir (Tablo 3).

Optimalite ölçütleri kullanan yöntemler arasında en eskisi maksimum parsimonidir (MP). Bu yöntem, gözlenen değişiklikleri açıklayabilecek en az mutasyonla oluşturulabilen ağacı araştırır. En basit (parsimonious) açıklamanın, evrimsel süreci en iyi açıkladığını varsayar. MP birbirlerine çok benzer dizilerin filogenisini incelemek için uygun bir yöntemdir. Ancak, farklı evrimsel hızlara sahip dizilerin incelenmesi için uygun değildir.

Uzun süre önce birbirlerinden ayrılan ya da hızla evrilen diziler arasındaki filogenetik ilişkileri tanımlamak için, maksimum olabilirlik (ML) güvenilir bir yöntemdir. ML, seçilen bir evrim modeline göre gözlenen dizileri açıklayabilecek en yüksek olasılığa sahip ağacın belirlenmesi esasına dayanır. Son yıllarda ML yöntemine benzeyen ve Bayes kuramının uygulandığı yeni ağaç oluşturma yöntemleri ortaya çıkmıştır. Bu yöntemlerde, belirli bir hipotezin ön (prior) olasılığı ile bu hipotezin olabilirlik (likelihood) oranı çarpılarak art (posterior) olasılık hesaplanır. Art olasılığı en yüksek bulunan hipotezin en optimal hipotez olduğu varsayılır. Bayesian analizlerini cazip kılan hususlardan biri, karmaşık evrim modellerinin sınanmasına olanak vermesidir. Bu yolla, farklılaşma zamanlarının

hesaplanması, doğal seleksiyon için önemli rezidülerin belirlenmesi ve rekombinasyon noktalarının saptanması gibi ML ve diğer yöntemlerin yetersiz kaldığı analizlerin yapılabilmesine olanak sağlar.

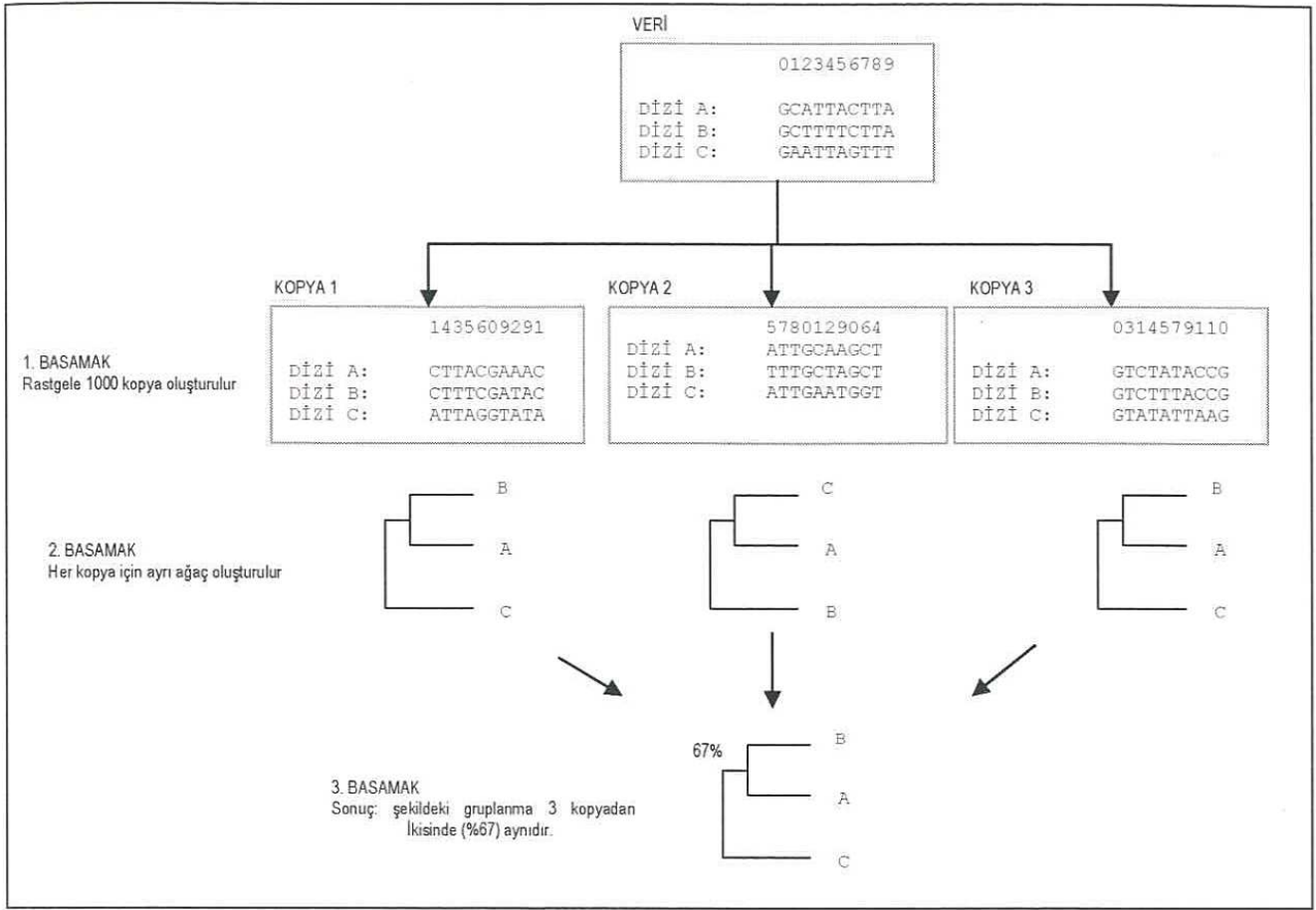
Tablo 3: Ağaç oluşturma yöntemlerinin karşılaştırılması

<i>Yöntem</i>	<i>Üstünlükleri</i>	<i>Kısıtları</i>	<i>Yazılım</i>
Komşu birleştirme (Neighbour joining)	Hızlı	Sayısal değerlere indirgenme nedeniyle filogenetik bilgilerin bazıları yitilir. Birbirinden farklı diziler için doğru sonuç vermeyebilir.	PAUP PHYLIP MEGA
Maksimum parsimoni	Birbirleriyle yakından ilintili diziler için uygun	Evrimsel hızları birbirinden farklı diziler için uygun değil	PAUP PHYLIP MEGA NONA
Maksimum olabilirlik	Evrimsel hızları farklı ya da uzaktan ilintili diziler için uygun	Çok yavaş	PAUP PHYLIP PAML
Bayesyan	ML yöntemine benzer	Ön olasılıkların bilinmesi ile ilgili sorunlar	MrBayes BAMBE

(3 no'lu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)

c. Ağacın güvenilirliğinin sınanması

Filogenetik ağacın topolojisinin ne oranda güvenilir olduğunu sınamak üzere bazı istatistiksel yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar arasında en sık kullanılanı olan "bootstrapping" analiz, kullanılan verilerin oluşan ağacı destekleyip desteklemediğini sınar. Bu amaçla, dizilerden rastgele oluşturulan alt kümelerin orijinal ağaca ne oranda benzediği hesaplanır (Şekil 8). Yüzde 70 ve üzerindeki değerler güvenilir kabul edilir.



Şekil 8: Bootstrap analizi (2 no'lu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)

KAYNAKLAR

1. Bioinformatics: sequence and genome analysis. David W Mount. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001
2. Baldauf SL: Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. Trends Gen 2003; 19: 345-51.
3. Holder M, Lewis PO: Phylogeny estimation: Traditional and Bayesian approaches. Nature Rev Genetics 2003; 4: 275-84.
4. Phillips AJ: Homology assessment and molecular sequence alignment. JBI-05-104, doi:10.1016/j.jbi.2005.11.005
5. Hall B, Barlow M: Phylogenetic analysis as a tool in molecular epidemiology on infectious diseases. AEP doi: 10.1016/j.annepidem.2005.04.010

İNSAN GENOM ARAŞTIRMALARI VE İNFEKSİYON HASTALIKLARI

Prof. Dr. Osman Şadi Yenen

*Istanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,
İstanbul***İnfeksiyöz hastalıklara genetik duyarlılık/dirençlilik**

Kimi infeksiyöz hastalıkların kimi bireylerde farklı gidiş gösterdiğine ilişkin gözlemlere dayanan verilerin tarihi çok eskilere kadar gitmektedir. Benzer şekilde kimi infeksiyöz hastalıkların kimi toplumlarda ya da etnik gruplarda farklı davranışlara sahip olduğu da bilinmektedir. Bu durumun konağın genetik yapısıyla ilişkili olabileceğine ilişkin ilk çalışmalar 1900'lerin ilk yarısında ikizler, evlatlıklar ve çeşitli etnik topluluklar düzeyinde yapılan araştırmalarla başlamıştır¹. Bugün, genel olarak, mikroorganizmaların çevreyle girdiği ilişkilerde, çevreden gelen uyarıların etkisiyle devamlı bir adaptasyon geçirdikleri ve bu adaptasyon sürecinin konak-mikrop etkileşiminde çeşitli varyasyonlara yol açtığı düşünülmektedir². Bu tür etkileşimlerin evrimi, sonuçta bir simbiyozu yol açıyorsa, bu hem mikrobun hem de konağın yararına bir evrimleşmedir. Bu açıdan bakıldığında, evrimsel stazın sağlandığı durumlarda infeksiyöz hastalık ortaya çıkmaz; hastalık, ancak henüz tamamlanmamış bir uyum sürecinin ürünüdür. Öte yandan, epidemiler sırasında ya da infeksiyöz hastalıklarla uzun süreli temasların bir sonucu olarak ortaya çıkan seçim baskısının, konağın genetik yapısını etkileyebileceğine ilişkin görüşler de çok yeni değildir. Doğrusu, infeksiyöz hastalıkla konağın genetik yapısının etkileşimine ilişkin, dolaylı da olsa ilk önermeler 1931'de Garrod ve 1948 tarihinde de Haldane'e kadar uzanır³.

Kan gruplarının 1900 yılında keşfinden sonra, kimi infeksiyöz ve infeksiyöz olmayan hastalıklarla kan grubu fenotipleri arasındaki ilişkilerin araştırılması, önemli ilgi alanlarından biri olmuştur. Her bir ABO fenotipinin, eksik olan fenotipe karşı antikor geliştiriyor olmasının, bu epitoplara taşıyan mikroorganizmalarla provokasyona bir yanıt olarak ortaya çıktığı olasılığı, infeksiyöz hastalıklarla bu ilişki araştırmalarının temelini oluşturmuştur⁴. İnfeksiyöz olmayan hastalıklarla ilişkide ise, ABH benzeri antijenlerle donanımlı mikroorganizmaların rolünün bir sonucu olabilme olasılığı, araştırmaların temel yönlendiricisi olmuştur. Bu bağlamda, çiçek, influenza A2, bilharzial hepatik yetersizlik, tropikal eozinofili, romatizmal kalp hastalığı, serebrospinal sifiliz ve romatizmal ateş gibi hastalıklarla kimi kan grubu fenotipleri arasında olası ilişkiler ileri sürülmüştür. Ancak, konağın genetik yapısı ile bir infeksiyona karşı direncin varlığı ilk kez, 1949'da JBS Haldane tarafından talasemi ile sıtma arasında kuramsal olarak kurulmuştur^{5,6}.

Gelişen genetik yaklaşımlar ve teknolojik ilerlemeler sayesinde kimi infeksiyöz hastalıklara karşı direncin Mendelyen (monogenik) özellikte olduğu saptanmıştır. *FY (DARC)*, *CCR5* ve *FUT2* genlerindeki mutasyonların, sırasıyla *Plasmodium vivax*, HIV ve norovirus infeksiyonlarına karşı dirençten sorumlu olduklarına ilişkin ciddi kanıtlar elde edilmiştir⁷⁻⁹. *P. vivax* infeksiyonuna karşı direncin temelinde, sonuçta Duffy kan grubu negatifliğiyle kendini gösteren, *FY* geninde bir SNP (tek nükleotid polimorfizm) varlığı söz konusudur⁷. *FY* geni tarafından kodlanan Duffy antijeni çeşitli hücre tiplerinde sergilenen bir kemokin reseptörüdür. Bu nedenle bu antijene "Duffy antigen/receptor for chemokines" ifadesinin kısaltılmış hali olan DARC adı da verilmektedir. *P. vivax*, bir

Duffy-binding protein aracılığıyla DARC'a bağlanır. HIV infeksiyonuna karşı direnç, CCR5 reseptörünün 1 transmembran bölgesinin bir bölümünü kodlayan kısmındaki 32-bp'lik bir delesyonun (delta32) sonucudur⁸. Norwalk virusları H-1 tip oligosakkarid ligandlara tutunurlar, bu nedenle bu ligandın sergilenmemesine neden olan ABH doku-kan grup ailesinde, alfa(1,2)fukoziltransferaz (FUT2 enzimi) geninde homozigot mutasyon varlığını taşıyan bireyler (nonsekretör ya da sekretör negatif fenotip bireyler olarak da adlandırılırlar) noroviruslara dirençlidirler⁹⁻¹¹. Görüleceği gibi bu genler, ilgili patojenin, sırasıyla eritrositlere, CD4 T hücrelere ve barsak epitel hücrelerine tutunmalarıyla ilgili hücre yüzeyi reseptörlerini kodlamaktadırlar. Bu genlerde ortaya çıkan (homozigot) mutasyonlar patojenlerin hedef hücreye girmelerini önleyerek, infeksiyon gelişimini engellemektedirler.

Bu bireysel genlerdeki mutasyonların yanında kimi genlerdeki mutasyonlarla ilişkili heterozigot genotiplerin de hastalık şiddetiyle ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu durumun en bilinen örneği hemoglobinopatilerle sıtma arasındaki ilişkidir^{12,13}. Kısaca, "sickle" hemoglobin heterozigot genotipi, şiddetli malarya riskinde %90'lık bir azalmayla ilişkilirken hemoglobin E Güneydoğu Asya'da, hemoglobin C ise, HbS'e benzer şekilde, Batı Afrika'da hastalık şiddetinin azalmasıyla ilişkilidir. Yine, alfa ve beta talasemiler *P. falciparum*'a karşı koruyucu etki göstermektedirler. Benzer şekilde, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği de şiddetli malaryaya karşı korunma sağlamaktadır. Bunlar dışında, 1980'lerden bu yana, malarya ile ilişkili olarak, hematolojik aday gen çalışmalarına HLA analizleri de eklenmiş ve HLA-B ile HLA-DR genlerindeki varyasyonların şiddetli malarya ile ilişkisi olduğu saptanmıştır.

İnfeksiyöz hastalıklara duyarlılığın olası genetik temelleri üzerinde yoğun olarak çalışılmaktadır ve kimi genetik ilişkilerin olabileceğine dair ipuçlarının bulunduğu infeksiyonların sayısı gün geçtikçe artmaktadır^{1,2,14-22}. Bu açıdan, kimi verilerin elde edildiği infeksiyonlar arasında tüberküloz, lepra, non-tüberküloz mikobakteri infeksiyonları, HIV, hepatit B, hepatit C, meningokok sepsisi, *Pneumocystis carinii*, *Cryptosporidium parvum*, EBV, CMV, *Toxoplasma gondii*, *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhi*, Batı Nil virusu ve kimi helmint infeksiyonları sayılabilir.

İnfeksiyon hastalıklarına duyarlılık, basit Mendelyen kalıtım kalıbını izlemez ve insanlardaki immün yanıt, genetik olarak kontrol edilen karmaşık bir süreçtir. Genetik duyarlılık da dahil olmak üzere, bir infeksiyon hastalığının ortaya çıkmasına çok sayıda faktör katkıda bulunmaktadır ve bu nedenle infeksiyon hastalıkları kompleks hastalıklar olarak ele alınırlar²³. Ancak, infeksiyon hastalıklarıyla ilgili genetik çalışmaları, öteki kompleks hastalıklarla ilgili genetik çalışmalardan ayıran en önemli faktör, çevresel etkilerin çok daha önemli olmasıdır ve bu nedenle çalışmalarda bu etkilere de yer verilmesi zorunludur. Öte yandan, bir infeksiyon hastalığına genetik duyarlılığın araştırılmasında, genetik belirleyicilerin saptanması için değişik yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan klasik olanları; epidemiyolojik çalışmalar, ikiz ve evlatlık çalışmaları, pedigrî analizleri gibi çalışmalardır. Bu çalışmalarda kalıtsallık ve kalıtım modeli belirlendikten sonra, ilgili genlerin ortaya çıkarılmasında genom ölçeğinde bir yaklaşım ya da hipoteze dayalı yaklaşım kullanılır. Genom ölçekli yaklaşımda, birliktelik (*linkage*) ve bağlantılılık (*association*) analizleri kullanılır ki, bunların her ikisi de hastalığa duyarlılıktan sorumlu genle ilişkili polimorfizmlerin saptanmasına dayanır. Hipoteze dayalı yaklaşım ise, hem *in vivo* hem de *in vitro* hayvan modellerine ya da insan verilerine dayanmaktadır. İnfeksiyon hastalıklarındaki genetik belirleyicilerin tespitinde kullanılan ve gün geçtikçe sayıları artan yöntemlere ilişkin çok sayıda kaynak vardır^{2,15,23,26-30}. Genotipleme teknolojisindeki, biyobilişimdeki ve istatistik

hesaplamalarındaki son gelişmeler ve hem mikroorganizma genomlarının hem de insan genomunun diziliminin elde edilmesindeki ilerlemeler, beraberlerinde getirdikleri bir çok sorunla birlikte, infeksiyon hastalıklarının genetik belirleyicilerinin anlaşılmasında yeni olanaklar sağlayacağına benzemektedirler.

İnsan genom araştırmaları ve ortaya çıkan eğilimler

Kromozomların kalıtım aracı olduğunun ve alkaptonürinin Mendelyen aktarımının gösterildiği 1902 yılından sonraki insan genomuyla ilgili önemli dönüm noktaları; 1944'de DNA'nın kalıtımın kimyasal temeli olduğunun gösterilmesi ve 1953'de de DNA'nın ikili sarmal modelinin önerilmesi olmuştur. Tek kromozomlar, kromozom parçaları ve DNA ile çalışmalar sonunda, 1973'de toplanan ilk Human Gene Mapping Conference'da 20 birliktelik (*linkage*) grubunu kapsayan yaklaşık 100 gene ilişkin veriler sunulmuştur³². Somatik hücre genetiğindeki ilerlemeler, sonunda İnsan Genom Projesi (İGP)'nin yolunu açmış, böyle bir proje 1980'lerin ortalarında önerilmiş ve 1990'larda yürürlüğe girmiştir. İnsan genomunun tam dizilimi ve haritalandırılması çalışmalarının ilk kaba tamamlanışı 2001'de gerçekleştirilmiş, yeni ve daha güvenilir dizilim çalışmaları ise 2004'de sonuçlandırılmıştır³²⁻³⁴. Bu gelişmeler bilim dünyasında büyük bir coşku ile karşılanmıştır. Öte yandan, gerek İGP'nin önerildiği dönemde, gerek proje çalışmaları sürerken, gerekse tamamlandıktan sonra projenin sonuçlarının ne gibi gelişmelere yol açacağı, doğuracağı etik sorunlar, bilimsel değeri üzerinde ciddi tartışmalar ve eleştiriler yapılmıştır³⁵⁻³⁷.

İGP'nin az sayıda ve beyaz insanlardan alınan örneklerle yürütülmesi İnsan Genom Çeşitliliği Projesi (İGÇP; *Human Genome Diversity Project*, HGDP) ve HapMap gibi farklı projelerin geliştirilmesine yol açmıştır^{38,39}. Bu projelerin, daha başka birçok sonucunun yanında, insan genomunun, bir anlamda mikroorganizmalar tarafından şekillendirilmesi nedeniyle, yerel ve toplumsal özelliklerinin belirlenerek, konak-parazit ilişkilerinin genetik özelliklerinin belirlenmesinde yardımcı olacağı düşünülmektedir⁴⁰. İnsan Genom Projesindekine benzer birçok eleştiri bu projeler için de yapılmaktadır.

Öte yandan, insan genomunun ayrıntılandırılmasıyla ilişkili bütün bu çalışmalar, teknolojinin de yönlendirmesiyle, giderek yeni bir genetik indirgemeciliğın örneklerini sergilemeye başlamıştır. Konumuz açısından önemli bir eğilim; kimi mikroorganizmaların moleküler çeşitliliği ile insan grupları (genetik çeşitlilikleri) arasında kurulan ilişkilerle, insan göçleri arasında bağlar kurma araştırmalarının yapıyor olmasıdır. Bu konuda iki tipik örnek tüberküloz ve HSV-1'dir^{41,42}. Dahası, örneğın tüberkülozun genetik bir hastalık olduğı ileri sürülebilmektedir⁴³. Böylesi çalışmalar sonuç olarak ve kaçınılmaz bir şekilde büyük önermelerde bulunmak durumundadırlar ("*results show a very fine example of co-evolution: the pathogen can be considered a character of the host and vice versa*"⁴⁴). Bu nedenle de insanlığın sosyal tarihi, tarih içerisinde infeksiyon hastalıkları ve toplum ilişkileri, infeksiyonların toplumlarda yaygınlaşmasındaki çevresel ve toplumsal koşulların göz ardı edilip sonunda, belki de, toplumlar ve bireyler arasında yeni "genetik" hiyerarşilerin kurulmasında malzeme olma olasılıkları vardır⁴⁵⁻⁵⁰. İnfeksiyon riski bakımından özgül gen ya da gen varyantlarına odaklanmaksızın, parazit ve konak genetik özelliklerinin bu riskteki göreceli katkılarının belirlenmesi daha önceliklidir⁵¹.

KAYNAKLAR

1. Hill AVS: Genes and susceptibility to infectious diseases, pp: 203-214. In: Scriver CR, et al (eds), *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. 2002, McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York.
2. Segal S, Hill AVS: Genetic susceptibility to infectious disease. *Trends Microbiol* 2003; 11: 445-8.
3. Weatherall D, Clegg J, Kwiatkowski D: The role of genomics in studying genetic susceptibility to infectious disease. *Genome Res* 1997; 7: 967-73.
4. Morton NE: Genetic epidemiology of infectious diseases: The first half-century, pp: 307-314. In: Dronamraju KR (ed), *Infectious Disease and Host-Pathogen Evolution*. 2004, Cambridge University Press, Cambridge.
5. Lederberg J: J.B.S. Haldane (1949) on infectious disease and evolution. *Genetics* 1999; 153: 1-3.
6. Weatherall DJ: J.B.S. Haldane and the malaria hypothesis, pp: 18-36. In: Dronamraju KR (ed), *Infectious Disease and Host-Pathogen Evolution*. 2004, Cambridge University Press, Cambridge.
7. Miller LH, et al: The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med* 1976; 295: 302-4.
8. Dean M, et al: Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR5 structural gene. *Science* 1996; 273: 1856-62.
9. Lindesmith L, et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med* 2003; 9: 548-53.
10. Harrington PR, et al: Norovirus capture with histo-blood group antigens reveals novel virus-ligand interactions. *J Virol* 2004; 78: 3035-45.
11. Tan M, Jiang X: Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. *Trends Microbiol* 2005; 13: 285-93.
12. Kwiatkowski DP: How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 171-90.
13. Carter R, Mendis KN: Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 564-94.
14. Hill AVS: The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001; 2: 373-400.
15. Cooke GS, Hill AVS: Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 967-77.

16. Dean M, Carrington M, O'Brien SJ: Balanced polymorphism selected by genetic versus infectious human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002; 3: 263-92.
17. Burgner D, Levin M: Genetic susceptibility to infectious diseases. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 1-6.
18. Quinnell RJ: Genetics of susceptibility to human helminth infection. *Int J Parasitol* 2003; 33: 1219-31.
19. Somech R, et al: Genetic predisposition to infectious pathogens: a review of less familiar variants. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 457-61.
20. Fordsham AJ, Hill AVS: Genetics of infectious diseases. *Hum Mol Genet* 2004; 13: R187-R194.
21. Casanova J-L, Abel L: Inborn errors of immunity to infection: the rule rather than the exception. *J Exp Med* 2005; 202: 197-201.
22. Glass WG, et al: CCR5 deficiency increases risk of symptomatic West Nile virus infection. *J Exp Med* 2006; 203: 35-40.
23. Clementi M, Di Gianantonio: Genetic susceptibility to infectious diseases. *Reprod Toxicol* 2005 (baskıda). doi:10.1016/j.reprotox.2005.08.006.
24. Tunçbilek E ve ark: Tıbbi Genetik. (Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF: *Medical Genetics*, 6th ed, Thompson & Thompson'dan çeviri) 2005, Güneş Kitapevi, Ankara.
25. Young ID: *Medical Genetics*. 2005, Oxford University Press, Oxford.
26. Blackwell JM: Genetics and genomics in infectious disease susceptibility. *Trends Mol Med* 2001; 7: 521-26.
27. Mir KU, Southern EM: Sequence variation in genes and genomic DNA: methods for large-scale analysis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000; 1: 329-60.
28. Forabosco P, Falchi M, Devoto M: Statistical tools for linkage analysis and genetic association studies. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5: 781-96.
29. Carlson CS, et al: Mapping complex disease loci in whole-genome association studies. *Nature* 2004; 429: 446-52.
30. Casanova J-L, Abel L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural condition. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 55-66.
31. Ruddle F: Hundred-year search for the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001; 2: 1-8.
32. International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
33. Venter JC, et al: The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-51.

34. International Human Genome Sequencing Consortium: Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004; 431: 931-45.
35. Lewontin R: It ain't necessarily so, pp: 133-195. *The Dream of the Human Genome and Other Illusions*. 2nd ed, 2001. New York Review Books, New York.
36. Nerlich B, Dingwall R, Clarke DD: The book of life: how the completion of the Human Genome Project was revealed to the public. *Health* 2002; 6: 445-69.
37. McCann-Mortimer P, Augoutinos M, LeCouteur A: 'Race' and the Human Genome Project: constructions of scientific legitimacy. *Discourse Soc* 2004; 15: 409-32.
38. Cavalli-Sforza LL: The Human Genome Diversity Project: past, present and future. *Nat Rev Genet* 2005; 6: 333-40.
39. The International HapMap Consortium: The International HapMap Project. *Nature* 2003; 426:789-95.
40. Tibayrenc M: The impact of human genetic diversity on the transmission and severity of infectious diseases, pp: 315-324. In: Dronamraju KR (ed), *Infectious Disease and Host-Pathogen Evolution*. 2004, Cambridge University Press, Cambridge.
41. Zozio T, et al: Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in two cities of Turkey: description of a new family of genotypes that is phylogeographically specific for Asia Minor. *BMC Microbiology* 2005; 5:44 doi:10.1186/1471-2180-5-44.
42. Bowden R, et al: Patterns of Eurasian HSV-1 molecular diversity and inferences of human migrations. *Infect Genet Evol* 2006; 6: 63-74.
43. Alcais A, et al: Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. *J Exp Med* 2005; 202: 1617-21.
44. Tibayrenc M: A molecular biology approach to tuberculosis. *PNAS* 2004; 101: 4721-2.
45. McNeill WH: *Plagues and peoples*. Doubleday, 1977, New York.
46. Watts S: *Epidemics and History. Disease, Power and Imperialism*. 1997, Yale University Press, New Haven.
47. Hui E K-W: Reasons for the increase in emerging and re-emerging viral infectious diseases. *Microb Infect* 2005 (baskıda) doi: 10.1016/j.micinf.2005.06.032.
48. Morse SS: Factors and determinants of disease emergence. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2004; 23: 443-51.
49. Foladori G: The challenge of infectious diseases to the biomedical paradigm. *Bull Sci Tech Soc* 2005; 25: 145-58.
50. Allen GE: Is a new eugenics afoot ? *Science* 2001; 294: 59-61.
51. Mackinnon MJ, et al: Heritability of malaria in Africa. *PloS Med* 2005; 2:e330.

SAVUNMA SİSTEMİNDE HÜCRESEL MEKANİZMALAR

Prof.Dr.Selim Badur

*Istanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,
Istanbul*

Yabancı etkene karşı organizmanın kendisini savunmak amacıyla, öncelikli olarak doğal direnci devreye soktuğunu; ancak bu engeli aşmayı başaran düşmanlara karşı, sonraki aşamada özgül bağışıklık mekanizmalarını kullandığını biliyoruz. Bu arada uzun yıllardan beri bilinmelerine karşın, epitel tabakası, sitokinler, fagositik hücreler, kompleman sistemi ve bir dizi antimikrobial peptitler gibi doğal direncin çeşitli yapıtaşlarını konu alan çalışmaların özellikle son yıllarda yoğunluk kazandığını görmekteyiz. Aynı dönemde, yukarıda saydığımız klasik doğal direnç etkenlerine ek olarak, çeşitli virus infeksiyonlarında etkili olan ve doğal direnç kapsamında ele alınan yeni bazı hücresel faktörler saptanmakta; Hepatit B virusu (HBV) ve Human immunodeficiency virus (HIV) infeksiyonları gibi modellerde bu yeni savunma proteinlerinin nasıl etkili oldukları araştırılmaktadır.

Örneğin CATERPILLER (CLR) gen ailesinin ürünleri olan ve yapısal olarak bitkilerin savunma sistemleri kapsamında çeşitli hastalıklara direnç göstermelerinde etkili olan R proteinlerine benzeyen bir dizi proteinin, inflamasyon ve apoptozda düzenleyici rol oynadıkları; ayrıca patojenleri tanımada devreye girdikleri saptanmıştır¹. NOD proteinleri olarak da isimlendirilen bu ailede; CIITA gibi antijen sunan hücrelerin transaktivatörü, CARD4/NOD1 gibi apoptoz uyarıcısı, NOD2/CARD15 gibi Crohn hastalığında önemi saptanmış olan ve barsaklarda inflamatuvar yanıt düzenleyicisi, CIAS/CRYOPYRIN gibi NF-kB ve IL-1beta inhibitörü, NAIP gibi apoptoz baskılayıcısı ve nihayet CARD7/NALP1 gibi kaspazlar üzerine etki ederek apoptoz ve inflamatuvar yanıtı regüle eden moleküller yer almaktadır².

Anti-viral etkinliğe sahip bir diğer protein ailesi, "tripartite motif" (TRIM) protein grubudur. Üzerinde çok çalışmanın yapıldığı, sitoplazmada bulunan TRIM 19 ve TRIM 5alfa gibi maddelerin; HIV, influenza, HSV, Lassa ve Ebola gibi virusların replikasyonunu baskıladıkları ve bu inhibisyonu özellikle yeni virus partiküllerinin oluşumu aşamasında, viral komponentlerin bir araya gelişini engelleyerek gerçekleştirdikleri gösterilmiştir³.

Söz konusu bu yeni moleküllerden üzerinde en fazla çalışmanın yapıldığı faktör, ilk kez 2002 yılında Sheehy ve arkadaşları⁴ tarafından, HIV modelinde etki mekanizması gösterilen "apolipoprotein B mRNA-editing catalytic protein (APOBEC)" dir. Çalışmada, hücrede bulunan CEM15 geninin, retrovirusların replikasyonunu inhibe ettiği ve CEM15'in, APOBEC ve forbolin-1 gibi sitozin deaminazlar ile sekans benzerliği gösterdiği kanıtlanmıştır.

Sheehy ve arkadaşlarının⁴ çalışmasını izleyen dönemde; CEM15 proteini ile aynı moleküller oldukları anlaşılan APOBEC proteinlerinin, yeni viral partiküllerin sentezinde gerekli olan retroviral cDNA oluşumunda sitozinlerin deaminasyonuna yol açarak viral replikasyonu kesintiye uğrattığı; yaşam mücadelesi veren virusların ise *vif* (*virion infectivity factor*) proteinleri üreterek APOBEC'leri parçalamaya çalıştıkları; omurgalılarda 11 farklı APOBEC proteininin bulunduğu; ve nihayet kısa bir süre kabul gören APOBEC'lerin klasik etki mekanizması olan deaminasyon yolu dışında, farklı

yöntemlerle de viral replikasyonu baskılayabildikleri gösterilmiştir. Günümüzde APOBEC3F ve APOBEC3G olarak isimlendirilen en az iki proteinin, retroviral infeksiyonu kesintiye uğratan hücrel savunma faktörleri olduklarını biliyoruz.

Retrovirusların replikasyon sürecinin önemli bir aşaması olan negatif DNA zincirinin sentezi sırasında; APOBEC'lerin neden olduğu sitozin (C) deaminasyonu sonucu ortamda urasil (U) yığılımı meydana gelmekte, virusun revers transkriptaz enzimi tarafından U molekülleri timin (T) olarak algılanmakta ve sonuçta pozitif DNA zincirinde guanin (G) moleküllerinin bulunması gereken bölgelere adenin (A) yerleşmektedir. Böylece genom üzerinde olumsuz etkiye sahip çok sayıda mutasyon gerçekleşmektedir. Kısaca özetlenen bu etki mekanizması, omurgalılarda antikor yanıtını etkileyerek immünoglobülin sınıflarının değişimine neden olan bir diğer sitozin deaminazın, kısaca AID olarak isimlendirilen "activation-induced deaminase"nin etki şeklini andırmaktadır.

Burada mutasyonların, virusları nasıl etkilediklerine bir göz atalım. Bu açıdan bakıldığında, mikroorganizmaların yaşam savaşı, replikasyon sürecinde oluşacak olumlu ve olumsuz mutasyonlar arasındaki denge üzerine kuruludur. Mutasyon tipleri açısından bakıldığında ise, tek bir tip nükleotid substitüsyonu şeklinde kendini gösteren mutasyon tipine, hipermutasyonlar adı verilmekte olup, bu gelişme etkeni açısından letal özellik taşır. Bu tip mutasyonların bir kısmı kızamık virusunda görüldüğü şekliyle A'in yerini G'in alması ile gerçekleşir; diğer hipermutasyon biçimi ise retroviruslarda görüldüğü şekliyle G yerine A'in geçmesi yönünde oluşur. Yapılan bir çalışmada, HIV suşlarında bu tip bir substitüsyona periferik mononükleer hücrelerde ve özellikle CD4⁺ hücrelerin aktivasyonu aşamasında rastlanıldığı bildirilmiştir⁵.

HIV replikasyonu ve bunu engelleyen APOBEC'lerin etki mekanizması, etkeni hücre kültüründe üretme çalışmaları sırasında gözlenen bazı gelişmeleri de açıklamaktadır. Yıllar önce HIV kültürünü gerçekleştirmeye çalışan araştırmacılar, ölümsüz insan T hücre kültürleri hazırlamış ve bu hücre suşlarını "üretim yatkın" (permissive) hücreler olarak isimlendirmişlerdir. Ancak aynı hücrelerin yüzeyinde HIV reseptörü veya koreseptörlerinin bulunmaması, infeksiyonu olanaksız kılmış ve bu tip hücreler, "üretim yatkın olmayan" (non-permissive) suşlar olarak adlandırılmıştır. Ayrıca *vif proteini* sentezlemeyen HIV suşlarının "üretim yatkın" hücrelerde replike olmadıkları ve bu gelişmenin APOBEC etkinliği ile bağlantısı olduğu gösterilmiştir⁶. Bu durumda, hücrenin kendisini korumak için doğal direnç kapsamında değerlendirilen yeni bir hücrel faktörü, yani APOBEC ailesinin proteinlerini kullanarak retroviral infeksiyonları engellemeye çalıştığını; kendi açısından yaşam savaşı vermekte olan HIV'in ise *vif proteinleri* üreterek APOBEC'leri yıkıma uğrattığı, varlığını sürdürmeye çalıştığını söyleyebiliriz.

Anti-retroviral etkinliğe sahip APOBEC3G'lerin etki mekanizmaları; memelilerde karsinojeniteye neden olan APOBEC1 ve immünoglobülin gen düzenlenmesinde farklılaşmalara yol açan AID proteinlerine benzer şekildedir. Nitekim AID'de görülene benzer biçimde, APOBEC3G'ler de DNA molekülünde C/G den T/A'ya değişim sonucu retroviral hipermutasyonuna neden olurlar⁷. Sonuçta *vif* sentezlemeyen HIV suşlarının üretildiği ve bol miktarda APOBEC sentezledikleri bilinen hücrelerden alınan retroviral cDNA'ların dizi analizlerinde, pozitif zincir üzerinde %25'i aşan oranda G-A mutasyonu saptanmıştır. Buna karşılık, APOBEC'lerin bulunmadığı ortamlardan izole edilen HIV suşlarında hipermutasyon hemen hemen görülmemektedir⁸. Bu deneysel bulgular; virusun replikasyonu sırasında oluşan ilk cDNA zincirinde APOBEC3G'nin sitozin deaminasyonuna yol açarak anti-retroviral etkinlik gösterdiğini ve virusun yaşamını etkilediğini; APOBEC3G'nin DNA-RNA hibridlerine ya da dsDNA'lara değil, sadece tek

zincirli DNA yapısına etki ettiğini göstermektedir⁹. Bu arada APOBEC'lerin deaminasyonu nasıl gerçekleştirdikleri de incelenmiş ve DNA üzerindeki sistein ve histidin moleküllerinin, çinko iyonlarının katalitik etkisi ve reaksiyona H₂O molekülünün katılması ile glutamik asit üzerinden amin grubunun ayrılmasına; sonuçta DNA üzerindeki C molekülünün bu mekanizma uyarınca deaminasyona uğrayıp, U'e dönüşmesine neden olduğu gösterilmiştir⁶.

APOBEC'lerin etki mekanizması incelenirken yanıt aranan önemli bir diğer konu, bu molekülün viruslara nasıl girebildiğidir. İnfekte bir hücrede yeni virus partikülleri sentezlenirken, hücre bir yanda da APOBEC üretmekte; bu yapılar, yeni oluşan viruslara entegre olmakta ve etkilerini, virusların infekte edecekleri yeni hücrelerde göstermektedirler. Sitoplazmik yerleşim özelliğine sahip APOBEC molekülleri, ya yeni virus partiküllerinin yapıtaşlarının bir araya gelmesi sırasında, virus içine raslantısal biçimde girmekte; ya bu yerleşme aşamasına hücresel bir protein katkıda bulunmakta; ya da *Gag proteini* gibi bir viral protein, APOBEC'leri bağlayarak virus içine çekmektedir¹⁰.

Deaminasyon yapmak suretiyle retroviral replikasyonu bozan APOBEC'lerin, HIV'in *vif proteini* tarafından nasıl yıkıma uğratıldığı ile ilgili moleküler düzeydeki çalışmalar; *vif'in*, henüz APOBEC'ler virion içine girmeden önce etki ettiğini, poliubikitilasyon ve proteazomda parçalama yaparak APOBEC'leri yıkıma uğrattığını göstermiştir¹¹. Bu yıkım aşamasında, *vif'in* sahip olduğu elongin B ve C, cullin-5 (CUL5) ve ring box-1 (RBX1) gibi proteinlerin rol oynağı saptanmıştır¹². Bu arada türler arasındaki APOBEC özgüllüğü araştırılmış ve sonuçta maymunlardan izole edilen SIV'lerdeki *vif proteinlerinin* homolog hücre APOBEC'lerini yıkıma uğrattırken, insan APOBEC3G'leri üzerine etki etmedikleri gösterilerek *vif proteinlerinin* türe özgül olduğu saptanmıştır¹³. Benzer biçimde, APOBEC3B ve APOBEC3C'nin de SIV için antiviral etkinlik gösterdikleri, buna karşın HIV'e etki etmedikleri belirlenmiştir¹⁴. Dolayısıyla, APOBEC3 ailesinden moleküllerin özgül olarak farklı retroviruslara etki ettikleri söylenebilir.

İnsan genomu, APOBEC3G dışında ve benzer yapıda on adet başka proteini de kodlar. Bunların en az yedisinin APOBEC3G genine yakın gen bölgelerinin ürünleri olması ve amino asit dizilerinin çok benzer olması, tümünde antiretroviral etkinin bulunabileceğini düşündürmüştü; ancak yapılan araştırmalar sadece APOBEC3B ve APOBEC3F'in bu tip bir etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir¹⁵. Ancak bu iki yeni APOBEC'in, APOBEC3G'den bazı farklılıkları bulunmaktadır. Her şeyden önce APOBEC3B ve özellikle APOBEC3F, sitozin deaminasyonunu başka bir dinükleotid bölgesinde gerçekleştirirler. Daha da önemlisi bu iki APOBEC'in -her ne kadar APOBEC3F konusunda çelişkili yayınlar bulunuyorsa da-, *vif* tarafından yıkımı söz konusu değildir^{15,16}. Bu arada APOBEC3F ve APOBEC3G'nin ortak özellikleri olarak, her ikisinin de hepatit B virusunun replikasyonunu bozdukları da gösterilmiştir¹⁷.

APOBEC'ler konusunda yapılan araştırmaların ve yayınların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Yapılan ve yapılacak olan incelemeler, bu özel savunma faktörlerine ait bilinmeyen bir çok sorunun yanıtlanmasını sağlayacaktır. Örneğin son çalışmalarda, APOBEC3G'nin antiviral özelliğinin sitidin deaminaz aktivitesinden bağımsız olarak da ortaya çıkabileceği ileri sürülmüştü; nitekim sitidin deaminidaz etkinliğinden yoksun bazı mutant APOBEC3G moleküllerinin de HIV-1'i inhibe ettikleri kanıtlanmıştır¹⁸.

Buraya kadar çeşitli özelliklerine değinilen APOBEC'ler ile onları inhibe eden viral *vif proteini* arasındaki etkileşimin pratikteki önemi nedir? Bu sorunun yanıtı henüz

bilinmemektedir, ancak *vif* inhibitörleri kullanarak APOBEC'lerin önünü açma ya da APOBEC'leri koruma altına alarak *vif* proteinlerinden etkilenmelerini engelleme yolları, belki de ileride HIV infeksiyonlarının tedavisi amacıyla yararlanılabilecek alternatif yöntemler olacaktır.

Sonuç olarak, HIV infeksiyonu örneğinden hareketle, günümüzde çeşitli viral infeksiyonların immünopatogenezi konusunda birçok yeni savunma faktörünün ortaya konduğu görülmektedir. APOBEC'ler ile paralel olarak, örneğin yine HIV infeksiyonlarında "Friend virus susceptibility factor-1" (Fv-1), "restriction factor 1" (Ref1) ve "Lentivirus susceptibility factor 1" (Lv1) gibi maddelerin, replikasyonu baskılayan hücrel faktörler oldukları belirlenmiş¹⁹, ancak kısa sürede bu maddelerin TRIM5 alfa'nın türe özgü varyantları olduğu kabul edilmiştir²⁰.

Sonuçta moleküler yöntemlerde kaydedilen gelişmeler sayesinde, eski olanaklarla gösterilemeyen düşük miktarlardaki bazı hücrel direnç faktörlerini günümüzde belirlemek mümkün olmakta, hem bilinmeyen yeni savunma mekanizmaları ortaya konmakta hem de ileriye yönelik yeni tedavi ufukları doğmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Ting JP-Y, Davis BK: CATERPILLER: A novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 387-414.
2. Inohara N, Nunez G: NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 371-82.
3. Nisole S, Stoye JP, Saib A: TRIM family: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 799-808.
4. Sheehy AM, Gaddis NC, Chol JD, Malim MH: Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 2002; 418: 646-50.
5. Janini M, Rogers M, Birx DR, McCutchan FE: Human immunodeficiency virus type 1 DNA sequences genetically damaged by hypermutation are often abundant in patient peripheral blood mononuclear cells and may be generated during near-simultaneous infection and activation of CD4 + T cells. *J Virol* 2001; 75: 7973-86.
6. Harris RS, Liddament MT: Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nature Rev Immunol* 2004; 4: 868-77.
7. Petersen-Mahrt SK, Harris RS, Neuberger MS: AID mutates *E.coli* suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature* 2002; 418: 99-103.
8. Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM et al: DNA deamination mediates innate immunity to Retroviral infection. *Cell* 2003; 113: 803-9.
9. Yu Q, König R, Pillai S, et al: Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nature Struct Mol Biol* 2004; 11: 435-42.

10. Alce TM, Popik M: APOBEC3G is incorporated into virus-like particles by a direct interaction with HIV-1 Gag nucleocapsid protein. *J Biol Chem* 2004; 279: 34083-6.
11. Marin M, Rose MM, Kozak SL, Kabat D: HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Nature Med* 2003; 9: 1398-403.
12. Yu X, Yu Y, Liu B, et al: Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* 2003; 302: 1056-60.
13. Mariani R, Chen D, Schröfelbauer B, et al: Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virion by Vif. *Cell* 2003; 114: 21-31.
14. Yu Q, Chen D, König R, et al: APOBEC3B and APOBEC3C are potent inhibitors of Simian immunodeficiency virus replication. *J Biol Chem* 2004; 279: 53379-86.
15. Bishop KN, Holmes RK, Sheehy AM, Davidson NO, Cho S-J, Malim MH: Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr Biol* 2004; 14: 1392-6.
16. Liddament MT, Brown WL, Schumacher AJ, Haris RS: APOBEC3F properties and hypermutation preference indicate activity against HIV-1 in vivo. *Curr Biol* 2004; 14: 1385-91.
17. Turelli P, Mangeat B, Jost S, Vianin S, Trono D: Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G. *Science* 2004; 303: 1829.
18. Newman ENC, Holmes RK, Craig HM, et al: Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminidase activity. *Curr Biol* 2005; 15: 166-70.
19. Zheng Y-H, Lovsin N, Matija Peterlin B: Newly identified host factors modulate HIV replication. *Immunology Letters* 2005; 97: 225.
20. Hatzioannou T, Perez-Cabarelo D, Yang A, Cowan S, Bieniasz PD: Retrovirus resistance factors Ref1 and Lv1 are species-specific variants of TRIM5 α . *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 10774-9.

RUTİN MOLEKÜLER TANI: Klinisyen Yaklaşımı

Doç. Dr. Yeşim Çetinkaya Şardan

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi, Sıhhiye, Ankara

Moleküler tanı yöntemlerinin kullanıma girmesi; ilk tanının konulması, hastalık prognozunun ve tedaviye yanıtın izlenmesi konularında Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı için yeni fırsatlar yaratmıştır. Birçok alanda moleküler yöntemler konvansiyonel diagnostik yöntemlerin yerini almaktan çok, tanıyı desteklemek amacıyla kullanılmakta ve ciddi bir maddi yükü beraberinde getirmektedir. Bu noktada klinisyenlere düşen en önemli görev doğru endikasyonlarda moleküler tanı yöntemlerine başvurmak ve gereksiz tetkik istememektir.

Moleküler tanı yöntemlerinin en faydalı olduğu alanlar aşağıda sıralanmıştır:

- Enfeksiyonların çoğundan bir veya iki patojenin sorumlu olduğu durumlar (örn. *Chlamydia trachomatis* veya *Neisseria gonorrhoeae*'nin etken olduğu cinsel yolla bulaşan hastalıklar)
- Bir enfeksiyon hastalığının tedavisi için etken mikroorganizmanın daha ileri düzeyde tiplendirilmesinin ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinin gerekli olmadığı durumlar (örn. viral enfeksiyonların çoğu)
- Konvansiyonel diagnostik yöntemlerin güvenilir olmadığı veya suboptimal olduğu durumlar (örn. bazı bakteriyel, paraziter, viral ve fungal enfeksiyonlar)
- Konvansiyonel tanı yöntemlerinin güvenilir olduğu fakat yavaş sonuç verdiği durumlar (örn. *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonları)
- Enfeksiyon etkeninin kantitasyonunun, hastalığın tedavisi ve prognozu yönünde öne çıktığı durumlar (örn. HIV enfeksiyonu)

Yavaş üreyen veya kültürde üretilmeyen patojenlerin saptanması

Konvansiyonel diagnostik yöntemlerin yavaş sonuç verdiği, duyarlılığının düşük ve pahalı olduğu ya da bu yöntemlerle tanı konulamayan bazı enfeksiyon hastalıklarının tanısında, moleküler yöntemlerin kullanımı önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu kapsamda hepatit C, enteroviral menenjit, boğmaca, herpes simpleks ensefaliti ve *C.trachomatis*'e bağlı genital enfeksiyonlar gibi bazı enfeksiyon hastalıklarının tanısında moleküler tanı yöntemleri altın standart olarak kültürün yerini almıştır. Ayrıca çok hassas veya zor üreyen ve laboratuvara transfer sırasında ölebilen ya da kültürde normal flora elemanlarının çoğalması nedeniyle tespit edilemeyen mikroorganizmaların etken olduğu enfeksiyon hastalıklarının tanısında da moleküler yöntemler önem taşımaktadır (örn. *N.gonorrhoeae*). Ancak tüm bu gelişmelere rağmen antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılabilmesi için mikroorganizmanın kültürde üretilmesine ihtiyaç duyulması, birçok alanda moleküler yöntemlerin, kültürün yerini almasına engel olmaktadır. Moleküler yöntemlerin altın standart haline geldiği enfeksiyon hastalıklarında ya rutin olarak

duyarlılık testlerine başvurulmamaktadır ya da patojenlerin duyarlılık paternleri tahmin edilebilmektedir.

Moleküler yöntemler özellikle klinik virolojide önemli kullanım alanı bulmuş, hızlı sonuç vermeleri, yüksek duyarlılıkları ve daha maliyet-etkin olmaları nedeniyle konvansiyonel yöntemlerin yerini almıştır (örn. enteroviral menenjit, HSV ensefaliti, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda CMV enfeksiyonu gibi). Moleküler tanı yöntemlerinin kullanıma girmesiyle son 20 yıl içinde daha önceden tanımlanmamış veya kültürde üretilmeyen çok sayıda patojenin tanımlanması mümkün olmuştur (hepatit C virusu, *Bartonella henselae*, *Tropheryma whipplei*, *Mycobacterium genavense*, Sin nombre virus, human herpes virus 8 gibi).

Hastalık prognozunun belirlenmesi

Moleküler yöntemlerin hastalık prognozunun belirlenmesine yönelik kullanımının en güzel örnekleri HIV, HPV ve CMV enfeksiyonlarıdır. HIV-1 ile infekte olan kişilerde, HIV-1 virus yükü AIDS'e progresyonun en iyi belirleyicisidir. 1990'lı yılların sonuna doğru yapılan çalışmalarla, plazma virus yükünün, hastalık progresyonunun takibi için CD4 sayısına oranla daha iyi bir gösterge olduğunun kanıtlanmasını takiben, virus yükü HIV-seropozitif kişilerin izlemi için gerekli rutin testlerden biri haline gelmiştir.

Bazı viral enfeksiyonlarda moleküler yöntemlerle virusun subtipinin belirlenmesi prognoz yönünden önem taşır. Örneğin, RSV ile infekte olan çocuklarda yapılan subtiplendirme çalışmaları, grup A viruslarla infekte olanlarda prognozun daha kötü olduğunu göstermiştir. HPV, kadınlarda servikste displazi, intraepitelyal neoplazi ve karsinoma neden olan bir virustur. Neoplaziye progresyon riskinin HPV 16 ve 18 subtiplerinde yüksek, HPV 6 ve 11 subtiplerinde düşük olduğu bilinmektedir.

Kalitatif CMV polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile aktif hastalık-latent enfeksiyon ayırımının yapılması mümkün olmazken, CMV virus yükü kullanılarak aktif hastalık gelişme riskinin yüksek olduğu durumlar saptanarak "preemptive" tedavi kararı alınabilmektedir.

Tedaviye yanıtın izlenmesi

Özellikle bazı viral enfeksiyonlarda tedaviye yanıtın önceden tahmin edilmesinde ve izlenmesinde moleküler tanı yöntemlerinin önemi giderek artmaktadır. Bu amaçla, genellikle özel direnç mutasyonları veya genotip araştırılmakta ya da virus yükü kullanılmaktadır. Örneğin, kronik HCV enfeksiyonunda virus yükü ve genotip, interferon ve ribavirin tedavisine yanıtın bağımsız belirleyicileridir. Tedavi öncesinde virus yükü >2 milyon kopya/ml olan veya HCV genotip 1 ile infekte olanlarda tedaviye yanıt daha kötüdür. Tedavi süresinin belirlenmesinde, diğer faktörlere ek olarak bu viral parametreler dikkate alınmaktadır.

HIV enfeksiyonunda tedaviye başlama, devam etme veya tedavi değişikliği yapma konusundaki kararlar, öncelikle kantitatif HIV-1 RNA testlerinin sonuçlarına göre verilmektedir. Kronik HBV ve HCV enfeksiyonlarında, viral yük takibi ile tedaviye yanıtın izlenmesi mümkündür. Organ nakli yapılan bir hastada yeterli tedaviye rağmen CMV virus yükünde azalma gözlenmemesi, direnç gelişimi ile ilişkilidir. HIV-1 enfeksiyonunda "reverse transcriptase" ve proteaz genlerinde direnç mutasyonları antiretroviral tedaviye kötü yanıt göstergesidir.

Örneklerin toplanması, laboratuvara ulaştırılması ve sonuçların yorumlanması

Moleküler tanı yöntemlerinden beklenen sonucun elde edilebilmesi için, örneklerin toplanması ve laboratuvara taşınması basamaklarına gereken özenin gösterilmelidir. Bu aşamada klinisyen ve laboratuvar arasında iyi bir iletişim ve işbirliğine ihtiyaç duyulmaktadır. Örneklerin toplanması ve laboratuvara ulaştırılması konusundaki tüm ayrıntıların klinisyen tarafından her zaman bilinmesi mümkün olmayabilir. Ancak laboratuvar istek formlarındaki açıklamaların dikkate alınması veya varsa hastanenin bu konu ile ilgili talimatlarının okunması hata yapılmasını engelleyecektir. Tereddüt duyulan her noktada laboratuvarın yönlendirmesine başvurulması, zaman kaybını ve gereksiz masrafi önlemenin en kolay yoludur.

Sonuçların yorumlanması aşamasında, kullanılan yöntemin gücünün ve kısıtlılıklarının bilinmesi ve test sonucunun her zaman hastanın klinik belirti ve bulguları ile birlikte yorumlanması önem taşır. Gereksiz tetkik istenmemesi, yorum aşamasında karşılaşılabilecek sorunların bir kısmının hiç yaşanmamasını sağlayacaktır. Tedaviye yanıtın değerlendirilmesi aşamasında, kalitatif PCR sonuçlarının dikkatle yorumlanması gerektiği unutulmamalıdır. Örneğin, tedaviyi takiben *C.trachomatis* DNA'sı yaklaşık üç hafta süreyle idrarda saptanabilir veya tedavi edilen bir HSV ensefalitinde beyin omurilik sıvısından virus DNA'sının kaybolması 2 haftadan uzun zaman alabilir.

KAYNAKLAR

1. Cook RL, Hutchison SL, Ostergaard L, Braithwaite S, Ness RB: Systematic review: noninvasive testing for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Ann Intern Med 2005;142: 9145-25.
2. DeBiasi RL, Tyler KT: Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. Clin Microbiol Rev 2004; 903-25.
3. Forum A, Olcen P, Skurnik M: Diagnostic clinical bacteriology-recent developments in the application of molecular biology tools. APMIS 2004; 112: 709-12
4. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS (eds): Molecular methods for microbial identification and characterization, pp: 169-88. In: Bailey's and Scott's Diagnostic Microbiology. 2002, 11th ed. Mosby Co, St Louis.
5. Nolte FS, Cliendo AM: Molecular detection and identification of microorganisms, pp: 234-56. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2003, 8th ed. ASM Press, Washington DC.

RUTİN MOLEKÜLER TANI : Laboratuvar Yaklaşımı**Doç. Dr. Ahmet Pınar**

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Sıhhiye, Ankara

İnsan beyni geçmişte çekilen zorlukları unutmak eğilimindedir. Mikrobiyoloji biliminin günümüzdeki durumuna gelebilmesi için geçen süreçlerde bazen şans, bazen beyin gücü ve disiplinli çalışma rol oynamıştır. 1800'lerin sonlarında, Louise Pasteur ve Robert Koch, hastalıkların gözle görülemeyen mikroorganizmalar tarafından oluşturulabileceğini ilk kez ileri sürmüşlerdir. O günlerden bu yana Mikrobiyoloji biliminde oldukça fazla sayıda gelişme yaşanmış ve günümüzde moleküler yöntemler hem bilimsel araştırmalar, hem de tanısal alanda çok yaygın kullanılır olmuştur. Öncelikle temel bilimsel araştırmalarda kullanılan moleküler yöntemler sayesinde mikroorganizmaların yapısı, özellikleri, patojenite faktörleri ve epidemiyolojileri hakkında bilgi birikimi sağlanmış, bu bilgilerin tanısal alanda kullanımına imkan sağlanmıştır.

Moleküler yöntemlerin tanısal mikrobiyolojide kullanımının üç ana amacı vardır:

1. Sonucun hızlı alınması
2. Konvansiyonel yöntemlerle saptanamayan mikroorganizmaların saptanabilmesi
3. Test duyarlılığının yüksek olması

Moleküler mikrobiyolojik tanı ve araştırma yöntemleri DNA, RNA, proteinler, lipidler ve polisakkaritler gibi çok çeşitli moleküllerle ilgilenmektedir. Nükleik asitler dışındaki moleküllerin daha çok araştırma amacıyla kullanılması ve proteinlerin daha çok serolojik ve tiplendirme tekniklerinde kullanılması nedeniyle konumuz daha çok nükleik asit temelli yöntemlerle ilgilidir. Nükleik asit temelli yöntemler arasında tanı amacıyla en sık ve yoğunlukla nükleik asit amplifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Dolayısıyla günümüzde rutin moleküler tanı kavramı, çoğunlukla nükleik asit amplifikasyon yöntemlerini içermektedir.

Rutin moleküler tanıda ilk aşama olan klinik örneklerin toplanması ve laboratuvara ulaştırılması, klinisyen ile laboratuvar yönetiminin sıkı işbirliğini gerektirmektedir. Bu aşamada; yanlış örnek seçimleri, geç transport, uygun olmayan ortamda transport ve uygun olmayan ortamda saklama gibi problemlerle sıklıkla karşılaşmaktadır.

İkinci aşama nükleik asitlerin ortama çıkartılması (ekstraksiyon) ve saflaştırılmasıdır. Birbirini takip eden bu iki aşama, birbiriyle oldukça bağlı ve nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinde duyarlılığı etkileyen en önemli aşamalardır. Tanısı istenen mikroorganizmaya bağlı olarak seçilen klinik örnek, laboratuvarda farklı yöntemlerle ekstraksiyon ve saflaştırma yapılmasını gerektirir. Örneğin, alınan kan örneğinde CMV araştırılacaksa, plazma fraksiyonunun kullanımı duyarlılığı artırır, ancak EBV araştırılacaksa, tam kanın ekstraksiyona alınması daha doğru bir yaklaşım olacaktır. İnhibitör etki nedeniyle heparinli kanın kullanılmaması ve kan örneklerinde inhibitör olan hem, EDTA, IgG, çeşitli plazma proteinleri ve iyonları uzaklaştıracak uygun yöntemlerin kullanılması, uygulanacak olan nükleik asit amplifikasyon yönteminin duyarlılığını artıracaktır. BOS, sinovyal sıvı ve amniyotik sıvılar göreceli olarak nükleik asit ekstraksiyonunun kolay yapıldığı örneklerdir. Doku örnekleri, ekstraksiyona alınmadan önce mekanik ve/veya enzimatik olarak parçalanmalıdır. Parafin bloklar, nükleik asit

yapısı kısmen bozulduğundan iyi birer örnek değildirler. Solunum sistemi örneklerinde ve özellikle balgam örneklerinde başlıca sorun viskozitedir. Bu nedenle pipetlemelerin doğru yapılması, balgam örneğinin ekstraksiyon işlemi öncesi fiziksel ve kimyasal yollarla sıvılaştırılması gereklidir. Moleküler tanı için en sorunlu örnek türü gaytadır. İnhibitörler ve nükleik asitler yönünden çok zengin olduğundan özel bazı ekstraksiyon ve saflaştırma yöntemlerine gereksinim duyulabilir. Plastik ya da telden yapılmış ve ucu dakron ya da rayon olan eküvyonlarla alınan sürüntü örnekleri, ekstraksiyon ve saflaştırma için en sorunsuz örneklerdir. Doğru alınan bir klinik örnek ile nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinin duyarlılığı oldukça yüksektir.

Ekstraksiyon aşaması, fiziksel ve/veya kimyasal yollarla gerçekleştirilebilmektedir. Ortama çıkartılan nükleik asitler ise fenol/kloroform gibi konvansiyonel yöntemlerin yanında günümüzde daha çok kullanılan manuel ya da otomatize sistemlerle saflaştırılabilmektedir. Otomatize kitler başlıca üç ana sistemle çalışmaktadır; a) Nükleik asitlerin kimyasal yöntemlerle çöktürülerek saflaştırıldığı kitler, b) Nükleik asitlerin santrifüjle bir membrana bağlanarak saflaştırıldığı kitler, c) Nükleik asitlerin silika ya da manyetik boncuklara bağlanarak saflaştırıldığı yöntemler. Günümüzde rutin moleküler tanı laboratuvarlarında, daha hızlı sonuç alınması, standardize edilebilmesi ve dış kontaminasyona daha kapalı olması gibi nedenlerden dolayı manuel ve otomatize kitler tercih edilmektedir. Hangi kit sisteminin kullanılacağı, laboratuvarda uygulanacak her tanısal parametre için ayrı ayrı saptanmalıdır.

Rutin moleküler tanı laboratuvarlarında ekstraksiyon ve saflaştırmadan sonra nükleik asit amplifikasyonu ve ürünlerin görüntülenmesi aşaması uygulanmaktadır. Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri üç grupta toplanabilir; 1- Hedef amplifikasyonu (PCR, SDA, TMA) 2- Prob amplifikasyonu (LCR), 3- Sinyal amplifikasyonu (bDNA, hybrid capture). Günümüzde her gruptan yöntemler kullanılabilir de son yıllarda nükleik asit amplifikasyon yöntemleri PCR temelli olma eğilimindedir. PCR yöntemi konvansiyonel olarak laboratuvarda tasarlanıp elektroforezle görüntülenebildiği gibi, özellikle ürün görüntülenmesi kolaylığı ve duyarlı kantitasyon sağlaması nedeniyle real-time PCR şeklinde de uygulanabilir. Kullanımı oldukça kolaylaştırılmış ve otomatize hale getirilmiş bu yöntemlerle, yüksek duyarlılık ve özgüllükte, 30-40 dakika gibi kısa sürede kantitasyon yapılabilen tanısal yaklaşımlar olası kılınmıştır.

Rutin moleküler tanının son aşaması yorumdur. Test sonuçları yorumlanırken hangi ekstraksiyon ve saflaştırma sistemlerinin kullanıldığı, hangi amplifikasyon yöntemlerinin hangi cihazlarda uygulandığı, yöntemin standardizasyonu gibi laboratuvar verileri yanında, hangi klinik örneğin kullanıldığı, saptanan mikroorganizmanın enfeksiyon etkeni olup olmadığı ve örnekteki enfeksiyon etkeninin canlılık durumu gibi klinik yaklaşımlara da gereksinim vardır.

Genel olarak rutin moleküler tanıda, laboratuvarda karşılaşılan sorunlar iki ana başlık altında özetlenebilir:

- 1- Yalancı negatif sonuçlar.
- 2- Yalancı pozitif sonuçlar.

Yalancı negatif sonuçların nedenleri arasında; klinik örnekte nükleik asit bulunmaması (yanlış klinik örnek seçimi, geç transport, uygun olmayan ortamda transport ve uygun olmayan ortamda saklama), klinik örnekte PCR inhibitörlerinin bulunması (doğal ya da kontaminasyon yoluyla) ve yeterince uzaklaştırılamaması, kullanılan protokolün yeterince iyi çalışmaması (duyarlılığın düşük olması), cihaz, kit, teknisyen kaynaklı sorunlar ve cihaz sonuçlarının laboratuvarda yanlış yorumlanması sayılabilir. Yalancı pozitif sonuçlar arasında ise; nükleik asit ya da amplikon kontaminasyonları, kullanılan

protokolün iyi çalışmaması (özgüllüğün düşük olması), cihaz, kit, teknisyen kaynaklı sorunlar ve yine laboratuvarda sonuçların yanlış yorumlanması sayılabilir. Bu sorunların tamamen ortadan kaldırılması mümkün olmasa bile en aza indirilmesi ve belki de en önemlisi hata yapıyorsa farkına varılması için çeşitli önlemlerin alınması gereklidir. Bu önlemler şöyle özetlenebilir:

1. Klinik örneklerin uygun bölgeden, doğru şekilde alınması ve uygun koşullarda, gecikmeden çalışılabilmesi için klinisyen, teknisyen, laboratuvar uzmanı ve bu konuda görev alan diğer personel arasında eşgüdüm sağlanması, aşamaların sıkı protokollerle kesinleştirilmesi.
2. Kontaminasyon, moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında en sık karşılaşılan sorundur. Kontaminasyon, örnekten örneğe ya da örnek toplanması, ekstraksiyonu ve pipetlemeler sırasında dışarıdan nükleik asit bulaşması şeklinde olabileceği gibi havadan, pipetlerle ve tüp kırılması gibi istenmeyen nedenlerle amplikon bulaşması şeklinde gerçekleşebilir. Kontaminasyonu en aza indirmek için şu önlemler alınmalıdır:
 - a. İşlemlerin fiziksel olarak ayrı bölgelerde uygulanması (Reaktif hazırlama bölgesi, klinik örnek hazırlama ve ekstraksiyon bölgesi, amplifikasyon bölgesi ve analiz bölgesi).
 - b. Her bölgede kullanılan malzemelerin o bölge dışına çıkartılmaması.
 - c. Pipetlerde filtreli uç kullanılması, kullanılırken püskürtmeden kaçınılması.
 - d. Çalışmalarda mutlaka pudrasız eldiven kullanılması (inhibitör) ve her aşamadan sonra eldiven değiştirilmesi.
 - e. Çalışılan bölgenin çalışma öncesi ve sonrası %10'luk çamaşır suyu ile temizlenmesi (nükleik asitler için en iyi dekontaminasyon ajanıdır).
 - f. Çalışılan cihazların sık aralıklarla dekontamine edilmesi.
 - g. Klinik örnek ve kullanılan reaktiflerin ayrı buzdolaplarında tutulması.
 - h. Amplifiye edilmiş örneklerin kesinlikle saklanmaması.
 - i. Amplikon kontaminasyonunun sonuçları etkilemesinin önüne geçilebilmesi için UNG gibi sistemlerin kullanılması.
3. Sonuçların güvenilirliğinin denetlenebilmesi için kalite kontrol önlemlerinin alınması gereklidir. Bu önlemler şu şekilde özetlenebilir:
 - a. Primer ve probler tercihen HPLC saflığında ve sertifikalı olmalıdır. Sertifikalı kitler tercih edilmelidir.
 - b. Kullanılan cihazların kalibrasyonları 6 ayda bir kontrol edilmelidir.
 - c. Her yeni lot kit pozitif ve negatif kontrollerle eski lot ile karşılaştırılmalıdır.
 - d. Her yeni lot pozitif kontrol 5 kez çalışılarak kontrol edilmelidir.
 - e. Test kontrolleri:
 - i. Pozitif kontrol (Saf hedef nükleik asit ya da negatif klinik örneğe karıştırılmış nükleik asit)
 - ii. Negatif kontrol (İçinde hedef nükleik asit bulunmayan klinik örnek)
 - iii. Kör (blank) kontrol (su ya da tampon)

- f. İnternal/inhibitör kontrolleri (Aynı şartlarda amplifikasyona uğrayan fakat hedef diziyi içermeyen nükleik asit) (İnhibitör saptandığında ekstrakte edilmiş örneğin 1/10 sulandırımı ile yeniden çalışılması duyarlılığı düşürmekle birlikte uygulanabilecek en doğru yaklaşımdır)
4. Laboratuvar da her yeni parametre için validasyon çalışması yapılmalıdır. Validasyonda saptanacak ölçütler şunlardır:
 - a. Doğruluk (accuracy): 50 pozitif ve 100 negatif örnek referans yöntemle en az %90 uyumlu olmalı.
 - b. Kesinlik (precision): 1 pozitif örnek 20 gün boyunca ya da 2 pozitif örnek 10 gün boyunca pozitif bulunmalı.
 - c. Analitik duyarlılık: Düşük titrede pozitif 20 örnek pozitif bulunmalı.
 - d. Analitik özgüllük: Yalancı pozitif sonuç verebilecek tüm etkenler denenmeli.
 - e. Raporlama aralığı: Lineer aralıkta belirlenen konsantrasyonlar saptanmalı.
 5. Laboratuvar personeli ve klinik-laboratuvar eşgüdümü için klinisyen ve laboratuvar çalışanlarının birlikte katılacağı eğitim programları düzenlenmelidir.

Anlaşılabacağı gibi rutin moleküler tanı yöntemlerinin doğru kullanılması için gerekli üç ana dayanak bulunmaktadır; altyapı, bilgi, ekip. Eğer laboratuvar altyapınızı uygun ve yeterli düzeyde sağlarsanız, moleküler yöntemler konusunda yeterli bilgi birikiminiz varsa ve bu yöntemleri uygulayabilecek ve doğruluğunu kontrol edebilecek yetenekte ve eğitilmiş bir ekibiniz varsa rutin moleküler tanı da doğru sonuç verebilirsiniz. Şu unutulmamalıdır ki, laboratuvarların ve kliniklerin asıl amacı birbirlerine yardım değil hastaya yardımdır. Hastaya yararlı olma olanağı ise klinik ve laboratuvar ekiplerinin eşgüdümü ile yakalanabilir.

KAYNAKLAR

1. Persing DH, Hayden RT, Wittwer CT, et al: Nucleic acid amplification methods, pp: 39-132. In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang Y, Unger ER, Relman DA, White TJ (eds), Molecular Microbiology, Diagnostic Principles and Practice. 2004. ASM Press, Washington DC.
2. Versalovic J, Unger ER, DuBois DB, Brown JT: Laboratory standardization, proficiency-testing programs, quality-control standards and monitoring, pp: 691-703. In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang Y, Unger ER, Relman DA, White TJ (eds), Molecular Microbiology, Diagnostic Principles and Practice. 2004. ASM Press, Washington DC.
3. Cockerill FR: Rapid Cycle, Real-time PCR for the Clinical Microbiological Laboratory. Workshop 03 and 04 Notes. American Society for Microbiology 105th General Meeting, 2005, Atlanta, Georgia.
4. Edwards KJ: Performing real-time PCR, pp: 71-84. In: Edwards K, Logan J, Saunders N (eds), Real-Time PCR, An Essential Guide. 2004. Horizon Bioscience, Norfolk, UK.

5. Lee MA, Leslie DL, Squirrell DJ: Internal and external controls for reagent validation, pp: 85-102. In: Edwards K, Logan J, Saunders N (eds), Real-Time PCR, An Essential Guide. 2004. Horizon Bioscience, Norfolk, UK.
6. Sambrook J, Russell DW, Irwin N, Janssen KA: In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction, pp: 8.18- 8.113. In: Sambrook J, Russell DW (eds), Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 3rd ed, 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
7. Sambrook J, Russell DW, Irwin N, Janssen KA: Working with synthetic oligonucleotide probes, pp: 10.11-10.48. In: Sambrook J, Russell DW (eds), Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 3rd ed, 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

GENOTYPIC DETECTION OF RESISTANCE TO ANTIMICROBIALS: WHERE ARE WE?

Roland Leclercq

CHU de Caen, 14033 Caen, France

Increasing spread of multiple antibiotic resistance in bacteria has led to therapeutic difficulties. The necessity to adapt therapy in serious infections has prompted microbiologists to achieve early identification of the bacteria causing the infection and of the antimicrobial resistance traits expressed by the microorganism. In addition, certain resistances to antibiotics are difficult to detect by routine susceptibility tests. Also, shortening the delay in the report of epidemic resistances allows early implementation of infection control measures. Therefore, taking opportunity of the development of molecular biology techniques, research efforts have been dedicated to the development of rapid, sensitive and specific techniques based on identification of nucleotidic sequences of resistance determinants. Although several methods are still in development, some are commercially available or can be easily introduced in clinical microbiology laboratories equipped for basic molecular biology.

Phenotypic versus genotypic detection of antimicrobial resistance

Phenotypic detection requires pure culture, allows to classify the isolate as susceptible, intermediate or resistant to the antimicrobial, to determine the level of resistance, to detect previously unknown types of resistance, uses low cost techniques and does not require complex equipment. However, it requires 18-24 h before reporting, or more for slowly growing bacteria, and some resistances may be misidentified when expressed at a low level in standard culture conditions.

Genotypic detection does not require culture and allows a rapid answer (less than 2 hours). However, the genotypic techniques are aimed at detection of resistance instead of susceptibility and, generally, the level of expression of the gene is not known. In addition, only known resistance genes can be detected. False negative results can be observed due to genetic variability and false positive results are observed in case of silent genes or, for PCR, of contamination. Finally, these techniques remain costly.

As a consequence, genotypic techniques do not replace phenotypic techniques but complement them. In particular, they are required to confirm a resistance suspected by a routine test, to rapidly identify multiple resistant bacteria, to detect resistance genes (or mutations) in fastidious bacteria (mycobacteria), for epidemiological studies and to characterize the genetic support of resistances.

Genotypic techniques and applications

A variety of genotypic techniques have been developed that include nucleotidic probes, DNA/DNA hybridization, PCR, real-time PCR, sequencing, pyrosequencing, dHPLC, RT-PCR (which allows quantification of expression) and microarrays. The most widely used are PCR and now RT-PCR.

Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA):

Resistance to methicillin correlates with acquisition of the *mecA* gene encoding a PBP2a with low affinity for beta-lactams. Due to frequent heterogeneous expression, detection of resistance to methicillin is challenging. Phenotypic detection of this resistance has

recently been improved by the disc diffusion test of ceftioxin which nicely correlates with the presence of the *mecA* gene. In addition, commercial latex kits have been developed for detection of PLP2a in *S.aureus*. However, detection of *mecA* still remains a gold standard. Several techniques have been proposed which combine identification of *S.aureus* with detection of *mecA* by PCR (LightCycler MRSA Detection Kit®) or hybridization (Evigene MRSA®, Genotype®MRSA)¹. These techniques require pure culture of staphylococci but some can also be used with positive blood cultures. Other techniques, such as IDI-MRSA® allow identification of MRSA from nasal swabs taken for epidemiological purposes with 100% sensitivity and 96.5% specificity²⁻⁴.

Enterococci resistant to glycopeptides:

Seven *Van* operons have been reported as responsible for glycopeptide resistance in enterococci. Slowly inducible expression of resistance may lead to its misidentification by routine techniques. Genotypic techniques are based on the detection of the gene encoding the ligase in the operon, the *van* gene (*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2*, *vanD*, *vanE* and *vanG*). A home-made multiplex PCR has been proposed for identification of four enterococcal species and nine glycopeptide resistance genes⁵. The same four species and four *van* genes (*vanA*, *vanB*, *vanC1*, and *vanC2*) can also be identified by a commercial hybridization kit, genotype® Enterococcus⁶. *vanA* and *vanB* genes can be amplified from feces samples by RT-PCR (LightCycler® Roche) with high specificity and sensitivity⁷.

Other resistances:

Resistance to aminoglycosides, macrolides and beta-lactams can also be identified by genotypic techniques. However, the multiplicity of the genes involved in these resistances are limitations for PCR techniques. Probably, development of microarrays that include several hundreds of probes will be helpful.

Resistance in fastidious microorganisms:

Resistance to clarithromycin or fluoroquinolones in *Helicobacter pylori* is a particular example where PCR detection can be easily used either from bacterial colonies or from biopsy samples⁸. This is related to unique mechanisms of resistance due to mutations in a small region of the *rrl* (encoding 23S ribosomal RNA gene) or *gyrA* (encoding the bacterial gyrase) genes, respectively. Another useful application is detection of resistance to rifampin in *Mycobacterium tuberculosis* which is due to mutations in the *rpoB* gene. Commercially available kits are now available for detection of this resistance. Since resistance to rifampin is frequently associated with resistance to isoniazid, detection of mutational resistance to rifampin predicts for multiple antibiotic resistance in *M.tuberculosis*.

In conclusion, several techniques have been developed for detection of antimicrobial resistance genes that are commercially available with excellent specificity and sensitivity. Some can be used directly from clinical samples. Their cost remain high and their interest should be balanced with the benefits expected in the situations where they are intended to be used. Development of microarrays used both for bacterial identification and detection of antimicrobial resistance are in progress.

REFERENCES

1. Levi K, Towner KJ: Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in blood with the EVIGENE MRSA detection kit. J Clin Microbiol 2003; 41: 3890-2.
2. Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, et al: New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. J Clin Microbiol 2004; 42: 1875-84.
3. Huletsky A, Lebel P, Picard FJ, et al: Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in less than 1 hour during a hospital surveillance program. Clin Infect Dis 2005; 40: 976-81.
4. Warren DK, Liao RS, Merz LR, et al: Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swab specimens by a real-time PCR assay. J Clin Microbiol 2004; 42: 5578-81.
5. Depardieu F, Perichon B, Courvalin P: Detection of the *van* alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. J Clin Microbiol 2004; 42: 5857-60.
6. Eigner U, Fahr A, Weizenegger M, Witte W: Evaluation of a new molecular system for simultaneous identification of four *Enterococcus* species and their glycopeptide resistance genotypes. J Clin Microbiol 2005; 43: 2920-2.
7. Sloan LM, Uhl JR, Vetter EA, et al: Comparison of the Roche LightCycler *vanA/vanB* detection assay and culture for detection of vancomycin-resistant enterococci from perianal swabs. J Clin Microbiol 2004; 42: 2636-43.
8. Lascols C, Lamarque D, Costa JM, et al: Fast and accurate quantitative detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mutations in *H. pylori* isolates from gastric biopsy specimens by real-time PCR. J Clin Microbiol 2003; 41: 4573-7.

BAKTERİ TANIMLANMASINDA 16S rRNA SEKANS ANALİZİ**Y.Doç.Dr.Bülent Bozdoğan**

*Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,
Aydın*

Bilimde ve teknolojiadaki ilerlemeler dünyada yeni canlı türlerinin keşfine ve bu canlıların sınıflandırılmasında kullanılacak yeni metotların bulunmasına olanak sağlamaktadır. Yirminci yüzyılın başında canlıların %100'ünün tanımlandığı ve sınıflandırıldığı düşünülürken, 20. yüzyılın ikinci yarısında bu oranın %80 olduğu varsayılmıştır. Moleküler yöntemlerin kullanıldığı günümüzde ise, çoğu prokaryot olmak üzere 13-14 milyondan fazla canlının var olduğu düşünülen dünyamızda bilimsel olarak bunların yalnızca yaklaşık %10-12'si (1.75 milyon canlı) tanımlanabilmiştir.

Bakterilerin tanımlanmasında kullanılan araçlardan birisi ve belki de şu anda kullanılan metotlar arasında en önemlisi 16S rRNA sekanslamasıdır. Prokaryotlar arasında kromozomda çok iyi korunan bölgelerden birisi de 16S rRNA genidir. 16S rRNA, ribozomun yapısını oluşturan parçalardan biridir. Ribozomlar yapısal olarak RNA yumağına yapışan proteinlerden oluşur. İki alt ünitesinden küçük alt ünite, 30S, 16S rRNA ve 21 proteinden, 50S alt ünitesi ise iki rRNA, 23S ve 5S ile onlara bağlanan 34 proteinden oluşur. 16S rRNA'nın 3' sonunda mRNA'ların ribozoma bağlanmasını sağlayan bölge olan "ribozom binding site" (RBS)'in eşleştiği bölge yer alır.

Filogenik analizler için 16S rRNA sekansının kullanılmasına Woese ve arkadaşlarının çalışmaları olanak sağlamıştır¹. 16S rRNA geni yaklaşık 1550 baz çiftinden oluşmaktadır. Genelde çok iyi korunmuş olmasına rağmen değişken bölgeler de mevcuttur. Filogenetik analizler için bu genin sekanslanması giderek daha yaygın olarak kullanılmaya başlanmış ve taksonominin en önemli araçlarından biri haline gelmiştir. Türler arası ayırımı istatistiksel olarak sağlamak amacıyla ya genin bütünü ya da 500 bazlık bir bölümü sekanslanır. Bu iki fragman analizi çoğunlukla benzer sonuçlar vermektedir.

Bakterilerin Sınıflandırılması

Bakterileri sınıflandırmak için kullanılan klasik yöntemler, bakterilerin koloni tiplerine, boyanma şekillerine, büyüme ve biyokimyasal özelliklerine, besin ihtiyaçlarına göre bakterileri gruplara ayırmıştır. Tüm bu özelliklerin değerlendirilebilmesi için bakterilerin kültürlerinin yapılması gerekmektedir. Oysa bakterilerin yalnızca %1'i kültür ortamlarında üretilmektedir².

Woese, 16S rRNA sekans analizi yöntemi ile prokaryotları sınıflandırmış ve evrimleşme haritalarını çıkartmıştır. Sekans analizi yöntemiyle yapılan sınıflandırmalar klasik sınıflandırmadan farklı olarak bakterilerin birbirleriyle olan evrim ilişkilerini ortaya koyabilmiştir.

Sekanslama yöntemiyle bakterin tanımlanması

Üniversal primerler, yani tüm bakterilerden 16S rRNA çoğaltabilen primerler yardımıyla PCR yöntemi kullanılarak 16S rRNA geni çoğaltılır. Amplifikasyonlar için en yaygın

kullanılan primerlerin sekansları şöyledir³; 8F 5' AGT TGA TCC TGG CTC AG 3' ve 1492R 5'ACC TTG TTA CGA CTT3'. Kültür örneklerinden veya steril bölgelerden alınan örneklerden PCR yapıldığında tek bir bakteriye ait gen çoğaltılır ve sekans analizi tek bakteri tanımlar. Kültür yapılmadan doku, gaita, su, toprak gibi değişik örneklerden doğrudan DNA izolasyonunu takiben PCR yoluyla 16S rRNA çoğaltılabilir. Ancak bu durumda birden fazla bakteriden 16S rRNA çoğaltılacağı için en iyi yol çoğaltılan fragmanları klonlamak ve ardından kolonileri sekanslamaktır⁴. Hem çevreden izole edilen örneklerde hem de klinik örneklerde klonlamanın ardından sekanslamanın yapılması, son zamanlarda gelişmekte olan bir yöntemdir.

Klinik örneklerde sekanslama yoluyla bakteri tanımlanması

Kültürü yapılamayan veya zor yapılan bakterilerin tanısında 16S rRNA sekanslama yöntemiyle tanı koymak mümkündür. Örneğin kültür yoluyla *C.trachomatis* tanısında özgüllük %100 olmasına karşın duyarlılık %70-90 arasında kalmaktadır. DNA çoğaltma yoluyla özgüllük ve duyarlılık çok yüksek düzeydedir (sırasıyla, %90-100 ve %97-100)⁵.

Tristan ve arkadaşları 8 vakalık araştırmaları sonucunda, yalnız kültürün zor olduğu durumlarda değil, aynı zamanda kültürün yapılabildiği durumlarda da 16S rRNA sekansı yöntemiyle kültürden farklı ve doğru tanıya ulaşılabilceğini göstermiştir⁶. Hastadan alınmış doku ve biyopsi örnekleri, apse, kan, püvy ve kateter gibi mikrobiyoloji laboratuvarına gelen her örnekten, hazır kitler kullanılarak veya klasik yöntemlerle DNA ekstraksiyonu yapmak mümkündür. DNA izole edilip edilmediğinin kontrolü için insan beta globülin geninin PCR yoluyla amplifikasyonu yaygın olarak kullanılır. Doku eklenmeden DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmesiyle elde edilen örnek ise negatif kontrol olarak kullanılır⁶.

Sekans sonuçlarının analizi

İki yönde sekanslanmış en az 500 bazlık sekans sonucu 'National Center for Biotechnology Information' (NCBI) web sayfasındaki BLAST programı kullanılarak (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) gen bankası veri tabanı ile karşılaştırılabilir. Mart 2006 tarihi itibarıyla, gen bankası veri tabanında çeşitli bakterilerden toplam 233.494 adet 16S rRNA sekansı kayıtlıdır. Karşılaştırmak için "nucleotide-nucleotide blast" (blastn) programı seçilmelidir. Eğer elde edilen sekansın veri tabanındaki sekanslarla homolojisi %99.5'den büyükse, o türün bir varyantı olarak kabul edilir. Eğer en yüksek homoloji %97 ile %99.5 arasında ise, bakterinin izole edildiği yerin orijinalliği ve oluşturduğu semptomların farklılığı ile değerlendirilir. Eğer orijinallik ve farklılık yoksa varyant olarak kabul edilir. Farklı ise homoloji %97'den azmış gibi değerlendirilir. Homoloji %97'den az ise fenotipik ve moleküler analizlerin hepsi yapılır; 23S rRNA, ITS, *rpob*, *groEL*, *recA* ve *gyrB* genleri sekanslanır. Elde edilen tüm bilgiler değerlendirildikten sonra sekans gen bankasına sunulur ve bakteri yeni tür olarak ve isim verilerek bir dergide yayınlanır³. Gen bankasına sekans <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/> adresinden kayıt için sunulabilir. İnternet aracılığıyla BankIt programı kullanılarak gen bankasına veri girilmesinin ardından, gen bankası girilen sekans için "accession number" (ulaşma numarası) gönderir ve bu numara yayında kullanılır. Gen bankası dışında, Japonya'dan DDBJ (DNA DataBank of Japan) ve Avrupa'dan EMBL (the European Molecular Biology Laboratory) olmak üzere iki sekans veri tabanı daha kullanılmaktadır.

Sonuç

Son yıllarda sekans analizi kolaylaşmış, yaygınlaşmış ve bu teknik eskisine oranla daha ucuz hale gelmiştir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında kültür veya direk olarak çeşitli dokulardan alınan örneklerden, 16S rRNA sekanslama yöntemiyle, enfeksiyon etkeninin gün içinde tanımlanması mümkün olmuştur⁷. Özellikle kültürü zor bakterilerin tanımlanması için, kısa sürede ve doğru sonuç vermesi açısından tercih edilebilir. Yöntemin olumsuz tarafları arasında; henüz klasik yöntemle oranla pahalı olması, uzmanlaşma ve laboratuvarda sekansör cihazının bulunma gerekliliği sayılabilir. Ayrıca antibiyotik duyarlılığının şimdilik yalnızca kültürle belirlenebiliyor olması, gelecek için 16S rRNA sekans analizine, klasik yöntemlerin yerini alan değil onlara yardımcı ve tamamlayıcı bir rol vermektedir.

KAYNAKLAR

1. Woese CR: Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 1987; 51: 221-71.
2. Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR: Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 1998; 180: 4765-74.
3. Drancourt M, Raoult D: Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4311-5.
4. Fredricks DN, Relman DA: Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanetholesulfonate. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2810-6.
5. Poxton IR: Molecular techniques in the diagnosis and management of infectious diseases: do they have a role in bacteriology? *Med Princ Pract* 2005; 14 (Suppl 1): 20-6.
6. Tristan A, Meyronet D, Benito Y, Celard M, Vandenesch F: Role of universal PCR 16S in diagnostic problems. *Antibiotiques* 2004; 6: 257-61.
7. Suau A, Bonnet R, Stutren M, et al: Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4799-807.

MİKROBİYOLOJİDE PROTEOMİKSLERİN YERİ

Prof.Dr.A.Mithat Bozdayı

Ankara Üniversitesi, Hepatoloji Enstitüsü, Ankara Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Ankara

Proteomiks, geleneksel olarak bir hücrenin veya bir organizmanın içerdiği protein takımı olarak tanımlanmaktadır. Proteomiks, özellikle postgenomik dönemde protein sentezinin ve gen ekspresyonunun araştırılmasında bir anahtar teknoloji olarak karşımıza çıkmaktadır. Protein ayırıştırma yöntemlerindeki teknik gelişmeler, hücre proteomunun önemli bir bölümünün eş zamanlı analizine imkan sağlamaktadır. Protein tanımlamada kullanılan gelişmiş proteomiks teknikleri (yüksek çözünürlükte iki boyutlu elektroforez ve protein karakterizasyonu), proteom ve genom arasında güvenilir bir bağ kurarak hücre metabolizmasının geniş çapta anlaşılmasını sağlar. Teknolojik ilerlemeler biyomedikal alanda olduğu gibi, medikal anlamda önemi olan mikrobiyal patojenlerin çalışılmasında da proteomik uygulamaların yaygınlaşmasını sağlamıştır. Mikrobiyal proteomiks uygulamalarındaki hızlı gelişmeler çok sayıda bakteriyel grubun tüm genom dizisinin ortaya çıkarılmasıyla başarılmıştır. Binin üzerinde prokaryotik ve ökaryotik genom dizisinin tamamlanması ve yüzlerce sekanslama projesine başlanmış olması¹, bilim adamlarını bilinen binlerce gen ürününün fonksiyonunun saptanması gibi zorlu bir görev ile yüz yüze getirmiştir. "Mikroarray" teknolojisi geniş ölçüde mRNA ekspresyonu düzeyine ilişkin oldukça önemli bilgi veren gelişmiş bir teknoloji olmasına rağmen, birçok durumda mRNA transkriptlerinin protein ekspresyonuyla direk ilişkili olmadığı bilinmektedir. Bu nedenle, proteomiks çalışmaları tamamlayıcı olan genomik çalışmalara hem kantitatif hem de fonksiyonel veriler sağlar.

Protein analizinde ekonomik olarak en etkin ve kolay yol, iki boyutlu jel elektroforezinin kütle spektrometrisi temelli sekanslama metodudur (2DE-MS). 2DE-MS, yaygın olarak patojenik bakterilerin proteomlarının karakterizasyonu ve karşılaştırılmasında ve son zamanlarda daha fazla parazitin genom dizisine ulaşılmasıyla parazitoloji alanında uygulanmaktadır²⁻⁴. Proteinlerin iki boyutlu-jel tabanlı elektroforetik ayrılması yönteminde ilk boyut, proteinlerin net yüklerine göre ayrılması (izoelektrik odaklama), ikinci boyut ise moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasıdır (SDS-PAGE). Jel üzerinde 2D ayrılma sağlandıktan sonra, proteinler boyanarak jel parçaları halinde çıkarılır ve jel içinde tripsin ile parçalanması sağlanır. Sonuçta oluşan triptik peptitler jelden ekstrakte edilerek kütle spektrometrisi tabanlı sekanslama metodu ile dizisi çıkarılır ve veri tabanı araştırılarak proteinler tanımlanır. Genel olarak 2DE-MS metotları referans haritalama ve protein ekspresyon profillemeye amaçları için kullanılır⁵. Bakteriyoloji alanında geniş çapta kullanılan referans haritalamanın asıl amacı proteinlerin özdeşliğinin ve jel üzerindeki yerleşkesinin belirlenmesidir. Referans haritalama çok sayıda önemli insan patojeninde tamamlanmıştır^{4,6,7}. Bu referans haritaları daha sonra protein ekspresyon profillemeye (PEP) çalışmaları için temel oluşturmaktadır. PEP, ya farklı organizmaların proteom farklılıklarını ya da tek bir organizmanın farklı uyarıcılar altında (örn. bakteriler için antibiyotikli ortamda) gösterdiği protein ekspresyonu farklılıklarını karşılaştırır. Bu aynı zamanda proteinlerin farklı koşullar altında görülebilen "upregülasyonunu" veya "downregülasyonunu" göstermektedir. Bakterilerin evrimsel başarısı yüksek ölçüde, oksijen, besin, pH ve doğal olarak bulunan antibiyotik gibi çok sayıda çevresel strese bağlıdır⁵. Bu nedenle mikroorganizmaların farklı dış uyarılara yanıtlarındaki proteom

farklılıklarının anlaşılması, yeni ilaç tedavileri geliştirmede potansiyel hedefler gibi çeşitli düzenleyici mekanizmaları belirleyebilir. PEP dış etkilere karşı mikrobiyal yanıtın anlaşılmasına ek olarak, protozoa alemi parazitlerinin yeni ilaç hedeflerinin belirlenmesinde ve ilaç dirençlerinin mekanizmalarının anlaşılmasında önemli bilgiler vermektedir. Tüm bu avantajlarına rağmen 2D jeller, çok küçük veya büyük, membran bağlı proteinler, ekstrem hidrofobik, asidik veya bazik proteinler ve hücrede az miktarda bulunan proteinler gibi bazı grup proteinleri yeterli derecede çözmemektedir⁸⁻¹⁰. Gelişen protein boyama teknikleri ve özgül pH derecesi ayarlama gibi ilerlemelere rağmen, 2DE-MS kullanarak bir organizmadaki proteinlerin büyük bir bölümü haritalanamamaktadır. Ayrıca 2D jel metotları otomasyona kolay adapte edilemezler⁹⁻¹⁰.

Diferensiyel jel elektroforezi (DIGE), klasik protein ekspresyon profillemeye söz konusu olan bazı sınırlamalara ve eksikliklere karşı geliştirilen bir proteomik metot olmuştur¹¹. Bu teknik, 2 farklı proteomun 2 farklı floresan boya ile kovalent olarak modifiye edilip birbiriyle karıştırılarak tek jel üzerinde karşılaştırılması kolaylığını sağlamaktadır. Proteomun basitleştirilmesi için geliştirilmiş metotlardan biri olan subproteom yaklaşımında, tüm proteom yerine örneğin yalnızca membran proteinleri gibi ilgilenilen kısmın haritalanması söz konusudur. Buna ek olarak triptik peptitlerin direkt sıvı kromatografisi (LC) ile ayrıştırılması ve bununla birlikte ardarda kütle spektrometrisi (LC/MS/MS) ve MS/MS analizi ile birlikte multidimensiyonel sıvı kromatografisi (MuDPIT) uygulanmaktadır. LC tabanlı bu proteomik metodolojilerinin oldukça etkili olmalarına rağmen, gelişmiş cihaz gereksinimleri ve post-translasyonel modifikasyon veya "diferansiyel splicing" sonucu protein alt türlerinin tanımlanmasındaki eksikler nedeniyle de bazı sınırlamaları vardır. Bu sınırlamaların üstesinden gelebilmek için, "subcellular" kısımlara ayırma yöntemi ve basit tek boyutlu (1D) LC/MS/MS yöntemi birlikte kullanılarak subproteom (membran proteinleri) incelenmiştir. Anlamlı olarak bu çalışmalar, antibiyotik direncine katılan ve gelişen ilaç tedavisinde yeni potansiyel hedef oluşturan proteinleri belirlemiştir.

2DE-MS kantitatif ve kalitatif proteom analizleri için kullanılıyor olsa da, jel tabanlı metotlardan direk ve kesin kantitatif bilginin elde edilmesi genellikle zordur. Bunun üstesinden gelebilmek için kompleks bir proteomdaki proteinlerin eş zamanlı olarak kesin kantifikasyonu ve identifikasyonu için "izotop-coded affinity tagging" (ICAT) ajanları geliştirilmiştir¹². Bu ajanlar, bazı bakteriyel ve parazitik patojenlerin hem gelişimsel aşamalarındaki hem de dış uyarılara yanıtlarındaki proteom değişimlerinin kantifikasyonunda başarılı şekilde kullanılmıştır. Buna ek olarak çoğu klasik proteomik teknikleri, protein-protein veya protein-inhibitör etkileşimleri gibi faktörlerle sağlanan post-translasyonel düzenlenmelerin direk bir değerlendirmesinin yapılmasına olanak vermemektedir. Bu nedenle bu yöntemler proteinlerin fonksiyonlarının anlaşılmasında başarısızdırlar¹³.

Klasik proteomik teknikler geçen on yılda mikrobiyoloji alanında kullanışlı uygulamalar olsa da, bu metotlar proteinlerin yalnızca belirlenmesine ve miktarına ilişkin bilgiler sağlamaktadır. Klasik proteomik metotlarının bu sınırlandırmasına işaret etmek üzere, "activity-based probes" (ABP'ler) olarak bilinen sentetik küçük moleküllerin kullanımı ile enzim aktivitesinin geniş çaplı patern profili son zamanlarda saptanmıştır¹⁴. Klasik proteomik teknikler (iki boyutlu jel elektroforezi), araştırılan proteomun protein miktarı ve özdeşliği hakkında bilgi verirken, protein fonksiyonu ancak ekspresyonundaki farklılıktan anlaşılabilir. Enzim söz konusu olduğunda ise aktivitesi genellikle bir seri post-translasyonel kontrol ile düzenlenir ve bu nedenle de aktivitesi protein miktarı ile direk ilişkili olmayabilir. Enzim aktivitesinin geniş çaplı profilinin çıkarılması ihtiyacını

karşılama üzere, aktivitenin indirek olarak ortaya çıkarılmasını sağlayan küçük molekül kimyasal problemlerin kullanımı ile bir seri yeni proteomik teknik geliştirilmiştir.

Aktivite tabanlı problemlerin kullanımı, kompleks proteomun protein aktivitelerinin özgül bir takımının analizini önemli ölçüde kolaylaştırır (fonksiyonel proteomiks olarak da adlandırılır). Bu uygulamada, kompleks proteom bir ABP ile işaretlenerek proteinler 2D (veya 1D) ile ayrıştırıldığında yalnız prob takılı olan aktif enzim gözlenir ve spot yoğunluğu normal koşullar altında gözlenen spot yoğunluğu ile direk olarak kantifiye edilerek protein aktivitesindeki farklılık belirlenir. Günümüzde çok sayıda enzimi hedef alan ABP'ler geliştirilmiştir ve bunlar protein fonksiyonunun geniş ölçüde anlaşılması için çok sayıda biyolojik çalışmada uygulanmaktadır. Birçok yeni ABP ailelerinin geliştirilmesi bu problemlerin, yeni ilaç hedefleri bulma ve bu hedeflerin kimyasal inhibitörlerinin belirlenmesi gibi uygulama alanlarını da paralelinde getirmiştir.

Farmasötik sanayi yıllarca hastalıkların ve enfeksiyonların tedavisi için yeni terapötik ajanların bulunmasıyla ilgilenmiştir. Son zamanlarda, kimyasal genetik olarak adlandırılan alanda protein fonksiyonunun ayrıştırılması için kullanılabilen küçük moleküllerin keşfi için stratejiler geliştirilmiştir. Kimyasal genetik; "forward kimyasal genetik" olarak adlandırılan ve fenotipik etkiler için tarayıcı küçük molekül kütüphanelerini kullanıp daha sonra incelenen fenotipten sorumlu hedeflerin belirlenmesi stratejisini izleyen bir tekniktir. "Reverse kimyasal genetik" taramasında ise, geliştirilen strateji, belli bir protein hedefi için küçük molekül kütüphanelerin taranması ve farmakolojik çalışmalarda ilgilenilen proteinin fonksiyonel rolünün anlaşılması için seçici inhibitörlerin belirlenmesidir¹⁵. Bu kimyasal genetik stratejiler klasik genetik ve biyokimyasal tekniklerden farklı üstünlükler içermektedir. Öncelikle, "forward kimyasal genetik" stratejileri protein hedefleri bilinmeden de biyolojik süreci alt üst eden bileşiklerin belirlenmesini sağlayabilmektedir. Ayrıca küçük molekül inhibitörlerinin kullanımı, ilgilenilen genin susturulması gibi ihtiyaçları ortadan kaldırarak daha hızlı sonuçlar verebilmektedir. Ayrıca mikrobiyolojide *P.falciparum* gibi bazı organizmaların genetik olarak manipüle edilmesi oldukça zordur¹⁶ ve bazı organizmalar üzerinde gen susturma teknikleri kullanılamamaktadır. Kimyasal genetik taramaların en temel sınırlandırıcı noktası, küçük moleküllerin hedeflerinin hızlı şekilde belirlenememesidir. Ancak kimyasal genetik alanında ilerleyen gelişmeler protein fonksiyonlarının belirlenmesinde etkili araçları sağlayacaktır.

İnsanlar için önem taşıyan patojenlerin tamamlanmış sekans sayılarının artması, gen ürünlerinin belirlenmesini kolaylaştıracak yeni metotlara olan talebi de gittikçe artıracaktır. Sonuç olarak, APS'lerin geliştirilmesinde olduğu gibi, hem klasik hem de kimyasal proteomiksin teknolojik bakış açısındaki ilerlemeler, mikrobiyoloji alanında kompleks proteomların daha geniş ölçüde anlaşılmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Celestino PB, de Carvalho LR, de Freitas LM, et al: Update of microbial genome programs for bacteria and archaea. *Genet Mol Res* 2004; 3: 421-31.
2. Vandahl BB, Birkelund S, Demol H, et al: Proteome analysis of the *Chlamydia pneumoniae* elementary body. *Electrophoresis* 2001; 22: 1204-23.

3. Schmidt F, Donahoe S, Hagens K, et al: Complementary analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* proteome by two dimensional electrophoresis and isotope-coded affinity tag technology. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 24-42.
4. Drummelsmith J, Brochu V, Girard I, Messier N, Ouellette M: Proteome mapping of the protozoan parasite leishmania and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. *Mol Cell Proteomics* 2003; 2: 146-55.
5. Cordwell SJ, Nouwens AS, Walsh BJ: Comparative proteomics of bacterial pathogens. *Proteomics* 2001; 1: 461-72.
6. Cho MJ, Jeon BS, Park JW, et al: Identifying the major proteome components of *Helicobacter pylori* strain 26695. *Electrophoresis* 2002; 23: 1161-73.
7. Cohen AM, Rumpel K, Coombs GH, Wastling JM: Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomics of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 2002; 32: 39-51.
8. Corthals GL, Wasinger VC, Hochstrasser DF, Sanchez JC: The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis* 2000; 21: 1104-15.
9. Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R: Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9390-5.
10. Graves PR, Haystead TA: Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66: 39-63;
11. Kan B, Habibi H, Schmid M, et al: Proteome comparison of *Vibrio cholerae* cultured in aerobic and anaerobic conditions. *Proteomics* 2004; 4: 3061-7.
12. Tonge R, Shaw J, Middleton B, et al: Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* 2001; 1: 377-96.
13. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R: Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 994-9.
14. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R: Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 1720-30.
15. Cravatt BF, Sorensen EJ: Chemical strategies for the global analysis of protein function. *Curr Opin Chem Biol* 2000; 4: 663-8.
16. de Bruin D, Lanzer M, Ravetch JV: Characterization of yeast artificial chromosomes from *Plasmodium falciparum*: construction of a stable, representative library and cloning of telomeric DNA fragments. *Genomics* 1992; 14: 332-9.

TÜBERKÜLOZ TANISINDA MOLEKÜLER YÖNTEMLERİ KULLANILIM MI? - I**Doç. Dr. Nuran Esen***Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı, Inciraltı, İzmir*

Bilinen en eski infeksiyon hastalıklarından olan tüberküloz günümüzde de önemini korumaktadır. Yıllardır hastalığın tanısında kullanılan aside dirençli boyama (ARB) mikroskopisi ve kültür hala altın standart olarak kabul edilmektedir. Yirmidört saat içinde sonuçlandırılan ARB mikroskopisinin duyarlılığı %30-60 arasında değişirken kültürde bu oran %80'e ulaşmakta ancak 2-4 hafta sonra sonuç alınabilmektedir. Bu nedenle mikobakteriyel infeksiyonların erken tanı ve tedavilerinde güvenilir sonuçlar veren hızlı testlere gereksinim duyulmaktadır. Son yıllarda kullanımı giderek artan moleküler yöntemler; mikobakterilerin klinik örnekten tanısında, tür düzeyinde tanımlanmasında, ilaç direncinin belirlenmesinde ve epidemiyolojik araştırmalarda kullanılmaktadır.

Moleküler testlerin klinik örnekte tüberküloz varlığının saptanmasında ARB mikroskopisi ve kültür kombinasyonu ile birlikte uygulanması önerilmektedir. Birçok laboratuvar da gerçekleştirilen moleküler testlerin duyarlılık ve özgüllükleri, DNA eldesi, çoğaltma ve saptamada kullanılan yöntemler nedeniyle değişkenlik göstermektedir. Klinik örneklerde tüberkülozun saptanmasında "in-house" PCR yönteminin geçerliliği ve tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla Noordhoek ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, basil miktarı standardize edilmiş örnekler aynı hedef bölgenin kullanıldığı yedi laboratuvar da test edilmiştir. Bu çalışmada, duyarlılık ve özgüllüklerin %2-90, yalancı pozitifliklerin ise %3-77 oranında değiştiği saptanmıştır. Bu nedenlerle klinik örnekte *Mycobacterium tuberculosis* tanısının konulmasında standardize edilmiş moleküler testlere gereksinim artmıştır.

Amplicor (Roche) ve MTD (*Mycobacterium tuberculosis* direct test) (Gen-Probe) testleri, *M. tuberculosis* ile tüberküloz dışı mikobakteri ayrımının yapılabildiği merkezlerde, son bir yıl içinde tedavi almayan hastaların solunum yolu örneklerinde kültür ile birlikte yapılması koşulu ile FDA onayı almıştır. Amplicor sadece direk bakı pozitif örneklerde, MTD ise hem pozitif hem de negatif örneklerde onay almıştır. Günümüzde bu testler ve SDA (Strand Displacement Amplification), LCR (Ligase Chain Reaction) ve gerçek zamanlı PCR gibi moleküler yöntemler, gerek solunum yolu gerekse solunum yolu dışındaki klinik örneklerde tüberkülozun saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır.

ARB pozitifliği ile moleküler testlerin pozitif bulunması tüberküloz tanısını desteklerken, her iki test sonucunun negatif olması tanıdan uzaklaştırmaktadır. ARB mikroskopisi ve moleküler yöntemlerin birbirlerini desteklemesi klinik tanıyı kolaylaştırmaktadır. Sonuçların farklı olması durumunda ise, ya klinik tabloya göre tanı konulmakta ya da testin tekrarlanması gerekmektedir. Ayrıca hastanın tedaviye yanıtı ve kültür sonuçlarının da, tüberküloz tanısının desteklenmesi veya reddedilmesinde kullanımı önerilmektedir.

Geleneksel yöntemlerle tanı konulmasındaki zorluklar nedeniyle, ARB mikroskopisi negatif pulmoner tüberkülozlu hastalar, moleküler testlerden en fazla yarar görecektir grubu oluşturmaktadırlar. Aynı grupta moleküler yöntemlerin değerlendirildiği meta-analizde, duyarlılıkların %9-100 ve seçiciliklerinin %25-100 arasında değiştiği saptanmıştır. Karşılaştırmaların kör yapıldığı bildirilmeyen çalışmalarda, özellikle duyarlılıklarda abartılı yükseklik dikkati çekmektedir. Düşük gelirli ülkelerde ARB

mikroskopisi negatif pulmoner tüberküloz olgularında, klinik ve radyolojik bulguların yanı sıra özgül olmayan antibiyotik tedavisine yanıtızılığın da tanı algoritmasında yer alması önerilmektedir.

Plevral efüzyonun sık nedenlerinden olan tüberküloz plörezisinin tanısında, ARB mikroskopisi ve plevral kültürün duyarlılıkları düşüktür. Tanıda duyarlılığı artıran plevral biyopsi örnekleri ise, invaziv yöntemler gerektirir ve teknik olarak zor elde edilir. Tüberküloz plörezili hastaların tanısında nükleik asit çoğaltma yöntemlerinin araştırıldığı meta-analizde, moleküler yöntemlerin tanıyı doğrulamada yararlı olduğu, ancak dışlamada yeterli olmadığı saptanmıştır. Bu nedenle geleneksel testlerin yerine geçemeyeceği, klinik bulgular ve geleneksel test sonuçları ile birlikte yorumlanması gerektiği vurgulanmıştır.

Basil sayısının az olduğu tüberküloz menenjitli hastaların BOS örneklerinde, geleneksel yöntemlerin duyarlılıkları solunum yolu örneklerinden daha düşüktür. Özellikle acil tanı konulması ile ölüm oranlarının azaltılabildiği bu olgularda moleküler testlerden yararlanılmaktadır. Thwaites ve arkadaşlarının tüberküloz menenjitli hastalarda yaptıkları çalışmada, daha hızlı ve ucuz olan ARB mikroskopisi MDT yönteminden daha duyarlı bulunmuş, bu nedenle alternatif test gereksiniminin devam ettiği bildirilmiştir. Tüberküloz menenjitlerde moleküler testlerin tanısal doğruluğunun araştırıldığı bir meta-analizde ise ticari kitlerde duyarlılıklar %56, seçicilikler %98 bulunmuştur. Tüberküloz menenjitli hastaların yaklaşık yarısının saptanabildiği bu yöntemle elde edilen negatif sonucun, tedavinin sonlandırılması için yeterli olmadığı, kültür negatifliği ve klinik verilerle birlikte karar verilmesi önerilmektedir.

CDC, Amerikan Torasik Derneği ve Amerikan İnfeksiyon Hastalıkları Derneği tarafından ortak hazırlanan 2005 yılı "Birleşik Devletlerde Tüberküloz Kontrolü" raporunda, optimal tüberküloz kontrol hizmetleri için klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanması gereken altı test bildirilmiştir. Bunlar sırası ile; ARB mikroskopisi, kültür, tanımlama, birincil seçenek ve ikincil seçenek ilaçlar için duyarlılık testleri ve 48 saat içinde sonuçlandırılması önerilen moleküler tanı testleridir. Ancak, her çalışmaya negatif ve pozitif kontrollerin eklenmesiyle maliyeti artan moleküler testler, optimal örnek sayısı ile gerçekleştirilmekte ve genellikle bu süre aşılmaktadır.

1980'li yıllardan itibaren tüm dünyada tüberküloz olgularının artışı, ilaç direnci ile paralellik göstermiştir. Geleneksel yöntemlerle ilaç direncinin belirlenmesi, izolasyonda olduğu gibi zahmetli ve zaman alıcı olduğundan, moleküler yöntemler rutin laboratuvarlarda da kullanılmaktadır. Rifampisine dirençli mutasyonlar; genellikle RRDR (rifampisin direncini belirleyen bölge) olarak adlandırılan rpo β 'nin 81 bazçiftlik gen bölgesinde gözlenmektedir. Ayrıca rifampisin direnci genellikle izoniyazid direnci ile birlikte görüldüğünden, ticari sistemlerin çoğu rifampisin direncini aramakta, bu amaçla ters hibridizasyon yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Moleküler yöntemlerle, dirençten sorumlu mutasyonların gösterilmesi genellikle direnci kanıtlarken, sessiz mutasyonlara da rastlanabilmektedir. Mutasyonların gösterilemediği durumlarda ise, dirençten sorumlu olan başka gen bölge mutasyonları veya başka mekanizmalar olabileceği de düşünölmelidir.

Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmalarını sağlayan DNA dizi analizi, emek yoğun olması ve uygulama zorluğu nedeniyle günlük kullanımda tercih edilmese de PCR-REA gibi moleküler yöntemler geleneksel testlere göre gerek süre, gerekse işgücü açısından avantaj sağlamaktadır.

Moleküler yöntemlerin geliştirilmesiyle; tüberküloz epidemiyolojisi araştırmaları, özellikle salgınlarda kaynağın belirlenmesi, reenfeksiyon-reaktivasyon ayırımının yapılabilmesi, iyatrojenik infeksiyonların ve laboratuvar kontaminasyonlarının tanımlanması mümkün olabilmektedir. Önceleri IS6110 RFLP ve PGRS (polymorphic GC-rich sequence) RFLP yöntemleriyle yapılan araştırmalar, son yıllarda "spoligotyping" (spacer oligonucleotide typing) ve MIRU-VNTR (mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat) gibi yöntemlerin geliştirilmesi ile hız kazanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Bartfai Z, Somoskovi A, Kodmon C, et al: Molecular characterization of rifampin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA sequencing and the line probe assay. J Clin Microbiol 2001; 39: 3736-9.
2. Cheng VC, Yew WW, Yuen KY: Molecular diagnostics in tuberculosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2005; 24: 711-20.
3. Controlling Tuberculosis in the United States (Recommendations from the American Thoracic Society, CDC, and the Infectious Diseases Society of America). MMWR 2005; 54: RR12.
4. Noordhoek GT, Kolk AH, Bjune G: Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. J Clin Microbiol 1994; 32: 277-84.
5. Notice to readers: Update: Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. MMWR 2000; 49: 593-4.
6. Pai M, Flores LL, Pai N, Hubbard A, Riley LW, Colford JM Jr: Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests for tuberculous meningitis: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2003; 3: 633-43.
7. Pai M, Flores LL, Hubbard A, Riley LW, Colford JM Jr: Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculous pleuritis: a systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis 2004; 4: 6.
8. Pai S, Esen N, Pan X, Musser JM: Routine rapid *Mycobacterium* species assignment based on species-specific allelic variation in the 65-kilodalton heat shock protein (*hsp65*). Arch Pathol Lab Med 1997; 121: 859-64.
9. Ramaswamy S, Musser JM: Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. Tuber Lung Dis 1998; 79:3-29.
10. Sarmiento OL, Weigle KA, Alexander J, Weber DJ, Miller WC: Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol 2003; 41: 3233-40.
11. Scott AN, Menzies D, Tannenbaum TN, et al: Sensitivities and specificities of spoligotyping and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing methods for studying molecular epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 2005; 43: 89-94.

12. Siddiqi K, Lambert ML, Walley J: Clinical diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in low-income countries: the current evidence. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 288-96.
13. Telenti A, Marchesi F, Balz M Bally F, Bottger EC, Bodmer T: Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 175-8.
14. Thwaites GE, Caws M, Chau TT, et al: Comparison of conventional bacteriology with nucleic acid amplification (amplified mycobacterium direct test) for diagnosis of tuberculous meningitis before and after inception of antituberculosis chemotherapy. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 996-1002.
15. Woods G: Molecular methods in the detection and identification of mycobacterial infections. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 1002-5.

TÜBERKÜLOZ TANISINDA MOLEKÜLER YÖNTEMLERİ KULLANILIM MI? - II

Y.Doç.Dr.Alpaslan Alp

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

Dünya genelinde ortalamalara bakıldığında, bugün için tüberküloz insidansında yüzgüldürücü bir azalma sağlanamadığı görülmektedir. Bunun en önemli nedeni, geç tanı konması ve dolayısıyla tedaviye geç başlanmasıdır. Tedavinin başlanmasına kadar geçen süreçte yeni bulaşlar meydana gelmektedir. Tüberküloz tanısında yaygın olarak kullanılan yöntemler, aside dirençli boyama yöntemleri sonrasında mikroskopik inceleme ile basilin görülmesi ve bakterinin çeşitli sıvı veya katı besiyerlerinde üretilerek tanımlanmasıdır. Günümüzde birçok merkezde tüberküloz tanısı amacıyla mikroskopik inceleme ve kültür kombinasyonu kullanılmaktadır. Mikroskopik incelemede, aside dirençli basilin görülebilmesi için örneğin mililitresinde en az 10.000 kadar bakteri bulunması gerekmektedir. Çeşitli çalışmalarda, tüberküloz tanısında mikroskopik inceleme duyarlılığının %50'lerin altına kadar düştüğü gösterilmiştir. Kültür ile örnekteki birkaç canlı bakterinin dahi gösterilebilmesi mümkündür, ancak kolonilerin katı besiyerinde gözle görülebilir hale gelmesi 4-6 hafta kadar sürebilmektedir. Sıvı kültür sistemlerinde bu süre 7-10 güne kadar indirilebilmektedir. 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. Ancak tüberküloz tanısı amacıyla kullanılmakta olan moleküler tanı yöntemlerinin vazgeçilmez bir ihtiyaç olup olmadığı halen tartışma konusudur. Oturumun bu kısmında, tüberküloz tanısında moleküler yöntemlerin rutin olarak kullanılması fikrinin gerekçeleri tartışılacaktır.

Tüberkülozun laboratuvar tanısında altın standart olarak kabul edilen yöntem kültür yöntemidir. Kültür yöntemleri içinde günümüzde en çok kabul gören yöntem ise Bactec radyometrik kültür yöntemidir. Bu yöntemin avantajı, pozitif örneklerde konvansiyonel kültür yöntemlerine göre genellikle daha kısa sürede sonuç verebilmesidir. Ancak tüberküloz tanısının 1-2 gün gibi kısa bir sürede konabilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle güvenilir ve hızlı tanı yöntemlerine ihtiyaç vardır. Moleküler yöntemler bu ihtiyacı karşılamak için potansiyel adaylar olarak ortaya çıkmışlardır. Herhangi bir testin rutin uygulamada kullanılıp kullanılmayacağına en önemli göstergeleri, testin özgüllük ve duyarlılığıdır. Tüberküloz tanısında kullanılan moleküler yöntemlerin özgüllükleri, yapılan birçok çalışmada yüksek bulunmuştur. Duyarlılık konusunda ise, uygulanan teste göre, oldukça değişik sonuçlar elde edilebilmektedir. Farklı duyarlılık sonuçları elde edilmesinde, kullanılan PCR yönteminin yanısıra, örnek türü ve örnek içindeki basil miktarı da önemli rol oynamaktadır. Teorik açıdan bakıldığında, örnek içinde birkaç basilin bulunması durumunda bile PCR sonucunun pozitif bulunabileceği söylenmektedir. Ancak pratik uygulamada, birçok çalışmada tüberküloz PCR duyarlılığının bu kadar yüksek olmadığı gösterilmiştir. Bunun nedenleri arasında; *M. tuberculosis* DNA'sının iyi bir şekilde açığa çıkarılamaması, örneğin işlenmesi sırasında basillerin kaybedilmesi veya örnek içinde inhibitör maddeler bulunması sayılabilir.

Hazır ticari PCR kitlerinin optimizasyonu çoğunlukla solunum yolu örnekleri için yapılmakta ve bu testler özellikle bu tür örnekler için tavsiye edilmektedir. Değişik çalışmalarda, solunum yolu dışındaki örnekler kullanıldığında PCR duyarlılığının düştüğü bildirilmiştir. Bilindiği gibi "in house" PCR uygulamalarında test duyarlılığının artırılması için optimizasyon çalışmalarının yapılması mümkündür. Bir başka deyişle, test protokolü üzerinde oynamalar yapılarak farklı örnek türleri için duyarlılık artırılabilir. Ancak hazır ticari kitlerin kullanılması durumunda bu imkan ortadan kalkmaktadır. Belli sertifikalara sahip hazır ticari kitlerin kullanılma zorunluluğunun getirilmesi, standardizasyon sağlanması açısından olumlu olsa da, test protokolü üzerinde oynama imkanı vermemesi nedeniyle kısıtlayıcı olacaktır. Bugüne kadar yapılmış olan çalışmalar incelendiğinde, özellikle hazır ticari PCR kitlerinde, solunum yolu örneklerinde daha yüksek duyarlılık sonuçları elde edildiği görülmektedir. Bu durumda, tüberküloz tanısında PCR rutin olarak uygulanacaksa, bunun solunum yolu örneklerinin ağırlıklı olduğu laboratuvarlarda uygulanmasının daha uygun olacağı sonucuna varılabilir.

PCR duyarlılığını etkileyen önemli faktörlerden biri de örnek içinde bulunan basil miktarıdır. Bu konuda yapılan çalışmalarda, yayma negatif örneklerde PCR duyarlılığının düştüğü gözlenmiştir. Genel olarak bakıldığında, günümüzde rutin moleküler tanı yöntemlerinin uygulandığı enfeksiyonlar içinde (HBV, HCV, HIV, CMV, vb), PCR duyarlılığının en düşük olduğu enfeksiyon tüberkülozdur. Bunun en önemli nedenleri, tüberkülozlu hastalarda basil atılımının az olması ve amplifikasyon reaksiyonunun solunum yolu örneklerinde bolca bulunan inhibitörlere duyarlı olmasıdır. *M. tuberculosis* hücreindeki antijenik yapılar, immünokompetan konaklarda granülomatöz bir inflamasyona neden olurlar. Bunun sonucunda enfeksiyon bölgesinde epitelioid hücreler ve fibroblastların yığılımı olur. Bu bariyer nedeniyle basillerin hava yollarına veya periton, perkardium gibi vücut boşluklarına atılımı engellenir. Basil atılımı ancak granülomatöz inflamasyon çok şiddetli olduğunda, kazeöz nekroz ve erozyon sonucunda mukozal lümeneye veya hava boşluklarına doğru gerçekleşir. Hava boşluklarına geçen basiller nekrotik materyallerle birlikte mukosilyer hareketle yukarı taşınarak, genellikle öksürük yoluyla dışarı atılırlar. Bu aşama, hastadan alınacak balgam veya diğer solunum yolu örneklerinde tüberküloz basiliinin saptanabilmesi için en uygun zamandır. Basil atılımının fazla olmadığı dönemlerde, bol inhibitör varlığının da eklenmesiyle, moleküler testlerin duyarlılığında azalma olabileceği düşünülmektedir. Özellikle solunum yolu dışındaki örneklerde inhibitor madde oranı daha fazladır. Bazı çalışmalarda bu tür örneklerde Lowenstein-Jensen besiyerinde 2-3 günlük inkübasyon sonrasında PCR duyarlılığının arttığı gösterilmiştir.

Bu verilere bakılarak, rutin tüberküloz PCR uygulamasının sadece yayma pozitif örnekler için gerçekleştirilmesinin daha ekonomik olabileceği sonucuna varılabilir. Çünkü yayma negatif örneklerde, PCR sonucu da çoğu zaman negatif olarak bulunmaktadır. Aslında rutin PCR uygulamasının esas amacı, yayma negatif saptanan tüberküloz hastalarına tanı konabilmesi olmalıdır. Ancak maalesef günümüz şartlarında bu amaca henüz ulaşamadığı gözlenmektedir. Bunun yerine yayma pozitif hastalara rutin PCR uygulanması, tedaviye başlanma süresini kısaltabilir. Bu sayede, sıvı kültür sisteminde basilin saptanması ve tanımlanması için harcanacak zamandan çok daha önce, aynı sonuca varılmış olacaktır. Böylece PCR yönteminin ekonomik olarak kullanılması mümkün olabilecektir.

Teorik olarak, örneğin laboratuvara ulaştırılmasından sonra bir veya iki gün içinde PCR sonucunun verilmesi mümkündür. Bu konuda özellikle "in house" PCR yöntemleri uygulanıyorsa sorun yaşanmayabilir. Ancak hazır ticari PCR kitlerinin kullanılması

durumunda, hızlı sonuç verme konusunda sorunlar yaşanabilmektedir. Ticari PCR kitlerinin çoğunda toplam test süresi kısa olmasına rağmen, belli sayıda örneğin bir kerede, aynı kontroller kullanılarak çalışılması gerekmekte, bu durumda da örnek sayısı belli bir rakama ulaşana kadar beklenmektedir. Böylece, örnek akışının fazla olmadığı laboratuvarlarda tüberküloz PCR sonuçlarının verilmesi bir haftayı bulabilmektedir. Uygulama açısından bakıldığında, teorik olarak 1-2 gün olan sonuç verme süresinin, örnek azlığı nedeniyle bir haftaya çıkması, PCR yönteminin "hızlı tanı" avantajını ortadan kaldırmaktadır. Bu nedenle, tüberküloz tanısında hazır ticari PCR kitlerinin kullanılması düşünülmüyorsa, kitlerin verimliliği de hesaba katılarak karar verilmelidir. Her PCR çalışmasında kullanılan pozitif ve negatif kontroller gözönüne alındığında, ortalama olarak haftada iki defa tüberküloz PCR uygulanması, sonuçların gecikmeden verilmesi açısından kabul edilebilir sınırlarda görünmektedir. Bu durumda, örnek sayısının az olduğu laboratuvarlarda tüberküloz PCR uygulamasının verimli olmayacağı sonucuna varılabilir.

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. 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 *M.tuberculosis* kompleksi dışındaki mikobakterilerin 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. Görüldüğü gibi tüberküloz tanısında, klinik şüphe ve yorumun büyük bir önemi vardır. Sonuca varılamayan olgularda klinik yorum belirleyici olabilmektedir.

Günümüz şartlarında, tüberküloz tanısında kültür yöntemleri ve özellikle de daha hızlı tanı sağlayan sıvı kültür sistemleri, vazgeçilmez yöntemler olarak görünmektedirler. Moleküler yöntemler ise tanı koyma sürecini belirgin derecede kısaltabilmelerine rağmen, mikroskopik inceleme ve kültür yöntemlerinin yerini alamamışlardır. Bugün gelinen aşamada, moleküler yöntemlerin tüberküloz tanısında kültür yöntemlerinin yerini alması söz konusu değildir. Bununla birlikte, moleküler yöntemlerin tamamlayıcı testler olarak kullanılmaları daha uygun görünmektedir. Tüberkülozun laboratuvar tanısı amacıyla PCR sonuçlarının değerlendirilmesinde, kullanılan yöntem ve incelenen örneğin türü göz önünde bulundurulmalı, özellikle solunum yolu dışındaki örneklerde ve yayma negatif örneklerde duyarlılığın daha düşük olabileceği unutulmamalıdır. Bunun yanısıra, PCR sonuçları kültür ve mikroskopik inceleme sonuçları ile bir bütün olarak yorumlanmalıdır. Klasik kültür yöntemlerinin yanında, tanımlama, genotiplendirme ve ilaç direnci saptanmasında moleküler yöntemlerin kullanımı en uygun seçenek olarak görünmektedir.

KAYNAKLAR

1. Boddington B, Wichelhaus TA, Brade V, Bittner T: Removal of PCR inhibitors by silica membranes: evaluating the amplicor *Mycobacterium tuberculosis* kit. J Clin Microbiol 2001; 39: 3750-2.
2. Cheng VCC, Yew WW, Yuen KY: Molecular diagnostics in tuberculosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2005; 24: 711-20.
3. Fegou E, Jelastopulu E, Sevdali M, et al: Sensitivity of the Cobas Amplicor system for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and extrapulmonary specimens. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 593-6.
4. Fernstrom MC, Dahlgren L, Ranby M, Fornsgren A, Petrini B: Increased sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* Cobas Amplicor PCR following brief incubation of tissue samples on Lowenstein-Jensen substrate. APMIS 2003; 111: 1114-6.
5. Huggett JF, McHugh TD, Zumla A: Tuberculosis: amplification-based clinical diagnostic techniques. Int J Biochem Cell Biology 2003; 35: 1407-12.
6. Kaul KL: Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis*: impact on patient care. Clin Chemistry 2001; 47: 1553-8.
7. Kihivya-Ndugga L, van Cleeff M, Juma E, et al: Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of tuberculosis in a population with high prevalences of tuberculosis and human immunodeficiency virus. J Clin Microbiol 2004; 42: 1012-5.
8. Lim TK, Mukhopadhyay A, Gough A, et al: Role of clinical judgement in the application of a nucleic acid amplification test for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. Chest 2003; 124: 902-8.
9. Lim TK, Zhu D, Gough A, et al: What is the optimal approach for using a direct amplification test in routine diagnosis of pulmonary tuberculosis? A preliminary assessment. Respirology 2002; 7: 351-7.
10. Rajalahti I, Ruokonen E-L, Kotomaki T, et al: Economic evaluation of the use of PCR assay in diagnosing pulmonary TB in a low-incidence area. Eur Respir J 2004; 23: 446-51.
11. Sarmiento OL, Weigle KA, Alexander J, et al: Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol 2003; 41: 3233-40.
12. Soini H, Musser JM: Molecular diagnosis of mycobacteria. Clin Chemistry 2001; 47: 809-14.

TRANSPLANT HASTALARINDA VİRAL ETKENLERİN SAPTANMASINDA MOLEKÜLER TEKNİKLER - SOLUNUM YOLU VİRUSLARI

Prof.Dr. Dilek Çolak

*Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji Bilim Dalı,
Antalya*

Tüm dünyada solunum yolu infeksiyonlarına yol açan solunum yolu virusları (SYV) transplant alıcılarını da etkilemektedirler. Bir süre öncesine kadar immün yetmezlikli hastalarda gelişen solunum yolu infeksiyonlarından sitomegalovirus (CMV) ve diğer herpesviruslar sorumlu tutulmakta idi. Ancak son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda toplum kaynaklı solunum yolu virus infeksiyonlarının her yaştaki immün yetmezlikli hasta gruplarında önemli hastalık ve ölüm nedeni olduğu gösterilmiştir. CMV infeksiyonları için yapılan etkili antiviral profilaksi ve tedavi sonucunda CMV pnömonisi oranları düşerken, SYV'nin neden olduğu pnömoni oranları artmaktadır.

SYV arasında influenza virusları (IV), solunum sinsityal virusu (RSV), parainfluenza viruslar (PIV), adenoviruslar (AV), rhinoviruslar (RV), coronaviruslar (CV) ve metapneumovirus (MPV) bulunmaktadır. Bu viruslar toplumda oluşturdukları infeksiyonların mevsimsel dağılımı ile benzer zamanlarda transplant alıcılarında da infeksiyon meydana getirirler; ancak oluşturdukları infeksiyon üç yönü ile sağlıklı kişilerdeki infeksiyondan farklıdır: a) infeksiyonun süresi uzundur, b) nozokomiyal bulaş olasılığı yüksektir, c) pnömoni insidansı ve ölüm oranı yüksektir.

Viral solunum yolu infeksiyonlarının tanısında virusun neden olduğu klinik tablo ve patogeneze göre, o virusun izolasyonu için uygun olan klinik örnekler belirlenmektedir. IV, RSV, RV ve MPV genellikle solunum yolu salgılarında bulunurlar. AV gibi yaygın hastalık oluşturanlar, solunum yolu salgıları, idrar ve kan gibi çeşitli örneklerden izole edilebilirler. Üst solunum yolları için en uygun örnekler nazofaringeal aspirat ve nazal yıkama sıvısıdır. Bununla birlikte alınması daha kolay olan nazofaringeal sürüntü, boğaz yıkama sıvısı, boğaz sürüntü örnekleri de kullanılabilir. Sürüntü alınırken koton ya da dakron eküvyonlar tercih edilmeli, kalsiyum aljinatlı eküvyonlar virus izolasyon şansını azalttıkları için kullanılmamalıdır. Alt solunum yolları; balgam, endotrakeal tüp aspiratları, bronkoalveoler yıkama sıvısı (BAL) ile örneklenebilir. İmmün yetmezlikli hastalarda açık akciğer biyopsisi gibi invaziv girişimlerden önce BAL mutlaka incelenmelidir. Sistemik viral infeksiyonlarda idrar ve kan örnekleri incelenebilir.

Transplant alıcıları gibi immün yetmezliği olan hastalarda, tanının en kısa sürede ve doğru olarak konulması büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla klinik örnekte antijen ya da nükleik asit tayinine yönelik testler kullanılmaktadır. Hücre kültürlerinde SYV'nin replikasyonları çok yavaş olduğundan erken tanıda faydaları tartışmalıdır, ancak kültür yöntemleri, birden fazla patojenin izole edilebilmesi ve antiviral duyarlılık testlerinin yapılabilmesi açısından yararlıdırlar. Nükleik asit tayinine yönelik olarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bugün için tanıda en çok kullanılan testler arasındadır. Multipleks PCR yöntemi ile pek çok virusun aynı anda tanısı konabildiği gibi, gerçek zamanlı (real-time) PCR yöntemi ile de kantitatif sonuçlar elde edilebilmektedir.

Bugün için üzerinde en çok durulan konulardan biri de transplant alıcılarında SYV için pre-emptif tedavi uygulamasıdır. Bunun için, hastaların belirli dönemlerde prospektif olarak izlenerek solunum yoluna ait örnekler ile kan örneklerinde SYV'nin PCR ile araştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Abdallah A, Rowland KE, Schepetiuk SK, et al: An outbreak of respiratory syncytial virus infection in a bone marrow transplant unit: effect on engraftment and outcome of pneumonia without specific antiviral treatment. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 195-203.
2. Bowden RA: Respiratory virus infections after marrow transplant: the Fred Hutchinson Cancer Research Center experience. *Am J Med* 1997; 102: 27-30.
3. Bredius RG, Templeton KE, Scheltinga SA, et al: Prospective study of respiratory viral infections in pediatric hemopoietic stem cell transplantation patients. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23: 518-22.
4. Couch RB, Englund JA, Whimbey E: Respiratory viral infections in immunocompetent and immunocompromised persons. *Am J Med* 1997; 102: 2-9.
5. Englund JA: Diagnosis and epidemiology of community-acquired respiratory virus infections in the immunocompromised host. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7: 2S-4S.
6. Gerna G, Vitulo P, Rovida F, et al: Impact of human metapneumovirus and human cytomegalovirus versus other respiratory viruses on the lower respiratory tract infections of lung transplant recipients. *J Med Virol* 2006; 78: 408-16.
7. Ghosh S, Champlin R, Couch R, et al: Rhinovirus infections in myelosuppressed adult blood and marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 528-32.
8. Ison MG, Hayden FG: Viral infections in immunocompromised patients: what's new with respiratory viruses? *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15: 355-67.
9. Ison MG, Hayden FG, Kaiser L, et al: Rhinovirus infections in hematopoietic stem cell transplant recipients with pneumonia. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 1139-43.
10. Legrand F, Berrebi D, Houhou N, et al: Early diagnosis of adenovirus infection and treatment with cidofovir after bone marrow transplantation in children. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 621-6.
11. Leruez-Ville M, Minard V, Lacaille F, et al: Real-time blood plasma polymerase chain reaction for management of disseminated adenovirus infection. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 45-52.
12. Lion T, Baumgartinger R, Watzinger F, et al: Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease. *Blood* 2003; 102: 1114-20.
13. Ljungman P, Ward KN, Crooks BN, et al: Respiratory virus infections after stem cell transplantation: a prospective study from the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28: 479-84.
14. Raboni SM, Nogueira MB, Tsuchiya LR, et al: Respiratory tract viral infections in bone marrow transplant patients. *Transplantation* 2003; 76: 142-6.
15. Runde V, Ross S, Trenscher R, et al: Adenoviral infection after allogeneic stem cell transplantation (SCT): report on 130 patients from a single SCT unit involved in a prospective multi center surveillance study. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28: 51-7.

16. Seidemann K, Heim A, Pfister ED, et al: Monitoring of adenovirus infection in pediatric transplant recipients by quantitative PCR: report of six cases and review of the literature. *Am J Transplant* 2004; 4: 2102-8.
17. Small TN, Casson A, Malak SF, et al: Respiratory syncytial virus infection following hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: 321-7.
18. Suparno C, Milligan DW, Moss PA, Mautner V: Adenovirus infections in stem cell transplant recipients: recent developments in understanding of pathogenesis, diagnosis and management. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 873-85.
19. Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, et al: Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1564-9.
20. Walls T, Hawrami K, Ushiro-Lumb I, Shingadia D, Saha V, Shankar AG: Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation: is treatment always necessary? *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1244-9.
21. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, et al: A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; 7: 719-24.
22. van Elden LJ, van Kraaij MG, Nijhuis M, et al: Polymerase chain reaction is more sensitive than viral culture and antigen testing for the detection of respiratory viruses in adults with hematological cancer and pneumonia. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 177-83.
23. van Kraaij MG, van Elden LJ, van Loon AM, et al: Frequent detection of respiratory viruses in adult recipients of stem cell transplants with the use of real-time polymerase chain reaction, compared with viral culture. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 662-9.

TRANSPLANT ALICILARINDA HERPESVİRUS İNFEKSİYONLARININ MOLEKÜLER TANISI

Dr. Ayla Özcan

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya

Viral patojenler nedeniyle oluşan infeksiyonlar, transplant alıcılarında mortalite ve morbiditenin en önemli nedenlerinden biridir. Transplantasyon sonrası görülen infeksiyonların %25-30'undan viruslar sorumludur. Cytomegalovirus (CMV); transplant alıcılarında görülen viral infeksiyonların yarısından fazlasının nedenidir ve bunu herpes simplex virus (HSV), varicella-zoster virus (VZV) Epstein-Barr virus (EBV) ve insan herpes virusu-6 (HHV-6) izler^{1,2}. Transplantasyondan sonra uygulanan immunosüpresif tedavi rejimleri nedeniyle görülen herpesviruslar gibi latent virusların endojen reaktivasyonu ciddi problemlere yol açabilir. Bu nedenle transplant alıcılarında herpesvirus infeksiyonlarının laboratuvar tanısı önemlidir.

Tanıda serolojik testlerin kullanımındaki başlıca iki amaç; kişinin primer infeksiyona karşı duyarlılığını saptamak ve kan/organ alıcı ve vericilerini taramaktır. Transplant alıcılarında görülen herpesvirus infeksiyonlarının büyük bir kısmı reaktivasyon olduğu için seroloji tanıda genellikle yardımcı değildir. Klinik örneklerden viral antijenler floresan antikor yöntemiyle boyanarak araştırılabilmektedir. Bu yöntemde örnekte yeterli miktarda hücre bulunması gerekmektedir. Bu da duyarlılığı azaltmaktadır. Tanıda altın standart, virus kültürü ile etkenin tanımlanmasıdır. Ancak geç sonuç vermesi, pahalı altyapı, deneyimli personel gerekliliği ve nispeten düşük duyarlılık gibi nedenlerle günümüzde bu tekniğin yerini moleküler tanı yöntemleri almaktadır³.

HSV TİP-1 VE TİP-2 İNFEKSİYONLARI

HSV tip-1 infeksiyonu genellikle orolabial bölgededir. Viral reaktivasyonda herpes labialis oluşur. HSV tip-2'nin primer ve rekürren infeksiyonları genital ve perianal bölgenin mukokütanöz yüzeyinde ağrılı vezikül ve ülserlerle karakterizedir.

Seroprevalans oranı, toplumdaki topluma değişse de HSV tip-1 için %60-70 arası, HSV tip-2 için %10-20 arasındadır. HSV tip-2 seksüel yolla bulaştığı için seroprevalansı seksüel aktivite yaşına kadar düşük kalmaktadır. Güngör ve arkadaşları 1988 yılında 180 serum örneğiyle yaptığı çalışmada HSV-2 seroprevalansını % 3.89 olarak saptamışlardır⁴.

Solid organ transplantasyonu (SOT) ve kök hücre/kemik iliği transplantasyonu (KHT/KİT) alıcılarında görülen HSV infeksiyonlarının çoğu latent virusun endojen reaktivasyonu ile oluşur. Antiviral profilaksi almayan transplant alıcılarında HSV infeksiyonu %70-80 oranında ve en sık transplantasyonun 2-3. haftalarında görülür⁵. Transplantasyondan yaklaşık altı ay sonra HSV reaktivasyon riski giderek düşme eğilimi gösterir^{5,6}.

Transplant alıcılarında görülen HSV infeksiyonu immünokompetan bireylerdeki gibi daha çok mukokütanöz yerleşim gösterse de, immün yetmezlik olduğu için daha uzun virus atılımı, daha çok invazyon ve diseminasyon potansiyeli gibi nedenlerle ayrılır⁶. Deneyimli

klinisyenler tipik mukokutanöz herpetik lezyonları kolayca tanıyabilseler de atipik lezyonlar ve herpetik viseral organ tutulumları laboratuvar doğrulaması gerektirir.

Tanı

Transplant alıcılarında görülen HSV infeksiyonlarının büyük kısmı reaktivasyon olduğu için seroloji genellikle yardımcı değildir. Antikor titresi ile HSV infeksiyonu arasında bir ilişki saptanmamıştır.

Tanıda altın standart, virusun hücre kültüründe üretilmesidir. Ama en erken 24-48 saat sonra sonuç vermesi, laboratuvar ekipmanı ve personeli gerektirmesi gibi nedenlerle günümüzde moleküler tekniklere yerini bırakmıştır⁷⁻⁹. Klinik örneklerden viral antijenlerin direk floresan antikor (DFA) yöntemiyle saptanması hızlı bir tanı yöntemi olmasına rağmen, duyarlılığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve hücre kültürüne göre daha düşüktür.

PZR tekniğiyle HSV DNA'sı; veziküler sıvı, lezyon kazıntıları, boğaz sürüntüleri, konjunktiva kazıntısı, doku, beyin omurilik sıvısı ve plazma gibi birçok farklı klinik örnekten saptanabilir. HSV DNA'sının periferik kan lökositlerinde saptanmasının, transplant alıcısında jeneralize HSV infeksiyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur⁹. Lezyonlardan alınan doku veya sürüntü örneklerinde kalitatif olarak HSV DNA'sının saptanması infeksiyonun varlığını işaret eder. Kantitatif PCR ise daha çok sistemik infeksiyonda tedaviye yanıtın değerlendirilmesi için önemlidir. PCR tekniğinde "in-house" veya ticari kitler kullanılabilir.

VZV İNFEKSİYONLARI

İnsanlar VZV'un tek rezervuarıdır. Primer infeksiyon erken yaşlarda görülür ve genellikle hafif şiddette, jeneralize veziküler lezyonlarla karakterizedir. Herpes zoster, VZV'un reaktivasyonu sonucu oluşan klinik tablodur. Gangliyondaki VZV reaktivasyonu ve replikasyonunu takiben, virus derinin duysal sinirleri boyunca ilerler ve epitelyal hücrelerde çoğalmaya başlar. Sonuçta herpes zoster özü veziküler döküntüler ortaya çıkar.

Erişkinlerin %90'ından fazlası VZV ile infekte olduğu için, transplant alıcılarında gerçek primer infeksiyon ancak pediatrik hasta grubunda görülür¹⁰. Ülkemizde 2004 yılında Savaş ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 0-15 yaş grubunda VZV seroprevalansı %85 bulunmuştur¹¹. Lenfoproliferatif malignitesi olanlar ve transplant alıcıları herpes zoster açısından yüksek risk altındadırlar¹². Transplant alıcılarındaki herpes zoster sıklığı immünsüpresyonun derecesiyle orantılıdır. HSV infeksiyonlarının aksine VZV reaktivasyonu genellikle SOT ve KHT/KİT takiben 100. günden sonra ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda KHT/KİT sonrası herpes zoster gelişiminin %75-85 vakada beş ay olduğu bulunmuştur¹³.

Transplant alıcılarında herpes zoster üç farklı klinik tablodan birisini gösterir. Birçok vakada hastalarda dermatomal deri erupsiyonları görülür. Bununla birlikte diseminasyon riski immünokompetan bireylere göre daha yüksektir. Daha az sıklıkla, belirgin dermatomal hattı izlemeyen varicella-benzeri deri lezyonları görülür. Buna "atipik jeneralize zoster" adı verilir. Son olarak da subklinik reaktivasyon da olabilir.

Tanı

VZV ve herpes zoster, tipik deri bulguları oluşturduğu için klinik ile tanı kolaylıkla konulabilir. Ancak transplant alıcılarında VZV ve HSV infeksiyonunu klinik olarak ayırmak bazen güç olabilir. Ayrıca, kütanöz belirtiler görülmeden oluşan viseral VZV infeksiyonu da sık olmamakla birlikte tanısı güç olabilir^{14,15}. Bu nedenlerle etkenin laboratuvar tanısı ile doğrulanması gereklidir.

Serolojik tanı genellikle yardımcı değildir. Antikor titresi ile herpes zoster geçirme riski arasında bir ilişki saptanmamıştır¹⁶. Bu nedenle, lezyonda VZV'un antijenleri veya nükleik asidinin saptanması aktif infeksiyonun göstergesidir.

Tanıda virusun hücre kültüründe üretilmesi ve 3-7 günde oluşturduğu sitopatik etkisinin gösterilmesi kullanılabilir. Fakat bu yöntem ile kısa sürede sonuç verilemez, zira virusun hücre kültüründe üremesi HSV'a göre daha uzun sürmektedir. DFA ile viral antijenlerin saptanması ise hızlı fakat PCR'na göre duyarlılığı düşük bir yöntemdir.

Moleküler yöntemlerle VZV DNA'sı; veziküler sıvı, lezyon kazıntıları, doku ve plazma gibi klinik örnekten saptanabilir. Fakat HSV gibi stabil bir virus olmadığından örnek alımı ve taşınmasında çok dikkatli olunmalıdır. PCR; yapılan çalışmalara göre hücre kültürüne göre daha hızlı ve duyarlı bir yöntem olarak bulunmuştur¹⁷. Lezyonlardan alınan doku veya sürüntü örneklerinde kalitatif olarak VZV DNA'sının saptanması infeksiyonu gösterir. Kantitatif PCR ise daha çok sistemik infeksiyonda tedaviye yanıtın değerlendirilmesi için önemlidir. Grant ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre; transplant alıcılarında görülen VZV infeksiyonlarında, plazmada VZV DNA'sının saptanmasının kuvvetle diseminasyonu desteklediği saptanmıştır¹⁴. PCR tekniğinde "in-house" veya ticari kitler kullanılabilir.

CMV İNFEKSİYONLARI

CMV transplant alıcılarında en sık görülen viral ajandır. Transplantasyon sonrasında görülen CMV infeksiyonunun spektrumu ve şiddeti; transplante edilen organın tipine, alıcı ve vericinin transplant öncesi serolojik durumuna, kullanılan immünosüpresif tedavi rejimi ve immün yetmezlik derecesine göre değişmektedir. CMV sadece invaziv doku infeksiyonlarıyla değil, aynı zamanda graft atılımı ile ilişkilidir. CMV bazı herpesvirusların aktif indükleyicisidir. Örneğin yapılan çalışmalarda CMV hastalığı ile EBV'a bağlı transplant sonrası lenfoproliferatif hastalık (PTLH) arasında ilişki saptanmıştır¹⁸.

CMV infeksiyonu genellikle transplantasyon sonrası ilk üç ayda görülür. Ancak uygulanan antiviral profilaksi nedeniyle daha geç de ortaya çıkabilmektedir. "CMV infeksiyonu", herhangi bir semptom olmaksızın hasta örneklerinden virusun izole edilmesi, viral antijenlerin, viral DNA'nın veya anlamlı antikor yanıtının saptanmasıdır. "CMV hastalığı" ise; tutulan organa ait hastalık semptomları ile birlikte CMV'un PCR ve biyopsi ile saptanmasıdır. Transplantasyondan sonra saptanan CMV viremisi veya yüksek viral yük, hastalık gelişimi ile doğrudan ilişkili bulunmuştur. "CMV sendromu" da; ateş, lökopeni ve trombositopeni ile birlikte CMV DNA'nın kanda saptanmasıdır¹⁹. Bununla birlikte; aynı bulgulara HHV-6, HHV-7 ve adenovirus gibi diğer virusların da sebep olacağı unutulmamalıdır.

Transplant sonrası gelişebilen CMV hastalığını önlemek için iki farklı yaklaşım vardır. İlki, transplantasyondan sonra tüm olgulara antiviral profilaksi uygulanmasıdır. Diğeri ise,

laboratuvar bulguları sonucunda CMV açısından yüksek riskli olduğu düşünölen hasta grubunun belirlenerek bu gruba antiviral uygulanmasıdır. Buna pre-emptif tedavi adı verilir. Ancak bu tedavi rejiminin, antijenemi testi ve PCR gibi yüksek pozitif prediktif değere sahip CMV testleri temel alınarak uygulanması daha doğru bir yaklaşımdır.

Tanı

CMV infeksiyonu ve hastalığının tanısında kullanılan yöntemler son yıllarda önemli gelişmeler göstermiştir. Önceleri CMV'un tanısı histopatolojik olarak yapılmaktaydı. Daha sonraları hücre kültürü yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Fakat bu yöntem zaman alıcı, duyarlılığı göreceli olarak daha düşük ve ekipman gerektiren bir tanı metodudur. Bununla birlikte pozitif viral kültürlerin, her zaman CMV hastalığı geliştirme riski ile ilişkili olmadığı saptanmıştır^{20,21}. Bir çalışmaya göre de, CMV pozitif viral kültürlerin pozitif ve negatif prediktif değerleri %46 ve %83 bulunmuştur²². Yüksek duyarlılıktaki pp65 antijen saptama yöntemi ve moleküler metodların geliştirilmesi, özellikle CMV hastalığı açısından yüksek riskli transplant alıcılarının hızla saptanması mümkün olmuştur.

pp65 antijenemi testi, semikantitatif floresan testi olup, periferik kanda infekte hücre sayısını saptama esasına dayanır. Testin duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, iyi standardize edilmiş ve kantitatif sonuç vermesine rağmen, klinik örneklerin hemen çalışılması gerekliliğı ve lökopenik hastaların sorun oluşturması nedeniyle son yıllarda CMV DNA'sını saptamaya yönelik moleküler testler daha çok kullanılmaya başlanmıştır. Yüksek düzey antijenemi, CMV hastalığı ile ilişkili olmasına rağmen literatürde bazı istisnalar da bulunmaktadır²³. Yapılan çalışmalarda, antiviral tedavi sırasında antiviral ilaç direnci olmamasına rağmen antijenemi testinde yükselmelerin görölebileceğı ve bu nedenle özellikle KİT alıcılarında izlem için antijenemi testinin kullanılmaması gerektiğı vurgulanmıştır.

PCR metodunda, klinik örneklerde viral DNA veya virusa ait mRNA'lar saptanarak çoğaltılır. Farklı klinik örneklerde çalışılabilmesi, diğer testlere göre duyarlılığının yüksek olması ve erken dönemlerde infeksiyonu saptayabilmesi testin avantajlarından. PCR ile CMV pozitifliği antijenemi testinden yaklaşık 7-10 gün önce saptanabilir. pp67 mRNA dizilerinin izotermal olarak çoğaltıldığı NASBA (nucleic acid sequence based amplification), hibridizasyon ve gerçek zamanlı (real-time) PCR yöntemleri CMV tanısında kullanılan diğer nükleik asit saptama testleridir. PCR yönteminin yüksek duyarlılığı nedeniyle bütün latent virüslerde olduğu gibi, hastalığı olmayan seropozitif olgularda da pozitiflik saptanabileceğinden, infeksiyonun tanısı ve tedavi izleminde kantitatif PCR metodlarının kullanılması daha doğru bir yaklaşımdır. PCR yöntemlerinde tam kan, lökosit ya da plazma örnekleri kullanılmaktadır. Bu örneklerin aynı hastadan alınmasına rağmen farklı viral yüklere sahip oldukları unutulmamalıdır.

Günümüzde transplantasyon merkezleri, birbirinden farklı ticari kantitatif PCR kitleleri kullanarak CMV izlemi yapmaktadırlar. Bu ticari sistemlerin kullandıkları standartlar da farklıdır. Bu nedenle yapılan çalışmalarda; transplantasyon merkezlerinin CMV izlemlerinde hep aynı metodu kullanmaları ve pre-emptif tedaviye başlamak için kendi eşik değerlerini saptamalarının gerekli olduğu belirtilmektedir.

CMV hastalığının tedavisi sırasında antiviral ilaçlara karşı direnç gelişebilir. Direnci göstermek için virusun üretilmesi ve antiviral duyarlılığın saptanması gereklidir. Ancak bu

sadece hücre kültürü ile yapılabilir. PCR ile mutant viral suşların hızlı bir şekilde saptanması mümkün olmaktadır^{24,25}.

HHV-6 ve HHV-7 İNFEKSİYONLARI

HHV-6, HIV'da olduğu gibi kendine hedef olarak CD4+ T lenfositleri seçmektedir. HHV-7 daha çok hücre ilişkilidir ve daha az litik bir virustur. HHV-6 ayrıca TNF alfa, interferon gamma gibi sitokinlerin de güçlü indükleyicisidir. Birbirine %88 oranında benzer A ve B varyantları bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda transplant sonrası görülen infeksiyonların çoğuna tip B'nin neden olduğu bulunmuştur.

Seroepidemiyolojik çalışmalar, HHV-6'ya bağlı primer infeksiyonların hayatın ilk yıllarında görüldüğünü ortaya koymuştur. Erişkinlerde seropozitiflik oranı %80 civarındadır²⁶. HHV-7'nin primer infeksiyonu geç çocukluk döneminde geçirilir. Vücutta latent olarak bulunduğu yerler tam olarak bilinmemekle birlikte, HHV-6'nın bronşiyal ve salgı bezlerinin epitelyal hücrelerinde, HHV-7'nin salgı bezlerinde latent kalabildiği gösterilmiştir.

Transplantasyon sonrası HHV-6'ya bağlı gelişen infeksiyonların çoğu 2-4. haftalarda görülür. HHV-6'ya bağlı semptomatik infeksiyon, KHT/KIT'de SOT'dan daha fazla sıklıkta görülür. CMV'den bu özelliğiyle de ayrılır. İmmünoşüpresif tedavi rejiminde, anti-T lenfosit uygulanması hem KHT/KIT hem de SOT alıcılarında önemli bir predispozan faktördür. HHV-6 ile GVHD arasındaki ilişki tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda karaciğer transplantasyonu sonrası gelişen allograft rejeksiyonu ile HHV-6'nın ilişkili olduğu bulunmuştur²⁷. HHV-6'nın neden olduğu klinik tablolar, virusun immünomodülatör etkilerinden dolayı oluşmaktadır.

HHV-7'ye bağlı viremi KHT/KIT alıcılarının %57'si, SOT alıcılarının ise %39'unun periferik kan mononükleer hücrelerinde PCR tekniğiyle saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda HHV-7'nin transplant alıcılarında CMV'un patojenitesini artırıcı etki yapabildiği bulunmuştur²⁸.

Tanı

Tanıda serolojik incelemeler yararlı değildir. Hücre kültürü tanıda yararlı bir yöntemdir. Ancak en hızlı yöntemlerden olan shell-vial yöntemiyle bile 72 saat sonunda sonuç alınabilmektedir. PCR temelli moleküler yöntemler tanıda kullanılabilir. Burada dikkat edilmesi gereken en önemli unsur, kalitatif PCR'nun latent viral genomu da saptayabilmesidir. Asemptomatik transplant alıcılarında periferik kan mononükleer hücrelerinde latent HHV-6 genom sayısı $10/10^6$ hücrenin altındadır. PCR'nun avantajlarından biri de içinde hücre bulunmayan örneklerde pozitifliğin önemli olmasıdır.

EBV İNFEKSİYONLARI

EBV, gamaherpesvirus ailesinden olup, infeksiyöz mononükleoz, Burkitt lenfoma ve transplantasyon sonrası gelişen lenfoproliferatif hastalık (PTLH) etkenidir. EBV'un temel bulaş yolu tükürüktür. Primer infeksiyon genellikle çocukluk çağında asemptomatik olarak geçirilir. Ama genç erişkinlik döneminde infeksiyöz mononükleoz kliniği de görülebilir. Virus B lenfositleri infekte eder ve primer infeksiyondan sonra burada latent kalır.

Seroepidemiyolojik çalışmalar primer infeksiyondan sonra gelişen seropozitiflik oranının genç erişkinlik döneminde gelişmiş ülkelerde %50-60, ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkelerde ise %80-90 civarında olduğunu göstermiştir.

Transplant alıcılarında EBV ile ilgili en riskli hastalık PTLH'dır. Yapılan çalışmalarda organ alıcılarında PTLH sıklığı %5-23 arasında bulunmuştur²⁹. Genellikle EBV seropozitif donörden organ alan seronegatif alıcılarda PTLH gelişme oranı çok yüksek olmasına rağmen, tüm transplant alıcıları serolojik durumuna bakılmaksızın risk altındadır. PTLH gelişme riski transplante edilen organ tipine göre de değişmektedir³⁰. En yüksek risk %32 ile ince barsak transplantasyonu sonrası oluşurken, bunu pankreas, kalp, akciğer ve karaciğer transplantasyonları izler.

Tanı

Tanıda serolojik incelemeler yararlı değildir. Histopatolojik inceleme, hastalığın tanısında altın standarttır. Bununla birlikte PTLH'da periferik kandaki EBV yükü artmıştır. Yapılan çalışmalarda, viral yükün artmaya başlaması lenfoproliferatif hastalık semptomlarından önce başladığı için, moleküler yöntemlerle viral yükün prospektif olarak izlenmesi önerilmektedir. Düşük EBV yükünün SOT alıcılarında negatif prediktif değeri %96-100 gibi çok yüksek bir değerde bulunmasına rağmen, pozitif prediktif değerleri %28-64 arasında değişmektedir³¹. Bununla birlikte, kantitatif PCR metodlarıyla antiviral tedavi yanıtının izlenmesi de mümkündür. Kullanılan kantitatif PCR testleri arasındaki standart farklılıkları, örneklerin niteliği (tam kan, plazma veya lenfosit) ve hangi sıklıkla alınacağı gibi konularda daha standardizasyon sağlanamaması, viral yük izlenmesinde önemli sorunlardandır.

HHV-8 İNFEKSİYONLARI

HHV-8, gamaherpesvirus ailesinden lenfotropik bir virustur. Diğer bir özelliği de konakta tümör oluşturabilme yeteneğidir. Primer infeksiyonun belirgin klinik bulguları yoktur. HHV-8'in viral replikasyon aşamaları ve persistan olarak kaldığı bölgeler tam olarak bilinmemekle birlikte, viral DNA tükrük ve periferik kan mononükleer hücrelerinde tesbit edilebilmektedir.

Virus primer infeksiyon sonrası latent kalmaktadır. HHV-8'in, Kaposi sarkomu (KS) veya diğer kanserlerin gelişiminde hangi mekanizmalarla etkili olduğu tam olarak bilinmemekle birlikte, hücre siklusu düzenleyici proteinlerini ve sitokin benzeri yapıları kodlayarak patogeneizde rol oynadığı düşünülmektedir.

HHV-8 prevalansı ülkenin gelişmişlik düzeyi ile paralellik göstermektedir. KS transplant alıcılarında %0.5-5 oranında görülür. Yapılan çalışmalarda bu olgularda HHV-8 reaktivasyonu da eş zamanlı saptanmıştır.

Tanı

Kütanöz ya da viseral KS tanısı da daha çok patolojik inceleme ile konur. Seroprevalans oranı düşük olduğu için serolojik tanı yararlıdır. Ancak testlerde farklı antijenlerin kullanılması ve tam bir standardizasyon sağlanamamış olması, bu testlerin kısıtlılıklarındandır. Bu nedenle tanı ve infeksiyonun takibinde moleküler teknikler son yıllarda kullanılan yeni metodlardır. HHV-8 kantitatif PCR testleri ile viral yük izlemi; transplant alıcılarının KS geliştirme riskleri ve antiviral tedaviye yanıtın değerlendirilmesi

için kullanılmaktadır³². Ancak PCR testlerinin optimizasyonu ve duyarlılığı ile ilgili ileri çalışmaların yapılması ve testlerin standardizasyonu gerekmektedir³³.

KAYNAKLAR

1. Patel R, Paya CV: Infections in solid-organ transplant recipients. Clin Microbiol Rev 1997;10: 86-124.
2. Smith SR, Butterly DW, Alexander BD, Greenberg A: Viral infections after renal transplantation. Am J Kidney Dis 2001; 37: 659-76.
3. Gomez E, Melon S, Aguado S, et al: Herpes simplex virus encephalitis in a renal transplant patient: diagnosis by polymerase chain reaction detection of HSV DNA. Am J Kidney Dis 1997; 30: 423-7.
4. Gungor S, Kocabeyoglu O, Gun H ve ark: Değişik yaş gruplarında ELISA ve IFAT ile herpes simpleks virus tip 2 antikor düzeylerinin saptanması. Mikrobiyol Bül 1988; 22: 113-9.
5. Wade JC, Day LM, Crowley JJ, et al: Recurrent infection with herpes simplex virus after marrow transplantation: role of the specific immune response and acyclovir treatment. J Infect Dis 1984; 149: 750-6.
6. Whitley RJ, Levin M, Barton N, et al: Infections caused by herpes simplex virus in the immunocompromised host: natural history and topical acyclovir therapy. J Infect Dis 1984;150: 323-9.
7. Cone RW, Hobson AC, Palmer J, et al: Extended duration of herpes simplex virus DNA in genital lesions detected by the polymerase chain reaction. J Infect Dis 1991; 164: 757-60.
8. Lakeman FD, Whitley RJ: Diagnosis of herpes simplex encephalitis: application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. J Infect Dis 1995; 171: 857-63.
9. Roubalova K, Suchankova A, Vitek A, et al: Presence of herpes simplex virus (HSV) in peripheral leukocytes of patient who developed active HSV infection after bone marrow transplantation. J Clin Virol 2000; 17: 37-42.
10. Pearlman LS: Posttransplant viral syndromes in pediatric patients: a review. Prog Transplant 2002; 12: 116-24.
11. Savaş S, Dallar Y, Arıkan I ve ark: 0-15 yaş grubu çocuklarda varicella-zoster virus seroprevalansı. Mikrobiyol Bül 2004; 38: 69-75.
12. Straus SE, Ostrove JM, Inchauspe G, et al: Varicella-zoster virus infections. Biology, natural history, treatment, and prevention. Ann Intern Med 1988; 108: 221-37.

13. Tzeng CH, Liu JH, Fan S, et al: Varicella zoster virus infection after allogeneic or autologous hemopoietic stem cell transplantation. *J Formos Med Assoc* 1995; 94: 313-7.
14. Grant RM, Weitzman SS, Sherman CG, et al: Fulminant disseminated varicella zoster virus infection without skin involvement. *J Clin Virol* 2002; 24: 7-12.
15. Rogers SY, Irving W, Harris A, et al: Visceral varicella zoster infection after bone marrow transplantation without skin involvement and the use of PCR for diagnosis. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 805-7.
16. Webster A, Grint P, Brenner MK, et al: Titration of IgG antibodies against varicella zoster virus before bone marrow transplantation is not predictive of future zoster. *J Med Virol* 1989; 27: 117-9.
17. Shoji H, Honda Y, Murai I, et al: Detection of varicella-zoster virus DNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid of patients with herpes zoster meningitis. *J Neurol* 1992; 239: 69-70.
18. Manez R, Breinig MC, Linden P, et al: Posttransplant lymphoproliferative disease in primary Epstein-Barr virus infection after liver transplantation: the role of cytomegalovirus disease. *J Infect Dis* 1997; 176: 1462-7.
19. Ljungman P, Griffiths P, Paya C: Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1094-7.
20. Kusne S, Shapiro R, Fung J: Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 1999; 1: 187-203.
21. Pillay D, Ali AA, Liu SF, et al: The prognostic significance of positive CMV cultures during surveillance of renal transplant recipients. *Transplantation* 1993; 56: 103-8.
22. Falagas ME, Snyderman DR, Ruthazer R, et al: Surveillance cultures of blood, urine, and throat specimens are not valuable for predicting cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. Boston Center for Liver Transplantation Cytomegalovirus Immune Globulin Study Group. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 824-9.
23. The TH, van den Berg AP, van Son WJ, et al: Monitoring for cytomegalovirus after organ transplantation: a clinical perspective. *Transplant Proc* 1993; 25 (Suppl 4):5-9.
24. Alain S, Honderlick P, Grenet D, et al: Failure of ganciclovir treatment associated with selection of a ganciclovir-resistant cytomegalovirus strain in a lung transplant recipient. *Transplantation* 1997; 63: 1533-6.
25. Baldanti F, Simoncini L, Sarasini A, et al: Ganciclovir resistance as a result of oral ganciclovir in a heart transplant recipient with multiple human cytomegalovirus strains in blood. *Transplantation* 1998; 66: 324-9.

26. Chua KB, Khairullah NS, Hooi PS: Seroepidemiology of human herpesvirus 6 in a population seen in the University Hospital, Kuala Lumpur, Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1996; 27: 91-5.
27. Schlitt HJ, Shi L: Human herpesvirus-6 and liver transplantation. *J Hepatol* 2002; 37: 681-3.
28. Kidd IM, Clark DA, Sabin CA, et al: Prospective study of human betaherpesviruses after renal transplantation: association of human herpesvirus 7 and cytomegalovirus co-infection with cytomegalovirus disease and increased rejection. *Transplantation* 2000; 69: 2400-4.
29. Paya CV, Fung JJ, Nalesnik MA, et al: Epstein-Barr virus-induced posttransplant lymphoproliferative disorders. *Transplantation* 1999; 68: 1517-25.
30. Cockfield SM: Identifying the patient at risk for post-transplant lymphoproliferative disorder. *Transplant Infect Dis* 2001; 3: 70-8.
31. No authors listed: Epstein-Barr virus and lymphoproliferative disorders after transplantation. *Am J Transplant*. 2004; 4 (Suppl 10): 59-65.
32. Pellet C, Chevret S, Frances C, et al: Prognostic value of quantitative Kaposi sarcoma-associated herpesvirus load in posttransplantation Kaposi sarcoma. *J Infect Dis* 2002; 186: 110-3.
33. Edelman DC: Human herpesvirus 8-a novel human pathogen. *Virol J* 2005; 2: 78.

TRANSPLANT HASTALARINDA VİRAL ETKENLERİN SAPTANMASINDA MOLEKÜLER TEKNİKLER: HEPATİT VİRUSLARI

Doç.Dr. A.Arzu Sayiner

Dokuz Eylül Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, İzmir

Transplant alıcılarında hepatit viruslarına bağlı komplikasyonlar, graft kaybına ve mortaliteye yol açabilmektedir. Risk, çoğu kez virus yükü ile paralellik göstermektedir. Hepatit viruslarına yönelik nükleik asit testleri, alıcı-verici çiftinin belirlenmesinde, profilaksi ve/veya tedavi kararının verilmesinde ve izlenmesinde vazgeçilemez öneme sahiptir.

Hepatit B virusu (HBV) ve karaciğer transplantasyonu

HBV'ye bağlı karaciğer yetmezliği, transplantasyon gerektiren nedenler arasında önemli bir yer tutmaktadır. HBV ile infekte alıcıda, profilaksi uygulanmazsa, HBV infeksiyonunun yineleme riski %80, 5 yıllık yaşam şansı %40-60'dır. Risk, büyük ölçüde transplantasyon sırasında replikatif HBV infeksiyonu varlığı ile ilişkilidir. Replikasyon, duyarlılığı $\leq 10^{2-3}$ kopya/ml olan bir yöntem ile değerlendirilmelidir. Uygun profilaksi ile HBV yineleme riski iki yıllık dönem için %10'nun altına indirilebilir. Profilakside, HBIG ve/veya antiviral nükleoz(t)id analogları kullanılmakta, kombinasyon tedavisi yeğlenmektedir. IV HBIG'nin pahalı olması ve kullanım güçlüğü nedeniyle, kısa süreli IV HBIG kullanımı veya IM olarak düşük dozda kullanımı yönünde çalışmalar bulunmaktadır. HBIG'ne olan gereksinim, transplantasyon öncesi virus yükü ile ilişkilidir. HBIG tek başına kullanıldığında, dozun yetersiz kalması, erken dönemde nükse; S antijeni (özellikle "a" determinantı) mutasyonları ise geç dönemde nükse yol açabilir. Transplantasyon öncesi (doğal veya antiviral tedavi ile) HBV DNA PCR negatif veya düzeyi 10^{2-3} kopya/ml altında olan olgularda kısa süreli IV HBIG kullanımının ardından IM yolla uygulanan düşük doz antikor tedavisi yeterli olabilmektedir. Transplantasyon öncesi HBV viral yükünün önemi nedeniyle, nakilden önce antiviral ajanlarla HBV DNA miktarının azaltılması, saptanamaz düzeye indirilmesi önerilir. Transplantasyondan birkaç ay önce başlanacak antiviral tedavi ile virus replikasyonu baskılanmakta, transplantasyondan sonra HBIG + antiviral kombinasyonu ile profilaksi sürdürülmektedir. Kullanılacak antiviral ajan, süresi; HBIG dozu, veriliş şekli, kullanım süresi; HBV DNA'da kararları etkileyebilecek eşik değerler ve alternatif tedaviler (HBV aşısı, vb) konularında henüz yanıtlanmamış sorular bulunmaktadır.

Olguların izleminde kullanılacak HBV DNA testinin duyarlılığı önemlidir. İzleminde, normal koşullar altında, üç aylık aralarla HBsAg, anti-HBs ve HBV DNA PCR izlemi önerilir. HBV DNA'da beklenen yanıtın alınamaması durumunda, tedavinin düzgün kullanılmaması ile ilaç direnci olasılıklarının ayrılması gereklidir. Bu amaçla, antiviral ajanlara direnç gelişimini belirleyecek mutasyon analizleri yapılmalıdır. HBV nüksü saptanan olgularda tedavi, giderek artan antiviral seçenekleri ile daha kolay düzenlenebilmektedir. Transplantasyon sonrası profilaksinin, bir süre sonra kesilip kesilemeyeceği bilinmemektedir. Bu kararın verilmesinde karaciğer dokusunda HBV DNA ve/veya cccDNA'nın araştırılması yol gösterici olabilir.

HBV ve böbrek transplantasyonu

HBV tedavisi uygulanmayan, HBsAg pozitif böbrek alıcılarının %80'de kronik karaciğer hastalığı gelişmekte, ölümlerin %35-57'si karaciğer hastalığına bağlı olmaktadır. HBV'ye bağlı karaciğer fonksiyon bozukluğu, sıklıkla nakil sonrası birinci yıl içinde ortaya çıkar. İmmünoşüpresif tedavi, özellikle kortikosteroid kullanımı virus replikasyonunu artırmaktadır. Solid organ transplantasyonunda nadir olmakla birlikte, HBsAg negatif, anti-HBc pozitif olgularda bile transplantasyon sonrası reaktivasyon gelişebilmektedir. Ancak transplantasyon öncesi HBV DNA pozitif hastalarda, risk daha fazladır. Karaciğer transplantasyonunda olduğu gibi, HBV DNA miktarını duyarlı bir yöntemle belirlemek ve transplantasyon öncesi antiviral tedaviye başlayarak replikasyonu baskılamak önemlidir. İnterferon, kronik böbrek yetmezliği hastalarında iyi tolere edilememekte, transplantasyon sonrasında da rejeksiyon riskini artırmaktadır. Lamivudin, transplant öncesi ve sonrası HBV replikasyonunu baskılamakta ve kronik HBV infeksiyonuna bağlı mortaliteyi azaltmakta etkilidir. Tedavinin başlanma zamanı ve süresi halen araştırılmaktadır. HBV DNA'nın izlenmesi, tedaviye yön verilmesinde ve direnç gelişiminin erken dönemde belirlenmesinde önemlidir.

HBsAg negatif, anti-HBc pozitif alıcıda, solid organ (karaciğer, böbrek, kalp) transplantasyonu ardından HBV reaktivasyonu gelişebilir. İzlemede %24 olguda serumda, %30 olguda karaciğerde HBV DNA pozitifliği saptanmıştır. İzlem, HBsAg ve HBV DNA ile yapılmalıdır.

HBV ve hematopoetik hücre transplantasyonu

HBsAg pozitif hastalarda, özellikle transplantasyon öncesi virus yükü fazla olanlarda, HBV reaktivasyonuna bağlı hepatit riski yüksektir. Risk, HBV DNA miktarı 10^5 kopya/ml'nin üstünde olan hastalarda, altında olanlara göre yaklaşık 10 kat fazladır. Transplantasyon öncesi inaktif olan infeksiyonda da aktiveleşme saptanabilir. Fulminan hepatit gelişme riski %12'dir. HBV hastalığı sıklıkla immün toparlanma aşamasında ortaya çıkmaktadır. Virus yükünün antiviral ajanlarla düşürülmesi, reaktivasyon riskini azaltmada önemlidir. Antiviral ajan kullanımının, transplantasyondan bir süre önce başlaması ve işlem sonrasında uzun süre sürdürülmesi önerilir.

Vericinin anti-HBs pozitif olması (geçirilmiş infeksiyon veya aşılama sonucu), bağışıklığın alıcıya da geçmesini sağlamaktadır. Böylece naif alıcılarda korunma sağlanabileceği gibi, HBsAg pozitif alıcıların bir kısmında (%65) antijenin negatifleştiği belirlenmiştir. Kalıcı HBsAg klerensi sağlanması, siroz gelişimini önleyebilmektedir. Verici kaynaklı bağışıklığın alıcıda kalış süresi bilinemediği için anti-HBs izleminin 6-9 ay aralarla yapılması, antikor düzeyinin azalması durumunda HBV DNA kontrolü ve HBV aşısı önerilmektedir.

Anti-HBc ve anti-HBs pozitif alıcılarda transplantasyon sonrası, HBV reaktivasyonu gelişebilmektedir (ters serokonversiyon). Allojenik transplantasyon sonrası 2 yılda %75, 5 yılda %100 olguda anti-HBs kaybı saptanmıştır. Bu olguların bir kısmında HBV reaktivasyonu gelişmiştir. Bu nedenle alıcı, anti-HBs ve HBV DNA açısından uzun süre izlenmelidir. Vericinin HBsAg pozitif olması durumunda, transplantasyon öncesi antiviral tedavi ile virus yükünün düşürülmesi, tercihan HBV DNA PCR negatifliğinden sonra hücre toplanması önerilmektedir.

Hepatit C virusu (HCV) ve karaciğer transplantasyonu

HCV pozitif hastalarda, infeksiyonunun yinelenme riski, transplantasyondan sonraki ilk yılda %70, transplantasyon öncesi viremi varsa %90'dır. Nüks, serum ve/veya karaciğerde HCV RNA'nın saptanması ile belirlenir. Hastalık, immün süpresyonu olmayanlara göre daha hızlı ilerlemekte, 5 yılda siroz gelişimi %20-30'a ulaşmaktadır. Graft kaybının en sık nedeni yineleyen HCV infeksiyonudur. Ciddi HCV nüksü açısından risk faktörleri arasında virolojik parametreler de bulunmaktadır. Transplantasyon öncesi virus yükünün yüksek olması, genotip 1 infeksiyonu, HBV/HIV koinfeksiyonu risk faktörleridir. Transplantasyon öncesi virus yükünün azaltılması, mümkünse saptanamaz hale getirilmesi önerilmekte, bu yolla kürün %40'lara çıkabileceği öngörülmektedir. Transplantasyon öncesi ve sonrası tedavide interferon ve ribavirin kombinasyonu yeğlenmektedir. İlaç yan etkileri nedeniyle doz azaltımı yapılmak zorunda kalınması tedavi başarısını etkilemektedir. Tedavide doz ve süre konusunda belirsizlikler bulunmaktadır. Tedavi, plazma virus yükü ile izlenir.

Araştırmalar, hepatik olmayan dönemde virus yükünün azaldığını, transplantasyon sonrası 12-24 saatte azalmanın devam ettiğini (virionların hepatosit ve karaciğerdeki retikuloendotelial sistem hücrelerince tutulması), ikinci haftadan itibaren serum HCV RNA miktarının artarak 4. ayda tepe noktaya ulaştığını göstermiştir. Virus yükü, birinci yılda, transplantasyon öncesi miktarın 10-20 katına ulaşmakta, kortikosteroid kullanımında ise 4-100 kat artmaktadır. Transplantasyon sonrası CMV infeksiyonu da, viral yükü artırıcı etki yapmaktadır. Nüksü önlemeye yönelik tedavi alan olgularda, transplantasyon sonrası 3. ve 6. ayda virus yükünün incelenmesi, 6.ayda nüks saptanmadıysa, 12. ayda HCV RNA testinin tekrarlanması önerilmektedir.

HCV ve böbrek transplantasyonu

HCV ile infekte alıcıda, transplantasyon öncesi HCV RNA'nın negatifleşmesini hedefleyen bir tedavi önerilmektedir. Transplantasyon sonrası tedavi sorunludur, interferon kullanımında rejeksiyon riski %50'lere çıkabilmektedir. Viral yük belirlemede kullanılacak test seçiminde, hemodiyaliz hastalarında heparin kullanımı nedeniyle ortaya çıkabilecek PCR inhibisyonu göz önüne alınmalıdır. TMA esaslı testlerin heparinden etkilenmemeleri nedeniyle üstünlük taşıdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Diyaliz hastalarında anti-HCV negatif, HCV RNA pozitif olgular görülebilmektedir. Bu nedenle transplantasyon adaylarının 3-6 ayda bir HCV-RNA testi ile değerlendirilmeleri önerilir.

HCV ve hematopoetik hücre transplantasyonu

Hematopoetik hücre transplantasyonu ile HBV/HCV ilişkisini irdeleyen çalışmalar, genellikle allojenik transplantasyon alıcılarında yapılmıştır. HCV, erken dönemde veno-oklüzif hastalık riskini artırmakta, bunun dışında kronik HCV infeksiyonun gidişi genellikle ilk 10 yılda sessiz olmaktadır. Transplantasyondan sonra HCV ile infekte olmuş hastaların izleminde biyopsi ile kanıtlanmış siroz oranı 15. yılda %11, 20. yılda %24 olarak saptanmıştır. Olgularda, gereğinde interferon ve/veya ribavirin tedavisi kullanılabilir. Kombine tedavide başarı daha fazla (%20) olmasına rağmen, hematolojik toksisite daha sık görülmektedir.

HBV ve HCV ile infekte verici kullanımı

▪ *Anti-HBc pozitif verici ve transplantasyon:* Alıcının HBV bağışıklığı taşınamaması, vericinin anti-HBc ve/veya anti-HBs pozitif olması durumunda, karaciğer nakliyle HBV bulaşma riski %33-100 arasında bildirilmiştir. Verici karaciğerinde HBV DNA'nın bulunması durumunda risk yükselmektedir. Plazmada HBV DNA'nın saptanamaması, karaciğer dokusunda virus bulunmadığının kanıtı değildir. Alıcının anti-HBs pozitif olması durumunda risk azalmaktadır. Genellikle dokuda HBV DNA testi yapılamadan transplantasyon gerçekleştirildiği için, seronegatif transplant adaylarının aşılınması ve anti-HBs yanıtının belirlenmesi önemlidir. Naklin, öncelikle HBsAg pozitif hastaya, ikinci sırada anti-HBs pozitif alıcıya, son seçenek olarak profilaksi altında antiHBc negatif alıcıya yapılması uygun olur. Transplantasyon sonrası uygulanacak profilaksi konusunda uzlaşmış bir öneri bulunmamaktadır.

Söz konusu vericilerin, karaciğer dışı solid organ transplantasyonunda sorun oluşturmadığı, klinik ve biyokimyasal HBV gelişmediği gösterilmiştir. Yine de alıcının HBV'ye karşı doğal bağışık veya aşılı olması ve aşılı olgularda transplantasyona yakın dönemde anti-HBs kontrolü önerilir.

▪ *HBsAg pozitif verici ve karaciğer transplantasyonu:* Bu tip verici, sadece HBsAg pozitif alıcılarda kullanılabilir. Karaciğerde hasarın minimal olması ve vericide viral yükün 10^{2-3} kopya/ml'nin altında olması durumunda kullanılması önerilir. Vericide HCV ve HDV koinfeksiyonu olmamalıdır. Transplantasyon sonrası uygulanan HBIG ve lamivudin tedavisi ile HBV'nin baskılandığı, ancak ciddi HDV infeksiyonu geliştiğine ilişkin olgu sunumu vardır.

▪ *HBsAg pozitif verici ve böbrek transplantasyonu:* Vericide HDV koinfeksiyonu bulunmamalıdır. HBV bulaşma riski, viral yük düzeyi ile ilişkilidir. HBV DNA negatif veya düşük olan vericiden HBsAg pozitif veya anti-HBs ve/veya anti-HBc pozitif alıcıya nakilde genellikle klinik açıdan sorun yaşanmadığı bildirilmiştir. Nakil öncesi organın kan içeriğini uzaklaştıracak yıkama yapılması da bulaşma riskini azaltmaktadır.

▪ *HCV pozitif verici ve karaciğer transplantasyonu:* Anti-HBc sonucu ile yetinilmemesi ve vericide HCV RNA bakılması uygun olur. HCV RNA pozitif vericiden, sadece HCV RNA pozitif alıcıya ve hastanın onayı alınarak organ nakli yapılabilir. Anti-HCV pozitif ancak HCV RNA negatif alıcıya nakil, ancak acil koşullarda yapılmalıdır. Organda hasar olmaması veya az olması önemlidir. Nakil sonrası, bazı alıcılarda kendi genotipinin, bazı alıcılarda vericinin genotipinin baskın olduğu, genotipler aynı bile olsa, bir suşun ön plana geçtiği saptanmıştır. Bazı çalışmalarda genotip 1'in baskın olma özelliği gösterdiği bildirilmiştir.

▪ *HCV pozitif verici ve böbrek transplantasyonu:* RNA pozitif vericiden RNA negatif alıcıya nakil sonucu, alıcıların %56'da RNA pozitifliği saptanmıştır. Suşun virülansının, HCV viral yükünün, alıcının duyarlılığının, organın nasıl saklandığının bulaşma riskini etkilediği düşünülmektedir. Alıcının anti-HCV pozitif olması superinfeksiyonu engellememektedir.

Hepatit A virusu (HAV) ve transplantasyon

▪ Fulminan HAV nedeniyle karaciğer transplantasyonu yapılan sınırlı sayıda olguda, nakilden 2-3 ay sonra serum ve dışkıda HAV RNA'nın saptanması ile infeksiyonun

tekrarladığı gösterilmiştir. Fulminan HAV nedeniyle transplantasyon yapılan olguların, başka bir nedenle açıklanamayan rejeksiyon epizodları, HAV nüksü açısından incelenmeli, bu amaçla HAV RNA testleri kullanılmalıdır.

▪ Transplant alıcılarında, aşı veya infeksiyona bağlı kazanılmış anti-HAV IgG titresi, sağlıklı bireylere göre hızla azalmakta ve birkaç yılda negatifleşebilmektedir. Geçirilmiş infeksiyonla kazanılmış anti-HAV antikorlarının, karaciğer transplantasyon alıcılarının %29'unda (nakil sonrası ikinci yılda); hematopoetik hücre alıcılarının %14'ünde (nakil sonrası birinci yılda) negatifleştiği saptanmıştır. Negatifleşmenin klinik anlamı bilinmemektedir.

KAYNAKLAR

1. Akalin E, Ames S, Sehgal V, Murphy B, Bromberg JS: Safety of using hepatitis B virus core antibody or surface antigen-positive donors in kidney or pancreas transplantation. *Clin Transplant* 2005;19: 364-6.
2. Arslan M, Weisner RH, Poterucha JJ, et al: Hepatitis A antibodies in liver transplant recipients: evidence for loss of immunity posttransplantation. *Liver Transpl* 2000; 6: 191-5.
3. Botero RC: Should patients with chronic hepatitis C infection be transplanted? *Transplant Proc* 2004; 36: 1449-54.
4. Chan TM, Fang GX, Tang CSO, et al: Preemptive lamivudine therapy based on HBV DNA in HBsAg-positive kidney allograft recipients. *Hepatology* 2002; 36: 1246-52.
5. Deschenes M, Laneuville P: Pre-emptive use of lamivudine in bone marrow transplantation with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2004, 39: 867.
6. Dignani MC, Miceli MH, Rosa CM, et al: Loss of hepatitis A virus (HAV) antibodies after peripheral stem cell transplantation (PSCT). *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 809-12.
7. Donataccio D, Roggen F, Reyck CD, et al: Use of anti-HBc positive allografts in adult liver transplantation: toward a safer way to expand the donor pool. *Transpl Int* 2006;19: 38-43.
8. Eisenbach C, Longerich T, Fickenscher H, et al: Recurrence of clinically significant hepatitis A following liver transplantation for fulminant hepatitis A. *J Clin Virol* 2006; 35 109-12.
9. Franchello A, Ghisetti V, Marzano A, et al: Transplantation of hepatitis B surface antigen-positive livers into hepatitis B virus-positive recipients and the role of hepatitis delta coinfection. *Liver Transpl* 2005; 11: 922-8.
10. Garcia-Retortillo M, Forns X, Feliu A, et al: Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *Hepatology* 2002; 35: 680-7.
11. Gürsoy M, Gür G, Arslan H, Özdemir N, Boyacıoğlu S: Interferon therapy in haemodialysis patients with acute hepatitis C virus infection and factors that predict response to treatment. *J Viral Hepat* 2001; 8: 70-7.
12. Günther M, Stark K, Neuhaus R, et al: Rapid decline of antibodies after hepatitis A immunization in liver and renal transplant recipients. *Transplantation* 2001; 71: 477-90.

13. Han DJ, Kim TH, Park SK, et al: Results on preemptive or prophylactic treatment of lamivudine in HBsAg positive renal allograft recipients: comparison with salvage treatment after hepatic dysfunction with HBV recurrence. *Transplantation* 2001; 71: 387-94.
14. Kamar N, Toupance O, Buchler M, et al: Evidence that clearance of hepatitis C virus RNA after interferon therapy in dialysis patients is sustained after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2092-8.
15. Khan N, Aswad S, Shidban H, et al: Improved detection of HCV infection in hemodialysis patients using a new HCV RNA qualitative assay: experience of a transplant center. *J Clin Virol* 2004, 30:175-82.
16. Knoll A, Boehm S, Hahn J, et al: Reactivation of resolved hepatitis B virus infection after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004, 33: 925-9.
17. Knoll A, Pietrzyk M, Loss M, et al: Solid-organ transplantation in HBsAg-negative patients with antibodies to HBV core antigen: low risk of HBV reactivation. *Transplantation* 2005; 79: 1631-3.
18. Lau GKK, He ML, Fong DYT, et al: Preemptive use of lamivudine reduces hepatitis B exacerbation after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Hepatology* 2002; 36:702-9.
19. Lau GKK, Leung YH, Fong DYT et al: High hepatitis B virus (HBV) DNA viral load as the most important risk factor for HBV reactivation in patients positive for HBV surface antigen undergoing autologous hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2002; 99: 2324-30.
20. Marzano A, Lampertico P, Mazzaferro V, et al: Prophylaxis of hepatitis B virus recurrence after liver transplantation in carriers of lamivudine-resistant mutants. *Liver Transpl* 2005; 11: 532-8.
21. Charlton M: Recurrence of hepatitis C infection: Where are we now? *Liver Transpl* 2005; 11: S57-S62.
22. Natov SN, Pereira BJ: Transmission of viral hepatitis by kidney transplantation: donor evaluation and transplant policies (Part 1: hepatitis B virus). *Transpl Infect Dis* 2002; 4: 117-23.
23. Onozawa M, Hashino S, Izumiyama K et al: Progressive disappearance of anti-hepatitis B surface antigen antibody and reverse seroconversion after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with previous hepatitis B virus infection. *Transplantation* 2005; 79: 616-9.
24. Özdoğan O, Ratip S, Ahdab YA, et al: Causes and risk factors for liver injury following bone marrow transplantation. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 421-6.
25. Peffaut de Latour R, Levy V, Asselah T, et al: Long-term outcome of hepatitis C infection after bone marrow transplantation. *Blood* 2004; 103: 1618-24.
26. Perrillo RP: Hepatitis B and renal transplantation: securing the sword of Damocles. *Hepatology* 2002; 36: 1041-5.
27. Ricchiuti A, Brunati A, Mirabella S, et al: Use of hepatitis C virus-positive grafts in liver transplantation: A single-centre experience. *Transplant Proc* 2005; 37: 2569-70.

28. Rostaing L: Treatment of hepatitis C virus infection after renal transplantation: new insights. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15 (Suppl 8): 74-6.
29. Terrault N, Roche B, Samuel D: Management of the hepatitis B virus in the liver transplantation setting: A European and an American perspective. *Liver Transpl* 2005; 11: 716-32.
30. Vargas HE, Laskus T, Wang LF, et al: Outcome of liver transplantation in hepatitis C virus infected patients who received hepatitis C virus-infected grafts. *Gastroenterology* 1999; 117: 149-53.
31. Velidedeoglu E, Desai NM, Campos L, et al: The outcome of liver grafts procured from hepatitis C-positive donors. *Transplantation* 2002; 73: 582-7.
32. No authors listed: Viral hepatitis guidelines in hemodialysis and transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 72-82.

TRANSPLANT ALICILARINDA GÖRÜLEN POLYOMAVİRUS İNFEKSİYONLARI VE TANIDA NÜKLEİK ASİT TESTLERİ

Doç.Dr.Ayşın Zeytinoğlu

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Bornova İzmir

İnsan polyomavirusları olan BKV ve JCV, *Papovaviridae* ailesinin *Polyomavirus* genusunda SV40 (simian vacuolating agent-40) ile birlikte sınıflandırılan çift sarmallı DNA viruslarıdır. Ortalama 40- 45 nm çapında, zarfsız, ikozahedral kapside sahiptirler. BKV, JCV ve SV40 arasındaki DNA homolojisi yaklaşık %70'dir. Hücreye pinositoz ile giren virionların kapsidi soyulduktan sonra nükleik asitlerin çekirdeğe taşınmasıyla replikasyon başlamaktadır. Polyomaviruslar tarafından sentezlenen erken proteinler, tümör antijenleri (büyük-T, küçük-t) olarak bilinmektedir. Virion partikülleri olan VP-1, VP-2, VP-3 ve agnoprotein ise geç proteinlerdir¹⁻³.

JCV ilk kez progresif multifokal lökoensefalopati (PML)'li bir hastanın beyin dokusundan, BKV ise renal transplant alıcısı bir hastanın idrar örneğinden izole edilmiş ve 1971 yılında tanımlanan bu viruslar ilk izole edildikleri hastaların isimlerinin ilk harfleriyle adlandırılmışlardır. Yetişkinlerde polyomavirusların seroprevalansı %70-80'dir^{1,2,4-6}. BKV ve JCV'nin bulaşma yollarında ve enfeksiyonun patogeneğinde tümüyle aydınlatılmamış noktalar vardır. Primer enfeksiyon, çocukluk çağlarında (BKV erken çocukluk ve JCV geç çocukluk) ve genellikle asemptomatik geçirilir^{2,6}. Primer enfeksiyonda virus viremi yaptıktan sonra kanda mononükleer hücrelerle diğer organlara taşınır ve latent enfeksiyona neden olur. BKV böbrekte ve kan hücrelerinde, JCV ise beyin dokusu, böbrek, akciğer ve retiküloendotelial sistemde latent olarak kalır^{2,6}. İmmünoşüpresyon durumunda (transplantasyon alıcıları, HIV/AIDS'liler, onkoloji hastaları), pankreatitte ve gebelikte reaktivasyon olur^{1,2,7}. Enfeksiyon sırasında oluşan humoral immün yanıtı rağmen yüksek antikor titreleri virusun reaktivasyonunu ve idrarla salınımını önleyememektedir. Bu durum hücresel bağışık yanıtın daha büyük önemi olduğunu düşündürmektedir². Sağlıklı bireylerin %30-50'sinin böbrek dokusunda polyomavirus saptanmaktadır^{2,8}.

İmmün şüpresyon polyomavirusların reaktivasyonuna neden olur. Reaktivasyon sonucunda geniş spektrumlu klinik tablolar görülür. JCV'nin sıklıkla etken olduğu PML daha çok HIV/AIDS'li hastalarda (%4-5); BKV'nin etken olduğu polyomavirus nefropatisi (PVN), hemorajik sistit ve üreteral stenoz renal transplant alıcılarında; yine BKV'ye bağlı hemorajik sistit kemik iliği transplant alıcılarında izlenmektedir. Nadiren BKV'nin neden olduğu üriner sistemle ilişkili tablolarda etken JCV, PML gibi daha çok JCV'nin görüldüğü tablolarda da (HIV/AIDS dışı olgularda) BKV etken olabilmektedir^{1,9,10}.

İmmünoşüpresif hastalarda 1980 sonrası HIV epidemisinin başlaması ve transplantasyon alıcılarında son dekatta etkisi yüksek immünoşüpresif ilaçların kullanımı ile özellikle HIV/AIDS tablosunda izlenen PML ve renal transplant alıcılarında izlenen PVN bir çok merkezin araştırma konusu olmuştur. Önceleri tanıda kullanılan idrarda viral sitoloji ve biopsi dokusunda viral histolojik kanıtlar gibi yöntemlerin yerini, idrar/kanda bakılan kantitatif DNA ve idrarda bakılan VP1 mRNA testleri almıştır. Bu hasta grubunda

reaktivasyonla izlenen söz konusu klinik tablolarda, kalitatif nükleik asit testleri ve seroloji tanıda yardımcı olamamaktadır^{1,9}.

“Polyomavirus enfeksiyonu” ve “polyomavirus replikasyonu”, seropozitif transplant alıcılarında sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Bu durumlarda latent virus reaktif olmuş ve replikasyon başlamıştır. Hasta örneklerinde virus varlığı; kültür, elektron mikroskopi, dokuda immünohistokimyasal (IHK) yöntemler ve idrarın sitolojik incelemesi gibi yöntemlerle gösterilebilir. “Polyomavirus hastalığı” ise, histopatoloji ve ultrastrüktüel kanıtlarla polyomavirusun neden olduğu sitopatik doku ve organ hasarıdır. Polyomavirus hastalığına iyi bir örnek olan ve renal transplant alıcılarında görülen PVN gibi durumlarda allograft kaybı %10-100 olduğu için tedavi yaklaşımları önem kazanmaktadır^{1,4}. BKV hastalığı böbrek dışında diğer solid organ transplant alıcılarında nadir olarak izlenmektedir⁹.

Renal transplant alıcılarında PVN prevalansı, değişik çalışmalarda %1-10 olarak bildirilmiştir. Olguların dörtte üçü transplantasyon sonrası birinci yılda, dörtte biri ise birinci yıldan sonra görülmektedir. Olguların >%97'sinde etken BKV'dir. Risk faktörleri arasında; yüksek etkili immünosüpresif ajanlar (mikofenolat mofetil-MMF, takrolimus vb.), alıcının özellikleri (yaş, cinsiyet, seronegatif olma, DM vb), allograft tipi ve virusa ait özellikler yer almaktadır^{1,4}.

Isırcı yüksek düzey viral replikasyon PVN için önemlidir. 2005 yılında hazırlanan konsensus raporunda, renal transplant alıcılarında öncelikle polyomavirus için bir tarama önerilmektedir. Tarama için, idrarda sitoloji (decoy hücreleri), idrarda kantitatif viral DNA veya idrarda kantitatif VP-1 mRNA testleri kullanılabilir. İdrar sitolojisi ile decoy hücrelerinin gösterilmesinin negatif prediktif değeri %100, ancak pozitif prediktif değeri <%30'dır¹. Olgular ilk iki yılda üçer ayda bir, 2-5 yılda ise yılda bir taranır. Bu rutin taramanın yanı sıra allograft disfonksiyonu veya biopsi yapıldığında da ek olarak seçilen yöntemle test yapılmalıdır. Taramada gözlenen pozitiflik, ek kantitatif testlerin yapılmasını gerektirir. Testler; idrarda kantitatif DNA'nın $>10^7$ kopya/ml, idrarda kantitatif VP-1 mRNA'nın $>6.5 \times 10^5$ kopya/ng total RNA veya plazmada kantitatif DNA'nın $>10^4$ kopya/ml olması durumunda PVN için anlamlıdır^{4,11}. İdrarda kantitatif mRNA VP1 ve kanda kantitatif DNA'nın saptanmasında özgüllük ve duyarlılık, her iki test için sırasıyla, %93.8 ve %93.9 ile %85 ve %100 olarak bildirilmiştir¹. Bu durumda PVN için risk yüksektir, tanı için allograft biopsisi yapılır. Kesin tanı, renal biopside polyomavirusa bağlı sitopatik değişikliklerin (tübüler epitel/glomerüler parietal hücrelerde intranükleer inklüzyonlar, tübüler nekroz, interstisyel inflamatuvar infiltrasyon, interstisyum fibrozu, vb) ve viral proteinlerin gösterilmesi ile konur. PVN'de histolojik değerlendirme Bannf şemasına ve PVN histolojik paternlerine (PVN A-C paternleri) göre semikantitatif yapılır^{1,4,12}. PVN tanısı alan hasta, 2-4 haftada bir idrar ve plazma kantitatif nükleik asit testleri ile izlenir. Eşik değer üzeri ısırcı polyomavirus replikasyonunda, yapılan allograft biopsisinin PVN'yi desteklememesi durumunda “preemptif” immünosüpresif ajanlar azaltılır, idrar/plazma kantitatif nükleik asit testleri 2-4 haftada bir yinelenir ve gerekirse biopsi tekrarlanır. Tedavi yaklaşımlarında en sık uygulanan yöntemler; immünosüpresif ajanların kesilmesi, dozlarının azaltılması veya güçlü etkili ajanların daha zayıf etkili immünosüpresif ajanlarla değiştirilmesidir. Son yıllarda ise cidofovir gibi antivirallerin kullanımı ile ilgili çalışmalar sürmektedir^{1,4}. Tedavi değişiklikleri konusunda henüz bir uzlaşma yoktur. PVN'ye bağlı organ kaybında retransplantasyon yapılabilir, ancak pretransplant polyomavirus replikasyonunun olmadığı gösterilmesi ve posttransplant polyomavirus replikasyonunun taraması yapılmalıdır^{1,4,13}. PVN tanısı almış allograft

böbreğin nefrektomisi ile BKV viral yükü üç gün içinde hızla düşmektedir, bu da yine BKV viral yükünün allograft ile ilişkisini net olarak göstermektedir^{6,9}.

Renal transplantasyon alıcılarında PVN tanısı için nükleik asit testlerinin yeri aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. Virus replikasyonunun saptanması için tarama (ilk 2 yıl 3 ayda bir, 2-5 yılda her yıl),
2. Tarama pozitif olan olgularda, plazmada kantitatif eşik değeri üzeri DNA varlığı ve idrarda kantitatif eşik değeri üzeri VP-1 mRNA varlığı ile muhtemel PVN olgularının saptanması,
3. Allograft biopsi ile PVN tanısı alan olguların prognoz ve tedavilerinin izlenmesi (2-4 haftada bir),
4. Retranplant düşünülen olgularda PVN'nin iyileştiğinin kanıtlanması ve retransplantasyon sonrası taramalarının yapılması.

Bazı araştırmacılar allograft biopside kantitatif BKV DNA veya mRNA'nın PVN için erken bir bulgu olmasından söz etmektedirler. Ancak biopsinin invazif bir işlem olması ve histolojik/ histokimyasal değerlendirmelerin tanı koydurucu olması nedeniyle bu yöntem çok benimsenmemiştir^{9,12}.

Kantitatif DNA amplifikasyon testlerinde büyük T antijen gen bölgesi ile VP-1/VP-2/VP-3 gen bölgesi, araştırmacılar tarafından kullanılan hedef bölgelerdir. Planlanan yöntemde BKV, JCV veya polyomavirus hedef bölgeleri seçilir. Eğer polyomavirus saptanmasında seçilen bölgede BKV ve JCV ayrımı yapılabiliyorsa, her iki virüsü de saptamak mümkün olmaktadır (real-time PCR'da erime eğrisi analizi, sekans analizi, vb.)^{4,7,11,12,14}.

Kantitatif DNA yöntemlerinde preanalitik koşulların, protokollerin, kantitasyonların standardizasyonu ve yine amplifikasyon inhibisyonu gibi sorunların çözümü için standardizasyonların yapılması gerekmektedir. Bu sorunlar şu şekilde sıralanabilir:

- a. İdrarda kantitatif DNA saptama yöntemlerinde, idrarın pelletinin, süpernatantının veya resüspansiyonunun kullanılması farklı değerlerin elde edilmesine neden olmakta ve benzer çalışmalarla karşılaştırılmasını olanaksız kılmaktadır.
- b. Üriner hücre pelleti kullanılarak yapılan nested PCR yöntemi, latent genomun da saptanması nedeniyle testin pozitif prediktif değerini düşürmektedir.
- c. İdrarda kantitatif VP-1 mRNA çalışmalarında, ilk basamaktaki RNA eldesinin saflığı, kontaminasyonla (üriner sistem hücrelerinden) yalancı pozitifliklere neden olabileceği için önemlidir.
- d. PVN olgularının üriner BKV salınımına karşın plazmada BKV DNA'nın saptanamaması, amplifikasyonda bir etkinlik düşüklüğünü gösterebileceği gibi, primerin hedeflediği bölgenin mutasyonu veya BKV replikasyonunun söz konusu olduğu bir durumda farklı bir viral etkenin (JCV gibi) etiyolojik ajan olmasına bağlı olabilir⁹.

KAYNAKLAR

1. Kazorsky A, Ducloux D: Renal transplantation and polyomavirus infection: recent clinical facts and controversies. *Transpl Infect Dis* 2003; 5: 65-71.
2. Shah KV: Polyomaviruses, p. 2027. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds), *Virology*. 3rd ed, 1996. Lipincott-Raven Publishers, Philadelphia.
3. Shah KV: Human polyomavirus BKV and renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 754-5.
4. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, et al: Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation* 2005; 79: 1277-86.
5. Mengel M, Marwedel M, Radermacher J, et al: Incidence of polyomavirus-nephropathy in renal allografts: influence of modern immunosuppressive drugs. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1190-6.
6. Nিকেleit V, Klimkait T, Binet IF, et al: Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. *N Engl J Med* 2000; 342: 1309-15.
7. Leung AY, Chan M, Tang SC, Liang R, Kwong YL: Real-time quantitative analysis of polyoma BK viremia and viruria in renal allograft recipients. *J Virol Method* 2002; 103: 51-6.
8. Boldorini R, Veggiani C, Barco D, Monga G: Kidney and urinary tract polyomavirus infection and distribution. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129: 69-73.
9. Hirsch HH, Steiger J: Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 611-23.
10. Randhawa P, Baksch F, Aoki N, Tschirhart D, Finkelstein S: JC virus infection in allograft kidneys. *Transplantation* 2001; 71: 1300-3.
11. Ding R, Medeiros M, Dadhania D, et al: Noninvasive diagnosis of BK virus nephritis by measurement of messenger RNA for BK virus VP1 in urine. *Transplantation* 2002; 74: 987-94.
12. Manon RB, Hoffman SC, et al: Molecular evaluation of BK polyomavirus nephropathy. *Am J Transpl* 2005; 5: 2883-93.
13. Hirsch HH, Ramos E: Retransplantation after polyomavirus-associated nephropathy: just do it? *Am J Transpl* 2006; 6: 7-9.
14. Merlino C, Bergallo M, Gribaudo G, et al: Polyomavirus BK DNA quantification assay to evaluate viral load in renal transplant recipients. *J Clin Virol* 2003; 28: 265-74.

ROLE OF BACTERIAL MOBILE DNA IN THE EMERGING MULTI-RESISTANCE TO ANTIBIOTICS

Thierry Naas

*Service de Bactériologie-Virologie, Hôpital de Bicêtre,
Assistance Publique/Hôpitaux de Paris, Faculté de Médecine Paris-Sud,
Université Paris XI, 94275 K.-Bicêtre, France*

Among the most important issues of clinical microbiology, increasing prevalence of bacterial pathogens expressing resistance to multiple antimicrobial agents is of special concern. The observed high frequency of multiresistance suggests mechanisms by which bacterial species can concentrate and efficiently exchange a variety of resistance determinants. The basic mechanisms of antibacterial resistance are well known, but novel contributing mechanisms have been discovered. Recently discovered factors with major implications for the emergence, dissemination, and maintenance of resistance include multidrug efflux, hypermutability, integrons, and insertion sequence-mediated gene mobilisation. Horizontal gene transfer has been proposed as a fundamental process underlying bacterial diversity. Transposons, plasmids and phages are widespread and have been shown to significantly contribute to lateral gene transfer. Recent discoveries about the integron/gene cassette system indicate it has the potential to play a role in this process. Gene cassettes are small mobile elements typically consisting of a promoterless ORF and a recombination site. Integrons are capable of acquisition and re-arrangement of gene cassettes and of the expression of their associated genes. The potential of the integron/gene cassette system is thus largely determined by the diversity contained within the cassette pool and the rate at which integrons sample this pool. Class 1 integrons are the most abundant in antibiotic-resistant clinical isolates, and possess two conserved segment (5'-CS and 3'-CS) located on either side of the integrated gene cassettes. The 5'-CS includes, *intI1*, a gene encoding an integrase and the promoters P_{ant} and sometimes P2 that are responsible for gene cassettes expression. Integrons are defective transposons unable of self-transposition. However, they are often located on transposons such as the Tn21-derivatives, on conjugative plasmids and rarely bracketed by two insertion sequences (IS26) forming a composite transposon. More than fifty different gene cassettes have been described in Gram negative rods (but also in Gram positive bacteria), encoding mostly antibiotic resistance genes that may lead to therapeutic failures. Among these latter the most worrisome are those encoding resistance genes to beta-lactams, such as class A ESBLs, VEB-1, GES-1, GES-2 or class B carbapenemases, such as VIM-, IMP- and SPM-like enzymes.

Bacterial insertion sequences (IS) are small DNA segments (<2.5 kb) with a simple genetic organisation. Most IS elements exhibit short terminal inverted-repeat sequences (IR) and encode a transposase, an enzyme that is required for transposition. These mobile elements play an important role in assembling sets of "accessory" functions in bacteria (such as genes forming parts of degradative or catabolic pathways) and in dissemination of resistance genes. By inserting within a coding sequence they may inactivate the gene, or by inserting upstream of a gene they may modify its expression. ISs may also help integration of plasmids into the chromosome of bacteria. Two ISs may also form a composite transposon, being capable of carrying the sequence located between the two ISs. Some ISs, are capable of mobilising nearby DNA, by a mechanism

similar to one-ended-transposition. The association of integrons with transferable elements may promote rapid dissemination among clinical strains, and create further opportunities for inclusion of additional resistance determinants. Recently novel ORFs (ORF513) have been described as being capable of mobilising resistance genes through a transposition/recombination process that still needs to be fully understood.

In order to illustrate these different mechanisms several examples will be taken in clinically relevant bacterial species: *Enterococci*, *Staphylococci* and Gram negative rods. The evolution of the resistance to antibiotics in *Staphylococcus aureus* and enterococci illustrates very well the ongoing process of bacterial evolution. The emergence of vancomycin resistance in these strains represent an additional step towards pan-resistance. Among Gram-negative rods, the main mechanism of resistance to beta-lactam antibiotics is related to production of beta-lactamases. These enzymes have been divided into four molecular classes (A, B, C and D) based on their protein sequence identity. Among Ambler class A enzymes, two phenomena have been observed that lead to resistance to broad spectrum cephalosporins: (i) point mutations occurring into sequence of narrow-spectrum enzymes (TEM or SHV) and (ii) appearance of novel plasmid-encoded genes that hydrolyse broad-spectrum cephalosporins, such as CTX-M-type enzymes, VEB-1, GES-1, BES-1, TLA-1 and the carbapenemases NMC-A, Sme-1, IMI-1, KPC-1/2 and GES-2 in *Enterobacteriaceae*, *P.aeruginosa* and *A.baumannii*. Class B carbapenemases are naturally chromosome-encoded and restricted to some bacterial species that are not clinically significant. However, some plasmid-encoded enzymes are emerging worldwide. IMP-, VIM- and SPM- beta-lactamases, and are reported mostly in *P.aeruginosa* and *Enterobacteriaceae*. Class C enzymes, naturally chromosome-encoded, are present in many environmental Gram-negative species. Up-regulation of their expression may confer also resistance to broad spectrum cephalosporins, by either mutations in their regulator gene or by increasing their copy number once located onto plasmids. Class D enzymes, also known as oxacillinases, have been reported to hydrolyse carbapenems in *A.baumannii* and to hydrolyse broad-spectrum cephalosporins in *P.aeruginosa*. In many cases, the disseminating beta-lactam resistance genes are associated to non-beta-lactam resistance genes, thus providing the genetic background of multiresistant phenotypes.

As a conclusion, microbiologist should always keep in mind that bacterial evolution is inescapable and that hospitals are the ideal setting for their selection.

REFERENCES

1. Appelbaum PC: The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 16-23.
2. Bush K: New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis 2001; 32: 1085-9.
3. Colak D, Naas T, Gunseren F, Fortineau N, Ogunc D, Gultekin M, Nordmann P: First outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital in Turkey. J Antimicrob Chemother 2002; 50: 397-401.
4. Livermore DM: Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. Clin Infect Dis 2003; 36: S11-23.
5. Mahillon J, Leonard C, Chandler M: IS elements as constituents of bacterial genomes. Res Microbiol 1999; 150: 675-87.

6. Naas T, Fortineau N, Snanoudj R, Spicq C, Durrbach A, Nordmann P: First nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* expressing a *VanD*-like phenotype associated with a *vanA* genotype. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3642-9.
7. Naas T, Fortineau N, Spicq C, Robert J, Jarlier V, Nordmann P: Three-year survey of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin in a French university hospital. *J. Hosp Infect* 2005; 61: 321-9.
8. Nordmann P, Poirel L: Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 321-31.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Bornova, İzmir

Hepatit B virusu (HBV), *Hepadnaviridae* ailesi içinde, memelileri infekte eden Orthohepadnavirus genusu içinde yer alır. HBV, zarflı, kısmen çift sarmallı DNA'sı olan prototipik bir *Hepadnaviridae* üyesidir. HBV DNA'sı genotiplere göre değişmekle birlikte ortalama 3200 baz uzunluğundadır. Diğer DNA viruslarına göre küçük olan bu viral DNA'dan birbirleriyle örtüşen açık okuma çerçeveleri sayesinde dört gen kodlanır: S geni (S), çekirdek (kor) geni (C), polimeraz geni (P) ve X geni (X). S geninden üç farklı başlama kodonundan okuma başlatılarak üç protein kodlanır. Bu gen bölgeleri sırasıyla pre-S1+pre-S2+S, preS2+S ve S'dir. Bu gen bölgelerinden sırasıyla büyük (L), orta (M) ve küçük S proteinleri sentezlenir. Küresel ve tübüler formda olan bu HBsAg proteinleri genom içermeyen şekillerde bol miktarda dolaşımda bulunur. Genomu ile birlikte tam olan virüs partikülüne (virion) Dane partikülü denir. Polimeraz enziminin DNA'ya bağımlı polimeraz, tersine transkriptaz (reverse transcriptase; RT) ve RNA-DNA hibridinde RNA'yı parçalayan RNaz H etkileri bulunan bölümleri vardır. Ayrıca transkripsiyonda öncül (primer) görevi gören uç (terminal) protein (TP) bölümü vardır. Polimeraz, DNA'nın negatif sarmalının 5' ucuna bağlıdır, fakat pozitif sarmalın 3' ucuna uzaması için etki eder.

HBV replikasyonu

HBV, konak hücreye zarfını dışarıda bırakarak girer ve sitoplazmada kapsitten soyulur. Nükleus içinde iki DNA sarmalı tamamlanarak uçları kapanır ve kovalen bağlarla kapalı dairesel DNA şeklini alır (covalently closed circular; cccDNA). HBV replikasyonu sırasında diğer DNA viruslarından farklı olarak nükleusda ara bir RNA transkripti (pregenomik RNA) sentezlenir, viral RT aktivitesi ile bu RNA'dan negatif DNA sarmalı sentezlenir, ardından pozitif sarmal sentezlenir, ama tamamlanamadan sentez durur, endoplazmik retikulumda sentezlenen zarf glikoproteinlerinin konaktan sağlanan lipid tabakası ile çevrelenmesi ile virion oluşur. Hepatositlerde pregenomik RNA ve cccDNA saptanması HBV replikasyonunun kanıtıdır. Serumda da cccDNA gösterilmiştir, ancak anlamı henüz açıklanamamıştır.

HBV'nin genetik değişkenliği

Revers transkriptaz enziminin yüksek mutasyon sıklığı (10^{-5} - 10^{-6} /bölge/yıl) özelliği nedeniyle HBV genomunda mutasyonlara sık rastlanır (doğal polimorfizm). HBV genomunun nükleik asit dizisinde %8'den fazla farklılık gösterdiği 8 genotip tanımlanmıştır (A-H). Tüm genomda %4-8 farklılık gösteren gruplar; alt grup (subgenotip) olarak adlandırılır (A1,2; B1-4; C1-4; D1-4; F1,2). Bu gruplar içinde %4'den az farklılık olanlar ise topluluk veya küme (clade) olarak tanımlanır¹.

Coğrafik olarak bir bölgede baskın bulunan HBV izolatları vahşi tip (prototip) olarak anılır. Ancak doğal olarak virus popülasyonunda genomun çeşitli bölgelerinde mutasyonlar bulunan farklı izolatlar vardır. Antiviral tedavi veya immün baskı (örneğin hiperimmün globulin, aşı) gibi nedenlerle vahşi virustan farklı dizilere sahip viruslar seçilebilir. Bu izolatlar varyant veya mutant olarak tanımlanır; genelde fonksiyonel olarak biyolojik özelliği değişmiş veya fenotipik olarak ilaç direnci ile ilişkisi kanıtlanmış varyantlar mutant olarak bilinir. Mutantların tanımlanmasında, amino asitlerin ait oldukları protein kısaltması ve amino asit numarasının kullanılması önerilir (rt, tp, rh, s, c, x)^{2,3}. HBV genomunun polimeraz bölgesi, çekirdek bölgesine ait mutasyonlar ve delesyonlar,

S bölgesi (pre-S1 ve pre-S2 dahil), bazal kor promoter ve pre-kor mutasyonları araştırılmış, fonksiyonel analizlerine ilişkin yayınlar yapılmıştır.

HBV genomunun incelenmesinde, mutasyonların etkisini araştırmak için fenotipik analiz gereklidir. Bir mutasyon, farklı genler üzerinde birden çok etkiye sahip olabilir. Etkinin ortaya çıkması için kombinasyonlar gerekli olabildiğinden, tüm genomun fonksiyonel analizi önem kazanır. Bir genin klonlanması ve ekspresyonu, tüm genomdaki fonksiyonunu göstermeyebilir. Bu nedenle HBV kökenlerinin replikasyon etkinliğini ve proteinlerin salınmasını araştırmak için HBV genomlarının tamamının incelenmesi gerekebilir. Gunther ve arkadaşları⁴, hastaların serum veya karaciğer dokularından izole edilen HBV genomlarının tamamının, bir amplifikasyonda çoğaltılıp klonlanarak nükleik asit dizisini araştırabilmeyi sağlayan bir yöntem tanımlamışlardır. HBV'nin tüm genomu karaciğerden elde edilen hücre dizilerini transfekte etmede kullanılır ve viral genlerin ekspresyon ve replikasyon özellikleri araştırılabilir.

Virus – hücre ilişkisi önemlidir. Konak hücrelere ait özellikler etkili olabilir. Mutantların etkinliğinin en sık sorgulandığı alanlar; fulminan hepatit B, fulminan seyreden alevlenmeler ve hepatoselüler karsinom olmuştur.

HBV genomunda mutasyonların etkileri araştırılırken; hücreye tutunma basamağından başlayarak hücreden salınmaya kadar her aşama anlamlı olabilir: Transkripsiyon, translasyon, enkapsidasyon, immunojenite. Tahmin edilen amino asit dizilerinin dışında başka fonksiyonel domenler olabilir. Bu nedenle tüm genomun transfeksiyonu önem kazanır. Translasyon ürünlerinin ikincil yapılarındaki değişiklikler protein etkinliğini değiştirebilir. Genom incelemesi ile yapılan yapısal analiz biyolojik çalışmalarla doğrulanmalıdır⁵.

Mutantların patogenezi ve klinik anlamının ortaya konmasının yanı sıra, pratikte en güncel olan tedaviye direnç ile ilişkili mutantların tanımlanabilmesi için, önce in-vitro ortamlarda transfeksiyon çalışmaları ile fenotipik olarak kanıtlanması gerekir.

KAYNAKLAR

1. Kramvis A, Kew M, François G: Hepatitis B virus genotypes. Vaccine 2005; 23: 2409-23.
2. Norder H, Courouce M, Coursaget P, et al: Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. Intervirology 2004; 47: 289-309.
3. Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, et al. and the HEP DART International Committee: Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. Hepatology 2001; 33: 751-7.
4. Gunther S, Li BC, Miska S, Kruger DH, Meisel H, Will H: A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. J Virol 1995; 69: 5437-44.
5. Wen YM : Structural and functional analysis of full-length hepatitis B virus genomes in patients: implications in pathogenesis. Gastroenterol Hepatol 2004; 19: 485-9.

HEPATİT B VİRUS İNFEKSİYONLARINDA ANTİVİRAL İLAÇ DİRENCİ

Prof.Dr.A.Mithat Bozdayı

Ankara Üniversitesi, Hepatoloji Enstitüsü, Ankara Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Ankara

Yeni nükleozid analoglarının geliştirilmesi ile ilaç direncinin kontrolü ve önlenmesi, hepatit B virus (HBV) infeksiyonlarının antiviral tedavisinde en önemli sorunlarından biri olarak ortaya çıkmıştır. Nükleozid analoglarının potansiyel bir tedavi stratejisi olarak kronik B hepatiti tedavisinde kullanımı yaklaşık 15 yıl önce başlamıştır. Bununla birlikte interferon, yaklaşık 10 yıl tek kullanım seçeneği olan bir antiviral olarak kullanılmaya gelmiştir. Son yıllarda, bir deoksitidin analogu olan ve doğal olmayan L-konfigürasyon yapısı ile lamivudin, HBV infeksiyonlarında onaylanarak kullanıma sunulmuştur. Lamivudin, HBV'ye karşı secici ve potansiyel etkisi ile kronik HBV infeksiyonu tedavisinde çok önemli bir kilometre taşı olmuştur. Kısa dönem etkisine rağmen, lamivudin monoterapisi uzun dönemde ilaç direnci sorunu oluşturmaktadır. Şu anda yeni nükleozid analoglarının anti-HBV etkinliği, farklı araştırma fazlarında değerlendirilmektedir.

HBV virolojisi

HBV, insanlarda infeksiyona neden olan en küçük DNA virusudur. HBV genomu kısmi olarak çift sarmallıdır ve yaklaşık 3200 baz uzunluğundadır. HBV, kendi sınırlı kodlama kapasitesini çok ekonomik olarak kullanır. Genomunun küçüklüğüne rağmen 4 protein kodlar. Bunlar; yüzey, kor, polimeraz ve X proteinleridir. HBV, pregenomik RNA aracılığı ile replike olur.

HBV'nin yaşam siklusu antiviral stratejilerin geliştirilmesinde kritik öneme sahiptir. Viral partiküllerin konak hücre duvarına adsorpsiyonu ve penetrasyonunu takiben, kılıfından kurtulan genom, kısmi çift sarmalın tamamlanacağı hücre nükleusuna taşınır. Bu yapı cccDNA'yı oluşturur. Viral cccDNA, hücre nükleusu içinde yer alacak ve HBV RNA üretimi için kalıp fonksiyonu göreceği şekilde mini kromozomlar oluşturur. Viral mini kromozomların transkripsiyonu ve oluşumu tamamen konak hücre enzimlerine bağımlıdır. Viral mRNA'lar, translasyonun, replikasyonun ve nükleokapsid oluşumunun gerçekleştiği sitoplazmaya taşınırlar. Olgunlaşmış nükleokapsidler iki yol izlerler; ya nükleus içine tekrar girerler, ya da endoplazmik retikulum içinde kılıf sahibi olarak hücre dışına sekrete edilirler.

HBV, bir pregenomik RNA aracılığı ile replike olur ve lamivudin, replikasyonu çeşitli basamaklarda zincir sonlanması prensibi ile baskılar. Bununla beraber cccDNA üzerine bir etkisi yoktur. HBV replikasyonunun hepatosit içinde primer olarak cccDNA'dan başlaması nedeniyle HBV DNA, tedavinin kesilmesini izleyen süre içerisinde serumda tekrar saptanabilir düzeye erişir. Bu nedenle lamivudin ile uzun süreli tedavi, düşük viral yük düzeyinin sağlanması ve infekte olmuş hepatositlerin konağa ait immün yanıt ile eradikasyonunu sağlar. Fakat uzun süreli bu tedavi stratejisi sıklıkla direnç gelişimi sorununu da beraberinde getirmektedir.

Nükleozid ve nükleotid analogları, aktif viral replikasyonunu baskılamakla beraber hiçbir cccDNA üzerine etkili değildir. Fakat, infekte olmuş hücre nükleusuna tekrar girerek cccDNA birikmesine neden olacak yeni viral genomların oluşumunu bloke ederler.

Hepadnavirus infeksiyonunun ortadan kaldırılmasında ve cccDNA'nın yok edilmesinde rol oynadığı düşünülen iki olası yol vardır; a) hücre içindeki virusun sitokin aracılı hücre yıkımına neden olmaksızın temizlenmesi, b) infekte hücrelerin T hücre aracılı yıkımı.

Ters transkriptaz inhibitörleri cccDNA rezervuarına etki etmediklerine göre, nükleozid ve nükleotid analogları viral yükü, konak immün sistemine ait mekanizmaların geride kalmış infeksiyonu temizleyebilecekleri bir düzeye indirebilmelidirler.

Direnç

İlaça dirençli HBV dizilerinin biyolojisi ve bu viruslarla persistan infeksiyon sonuçları hakkındaki bilgiler çok azdır. Bazı çalışmalar, ilaca dirençli HBV dizilerinin in-vitro ortamda replikasyonlarının azalmış olduğunu gösterebilirler de, bu HBV dizilerinin daha az patolojik olduğu sonucuna ulaşmak oldukça zordur. Bununla beraber başlangıçta bu yönde bir yaklaşım genel kabul görmüştür. HIV infeksiyonlarından elde edilen deneyimler, ilaca dirençli viral dizilerin hastalığın gelişiminde önemli rol oynayabileceğini göstermektedir.

Hem virus hem de konağa ait faktörler, kronik infeksiyon sürecinde HBV viral genetik heterojenite oluşumuna etki eden faktörlerdir.

Antiviral ilaç direnci; viral mutasyon frekansına, antiviral için seçilmiş hedef bölgenin içsel mutasyona uğrama özelliğine, anti-viral ilaç tarafından oluşturulan seçici baskıya ve virus replikasyon oranına bağlı olarak belirlenir. Replikasyon uyumu ve replikasyon aralığı da direnç gelişimini belirleyen ana etkenlerdendir.

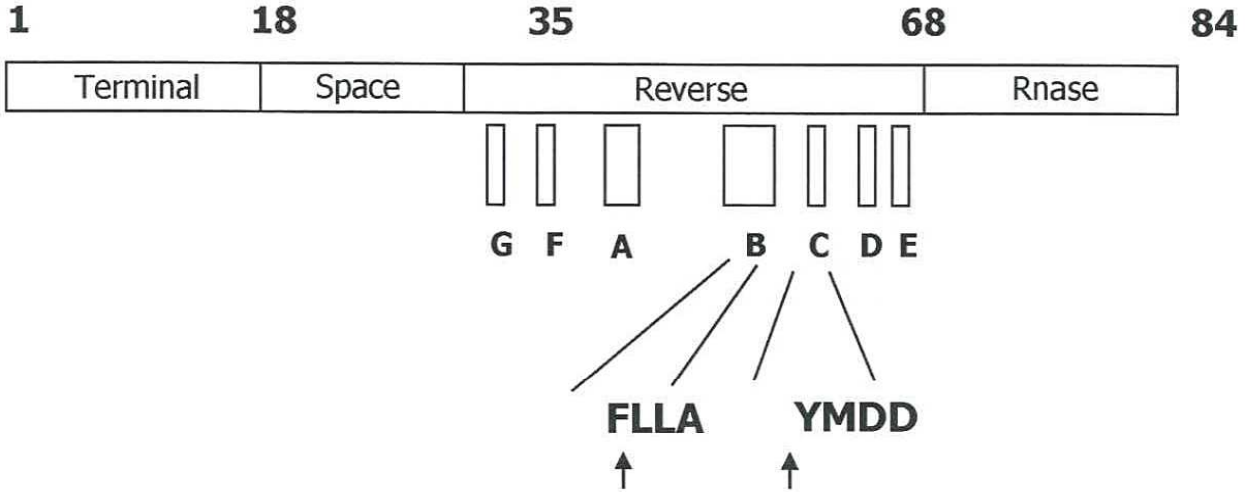
HBV'un sahip olduğu polimerazın doğrulayıcı aktivitesi, yani 3' -5' ekzonükleaz aktivitesi yoktur. Bir başka deyişle HBV polimeraz yanlış sokulmuş dNTP'leri uzaklaştırabilir. HBV'de virion üretimi, HIV ve HCV virion üretimi ile karşılaştırıldığında daha yüksektir. Yüksek virion üretimi ve HBV polimeraz hata oranı birlikte bir viral genetik heterojenite yaratmak için yeterlidir (virion üretimi: 10^{11} - 10^{12} virion/gün; polimeraz hata oranı: 10^{-7} değişim/nükleotid/gün; baz çiftleşme hatası: 10^7 nükleotid/gün). HBV'nin yaşam siklusu ve kinetiği ile ilgili bilgiler HBV infeksiyonunun doğal seyri ve klerensi ile ilgili modellerin oluşturulmasında kullanılır.

İlaça dirençli HBV dizilerinin ortaya çıkması ve çoğalması immün sistemin ve anti-viral ilaçların seçici baskısı altında gelişir. Lamivudin tedavisi altında HBV viral yükü monitorize edildiğinde, viral yükteki düşüşte iki faz saptanmaktadır. Birinci faz; virusun plazmadan temizlenmesine işaret ederken, ikinci faz infekte hücrelerin kaybına işaret eder.

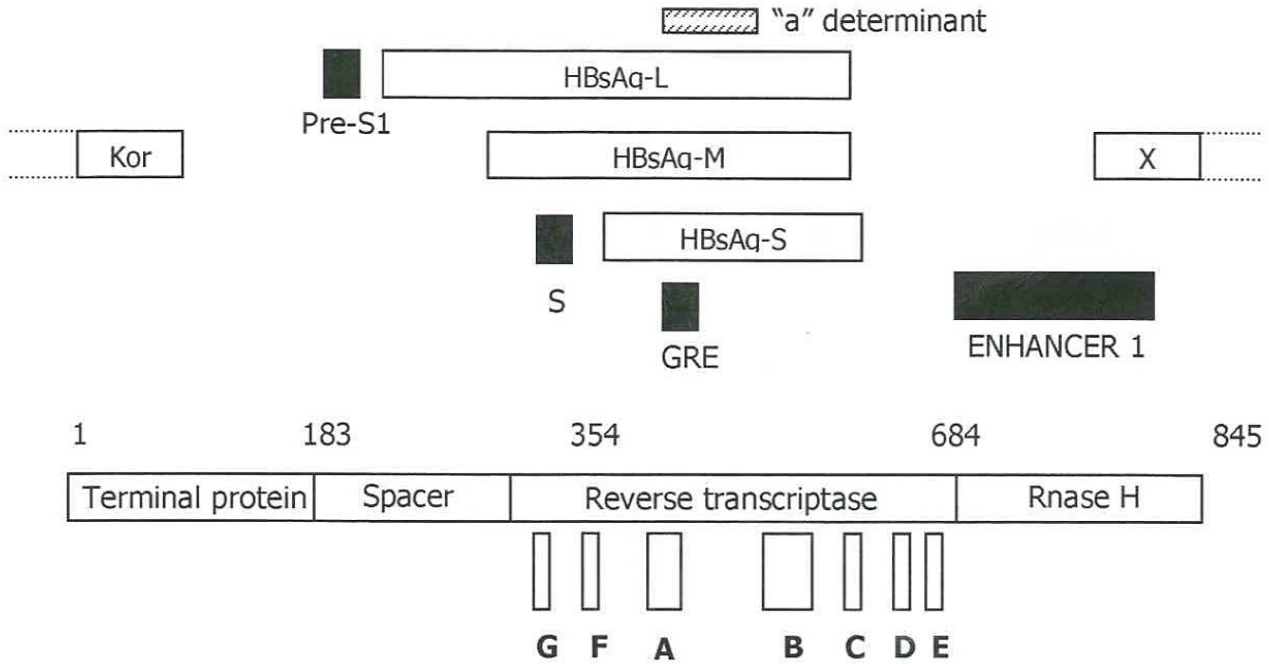
Anti-viral direnç gösteren HBV dizilerinin replikasyonlarında hasar olduğu ve daha az uyum gösteren dizilerin olduğu bir süre genel olarak kabul görmüş ise de, gerçek tam olarak böyle değildir. Bu dizinlerle devam eden infeksiyonlarda histopatolojik bozulmanın devam etmekte olduğu ve HIV infeksiyonlarındaki benzer durumlarda hastalığın ilerlediği gösterilmiştir. İlaça dirençli HBV popülasyonları, herhangi bir anti-viral tedavi almamış kişilerde de görülebilmekte ve anti-virallerin seçici baskıları altında bazı dizinler seçilebilmektedir. Dirençli dizilerin replikasyon hasarlı olduğu varsayılırsa, ikincil bazı mutasyonların replikasyon restorasyonuna telafi edici bir şekilde katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür. Viral replikasyonu tamamen veya kısmen düzelten olası mutasyon

paternleri şunlardır: G145R (yüzey geni), D144E/D145R (yüzey geni), rtL80I/V, rtV173L, Pre-S1 genindeki delesyonlar ve pre-kor stop kodon mutasyonları.

HBV polimeraz, hem RNA hem DNA bağımlı polimeraz olarak fonksiyon görür. Dört farklı fonksiyonel bölgesi vardır: 1) "Priming" bölgesi, 2) Herhangi bir enzimatik fonksiyonu bilinmeyen "Spacer" bölgesi, 3) DNA ve RNA bağımlı DNA polimeraz aktivitesi olan ters transkriptaz enzimi, 4) RNaz H aktivitesinden sorumlu bölge. Ters transkriptaz bölgesi diğer polimerazlarda da iyi korunmuş 5 bölge içerir. Son zamanlarada 2 bölge daha tanımlanmıştır. A, C ve D; dNTP bağlanması ve katalizi ile ilgili iken, B ve E bölgelerinin kalıp primer pozisyonlanması ile ilgili olduğu sanılmaktadır.



HBV polimeraz; HBsAg bölgesi ile tam olarak, X ve kor bölgesi ile kısmi olarak çakışmaktadır. *Pol* geni ters transkriptazının yüzey geni ile tam olarak çakışması, *pol* genindeki değişikliklerin yüzey geninde de değişikliğe yol açmasına neden olur. Yüzey genindeki bu değişikliklerin virusun yaşam siklusunu etkileyebilecek değişiklikler olması olasıdır.



RT bölgesinin C subdomaini polimeraz aktivitesi için gerekli olan ortak bir YMDD (tirozin-metionin aspartat-aspartat) motifine sahiptir. Bu motif tüm hepadnavirus polimerazlarında ve HIV ters transkriptazlarında çok iyi korunmuş durumdadır (Tablo 1).

Tablo 1. Hepadnavirus polimerazlarında ve HIV ters transkriptazlarındaki motifler

Virus	Amino asit pozisyonu	Amino asit dizisi	Gen bankası no.
DHBV-16	508-517	TFTYMDDFLL	K01834
HHBV	510-519	TFSYMDDFLL	M22056
HBV 991	548-557	AFSYMDDVVL	X51970
WHV 2	584-593	VFAYMDDLVL	M11082
GSHV BA 131	582-591	AFAYMDDLVL	K022715
ASHV	579-588	AFAYMDDLVL	U29144
HIV1	181-190	IYQYMDDLVI	K02013

Korunmuş YMDD bölgesi polimerazın katalitik domaini içerisinde yer alır ve nükleotid bağlanmasından sorumludur. İlk iki amino asit YM kalıp primer etkileşiminde rol oynarken, iki amino asit M dNTP bağlanmasında kritik bir rol oynar.

Şimdiye kadar lamivudine direnci belirleyen 6 ana mutasyon paterni tanımlanmıştır. Lamivudine direnç gösteren majör mutasyonlar Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Lamivudine direncini belirleyen mutasyon paternleri

Patern no.	HBV pol değişimleri	HBsAg değişimleri
1	rtL180M + rtM204V	(NC) + (I195M)
2	rtM204I	(W196S;W196L)
3	rtL80V/I + rtM204I	(NC) + (W196S;W196L)
4	rtL180M + rtM204I	(NC) + (W196S;W196L)
5	rtV173L + rtL180M + rtM204V	(E164DL)+(NC)+(I195M)
6	rtL180M + rtM204S	(NC) + (W196V; W196A)

Hemen çoğu, YMDD motifinde ve B domainin 180. kodonunda yer alan çiftli mutasyonlardır. Moleküler modelleme çalışmaları, daha önce de belirtildiği gibi rtM204 amino asidinin zincir uzamasına sokulacak dNTP ve kalıp bağlanması ile düzgün geometrik konumlanmada rol oynadığını göstermiştir. RT enziminin nükleotid bağlama kapasitesi rtM204V/I varyantları oluştuğunda bozulur.

Valin veya izoleüsinin metil grupları ile lamivudinin yapısındaki sülfür atomları arasında “steric hindrance-üç boyutlu saklanma) meydana gelir. “Steric hindrance” ile ilgili olan direnç, L-nükleozidlerin genel bir problemi gibi gözükmektedir.

Diğer anti-HBV ajanların majör lamivudine dirençli mutasyon paternlerine olan etkisi in-vitro çalışmalarda sınanmış ve adefovir ile DAPD bu dizinlerde başlıca etkili ajanlar olarak saptanmışlardır.

Adefovire direncinin özellikleri

- Adefovir direnci nadir görülmektedir (%2.5/yıl).

- HBV polimerazda yeni bir mutasyon paterni dirence neden olur: rtN236T (asparajinden treonine değişim)
- Adefovir difosfat, doğal substratı dATP ile çok fazla benzerlik gösterir.
- Asiklik yapısı "steric hindrance" oluşumunu engelliyor olabilir.

Anti-viral dirençli HBV dizinlerinin saptanması

1. Genotipik yöntemler

- DNA dizi analizi
 - PCR ürünlerinin DNA dizi analizi
 - Klonlanmış dizinlerin DNA dizi analizi
- Line prob assay
- PCR-RFLP
- Gerçek zamanlı PCR

2. Fenotipik yöntemler

İlaca dirençli HBV dizinlerinin biyolojik özelliklerinin çalışılmasında kullanılan teknikler

- Hayvan hepadnavirus modelleri
 - "Woodchuck" hepatit virusu
 - "Duck" hepatit B virusu
- Transfeksiyon temelli modeller
 - Geçici transfeksiyon
 - HBV eksprese eden stabil hücre dizinleri
 - "HBV-baculovirus" rekombinantları
- Hücreden yoksun enzim deneyleri

KAYNAKLAR

1. Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, et al: Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. *Hepatology* 1998; 27: 1670-7.
2. Angus P, Vaughan R, Xiong S, et al: Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterol* 2003; 125: 292-7.
3. Balzarini J, Naesens L, Herdewijn P, et al: Marked in vivo antiretrovirus activity of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl) adenine, a selective anti-human immunodeficiency virus agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 332-6.

4. Bozdayı AM, Eyigün CP, Türkyılmaz AR, Avcı IY, Pahsa A, Yurdaydın C: A novel pattern (sW195A) in surface gene of HBV DNA due to YSDD (L180M plus M204S) mutation selected during lamivudine therapy and successful treatment with adefovir dipivoxil. *J Clin Virol* 2004; 31: 76-7.
5. Bozdayi AM, Uzunalimoglu O, Turkyilmaz AR, et al: YSDD: a novel mutation in HBV DNA polymerase confers clinical resistance to lamivudine. *J Viral Hepat* 2003; 10: 256-65.
6. Chang TT, Lai CL, Liaw YF, et al: Incremental increases in HBeAg seroconversion and continued ALT normalization in Asian chronic HBV (CHB) patients treated with lamivudine for four years. *Antiviral Ther* 2000; 5 (Suppl 1): 44.
7. Delaney WE 4th, Edwards R, Colledge D, et al: Cross-resistance testing of antihepadnaviral compounds using novel recombinant baculoviruses which encode drug-resistant strains of hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:1705-13.
8. Delaney W, Yang H, Westland C, Das K, Arnold E, Miller M: Functional analysis of rtV173L, an HBV polymerase mutation frequently observed in lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients. *Hepatology* 2002; 36: 373A.
9. Gilson RJC, Chopra KB, Newell AM, et al: A placebo-controlled phase I/II study of adefovir dipivoxil in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 1999; 6: 387-95.
10. Gunther S, Li BC, Miska S, Kruger DH, Meisel H, Will H: A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol* 1995; 69: 5437-44.
11. Jardi R, Buti M, Rodriguez-Frias F, et al: Rapid detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus polymerase gene variants. *J Virol Methods* 1999; 83: 181-7.
12. Leung NW, Lai CL, Chang TT, et al: Extended lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B enhances hepatitis B e antigen seroconversion rates: results after 3 years of therapy. *Hepatology* 2001; 33:1527-32.
13. Melegari M, Scaglioni Pp, Wands Jr: Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famciclovir administration are replication defective. *Hepatology* 1998; 27: 628-33.
14. Moraleda G, Saputelli J, Aldrich CE, et al: Lack of effect of antiviral therapy in nondividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus. *J Virol* 1997; 71: 9392-9.
15. Ono SK, Kato N, Shiratori Y, et al: The polymerase L528M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance. *J Clin Invest* 2001; 107: 449-55.

16. Ono-Nita SK, Kato N, Shiratori Y, et al: Susceptibility of lamivudine-resistant hepatitis B virus to other reverse transcriptase inhibitors. *J Clin Invest* 1999; 103: 1635-40.
17. Pai SB, Bozdayı AM, Pai RB, et al: Emergence of a novel mutation in the FLLA region of hepatitis B virus during lamivudine therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2618-24.
18. Seta T, Yokosuka O, Imazeki F, Tagawa M, Saisho H: Emergence of YMDD motif mutants of hepatitis B virus during lamivudine treatment of immunocompetent type B hepatitis patients. *J Med Virol* 2000; 60: 8-16.
19. Severini A, Liu XY, Wilson JS, Tyrrell DLJ: Mechanism of inhibition duck hepatitis B virus polymerase by (2)-b-L-28,38-dideoxy-thiacytidine. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1430-5.
20. Stuyver L, Van Geyt C, De Gendt S, et al: Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 702-7.
21. Xiong X, Flores C, Yang H, Toole JJ, Gibbs CS: Mutations in hepatitis B DNA polymerase associated with resistance to lamivudine do not confer resistance to adefovir in vitro. *Hepatology* 1998; 28: 1669-73.
22. Xiong X, Flores C, Yang H, Toole JJ, Gibbs CS: Mutations in hepatitis B DNA polymerase associated with resistance to lamivudine do not confer resistance to adefovir in vitro. *Hepatology* 1998; 28:1669-73.
23. Yang H, Westland C, Xiong S, Delaney WE 4th: In vitro antiviral susceptibility of full-length clinical hepatitis B virus isolates cloned with a novel expression vector. *Antiviral Res* 2004; 61: 27-36.
24. Zoulim F: Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection. *Antiviral Research* 2004; 64: 1-15.

MUTASYON ANALİZİNİN HASTA YÖNETİMİNDE YERİ

Dr. Rüçhan Yazan Sertöz

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Bornova, İzmir

Moleküler biyolojideki son gelişmeler sadece genetik alanında değil viral hepatit alanında da geniş kullanım alanı bulmuştur. Klinik viroloji laboratuvarlarında nükleik asit testleri, viral hepatit etkenlerinin saptanması ve tanımlanması, hastalık prognozunun belirlenmesi, tedaviye yanıtın değerlendirilmesi, direnç genlerinin araştırılması, virusların genotiplerinin belirlenmesi gibi pek çok amaçla kullanılmaktadır. Bu bölümde mutasyon analiz yöntemleri ve hasta yönetimindeki yeri tartışılacaktır.

Dizi analizinde geleneksel yöntemler (Maxam Gilbert, Sanger) ve son yıllarda "shotgun" yöntemleri uygulanmaktadır. Bunların içinde Sanger zincir sonlandırma reaksiyonu, viral hepatit etkeni virusların dizi analizinde en sık kullanılan yöntemdir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), dizileme reaksiyonu, elektroforez ve analiz basamaklarını içerir. Farklı floresan boya ile işaretlenmiş dideoksinükleotidlerin, zincirin uzamasına engel olmasına dayanır. Boyalardan yayılan floresans CCD kamera üzerine toplanır ve dijital sinyal şeklinde yazılım programı ile yorumlanır. CCD kamera üzerindeki ışık şiddetinin tespiti için farklı filtreler kullanılır. Filtreler farklı dalga boylarında sinyal veren farklı işaretleri ayırırlar. Floresans şiddeti mavi, yeşil, siyah ve kırmızı dalgalar şeklinde sergilenmektedir. Ortaya çıkan sinyallerin bütününe "elektroferogram" denir. Bu amaçla ticari sistemler geliştirilmiştir (ABI, Visible Genetics, vb). Bu şekilde, dizideki genotipe özgü farklılıklar ve ilaç direnci ile ilişkili dizi değişiklikleri ayırdedilebilir. HBV enfeksiyonunda tedavide kullanılan nükleozid analoglarından en sık lamivudin ve nükleotid analoglarından adefovir'in etkili olduğu polimeraz/revers transkriptaz genindeki mutasyonlar araştırılır.

İlaç direnci ve yeni mutasyonların belirlenmesinde, nükleik asit dizi analizi altın standart olmakla birlikte rutin laboratuvarlarda kullanımı zordur. Ayrıca minör mutant ve karışık viral enfeksiyonların tanımlanmasında yetersiz kalabilmektedir. Kullanım kolaylığı nedeniyle antiviral ilaç direnci araştırılmasında, ters hibridizasyon (revers hibridizasyon) yöntemi tercih edilmektedir. Bu yöntemde naylon veya nitroselüloz şeritlerin üzerine bant şeklinde genotipleri ve ilaç dirençlerini ayırt edici nükleik asit dizilerini içeren özgül probler yapıştırılmıştır. Klinik örnekten elde edilen nükleik asitler PCR ile çoğaltıldıktan sonra bu şeritler üzerinde hibridizasyon yapılır. ELISA formatındaki saptama sistemi ile değerlendirilir. Bu amaçla ticari kitler ve çok sayıda örneği çalışabilmek için otomatik sistemler bulunmaktadır.

Genetik olarak birbirinin aynı olan canlıların çoğaltılması veya diğer bir deyişle tek hücreden çok sayıda hücre elde edilmesine "klonlama" denir. Çok çeşitli klonlama sistemleri bulunmaktadır. Restriksiyon enzimleriyle klonlama, TA klonlama ve TOPO TA klonlama, rekombinan klonlama ve disistronik klonlama bunlardan birkaçına örnektir. Genel olarak PCR ürünlerinin elde edilmesi, vektöre klonlama, transformasyon ve analiz basamaklarını içerir. Direk sekanslama yöntemlerinin yetersiz kaldığı minör mutantlar ve

karışık viral popülasyonlarda klonlama antiviral ilaç direnci ile hasta yönetiminde klinisyene yardımcı olabilmektedir.

Mikroçipler (Mikro-yonga) üzerinde uygulanan hibridizasyonla ise, aynı anda çok küçük hacimlerde çok sayıda genetik örnek araştırılabilir. Oligonükleotid veya PCR ile elde edilmiş probler, genellikle cam, silikon, nitroselüloz veya naylon bir membrana yapıştırılmıştır. Aynı yüzey üzerinde çok sayıda probun dizilmesi "array" anlamına gelir. Yüzeyde mm²'ye binlerce farklı prob yapıştırılabilir. Böylece çok küçük bir alanda çok sayıda genetik dizi araştırılabilir (microarray). Daha çok gen ekspresyonu, özgül virusların ve virus gruplarının varlığının araştırılması ve antiviral ilaç direnci araştırılması amacıyla kullanılır.

KAYNAKLAR

1. Erensoy S: Viral infeksiyonların tanısında moleküler biyolojik yöntemler ve filogenetik analiz, s: 71-87. Ustaçelebi S, Abacıoğlu H, Badur S (ed), Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. 2004, Güneş Kitabevi, Ankara.
2. Kawaguchi K, et al: Detection of hepatitis B virus DNA in sera from patients with chronic hepatitis B virus infection by DNA microarray method. J Clin Microbiol 2003; 41: 1701-04
3. Horasanlı S: Dizi analizleri ve bioinformatik, s: 89-99. Ustaçelebi S, Abacıoğlu H, Badur S (ed), Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. 2004, Güneş Kitabevi, Ankara.
4. Niesters HG: Molecular and diagnostic clinical virology in real time. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 5-11.

**APPLICATION OF MOLECULAR METHODS IN DIAGNOSIS OF
DERMATOPHYTOSIS BASED ON THE CURRENT SPECIES CONCEPT****Yvonne Gräser***Institute of Microbiology and Hygiene, Charité, Berlin, Germany*

Dermatophytes cause fungal infections of keratinised tissue (skin, hair, nails). Recently, the Achilles Project, a large scale survey of more than 90.000 patients, has shown that the prevalence of fungal foot disease only is higher than 30% in Europe.

Dermatophytes belong to three genera, *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton*. They are grouped in three categories based on ecological niche and host preference. Anthropophilic species exclusively infect humans, zoophilic species are adapted to mammals and geophilic dermatophytes live in the soil. Species of the latter two groups, however, are also able to cause human infections.

Identification of the etiological agent of onychomycosis or Tinea is important prior to commencing therapy. The identity of the fungal organism provides guidance in relation to efficacy and duration of a given antifungal agent. Current diagnosis and treatment procedures for dermatophytoses rely on direct microscopic examination of fungal elements in clinical specimens using 30% KOH, in combination with the identification of the etiological agent based on the examination of its colony and microscopic morphology. Patients are often treated as soon as fungal elements are shown to be present microscopically. These methods are low in specificity and may be very time consuming, because growth, sporulation, and routine physiological testing (e.g., urease enzyme assay) of the fungi involved may take 2-4 weeks. In addition, 15-50% of microscopically true-positive samples fail to grow a culture. Moreover, dermatophyte species show an unusual level of variation in the expression of phenotypic features (e.g., formation of pigment or conidia).

In the last years, the application of PCR technology to the field of dermatophyte differentiation has led to a renewed taxonomical classification using sequence data of the ITS (internal transcribed spacer) region of the ribosomal DNA and other DNA markers. The talk will give an overview on the current species concept of dermatophytes based on ecological, morphological and molecular characteristics which is a prerequisite for molecular diagnostics.

The usefulness of different DNA markers for species discrimination in dermatophytes will be presented and a PCR strategy introduced for the species specific detection of *Trichophyton rubrum*, the causative agent of onychomycosis, where the extraction of fungal DNA is conducted directly from the nail specimens.

HIV GENOTİP TAYİNİ VE HIV GENOTİPLERİNİN ÜLKEMİZDEKİ DAĞILIMI

Prof.Dr. Gülden Yılmaz, Dr. Kenan Midilli

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, İstanbul

Viral genotiplendirme işlemi ile, viral genlerin genetik varyantlarda doğal olarak veya ilacın seçici baskısı altında gösterdikleri farklılıkların tanımlanması için, virusların nükleik asit dizileri incelenir. DNA dizilemesi, nükleotidlerdeki kritik değişiklikleri saptamada altın standarttır. Bu nedenle, antiviral ilaçlara direnç yol açabilecek tek bir baz değişiklikleriyle virus tip ve alttiplerini saptamada en doğru yol dizileme yöntemleridir. DNA dizilemesi, kullanımdaki çoğu klinik laboratuvar yöntemlerinin ötesinde zaman alıcı, özel eğitim ve deneyimin yanı sıra kaynak gerektiren bir yöntemdir. PCR amplifikasyonu ile DNA dizilemesinin birlikte kullanılması ve otomatik dizileme sistemleri ile genotiplendirme, donanımlı klinik laboratuvarlara da taşınmıştır¹.

Human immunodeficiency virus (HIV) genotiplendirmesi amacıyla, dizileme için periferik kan mononükleer hücrelerinden elde edilen proviral DNA ya da plazmadaki serbest viriondaki HIV RNA kullanılabilir. Plazmadaki HIV RNA'sının kullanılması tercih edilmektedir. Günümüzde RT-PCR'ı takiben otomatik dizileme cihazlarında dizileme yapılmaktadır. Kromatogramlar otomatik olarak okunmakta ve DNA-dizileme programları ile yorumlanmaktadır. Ancak özel programlar ile kullanıcı, primer kromatogramı inceleyebilir, DNA dizi fragmanındaki ambijiositeleri gözden geçirebilir ve diziyi kontrol edip çeşitli formatlarda saklayabilir. Dizi verilerinin kalitesini artırmak için, incelenen DNA bölgesi ileri ve ters primerler kullanılarak çeşitli kez farklı noktalardan dizilenir ve DNA fragmanı üst üste binen ufak parçalara bölünerek incelenir. Dizi elde edildikten sonra, veri bankaları ile karşılaştırılarak dizi benzerlik/homoloji araştırmaları ve genetik veritabanından elde edilen uygun karşılaştırılabilir standart diziler ile hizalaması yapılarak, filogenetik ilişkinin gösterildiği ağaç oluşturulur. Önceleri HIV genotiplendirmesinde *gag* ve *env* genlerinin belirli bölgeleri kullanılırken, günümüzde antiretroviral direnç tayini sırasında revers transkriptaz (RT) ve polimeraz genlerindeki direnç mutasyonlarının incelenmesi sırasında elde edilen diziler ile belirli programlar kullanarak genotip sonucu elde edilebilmektedir¹⁻³.

HIV-1, dünyada yayılmaya devam etmekte ve toplumların hareket ve etkileşimleri ile birlikte genetik farklılaşma artmaktadır. HIV-1'in genetik olarak değişken olmasının ana nedenleri, nokta mutasyonları ve rekombinasyondur. Günlük replikasyon hızı 10^9 - 10^{10} ve mutasyon hızı genomun replikasyonu başına birdir. Buna bağlı olarak, HIV-1'in moleküler epidemiyolojisi karmaşık ve devamlı bir evrimleşme içindedir. Yeni varyantların ortaya çıkışı, farklı coğrafik bölgelerdeki HIV-1'in prevalansını, alttip epidemiyolojisini ve riskli davranış paternini yansıtır. HIV-1; M (majör), O (outlier-other) ve N (non-M non-O, new) gruplarından oluşmaktadır. M grubu virusların, pandemiden esas sorumlu olan suşlar olduğu ve yaklaşık 70 yıl kadar önce orta Afrika'dan yayılmaya başladığı bilinmektedir. Filogenetik analizler; M grubu içinde A-D, F-H, J ve K olmak üzere 9 alttip olduğunu ve bu alttiplerin *env* geninde %20-30 ve *gag* geninde 15-22 oranında farklılık gösterdikleri ortaya konmuştur. A alttipi A₁, A₂ ve A₃ olmak üzere üç, F alttipi de F₁ ve F₂ olmak üzere iki alt-alttipe sahiptir. D alttipi, B2 olarak sınıflandırılabilir. Bunlara ek olarak en azından 21 alttip karışımları olan "circulating recombinant forms"

(CRFs) tanımlanmıştır. Ek olarak "unique rekombinant formlar"da saptanmışlar ve alttip tayini için altın standart olan tüm genomun dizilenmesi ile incelenmişlerdir.

HIV-1 alttiplerinin epidemik paternleri devamlı bir değişim içindedir. B alttipi dünyadaki infeksiyonların %12'sinden sorumlu iken C alttipi infeksiyonların yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır. Pekçok ülkede çeşitli alttipiler birlikte bulunmaktadır. Belirli alttipiler belirli ülkelerde özellikle belirli popülasyonlarda bulunabilir. A, B, C, D alttipileri dünya üzerinde yüksek oranda görülmektedir. A alttipi özellikle Doğu Afrika, Batı Avrupa ve Orta Asya'da; B alttipi Amerika, Batı Avrupa, Avustralya ve Japonya'da; C alttipi Güney ve Doğu Afrika, Hindistan, Çin ve Nepal'de; D alttipi ise Doğu Afrika'da daha sıklıkla bulunmaktadır. F, G, H, J ve K alttipileri düşük oranlarda saptanmakta olup, F alttipi Güney Amerika, Orta Afrika ve Batı Avrupa'da; G, H ve J alttipileri de özellikle Orta Afrika'da rastlanır. Batı Avrupa'da 1996 yılına kadar eşcinsellerde B, heteroseksüellerde C ve nozokomiyal yolla bulaşmış infeksiyonlarda ise G alttipi en sıklıkla bulunmuştur. 2003 yılında tüm infeksiyonların büyük oranından A₁ sorumlu hale gelmiştir. Başlangıçta çoğu olguyu B alttipi oluştururken, Batı Avrupa'da B alttipi dışındaki suşlarda artış saptanmaktadır. Bu B alttipi dışındaki suşlar, özellikle Afrika ve Asya'dan gelenlerde ve heteroseksüellerde sık görülmektedir. Ancak artık B alttipi dışındaki suşlar endemik bölgelerden gelenlere sınırlı değildir. Kanada'da da B alttipi suşlar artmaktadır. En yüksek oranda saptanan CRF'ler CRF01-AE ve CRF02-AG olup, CRF01-AE Güneydoğu Asya'da ve CRF02-AG de özellikle Batı ve Orta Afrika'da görülmektedir. Baskın HIV alttipileri ve CRF'ler; Kuzey ve Orta Amerika'da B; Güney Amerika'da B, B/F; Batı Avrupa'da B ve çeşitli B dışı alttipiler; Doğu Avrupalı ve Orta Asya'da A, B, A/B ve F; Hindistanda C; Çin'de B, C, B/C; Güneydoğu Asya'da CRF01-AE, B; Avustralya'da B; Doğu Afrika'da C, A, D; Güney Afrika'da C; Batı Afrika'da CRF02-AG ve Orta Afrika'da çeşitli alttipilerdir. CRF'lerle koinfeksiyon, sıklıkla superinfeksiyon sonucu oluşmaktadır. CRF'ler tüm dünyada artan sıklıkla bulunmaktadır. Virus evolüsyonunda rekombinasyon, önemli bir mekanizma olsa bile HIV-1 suşları arasında rekombinasyon belirli sınırlar içinde gerçekleşir. Çapraz koruyucu bağışıklık derecesi farklı suşlarla superinfeksiyon riskini belirler. Rekombinasyonun oluşabilmesi için, farklı iki suşun RNA'larının aynı virus partikülü içine paketlenmesi gereklidir. Bu durumda RT enzimi, iki farklı suşun RNA'larını kopyalayarak mozaik diziler oluşturur. *Env*, *gag* ve *pol* yapısal genlerine ek olarak HIV-1 alttipileri uzun terminal tekrarlayan dizilerinde, transkripsiyonel promoter'lar, *nef*, *tat*, *rev*, *vpr* regülatuar genlerinde de farklılık gösterirler. Bu farklılıklar, hücresel tropizmi, viral replikasyon kinetiklerini, bulaşma yollarını ve hastalık gelişimini etkileyebilir. Örneğin C alttipinin B alttipine kıyasla 10-100 kat daha düşük replikasyon kapasitesine sahip olduğu, daha yüksek in utero geçiş özelliğinde olduğu, genital sekresyonlarla atılımın A ve D alttipilerine göre daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır. Şu ana kadar olan veriler HAART'a yanıtın alttipiler arasında anlamlı fark göstermediği yönündedir ve tedavi ile ilişkili direnç mutasyonlarının B ve B alttipi dışındaki tiplerde benzer olduğu ve direnç yorum algoritmelerinin alttipden bağımsız olduğu varsayılmaktadır⁴.

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda, 1994-2002 yılları arasında HIV infeksiyonu tanısı konmuş 27 HIV/AIDS hastasında genotip çalışmaları yapılmıştır. Nested PCR yöntemi ile, HIV-1 M, N, O grupları için CDC HIV-1 primer setleri kullanılarak (gp40F1, gp41R1 and gp46F2, gp47R2) *env* geninin gp41 bölgesinin 460 bp uzunluktaki kısmı amplifiye edilmiştir. PCR ürünü, "ABI-PRISM 310 sequencer" (Applied Biosystems, Foster City, USA) ile "big-dye terminator" kiti kullanılarak iki yönlü dizi analizine tabi tutulmuş, dizi analizi sonuçları "Genestudio Pro Contig Editor" kullanılarak değerlendirilmiştir. "CLUSTAL W 1.83" ile dizi hizalaması yapılmış ve filogenetik ağaçlar "neighbor-joining" yöntemine dayanılarak "Genestudio"

içinde yer alan programlar kullanılarak oluşturulmuştur. Rekombinasyon analizi "Simplot 2.5" programında yapılmıştır. 27 HIV suşundan dördü A, 19'u B, biri C, biri D ve ikisi de F₁ alttipinde bulunmuştur⁵⁻¹⁰. Yine 2003 yılı sonundan beri dizileme ile rutin genotipik direnç çalışmaları sırasında, 39 HIV ile infekte kişiye antiretroviral direnç tayini uygulanmıştır. Genotipik yöntemle direnç tayini için, revers transkripsiyon aşamasından sonra, nested PCR yöntemi ile virus genomunda proteazın tamamı ile RT'in yaklaşık ilk 220 amino asidini kodlayan bölgelerini içine alan kısım çoğaltılmaktadır. Çoğaltılan PCR ürünleri saflaştırılma aşamasından sonra "big-dye terminator" kiti kullanılarak "cycle sequencing" işlemine tabi tutulmaktadır. DNA dizi analizinde ABI 310 dizi analiz cihazı (Foster City, ABD) kullanılmaktadır. Sekans ön değerlendirme ve hizalamaları DNASTAR paketi içinde yer alan Seqman programı ve Bioedit programları kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Direnç ile ilişkili mutasyonlar internet ortamında bulunun "geno2pheno" ve "stanford hivdb" sitelerindeki motorlar aracılığıyla araştırılmaktadır. Her iki sitedeki motorlar üzerinden direnç değerlendirmeleri ile alttip belirlemesi de otomatik olarak yapılmaktadır. Bu değerlendirmelerde 39 hastadan 24'ünde B, üçünde F₁, beşinde D, dördünde C ve üçünde CRF (bir CRF03-AB ve iki CRF02-AG) saptanmıştır¹¹⁻¹⁴.

KAYNAKLAR

1. Salminen M: Recombination and molecular epidemiology of HIV-1 and enteroviruses, pp: 97-119. In: Leitner T (ed), Molecular Epidemiology of Human Viruses. 2002, Kluwer Academic Publishers, Boston.
2. Caliendo AM, Yen-Lieberman B : Viral genotyping, pp: 489-99. In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang Y, Unger ER, Relman DA, White TJ (eds), Molecular Microbiology Diagnostic Principles and Practice. 2004, ASM Press, Washington DC.
3. Chappey C, Imamichi H, Salzman P: Sequence analysis of human immunodeficiency virus type 1 haplotype, pp: 802-9. In: Rose NR, Macario EC, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM (eds), Manual of Clinical Laboratory Immunology. 1997, ASM Press, Washington DC.
4. Geretti AM: HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. Curr Opin Dis 2006; 10: 1-7.
5. Yılmaz G, Midilli K, Turkoğlu S, et al: Genetic subtypes of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in Istanbul, Turkey. Int J Infect Dis (baskıda).
6. Pieniazek D, Young C, Lal R: Phylogenetic analysis of the gp41 envelope of HIV-1 groups M, N, and O strains provides an alternate region for subtype determination, pp: III1-III8. In: Korber B, Foley B, McCutchan F, et al (eds), Human Retroviruses and AIDS. 1998, Los Alamos National Laboratories, Los Alamos, New Mexico.
7. Ray SC, Lole KS, Bollinger RC, et al: Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. J Virol 1999; 73: 152-60.
8. Yang C, Pieniazek D, Oven SM, et al: Plasma detection of phylogenetically diverse human immunodeficiency virus type 1 using generic primers amplifying both group M and group O. J Clin Microbiol 1999; 3: 2581-6.

9. Fonjungo PN, Dash Bc, Mpoudi EN, et al: Molecular screening for human immunodeficiency virus group N and SIV cpz-like virus infection in Cameroon. AIDS 2000; 5: 750-2.
10. www.genestudio.com
11. <http://hivdb.stanford.edu/>
12. <http://195.37.60.133/cgi-bin/geno2phwni.pl/>
13. <http://www.niaid.nih.gov/daids/default.htm>
14. Lindstrom A, Albert J: A simple and sensitive 'in-house' method for determining genotypic drug resistance in HIV-1. J Virol Methods 2003;107: 45-51.

K-21

DIAGNOSIS OF PARASITES IN VARIOUS CLINICAL SAMPLES: NEW METHODS

Andrea J. Linscott, Ph.D., D (ABMM), Associate Professor

Director, Clinical Microbiology, LSU Health Sciences Center – Shreveport, 1501 Kings Highway, Shreveport, LA 71103

Objectives

- Discuss current recommendations for the diagnosis of parasites
- Discuss new methods for the diagnosis of parasites
- Discuss problems encountered in the clinical laboratory for the diagnosis of parasites

Recognition of Parasitic Infections

- Knowledge of epidemiologic risk factors
 - Travel
 - Immigration
- Clinical presentation
 - Immunosuppressive effects

Diagnostic Procedures for Stool Specimens

- Specimen Collection
 - Fresh stool should be examined, processed, or preserved immediately
 - One volume of stool should be mixed to three volumes of preservative. Mix well.

“Routine O & P Examination”

- Direct wet exam
 - Fresh sample
 - Liquid or semi-liquid
- Concentration
- Permanent stained smears

Ova and Parasite Examination

- Direct examination
- Concentration
- Fresh or preserved in formalin, PVA, SAF, MIF, or newer single-vial fixative systems
- Permanent stained smear

Direct Smear

- Assess worm burden, provide quick diagnosis of heavily infected specimen, check organism motility
- Fresh stool that has not been refrigerated
- Low-power examination of entire 22- by 22-mm cover slip, high examination of 1/3 of cover slip area
- Presumptive results
- Once iodine added to preparation, the organism will be killed and motility will be lost

Concentration

- Designed to allow recovery of protozoan cysts, coccidian oocysts, microsporidian spores, and helminth eggs and larvae

- Low-power examination of entire 22- by 22-mm cover slip, high examination of 1/3 of cover slip area
- Preliminary result
- Formalin-ethyl acetate sediment concentration is most common method
- Zinc sulfate flotation will not detect operculated or heavy eggs (examine surface and sediment)

Permanent Stained Smears

- Provide contrasting color for background debris and parasites present, allows detailed organism morphology under oil immersion examination
- Designed to allow recovery and identification of intestinal protozoa
- Fresh or preserved in PVA, SAF, MIF, or newer single-vial fixative systems
- Trichrome, iron-hematoxylin, modified iron-hematoxylin, polychrome IV, dehydrating solutions (alcohols and xylenes), mounting fluid (optional)
- Oil immersion examination of at least 300 fields

Microscopic Examination

- Trophozoites and cysts of intestinal parasites
- Oocysts of coccidia and spores of microsporidia (special stains needed)
- Helminth eggs and larvae
- RBCs, which may indicate ulceration or other hemorrhagic problems
- WBCs, specifically PMNs, which may indicate inflammation
- Eosinophils, which usually indicate the presence of an immune response
- Macrophages, which may be present in bacterial or parasitic infections
- Charcot-Leyden crystals, disintegrating eosinophils
- Fungi and yeasts
- Plant cells, pollen grains, fungal spores
- Plant fibers, root, or animal hairs

Note: May simulate some helminth eggs or larvae, protozoan cysts, coccidian oocysts, or microsporidial spores

Quantitation

- Few = ≤ 2 per 10 oil immersion fields
- Moderate = 3 to 9 per 10 oil immersion fields
- Many = ≥ 10 per 10 oil immersion fields

Report quantitation for:

- Intestinal protozoa
 - *Blastocystis hominis*
- Helminths
 - *Trichuris trichiura*
 - *Clonorchis sinensis* eggs
 - Schistosome eggs
- Blood parasites
 - All malaria organisms
- Blood cells
 - PMNs, Macrophages, RBCs
- Charcot-Leyden crystals

What and How to Report

- Report genus and species

- Protozoa
- Trematodes
- Cestodes
- Nematodes
- Life cycle stages
 - Intestinal protozoa (cyst and/or trophozoite)
 - Blood protozoa (gametocyte)
 - Yeast (budding and/or presence of pseudohyphae)
- Quantitation
 - *Blastocystis hominis*
 - Trematodes
 - Filarial nematodes
 - Yeast, human cells (WBCs, RBCs), crystals (C-L, barium)

Specimen Collection Times

- Series of three specimens submitted on separate days

Detection of Parasite Antigen

- *Entamoeba histolytica*
- *Cryptosporidium* spp.
- *Giardia intestinalis* (*lamblia*)
- *Trichomonas vaginalis*
- *Plasmodium* spp.
- *Wucheria bancrofti*

Immunoassays

- Enzyme immunoassay (EIA)
- Direct fluorescence (DFA)
- Rapid
 - Rapid immunochromatographic
 - Dipstick
 - Cartridge

Specimens for Antigen Detection

- Fresh or preserved stool samples, but refer to the manufacturer's instructions
 - Fresh, unpreserved stool must be used for *E. histolytica*/*E. dispar* antigen detection test

Stool Immunoassays

- *Giardia lamblia*
- *Cryptosporidium parvum*
- *G. lamblia*/*C. parvum*
- *Entamoeba histolytica*/*E. dispar* group
- *Entamoeba histolytica*
- *Cryptosporidium*/*G. lamblia*/*E. histolytica*

Immunoassays

- Pros
 - Simple to perform
 - Large number of tests can be performed at one time (Reducing costs!)
- Cons

- Method detects only one or two pathogens at one time
- Ova and parasite must be performed to detect other parasitic pathogens

Amebiasis

- Used to differentiate pathogenic *Entamoeba histolytica* from the non-pathogenic *E. dispar*
- Assay uses monoclonal antibodies that detect the galactose-inhibitable adherence protein in the pathogenic *E. histolytica*

Differences between *E. histolytica* and *E. dispar*

- Pathogenicity
- DNA sequence
- Phosphoglucomutases
- Hexokinase isoenzyme
- Secretion of acid phosphatases

Differentiation between *E. histolytica* and *E. dispar*

- Trophozoites with ingested RBCs in cytoplasm is diagnostic for *E. histolytica*
- Immunodetection
 - EIA or ELISA format
 - Requires fresh stool

Reporting

If no ingested RBCs are seen or immunoassay is not available:
Report as "*Entamoeba histolytica* / *E. dispar*"

***Entamoeba histolytica* Cyst**

- Cyst often have halos
- Mature cyst have 4 nuclei
- Central karyosome
- Fine, uniform peripheral chromatin
- Cyst measures 12 – 15 μm

***Entamoeba histolytica* Cyst**

- Blunted ends on chromatoid bodies
- The permanent stained smear is most important technique for recovery and identification

***Entamoeba histolytica* Trophozoites**

- Ingested RBCs
- Trophs measure 15 – 20 μm (range 10 – 60 μm)
- Granular or "ground- glass" cytoplasm
- Single nucleus
 - Central karyosome
 - Uniform peripheral chromatin

Cryptosporidiosis

- Antigen detection is current test of choice
- Increased sensitivity over modified acid-fast staining techniques
- DFA format is most sensitive (99%) and specific (100%)
 - Identifies oocysts in concentrated or unconcentrated fecal samples

Giardiasis

- Antigen detection is current test of choice
- Sensitivity and specificity of DFA kits were 100% compared to those of microscopy
- EIA sensitivity ranges from 94 – 100% with specificity being 100%

Malaria

- Immunochromatographic assays
- Uses whole blood
- Enzyme detection
 - Histidine-Rich Protein-2 (HRP-2)
 - *Plasmodium* aldolase
 - *Plasmodium* lactate dehydrogenase

ParaSight F

- Detects histidine-rich protein-2
- Specific for *P. falciparum*
- Becton Dickinson – no longer available

OptiMAL

- Detects *Plasmodium* lactate dehydrogenase
- *P. falciparum*
 - Sensitivity 88%, specificity 82%
- *Plasmodium* spp.
 - Sensitivity 65%
- Flow Inc., Portland, OR, USA

Evaluation of a new *Plasmodium* lactate dehydrogenase assay (OptiMAL-IR®) for the detection of malaria. (Pattanasin S, et al. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2003. 97: 672-4.)

Now Malaria

- Pan-specific antigen combined with HRP-2
- *P. falciparum*
 - Sensitivity 96.4%, Specificity 97%
- *Plasmodium* spp.
 - Sensitivity 67%, Specificity 100%
- Binax, Portland, ME, USA

Performance of the Now Malaria rapid diagnostic test with returned travelers: a 2-year retrospective study in a French teaching hospital. (Durand F, et al. Euro, Soc Clin Microbiol Inf Dis, 2005. 11: 903-7.)

Special Stains

- Modified trichrome stain for microsporidia
- Modified acid-fast stain for coccidia

“Microsporidia”

- Refers to a group of obligate intracellular, spore-forming protists
- Genera
 - *Enterocytozoon*
 - *Encephalitozoon*
 - *Nosema*
 - *Pleistophora*

- *Vittaforma*
- Trachipleistophora
- Spore
 - Polar tubule, which is an extrusion mechanism for injecting the infective spores into host cell

Microsporidia Epidemiology

- Found globally
- Ingestion of spore is most probable mode of transmission
- Aerosol route also consideration (found in respiratory tract)
- No congenitally acquired human infections reported

Microsporidia Clinical Significance

- Most frequent in persons with HIV
- Emerging infection in immuno-compromised individuals
- Persons with severe cellular immuno-deficiency appear to be at highest risk
- Dissemination possible
- Self-limiting to severe diarrhea

Microsporidia Findings

- Mucosal abnormalities
- Nodular skin disease
- Keratoconjunctivitis, sinusitis, tracheobronchitis, encephalitis, interstitial nephritis, and hepatitis

Collection, Transport, and Storage

- Stool specimens, duodenal aspirates, or other body fluid fixed in 10% formalin
- For histological examination, tissue specimens fixed in formalin
- For EM, tissue fixed in glutaraldehyde

Spore Detection

- Chromotrope-based stain
- Hematoxylin and eosin stain
- Gram stain of paraffin-embedded tissue sections

Chromotrope Stain

- Modified trichrome stain
 - Formalin fixed stool suspension (unconcentrated) or other clinical material, heat fixed to slide
 - Stain for 90 minutes
- Quick-hot gram-chromotrope stain
 - Perform gram stain omitting safranin step
 - Place slide in warmed (50° to 55°C) chromotrope stain for 1 minute

Chromotrope References

- www.dpd.cdc.gov
- A new and improved "quick-hot gram-chromotrope" technique that differentially stains microsporidian spores in clinical samples, including paraffin embedded tissue sections. (Moura H, et al. Arch Pathol Lab Med, 1997. 121: 888-93.)

Coccidian Parasites

- *Cryptosporidium*
- *Cyclospora*
- *Isospora*
 - All life cycle stages of these parasites are intracellular
 - Inhabit the intestinal mucosa and cause diarrheal illness in humans
 - Transmission associated with food and water

***Cryptosporidium* Diagnosis**

- Examination for oocysts (4 – 6 µm)
- Do not stain with iodine
- Trichrome and iron-hematoxylin don't uniformly stain oocysts
- Oocysts can be seen with auramine-rhodamine
- Confirm by modified acid-fast staining, immunoassay, or molecular methods
- Histological examination of intestinal biopsy
- Scanning and transmission electron microscopic examination of duodenal aspirates and biopsy specimens

***Cyclospora* Diagnosis**

- Detection of oocysts (8 – 10 µm)
- Oocysts don't stain well with Giemsa, trichrome, hematoxylin
- Autofluorescence can be used for confirmation
- Modified acid fast stain for confirmation

Molecular Diagnosis

- Microscopic examination is still considered the "gold standard"
- PCR
 - Conventional PCR
 - Real-time PCR

Specimen Collection for Molecular testing

- Stool specimens
 - Specimen must be collected in absence of preservatives
 - Kept and shipped at 4°C or frozen (shipped with dry ice)
- Blood specimens
 - Collect 1-5 ml blood in EDTA tubes prior to anti-parasitic therapy and shipped at 4°C

PCR Analysis

- *Cryptosporidium* spp.
- *Cyclospora cayetanensis*
- *Entamoeba histolytica*
- *E. dispar*
- *Giardia lamblia*
- Microsporidia

***Cryptosporidium* Paper**

Detection of *Cryptosporidium* and Identification to the Species Level by Nested PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism (Coupe S, et al. J Clin Microbiol 2005, 43: 1017-23.)

- Spiked stool samples gave an estimated PCR detection of one oocyst

- PCR could be applied to stool or environmental (water) specimens
- RFLP analysis was used to speciate

E. histolytica Paper

- Real-time PCR assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. (Roy S, et al. JCM 2005, 43: 2168-72.)
 - Tested 182 stool and 23 liver abscess specimens tested using real-time PCR, conventional PCR, and antigen detection

Microsporidia Papers

- Real-Time PCR method for detection of *Encephalitozoon intestinalis* from stool specimens. (Wolk DM, et al. JCM 2002, 40: 3922-8.)
- Simultaneous detection of four human pathogenic microsporidian species from clinical samples by oligonucleotide microarray. (Wang Z, et al. JCM 2005, 43: 4121-8.)

PCR Analysis

- *Plasmodium* spp.
- *Leishmania* spp.
- *Toxoplasmosis gondii*
- *Babesia* spp.

Malaria Papers

- Real-Time quantitative PCR for determining the burden of *Plasmodium falciparum* parasites during pregnancy and infancy. (Malhotra I, et al. JCM 2005, 43: 3630-5.)
- Real-Time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. (Mangold KA et al. JCM 2005, 43: 2435-40.)
- PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. (Johnston SP, et al. JCM 44: 1087-9.)
- Real-time nucleic acid sequence-based amplification is more convenient than real-time PCR for quantification of *Plasmodium falciparum*. (Schneider P, et al. JCM 2005, 43: 402-5.)

Leishmaniasis Papers

- Evaluation of PCR for diagnosis of Indian Kala-Azar and assessment of cure. (Maurya R, et al. JCM 2005, 43: 3038-41.)
- Detection of *Leishmania braziliensis* in human paraffin-embedded tissues from Tucuman, Argentina by polymerase chain reaction. (Lanus E, et al. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005, 100: 187-92.)

Toxoplasmosis Papers

- Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: Importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. (Colombo FA, et al. JCM 2005, 43: 5044-7.)
- Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. (Cassaing S, et al. JCM 2006, 44: 720-4.)

Collection Time Dilemmas

Dilemma 1

- Stool from in-patient (day 3 of hospitalization) sent for ova and parasite
- Should this be done?

Pro

- Normally, very few parasitic infections can be acquired by an inpatient
- Although rare, one of these infections is cryptosporidiosis which has been documented in nosocomial transmission

Cons

- Etiologic agents other than parasites are more likely to cause diarrhea in patients who have been hospitalized for 3 or more days
- There are always exceptions, consult laboratory

Dilemma 2

- 3 separate stools collected within 10 days
- Concentration and permanent stained smear performed on all specimens
- Direct wet smear performed on fresh specimens

Pros

- Maximize recovery of all organisms
- Concentration of protozoan cysts, helminth eggs and larvae
- Permanent stain for confirmation of protozoa
- Specimen available for special stains
- Complies with CAP checklist

Cons

- Labor intensive

Dilemma 3

- 3 separate stools collected within 10 days
- Concentration performed on pooled specimens
- Permanent stained smears performed on all specimens (performed as 3 separate examinations)

Pros

- Time saved by pooling concentrated samples and reading one concentrated sample
- More likely to recover intestinal protozoa on permanent stains

Cons

Labor intensive

Dilemma 4

- 3 stools collected over a 7-10 day period
- Pooled 3 specimens and performed one concentration and one permanent stain

Pros

- Save time and expense

Cons

- Organisms in low numbers may be missed due to the dilution factor
- Can only be billed as a single O & P

Dilemma 5

- 3 stools placed in same vial by the patient
- Performed one concentration and one permanent stain

Pros

- Require only a single collection vial
- Save time and expense

Cons

- Too complicated!
- Not the proper ratio of specimen to preservative

- Organisms not properly fixed
- Organisms may be missed

Dilemma 6

- 1 stool collected
- Concentration and permanent stained smear performed
- Additional specimen may be examined after results of the first specimen reported

Pros

- Some feel that most intestinal parasitic infections can be diagnosed from examination of a single stool
- If the patient becomes asymptomatic after collection of the first stool, the subsequent specimens may not be necessary

Cons

- Diagnosis from a single specimen depends on the experience of the microscopist, proper specimen collection, and parasite load
- Organism in small numbers may be missed
- Collection of specimens 2 or 3 may be outside the 10-day recommended time frame

Dilemma 7

- 1 stool collected
- Concentration performed
- Permanent stained smear performed only if something suspicious is seen on concentration

Pros

- Thought to save time, but is unacceptable both technically and in terms of quality care

Cons

- Does not meet CAP checklist requirements
- Numerous studies have confirmed the importance of the permanent stain

Summary

- Recognition of possible parasitic infection
- Correct specimen collection, transport, and processing
- Choosing appropriate specimen type and test

BAKTERİYEL İNFEKSİYONLARIN TANISINDA YENİ MOLEKÜLER TESTLER

Doç. Dr. Tanıl Kocagöz

Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları AD.

Türk İnovatif Biyoteknoloji Organizasyonu (TİBO) ve Salubris

Moleküler tanı yöntemleri, mikroskopik inceleme ve kültür gibi yöntemlere göre daha karmaşık, emek yoğun, deneyimli personel gerektiren yöntemler olduğu için bu yöntemlerin yerini almamıştır. İnsanda enfeksiyona yol açan birçok bakteri, hem besiyerlerinde kolayca ve kısa sürede üretilbildiğinden, hem de örnekte tek canlı bakteri olduğunda dahi kültürle kolayca saptanabildiğinden, duyarlılığı daha düşük olan moleküler yöntemler bu tür bakterilerle olan enfeksiyonların tanısında kullanılmamaktadır. Buna karşın, kültürde üretilmeyen, üretilmesi zor olan ya da uzun süre alan bakteriyel enfeksiyonların tanısında moleküler tanı yöntemleri önemli kullanım alanı bulmuştur¹.

Günlük kullanımda moleküler yöntemlerle tanısı konmaya çalışılan bakteriyel enfeksiyon etkenleri arasında; başta *Mycobacterium tuberculosis*² olmak üzere, *Mycobacterium leprae*, atipik pnömoni etkenlerinden *Legionella pneumophila* (*Mycoplasma pneumoniae* ve *Chlamydia pneumoniae* ile birlikte)³, *Brucella* türleri⁴, *Bordetella pertussis*⁵, *Borrelia burgdorferi*⁶, *Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi*⁷, *Bacillus anthracis* ve *Francisella tularensis* sayılabilir⁹.

Bazı bakteriyel patojenlerin kültür besiyerlerinde kolayca üretilmesine karşın, belli genetik özellikleri belirlenmedikçe klinik anlamı olmadığı durumlarda da moleküler genetik testler büyük önem taşır. Örneğin, gastroenterite yol açan *Escherichia coli* türlerinin enterotoksin, verotoksin gibi genlerinin gösterilmesi bu etkenin sağlıklı kişilerin dışkıusunda bulunan *E.coli*'den farklı bir özellik taşıdığını ortaya koyar¹⁰. Üremek için özel kültür besiyerleri gerektiren bakteriyel patojenlerin belirlenmesinde ve etiyojisinde birçok etkenin olası olduğu klinik tablolara yol açan etkenlerin kısa sürede ortaya çıkartılmasında, tek tüpte birçok etkene ait nükleik asitleri çoğaltan yöntemler kullanılabilir. Örneğin Kong ve arkadaşları, gastroenterite yol açan altı farklı bakteriyel patojeni çoklu polimeraz zincirleme tepkimesi (polymerase chain reaction; PCR) ile tek tüpte gerçekleştirdikleri test ile saptayabilmişlerdir¹¹.

Kültür besiyerlerinde bakterilerin üretilbilmeleri, antibakteriyel ilaçlara duyarlılığın saptanmasını da sağlamaktadır. Ancak bazı özel durumlarda, kültür ile yapılan duyarlılık testleri her zaman istenen doğruluk düzeyinde sonuç vermemektedir. Bunlar için en çarpıcı örnek, stafilokoklardaki metisilin direncinin belirlenmesidir. Metisiline dirençli stafilokoklarda bu direnç öylesine değişken (heterojen) bir şekilde ortaya çıkabilmektedir ki, kültüre dayalı yöntemlerle güvenilir bir şekilde saptanmasında önemli sorunlar yaşanmaktadır. Bu nedenle metisilin direncine yol açan *mecA* geninin varlığının nükleik asit çoğaltma yöntemleri ile belirlenmesi metisilin direncinin saptanmasında standart referans yöntem haline gelmiştir¹². Vankomisin direncinin¹³ ve beta-laktamazların¹⁴ belirlenmesi de moleküler tanı yöntemleri ile etkin bir şekilde yapılabilmektedir. *M.tuberculosis* kültür besiyerlerinde yavaş ürediği için, bu etkende ilaç direncine yol açan

genetik değişikliklerin moleküler yöntemlerle saptanması, ilaç direncinin kültüre oranla çok kısa sürede saptanmasını sağlamaktadır¹⁶.

Nükleik asit çoğaltma yöntemleri içerisinde PCR, klinik örneklerde patojen mikroorganizmaların ve genetik özelliklerinin saptanmasında en yaygın olarak kullanılan yöntem olmuştur. Bunu TMA (Transcription Mediated Amplification)¹⁷ ve SDA (Strand Displacement Amplification)¹⁸ gibi nükleik asit çoğaltma yöntemleri izlemiştir. Bu yöntemlerin hepsinde, ya nükleik asitleri çoğaltma ya da çoğaltılan ürünleri saptama için karmaşık ve pahalı cihazlar ve deneyimli kullanıcılar gerekmektedir. Bu sorunlar, nükleik asit çoğaltma yöntemlerinin günlük kullanımda yaygınlaşmasını kısıtlamış ve gelişmiş olanakları bulunmayan laboratuvarlar veya daha önemlisi sahada kullanılabilir olmalarını engellemiştir. Oysa tüberküloz gibi hastalıklar, daha ziyade az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin sorunudur ve bu ülkelerde gelişmiş laboratuvar olanakları yaygın olarak bulunmamaktadır. Bu nedenle karmaşık ve pahalı cihazlar gerektirmeyen, bir tüp içerisinde sadece birkaç çözelti karıştırılarak yapılabilen, pahalı olmayan nükleik asit çoğaltma yöntemlerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda geliştirilen iki yeni nükleik asit çoğaltma yöntemi, helikaza dayalı çoğaltma (Helicase Dependant Amplification; HDA) ve ilmiğe dayalı çoğaltma (Loop Mediated Amplification; LAMP) bunu gerçekleştirebilme olasılığı bulunan yöntemlerdir.

Bilindiği gibi PCR'da DNA'nın denatürasyonu için test tüplerinin 95°C'e dek ısıtılması gerekir. Bu iş için sıcaklık döngü cihazlarında tüpler döngüler içerisinde ısıtılır. HDA'da ise, iki zincirin birbirinden ayrılması helikaz enzimi tarafından sağlanır. Açılan DNA zincirleri tek zincir bağlayan protein (single strand binding protein) molekülleri tarafından açık olarak tutulur. Çoğaltılmak istenen bölgeye özgül primerler DNA'da uyumlu oldukları bölgelere bağlanırlar. DNA polimeraz primerlerden başlayarak DNA sentezi yapar. Yeni oluşan çift zincirler tekrar helikaz tarafından açılır ve yeni oluşan kalıba primerler bağlanarak zincirleme bir çoğaltma tepkimesi başlar. HDA için *E.coli* helikazı kullanıldığında bütün işlem 37°C'de gerçekleştirilir. Helikazın DNA'ya etkili bir şekilde bağlanabilmesi için *mutL* ürünü protein de gerekir¹⁹. Ancak daha yeni çalışmalar ile, *T.tengcongensis*'den elde edilen (Tte) helikazın 60-65°C'de çalıştığı ve *mutL* benzeri bir proteine gereksinim duymadığı ve bu sıcaklıklarda DNA'yı daha etkili bir şekilde çoğalttığı gösterilmiştir²⁰.

İzotermal olarak nükleik asitleri çoğaltmayı sağlayan bir başka yöntem de LAMP'dir. Bu yöntemde çoğaltılmak istenen bölgeye özgül altı primer kullanılır. Önce birbirine bağlı bir prob primer oligonükleotidinden başlayarak bir zincir sentezi yapılır. Sonra dıştan yeni bir primer ile DNA sentezi yapılırken, polimerazın zincir ayırma özelliği sayesinde daha önce sentezi yapılmış zincir kalıp üzerinden kalkar. Bu zincirin en başındaki prob bölgesi, kendi üzerine özgül bölgeye bağlanarak bir ilmik oluşturur. Zincirin sonundaki bölge ise ters taraftaki primerler için kalıp oluşturur. Ters tarafta aynı işlem tekrarlandığında, bu tarafta da bir ilmik ortaya çıkar. Sonra, ilmik içerisine uyan primerlerden başlayan DNA sentezi, eş zamanlı zincir ayrılması ve yeni ilmikler oluşması ile tepkime zincirleme bir şekilde devam eder²¹. DNA sentezi sırasında nükleotid trifosfatlar yeni zincirlere eklenirken çok miktarda pirofosfat açığa çıkar. Pirofosfat molekülleri magnezyum iyonları ile birleşerek çökelti oluştururlar. Bu çökeltinin gözlenmesi hiçbir cihaza gerek kalmadan nükleik asitlerin çoğaldığını gösterebilir²².

Sonuçta moleküler tanı testleri, kolaylaştıkça, ucuzladıkça ve duyarlılık ve özgüllükleri arttıkça bakteriyel enfeksiyonların tanısında, günlük kullanımda giderek yaygınlaşacaktır.

KAYNAKLAR

1. Lisby G: Application of nucleic acid amplification in clinical microbiology. *Mol Biotechnol* 1999; 12: 75-99.
2. Kocagöz T, Yılmaz E, Özkara Ş, et al: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by polymerase chain reaction using a simplified procedure. *J Clin Microbiol* 1993 ; 31:1435-8.
3. Pinar A, Bozdemir N, Kocagoz T, Alaçam R: Rapid detection of bacterial atypical pneumonia agents by multiplex PCR. *Cent Eur J Public Health* 2004; 12: 3-5.
4. Debeaumont C, Falconnet PA, Maurin M: Real-time PCR for detection of *Brucella spp.* DNA in human serum samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 842-5.
5. Hu JJ, Lu CY, Chang LY, et al: Survey of pertussis in patients with prolonged cough. *J Microbiol Immunol Infect* 2006; 39: 54-8.
6. Susanne M, Gutzmer R, Kapp A, Werfel T: Sensitive detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA and differentiation of *Borrelia* species by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2663-7.
7. KA Orle, Gates CA, Martin DH, Body BA, Weiss JB: Simultaneous PCR detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and herpes simplex virus types 1 and 2 from genital ulcers. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 49-54.
8. Bell CA, Uhl JR, Hadfield TL, et al: Detection of *Bacillus anthracis* DNA by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2897-902.
9. Johansson A, Ibrahim A, Göransson I, et al: Evaluation of PCR-based methods for discrimination of *Francisella* species and subspecies and development of a specific PCR that distinguishes the two major subspecies of *Francisella tularensis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4180-5.
10. Franck SM, Bosworth BT, Moon HW: Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1795-7.
11. Kong RY, Lee SK, Law TW, Law SH, Wu RS: Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. *Water Res* 2002; 36: 2802-12.
12. Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, et al: New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1875-84.
13. Patel R, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Cockerill 3rd FR: Multiplex PCR detection of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes in enterococci. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 703-7.

14. Corinne C, Herbert R, Herbert H: Real-time PCR and melting curve analysis for reliable and rapid detection of SHV extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1730-6.
15. Mullis KB, Faloona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-50.
16. Kocagoz T, Saribas Z, Alp A: Rapid determination of rifampin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 6015-9.
17. Mc Donough SH, Bott MA, Giachetti C: Application of transcription-mediated amplification to detection of nucleic acids from clinically relevant organisms, pp: 113-23. In: Lee H, Morse S, Olsvik O (eds), *Nucleic Acid Amplification Technologies; Application to Disease Diagnosis*. 1997, Biotechniques Books. Natick, USA.
18. Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, Little MC, Nadeau JD, Malinowski DP: Strand displacement amplification- an isothermal in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 1691-6.
19. Vincent M, Xu Y, Kong H: Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Rep* 2004; 5: 795-800. Epub 2004 Jul 9.
20. An L, Tang W, Ranalli TA, Kim HJ, Wytiaz J, Kong H: Characterization of a thermostable UvrD helicase and its participation in helicase-dependent amplification. *J Biol Chem* 2005; 280: 28952-8. Epub 2005 Jun 13.
21. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: E63.
22. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T: Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 150-4.

BAKTERİYEL ENFEKSİYONLARIN TEDAVİSİ VE TAKİBİNDE MOLEKÜLER TESTLER

Doç.Dr.Ufuk Hasdemir

*Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Haydarpaşa Kampüsü,
Tıbbiye Cad. Kadıköy, İstanbul*

Enfeksiyon etkeni bir bakterinin antimikrobiyal duyarlılığını belirlemek, klinik mikrobiyoloji laboratuvarının temel işlevlerinden biridir. Üretilen sonuç hastanın tedavisine yaklaşımda büyük önem taşımakta olup, çoğu enfeksiyon hastalığının ampirik tedavi şeması, lokal, bölgesel veya dünya çapında antimikrobiyal duyarlılık test sonuçları baz alınarak hazırlanmaktadır. Enfeksiyon kontrol önlemleri açısından da klinik önemi olan bakterilerde antimikrobiyal direncinin tesbiti büyük önem taşımaktadır.

Antimikrobiyal direncin gelişimi ve bakteriler arasında hızla yayılımı; morbidite, mortalite ve sağlık hizmetleri harcamaları üzerindeki etkileriyle, insan sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Antimikrobiyal tedaviyi doğru yönlendirebilmek amacıyla klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının doğru ve hızlı antimikrobiyal duyarlılık test yöntemlerine gereksinimleri vardır. Bu yazıda, bakterilerin antimikrobiyal direncinin saptanmasında moleküler yöntemlerin günümüzdeki yeri, avantajları ve sınırlamaları irdelenmektedir.

Antimikrobiyal direncin moleküler temelleri

Bakterilerde antimikrobiyallere dirençten sorumlu bir çok farklı mekanizma bulunmakla birlikte, direncin ortaya çıkışında rol alan temel genetik olaylar; bakterinin doğal direnç genlerinin ekspresyonunu düzenleyen genlerin aktivasyonunu veya doğal genlerin direnç alellere mutasyonunu, ya da kromozomal veya ekstrakromozomal yabancı direnç genlerinin kazanılmasını kapsamaktadır. Klinik önemi olan bakteri türlerinin çoğunda antimikrobiyal direncin bakteriler arasında yayılımından sorumlu esas mekanizma, yabancı genlerin bakteriler tarafından horizontal yolla kazanımı olup, farklı antimikrobiyallere dirençten sorumlu bir çok genin grup halinde plazmidler, transpozonlar veya integronlar aracılığı ile bir bakteriden diğerine geçişi, çoklu antimikrobiyal direnci olan bakteri popülasyonlarının ortaya çıkışı ile sonuçlanmaktadır. Günümüzde klinik önemi olan bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde sorun yaratan antimikrobiyal dirençten sorumlu genetik mekanizmalardan bazıları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Antimikrobiyal direncin biyokimyasal mekanizmalarının ve bunların genetik temellerinin aydınlatılması, hızlı ve güvenilir antimikrobiyal duyarlılık testlerinin geliştirilmesi ve direnç fenotiplerinin terapötik yorumu açısından büyük önem taşımaktadır.

Tablo 1. Klinik önemi olan bazı bakterilerde antimikrobiyal dirençten sorumlu olan esas genetik mekanizmalar ve bunların saptanmasında kullanılabilen bazı moleküler yöntemler

Bakteri(ler)	Antimikrobiyal	Gen	Moleküler yöntem(ler)^a
Stafilokok	Metisilin Oksasilin	<i>mecA</i>	PCR-jel elektroforezi PCR bazlı dizi analizi LiPA DNA microarray
Enterokok	Vankomisin	<i>van A-E ve G</i>	PCR-RFLP Multipleks PCR DNA microarray
<i>Enterobacteriaceae</i>	β -laktamlar	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{OXA}</i> , <i>ampC</i>	PCR-RFLP PCR-SSCP DNA microarray
	Kinolonlar	<i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> , <i>parE</i> 'de nokta mutasyon	PCR-RFLP PCR-SSCP DNA microarray
<i>M. tuberculosis</i>	Rifampin	<i>RpoB</i> 'de nokta mutasyon	PCR bazlı dizi analizi PCR-LiPA PCR-SSCP PCR-CFLP PCR-moleküler fenerler DNA microarray
	İsoniazid	<i>katG</i> , <i>inhA</i> , <i>ahpC</i> 'de nokta mutasyon	PCR bazlı dizi analizi PCR-SSCP PCR-CFLP PCR-RFLP DNA microarray
	Etambutol	<i>EmbB</i> 'de nokta mutasyon	PCR bazlı dizi analizi PCR-SSCP
	Streptomisin	<i>rpsB</i> , <i>rrs</i> 'de nokta mutasyon	PCR bazlı dizi analizi PCR-RFLP
	Pirazinamid	<i>PncA</i> 'da nokta mutasyon	PCR bazlı dizi analizi

^a Moleküler yöntemlerin açık isimleri metin içinde verilmiştir.

Antimikrobiyal direncin saptanmasında fenotipik yöntemlere karşı genotipik yöntemler

Klasik antimikrobiyal duyarlılık testleri; klinik örnekten bakterinin izolasyonunu takiben, kültür ortamında enfeksiyon etkenini, test edilecek antimikrobiyalin farklı konsantrasyonları ile karşılaştırarak üremenin inhibe olduğu antimikrobiyal konsantrasyonunun belirlenmesi prensibine dayalıdır. Bu yöntemle bir bakterinin antimikrobiyal duyarlılık profilinin ortaya konması, hızlı üreyen bakteriler söz konusu olduğunda bile, en az 24-48 saate gereksinim göstermektedir. *Mycobacterium tuberculosis* gibi yavaş üreyen bakterilerde ise bu süre haftalarla veya aylarla ifade edilmektedir. Bakterilerin antimikrobiyallere karşı gösterdiği direncin insan sağlığını tehdit ettiği günümüzde, özgül direnç genlerini saptayabilen hızlı moleküler yöntemlerin gelişiminin ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanımının, heyecan ve umut verici bir yaklaşım olduğu açıktır.

Moleküler yöntemler; 1) dirençten büyük ölçüde sorumlu olan genetik mekanizma(lar)nın bilindiği ve yapay ortamda üretilmeyen ya da yavaş üreyen bakterilerde antimikrobiyal direncin saptanmasına, 2) hızlı sonuç üretebilmesi ve hatta doğrudan klinik örneklerle

uygulanabilmesi nedeniyle zaman tasarrufuna, 3) bilinen genetik direnç mekanizmalarının yayılımının takibine olanak sağlamalarıyla, kültür bazlı fenotipik yöntemlere göre üstünlüğe sahiptirler. Buna karşın moleküler yöntemlerin bazı dezavantajları mevcuttur:

1. Test edilen direnç determinantı dışındaki bilinmeyen bir genetik mekanizmanın aynı antimikrobiyale dirençten sorumlu olduğu durumda veya test primerinin bağlanma kısmındaki bir mutasyon sonucu direnç geni amplifikasyonunun önlenmesi sonucu yanlış negatif sonuç verebilirler.
2. Doğrudan karışık floralı klinik örneklere uygulandıklarında, hedef direnç geni amplifikasyonunun önlenmesi sonucu yanlış negatif sonuç verebilirler.
3. Direnç geni olduğu halde gen ekspresyonunun olmadığı durumlarda yanlış pozitif sonuç verebilirler.
4. Hedef genetik determinanta özgül mRNA'nın kantitatif ölçümü olmadıkça, gen ekspresyonunu düzenleyen mutasyonları saptayamazlar.
5. Çoğunlukla test edilen her antimikrobiyal için ayrı bir test yapılmasına gereksinim duyarlar.
6. Direncin saptanmasını hedeflediklerinden, antimikrobiyal tedavi yaklaşımında esas alınan, bakterinin duyarlı olduğu antimikrobisellerin belirlenmesi için ek testlerin yapılması gereği doğururlar.

Moleküler antimikrobiyal direnç testleri

Moleküler antimikrobiyal direnç testleri, esas olarak nükleik asit hibridizasyonu ve amplifikasyonu prensibine dayanılarak geliştirilmektedir. Bu yöntemler, işaretli tek zincirli nükleik asitlerin (prob) ve hedef gene komplementer olan amplifikasyon oligonükleotidlerinin (primer) geliştirilmesinde kullanılacak olan geniş veritabanlı genetik bilgiye gereksinim göstermektedir. Hedefin seçimi, metodun analitik duyarlılık ve özgüllüğü açısından büyük önem taşımaktadır. Nükleik asit problemleri veya primerleri, bilinen bir direnç genine veya tek bir nükleotid polimorfizmine veya birbiriyle ilişkili direnç determinantlarını barındıran bir gen bölgesine özgül olabilirler. Antimikrobiyal direnç genlerinin saptanmasında kullanılan nükleik asit amplifikasyon yöntemleri arasında; "ligase chain reaction" (LCR), "self-sustaining sequence replication" (SSSR), "strand displacement amplification" (SDA) ve "QB replicase amplification" gibi yöntemler olmakla birlikte, bu amaçla kullanılan en yaygın yöntem polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'dir (Tablo 1.). Klasik PCR'larda, testin ilk basamağı, hedef nükleik asitin amplifiye edilmesini, ikinci basamağı ise amplikondaki direnç genlerinin varlığının teyidini amaçlamaktadır. İkinci basamakta kullanılan metodlar arasında, jel elektroforezi/"southern blot", "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA), "restriction fragment length polymorphism" (RFLP), DNA dizi analizi, "single-strand conformation polymorphism" (SSCP), "cleavage fragment polymorphism" (CFLP), "RNase cleavage", heterodupleks ve "line probe" (LiPA) yöntemleri sayılabilir (Tablo1.). Klasik PCR yöntemlerinde ikinci basamak testlerinin uygulanması gerekliliği, kontaminasyon riskini artıran bir faktör olup, bu yöntemlerin özgüllüğünü etkilemektedir. Son yıllarda geliştirilen moleküler fenerler (molecular beacons), amplifikasyon ortamında amplifiye olan ürünün eş zamanlı monitörizasyonuna olanak sağlayarak, PCR bazlı yöntemlerle yaşanan

kontaminasyon probleminin azaltılmasına yardımcı olmuşlardır. Birden fazla primer kullanımı ile farklı direnç genlerinin aynı anda saptanmasına olanak sağlayan bir diğer yeni metod, multipleks PCR yöntemidir. Otomatizasyona uygun kapasitesi nedeniyle son yılların gözde metodlarından bir diğeri de, hibridizasyon prensibine dayalı DNA "microarray" olup, klasik hibridizasyon yöntemlerinin aksine bu yöntemde, farklı direnç genlerine özgü probler membran yerine, katı bir yüzeye kaplanır (Tablo 1.). Test edilecek DNA ekstrakte edilip işaretlendikten sonra, katı yüzeydeki proba hibridizasyona bırakılır. Hedef-prob hibridizasyonunun saptanması ise raportör bir sistemle yapılır.

Moleküler mikrobiyolojik tekniklerdeki özetlenen tüm bu gelişmeler, maliyet-etkin ve uygulanımı kolay moleküler bazlı antimikrobiyal direnç testlerinin, fenotipik yöntemlere ek olarak rutin tanı laboratuvarlarına yaygın olarak girişinin pek uzun zaman almayacağına işaret etmektedir.

Moleküler antimikrobiyal direnç testlerinin rutin mikrobiyoloji laboratuvarındaki uygulama alanları

Günümüzde, antimikrobiyal direncini belirlemeye yönelik olarak geliştirilen moleküler yöntemlerin büyük bir kısmının kullanımı, araştırma laboratuvarları ile sınırlı olup, henüz bu tekniklerden az bir kısmı rutin laboratuvarlarda tanısal amaçlı olarak kullanıma girebilmiştir.

Staphylococcus aureus'ta metisilin direncini saptamak üzere geliştirilen moleküler testlerden bazıları, duyarlılık ve özgüllüklerinin yüksekliği, fenotipik yöntemlerle yaşanan sıkıntılar ve direncin esas olarak *mecA* genine bağlı olması nedeniyle rutin tanı laboratuvarlarında kendilerine uygulama alanı bulmuş olup, bu amaçla gerçek zamanlı PCR ve multipleks PCR prensibine dayalı ticari testler (IDI-MRSA; GeneOhm, LightCycler *mecA* Detection Assay, Roche Diagnostic) mevcuttur.

Enterokoklarda vankomisin direncini saptamak üzere gerçek zamanlı PCR prensibine dayalı olarak geliştirilen bir kit (LightCycler *vanA/vanB* Detection Assay, Roche Diagnostic), rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın kullanıma adaydır.

Mycobacterium tuberculosis'te rifampisin direncinin saptanması, moleküler antimikrobiyal direnç testlerinin rutin laboratuvarlarda kullanıma girdiği diğer bir alan olup, *rpoB* genindeki mutasyonu saptamak üzere LiPA prensibine dayalı ticari test (LiPA, Inno-Genetics) mevcuttur. Diğer antitüberküloz ilaçlara dirençten sorumlu mekanizmaların kompleksliği, bunları saptamak üzere rutin laboratuvarlarda kullanılabilecek duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek moleküler testlerin geliştirilmesini sınırlayan bir faktör olmakla birlikte, son yıllarda *katG*, *inhA*, *rpoB*, *rpsL* ve *gyrA*'daki mutasyonların eşzamanlı saptanmasına olanak sağlayan DNA "microarray" yöntemi, yakın gelecekte rutin mikobakteriyoloji laboratuvarındaki yerini alacağına benzemektedir.

Günümüzde *Helicobacter pylori*'de makrolid antibiyotiklere karşı direncin giderek artışı ve fenotipik yöntemlerle bu direncin saptanmasında yaşanan zorluklar, moleküler testlerin rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarına girmesine neden olmuştur. Bu amaçla kullanılan moleküler testlerden PCR-LiPA, diğer PCR-RFLP, DNA dizi analizi gibi yöntemlere göre 23S rRNA'daki çoklu mutasyonların eş zamanlı tespitine olanak sağlaması bakımından daha avantajlı gözükmektedir.

Günümüzde farklı bakteri gruplarında insan sağlığını tehdit eden diğer bir çok antimikrobiyal direnç mekanizmasını saptamaya yönelik moleküler teknikler mevcut olmakla birlikte, bunlar daha çok araştırma ve epidemiyolojik amaçlı kullanılmakta olup, rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarına tanısal amaçlı girişleri için zamana ihtiyaç vardır. Bunlara örnek olarak; Gram negatif ve pozitif bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere dirençten sorumlu genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz veya metallobeta-laktamaz üretiminden, florokinolon ve aminoglikozid antibiyotiklere dirençten sorumlu genleri saptamaya yönelik olarak kullanılan moleküler teknikler verilebilir.

Sonuç

Bakteriler tarafından yeni antimikrobiyal direnç mekanizmalarının geliştirilmesi ve önceden varlığı bilinmeyen çevresel kaynaklı direnç genlerinin, klinik önemi olan bakterilere geçişinin devam ettiği sürece, klasik fenotipik antimikrobiyal duyarlılık testleri önemini korumaya devam edecektir. Diğer yandan, moleküler mikrobiyolojideki hızlı gelişmeler sayesinde, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına moleküler antimikrobiyal direnç testlerinin girişi ve yaygınlaşması hız kazanacak ve bu testler fenotipik yöntemleri tamamlayıcı rollerini üstlenmeye devam edeceklerdir.

Sonuç olarak, dirençli bakteri popülasyonlarının artışı devam ettiği sürece, rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarının, antimikrobiyal tedaviyi yönlendirmedeki rolü de giderek artacak ve bakterilerdeki antimikrobiyal direnci ile ilişkili tüm bilimsel araştırmaların ışığında ortaya çıkacak olan teknolojik gelişmelerle, hızlı, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, maliyet etkin ve uygulanımı kolay testlerin geliştirilmesi mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Brazas MD, Hancock RE: Using microarray gene signatures to elucidate mechanisms of antibiotic action and resistance. *Drug Discov Today* 2005; 10: 1245-52.
2. Cockerill III FR: Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 199-212.
3. Cockerill III FR, Smith TF: Response of the clinical microbiology laboratory to emerging (new) and reemerging infectious diseases. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2359-65.
4. Diekema DJ, Dodgson KJ, Sigurdardottir B, Pfaller MA: Rapid detection of antimicrobial-resistant organism carriage: an unmet clinical need. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2879-83.
5. Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ: Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 836-71.
6. Frye JG, Jesse T, Long F, Rondeau G, et al: DNA microarray detection of antimicrobial resistance genes in diverse bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 138-51.
7. Katoch VM: Advances in molecular diagnosis of tuberculosis. *Med J Armed Forces India* 2003; 59: 182-6.

8. Patel R, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Cockerill III FR: Multiplex PCR detection of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes in enterococci. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 703-7.
9. Pfaller MA: Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 312-8.
10. Soini H, Musser JM: Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chem* 2001; 47: 809-14.
11. Sundsfjord A, Simonsen GS, Haldorsen BC, Haaheim H: Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. *APMIS* 2004; 112: 815-37.
12. Tang X, Morris SL, Langone JJ, Bockstahler LE: Microarray and allele specific PCR detection of point mutations in *Mycobacterium tuberculosis* genes associated with drug resistance. *J Microbiol Methods* 2005; 63: 318-30.
13. Woodford N, Sundsfjord A: Molecular detection of antibiotic resistance: when and where? *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 259-61.
14. Zheng X, Kolbert CP, Varga-Delmore P, Arruda J, et al: Direct *mecA* detection from blood culture bottles by branched-DNA signal amplification. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 4192-3.

İNFEKSİYON KONTROL PROGRAMLARINDA MOLEKÜLER TESTLERİN YERİ**Prof. Dr. Sesin Kocagöz***Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları AD.*

Hastane kaynaklı infeksiyonların, gerek ülkemizde gerekse dünyada hastanelerin vermiş olduğu sağlık hizmetinin kalitesini etkileyen önemli etkenlerden biri olduğu ve gerek alınan sonuçların gerekse yapılan harcamaların olumsuz yönde gelişmesinde rol oynadıkları bilinmektedir. Bu tür infeksiyonlara neden olan etkenlerin büyük bir kısmı çoklu dirençli mikroorganizmalardır ve bu nedenle mortalitesi yüksek, tedavisi güç sorunlu infeksiyonlar ortaya çıkmaktadır. Böylesine önemli sorunlar yaratan infeksiyonların oranlarını etkin bir şekilde azaltabilmek amacıyla, infeksiyon kontrol ekibinin hem etkili hem de sürekli koruyucu önlemler alabilecekleri etkin bir hastane kontrol programını kullanıp uygulamaları gereklidir. Başta "The Study of the Efficacy of Nosocomial Infection Control and Prevention" (SENIC) gibi birçok benzer çalışmanın sonuçları, etkili önlemler alındığı takdirde hastane infeksiyonlarının en az üçte birinin önlenilebileceğini göstermiştir. Bu uygulamaları yaşama geçirebilmek için de elde edebilecekleri sonuçları 'kanıta dayalı' veriler ile desteklemeleri gereklidir. Bu destekten yoksun iseler, hastane infeksiyonlarının önlenmesi için, hastane yönetimi ve çalışanlarına gerektiği durumlarda herhangi bir kısıtlama veya düzenlemeyi yaptırmakta zorlanacaklardır.

İnfeksiyon etkenlerin kısa sürede saptanıp tanımlanabilmeleri; bulaşma risklerini azaltmakta, etkin tedavilerinin hızla yapılabilmesine olanak sağlayarak hastaların hastanede yatış süresini kısaltmakta, gereksiz antibiyotik kullanımı nedeniyle oluşabilecek yan etkileri önlemekte ve antibiyotik direnci gelişme riskini düşürmektedir. Moleküler testlerin yardımı ile, izole edilen infeksiyon etkenlerinin birincil mi, tekrarlayan mı yoksa ikincil bir etken mi olduğu da kolaylıkla anlaşılabilir. Ayrıca bu yöntemler ile kısa sürede çok ilaca dirençli (multiple drug resistant; MDR) suşların kaynakları ve yayılma yolları da saptanabilmektedir. Bu sayede, risk faktörlerinin belirlenmesi, hastanede bölümler arası ve hatta hastaneler arası kontrol programlarının değerlendirilmesi, daha etkili ya da değişik kontrol önlemlerinin alınabilmesine olanak sağlanabilmektedir.

Etkin bir infeksiyon kontrol programının yürütülebilmesi için iki önemli unsurun bulunması gereklidir. Öncelikle düzgün ve güncel bir veri toplama sistemi bulunmalı, infeksiyonlardan süphelenildiği dönemlerde uygun süre ve koşullarda alınmış kültürlerin sonuçlarını içermelidir. Kültür ile sonuç alınmasının gecikebileceği yaşamsal durumlarda, bekleme sürelerini kısaltmak için moleküler yöntemlerin kullanılması çok önemlidir. Ek olarak, mikrobiyoloji laboratuvar sonuçlarının sürekli incelenip yorumlanması gereken durumlarda, hastaların akciğer grafi sonuçları, hemşire raporları ve hasta bulguları da izlenebilmelidir. İnfeksiyon kontrolünde ikinci önemli unsur, infeksiyon kaynaklarının ve yayılma yollarının ortaya çıkartılmasıdır. Bu; infeksiyon kontrol ekibinin topladığı veriler doğrultusunda seçilen olgularda moleküler epidemiyolojik testlerin uygulanması ve diğer mikrobiyoloji sonuçları ile birlikte kullanılması ile etkin bir şekilde sağlanabilmektedir.

Moleküler genetik tanı yöntemleri, hastane infeksiyonlarının izlenmesinde ve kontrolünde vazgeçilmez araçlar haline gelmiştir. Özellikle yoğun bakım birimlerinde oluşan

salgınların kaynaklarının araştırılmasında, günlük kullarımdaki testlerin yanı sıra polimeraz zincirleme tepkimesi (PCR) ve değişken alanlı gel elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis; PFGE) gibi genotipik yöntemlerinin kullanılması önem taşımaktadır. Hastanelerde ortaya çıkan salgınlar genelde klonal olmaktadır. Bu salgınlar sırasında tarama kültürleri ile soyutlanan enfeksiyon etkenlerinin moleküler genetik yönden incelenmesi, epidemik klonun dağılımından sorumlu etkenlerin ne olduğunu anlamasını sağlayabilmektedir.

Hastane salgınlarının ortaya çıkmasından sorumlu etkenlerin başında, hastane personeli ve ortak kullanılan aletlerin geldiği bilinmektedir. Bunların saptanması; el yıkama, her hastanın başına işlem sonrası el dezenfeksiyonu amacı ile lavabo, alkol çözeltileri yerleştirilmesi, aspiratör hortumlarının sterilizasyon işlemlerinin devreye konması ve bakımları, eğitim seminerleri gibi bir dizi önlemin alınmasının planlanmasını sağlamaktadır. Yerinde ve etkili önlemler salgınların önlenmesinde ya da en aza indirgenmesinde büyük önem taşımaktadır.

Moleküler tanı yöntemleri, sorun çıkarma olasılığı yüksek olan mikroorganizmaların önceden tanımlanabilmeleri için tarama kültürleri ile saptanan patojen etkenlerin karşılaştırılmalarını sağlayabilmektedir. Özellikle yayılım riski olacağı düşünölen alanlarda bu organizmalar göröldüğü zaman, daha sık tarama kültürleri alınıp buralardan üretilen etkenler ile hastalardan üretilenler arasındaki klonal benzerlikler saptanabilmektedir. Klonal bağlantının olduğunu saptanması, salgınlar oluşmadan gereken önlemlerin alınması ve düzenlemelerin yapılmasına olanak sağlamaktadır. Ayrıca, yıllar içindeki klonal gelişmenin incelenmesi ile de, gelecekteki salgınların oluşmasında rol oynayabilecek transpozon ve plazmid alış-verişi gibi genetik öğeler de tanımlanabilmektedir.

Moleküler tanı testleri sayesinde risk faktörlerinin belirlenmesi; hastanede bölümler arası ve hatta hastaneler arası enfeksiyon kontrol programlarının değerlendirilmesini sağlayarak daha etkili kontrol önlemlerinin alınabilmesinin önünü açabilmektedir. Bu tür çalışmaların hangi durumda ve izolatlarda yapılacağı hastaneden hastaneye değişmektedir. Her hastanenin enfeksiyon kontrol ekibi, bu gereksinimleri düzenli programlar veya acil toplantılarla belirlemelidir. Bu yöntemler kurulurken ve kullanılırken hastanenin olanakları dikkate alınmalıdır. Moleküler tanı yöntemlerinin, enfeksiyon kontrol programlarında yaygın olarak kullanılabilmesi için ucuz, kolay, hızlı ve güvenilir olmaları gerekmektedir. Ayrıca bu tür testlerin ne kadar sıklıkla uygulanması gerektiği de belirlenmelidir. Özellikle bütçesi kısıtlı merkezlerde bu tür taramaların maliyet/yarar oranları iyi değerlendirilmelidir. Bu testlerin işletebilmesi için, hastane laboratuvarlarına kurulum maliyeti ve kullanacak personelin eğitimi dikkate alınmalıdır. Bu testlerin bir hastanede kurulması olanak dışı ise bu sorun, bu tür hizmeti verebilme olanağı olan merkez laboratuvarları ile işbirliği sonucunda çözülebilir. Örneğin San Fransisco'da tüm bölge hastaneleri tüberküloz izolatlarını bölge Halk Sağlığı Laboratuvarlarına (Public Health Laboratories) göndermekte, gerekli olan tanımlama, klonal ilişkilendirme ve duyarlılık sonuçlarını oradan temin etmektedirler. Böylece, hem dirençli tüberküloz etkeni ile kendi personelini karşılaştırma riskini azaltmakta, hem de maliyeti yüksek sistemleri kurmaya gerek olmadan bu hizmetten yararlanabilmektedirler. Ayrıca bu bölgenin tüm tüberküloz izolatlarını tek merkezde toplayarak, klonların kolayca ilişkilendirilebilmelerini sağlamaktadırlar.

Ne yazık ölkemizde genelde bu konunun önemi, salgınlar oluştuktan sonra yani "iş işten geçtikten sonra" hastane yönetimi ve devlet yetkilileri tarafından anlaşılmaktadır. Bu

durum, hastaların bu infeksiyonlardan ölmesine, yoğun bakımların kapatılmasına ve böylece verilen hizmetin aksamasına, ekonomik açıdan daha pahalıya mal olan geç kalınmış bir takım önlemlerin alınmasına, tedavi ve girişimlerin plansızca yapılmasına yol açmaktadır. Ülkemizde de en ekonomik ve en etkin hastane infeksiyon programları; infeksiyon ve salgınlar oluşmadan önceden saptanıp gerekli önlemlerin erkenden planlı bir şekilde düşünülerek alınması ile gerçekleştirilebilir.

KAYNAKLAR

1. Peterson LR, Noskin GA: New technology for detecting multidrug-resistant pathogens in the clinical microbiology laboratory. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 306-11.
2. Tankovic J, Legrand P, Gatines G, Chemineau V, Brun-Buisson C, Duval J: Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic typing methods. *J Clin Microb* 1994; 32: 2677-81.
3. Brossette SE, Hacek DM, Gavin PJ, et al: A laboratory-based, hospital-wide, electronic marker for nosocomial infection: the future of infection control surveillance? *Am J Clin Pathol* 2006; 125: 34-9.
4. Brown SM, Benneyan SJ, Theobald DA, et al: Binary cumulative sums and moving averages in nosocomial infection cluster detection. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 1426-32.
5. Nosocomial Infection National Surveillance Service(NINSS); Surveillance of Hospital-Acquired Bacteraemia in English Hospitals 1997-2002
6. Struelens MJ, Denis O, Rodriguez-Villalobos H: Microbiology of nosocomial infections: progress and challenges. *Microb Infect* 2004; 6: 1043-48.
7. Noskin GA, Peterson LR: Engineering infection control through facility design. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 354-7.
8. Macqueen S: Great Ormond Street Hospital for Children NHS Trust- Infection Control Annual Report April 04- March 05. www.ich.ucl.ac.uk/publications/aicr/2005_annual-infection-control-report.pdf
9. Zoutman DE, Ford BD: The relationship between hospital infection surveillance and control activities and antibiotic-resistant pathogen rates. *Am J Infect Control* 2005; 33: 1-5.

“MICROARRAY” TEKNOLOJİSİNDE SON GELİŞMELER

Dr. Serdar Tuncer

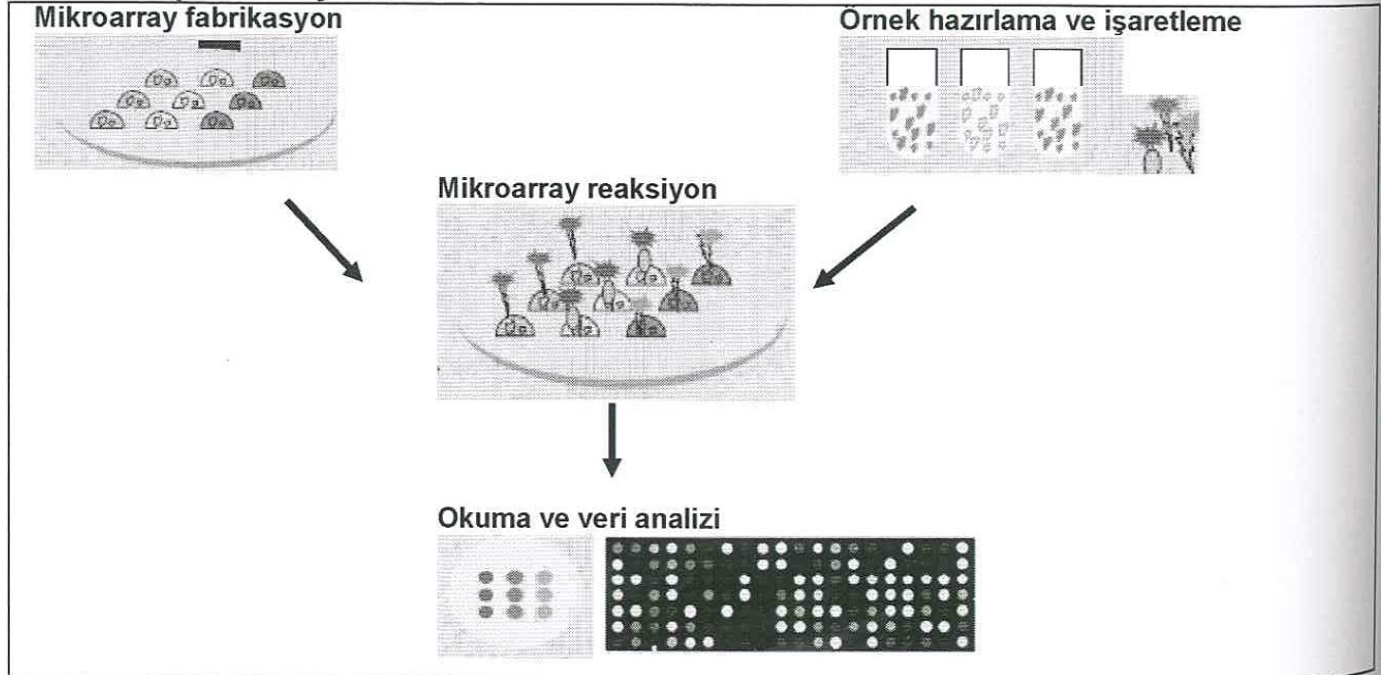
Metis

Moleküler tekniklerdeki ilerlemeler, faydalı yeni ürünlerin hızla ortaya çıkması ve problemlerin çözümünde sağlık ve yaşam bilimlerinin yakın geleceğinde en önemli faktör olarak kabul edilmektedir. Geçtiğimiz yıl yayımlanan endüstriyel analiz raporlarına göre global bütün teknolojiler arasında “mikroarray” teknolojisi, gelecek 10 yıl içinde en hızlı gelişme gösterecek teknoloji segmenti olacaktır. Literatürde “mikroarray” ile eş anlamlı olarak bioçip, DNA-çip, “gen-array” terminolojileri de kullanılmaktadır.

Nükleik asit (NA) amplifikasyonları, floresans sensörler ve NA problemler birinci nesil moleküler teknolojileri oluşturmaktadır. Günümüzdeki yeni nesil teknolojiler olan “microarray”, “microfluidics” ve yeni biosensörler emekleme dönemlerini aşmış ve günlük hayatımıza girme yolundadır. Klasik moleküler biyoloji yaklaşımlarında bir gen ve bir deney yapılmakta iken, yeni nesil teknolojiler ile bütün resmin görülebileceği deney formatları oluşmuştur. “Mikroarray” teknolojisi ile binlerce gen veya ürünleri (RNA ve proteinler gibi) arasındaki ilişkiyi bir çip üzerinde eş zamanlı olarak araştırma imkanının doğması, hayatın sırlarından biri olan bu komplike orkestranın nasıl çalıştığını anlamamıza imkan verecektir.

“Array”, örneklerin bir sıralama dahilinde bir yüzeyde düzenlenmesidir. Bu düzenlemede yüzeyin her noktasında bilinen yakalayıcı molekülü sabitlemek önemlidir. Karşılıklı baz eşleşmesi veya hibridizasyon DNA-“mikroarray”, protein-protein eşleşmesi veya antijen-antikor bağlanması protein-“mikroarray”lerin bilinen temel mekanizmasını oluşturmaktadır. Moleküler biyolojideki teknolojik ilerlemelere, mikrofabrikasyon teknolojisindeki gelişmelerin de eklenmesi ile “mikroarray”ler doğmuştur. 1990’ların başında doğan bu teknolojinin gelişmesi geçtiğimiz yıllarda insan genom projesinin tamamlanması ile katalize olmuştur. Şekilde “mikroarray” teknolojisinin temel işleyiş mekanizması şematize edilmiştir.

Mikroarray Teknolojisi



Bir DNA "mikroarray", küçük katı bir yüzey üzerine sayısı yüzbinlere kadar çıkabilen değişik gen dizilerinin bilinen noktalara immobilize edildiği bir test aparatıdır. Katı yüzeyler genellikle mikroskop slayt camlarından oluşmakla birlikte, silikon yüzeyler veya naylon membranlar da kullanılabilir. DNA bu yüzeye püskürtme, spotlama veya direk olarak yüzeyde sentez yapılarak immobilize edilir. Spotlar DNA, cDNA veya oligonükleotid olabilir. Floresan işaretli moleküller varlığında enzimatik bir reaksiyon ile test edilecek NA örneği hazır hale getirildikten sonra, "array" yüzeyinde özgül hibridizasyon-bağlanma gerçekleştirilmektedir. Yeni hibridizasyon formatları geliştirilmekle birlikte, günümüzde çoğunlukla katı-yüzey tekniği kullanılmaktadır. Bu basamak tamamlandıktan sonra kullanılan floresanların ışımalarını ölçebilecek okuyucu bir cihaz (lazer veya CCD kamera) yardımı ile "array" üzerindeki sinyallerin ölçümü yapılmaktadır. Elde edilen sinyaller bilgisayara aktararak özel bir yazılım programı aracılığı ile hesaplanıp elde edilen veri, dijital bir görüntüye çevrilmektedir. Floresanların yoğunluğuna göre "array" üzerinde her noktada özgül hibridizasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği bu şekilde anlaşılmaktadır. "Array" matrisinde yapılan tasarımın özelliğine (yerleştirilen yakalayıcı oligo bilgileri) göre sonuç analizi tamamlanmış olmaktadır.

DNA "mikroarray" teknolojisinin iki ana uygulama kapsamı vardır:

- 1) DNA dizisinin saptanması: Örnekler ile hibridizasyon sonrası alınan sinyale göre, oluşan matris sinyallerden DNA dizisi ortaya çıkmakta veya nokta mutasyon (SNP) saptanabilmektedir.
- 2) Gen ekspresyonunun saptanması: Referans kontrol sinyalleri ile karşılaştırılarak mRNA miktarının tayini yapılmaktadır.

Bu iki uygulama 2 farklı formatta gerçekleştirilmektedir:

- 1) cDNA "array": cDNA probe (500-5000 baz çifti) olarak katı yüzey üzerine yerleştirilir ve işaretli hedefler ile tek tek veya karışık olarak hibridizasyon sonrası analiz edilir.
- 2) Oligonükleotid "array": 20-80 baz çiftlik oligonükleotidler katı yüzey üzerine immobilize edilir veya katı yüzey üstünde sentezlenir, işaretlenmiş hedef gen/DNA ile hibridizasyon sonrası analiz edilir.

Bir DNA "mikroarray" deneyinin tasarım ve gerçekleştirilmesi genel olarak aşağıdaki aşamalardan geçer (her basamak için alternatif stratejiler geliştirilmelidir).

"Mikroarray" test geliştirme aşamaları					
1) Prob seçimi (Bilinen cDNA veya dizisi bilinen oligo)	2) Array (Çip) Fabrikasyon (Prob immobilizasyonu)	3) Hedef (Floresan işaretli örnek)	4) Hibridizasyon	5) Okuma-Çıktı alma	6) Analiz (informatik)
Oligo uzunluğu, cDNA'lar, kromozom veya çip üzerinde bütün organizma....	Fotolitografi, pipet, damla dokundurma, piezoelektrik (ink-jet), elektrik...	Enzimatik, RNA, mRNA, PCR ürünü, cDNA.....	Baz modifikasyon, süre, elektroforez, flow sitometri, ligaz, elektrik akımı.....	Floresans, elektrik rezistans, kütle spektrofotometresi, elektroforez.	Robotik kontrol, Görüntü analizi, internet, bioinformatik.

Uygulama amacı ve tasarım geliştirmenin özelliklerine göre yukarıdaki her aşama için çok sayıda değişik seçenek ve kombinasyon mevcuttur. Bir "mikroarray" deney tasarımı için gereken en temel bilgiler şunlardır:

- 1) "Array" tasarımı: Slayt (katı yüzey), prob seçimi ve slayt üzerinde prob yerlerinin belirlenmesi.

- 2) Deney tasarımı: Kullanılacak örnek, örnek hazırlığı veya NA amplifikasyon, işaretleme, hibridizasyon ve parametrelerinin belirlenmesi. Çıktıların ölçülmesi ve veri analizidir.

Protein "array"lerin uygulamaları; protein ekspresyonu profilinin çıkarılması (örn. sitokin ölçümleri), teşhis (örn. otoantikorlar) ve protein fonksiyonlarının belirlenmesi (örn. epitop haritası çıkarılması, enzim aktivitesi) olarak sınıflandırılabilir. Protein "mikroarray" prensipleri klasik immünoassay prensipleri ile aynıdır. Test formatının minyatürleşmesi, test süresinin kılmasını yanı sıra çok sayıda analiz sonucunu aynı anda alma imkanı sağlamaktadır. Protein ve DNA "mikroarray"lerin özellikleri arasındaki farklılıklar aşağıda özetlenmiştir.

Protein "array"	DNA "array"
Hedef molekül tanıma reseptör bağlantısı ile oluşur (ionik, van der Waals, hidrojen..)	Hedef molekül hibridizasyon ile tanınmaktadır (hidrojen bağları)
Prob özgüllüğü ile aminoasit dizisi arasında korelasyon yoktur	Hedef-prob hibridizasyonu diziler ile koreledir
Hedef amplifikasyon yöntemi yoktur, sadece sinyal amplifikasyon mevcuttur	Hedef ve sinyal amplifikasyon metodları vardır
Antikor, protein veya reseptör üretimi veya sentezi zordur	DNA sentezi kolay uygulanır ve ucuzdur
Prob oryantasyonu fonksiyonu etkiler	Basit immobilizasyondur
Biyokimyasal olarak stabil değildir	Stabildir

İnsan genomunun dizisinin çıkarılması sonrası, moleküler tanı teknolojilerinde beklenen dramatik değişiklik henüz etkilerini yeni göstermektedir. Fonksiyonel genomik araştırmalarında belirgin artış son yıllarda başlamıştır. Biyoinformatik, nanoteknoloji ve minyatürleştirme, mikroelektronikteki gelişmeler klinik çalışmalara entegre olmuş ve enformasyon ve bilgisayar endüstrisi ile geleneksel tıp mühendisliği değişikliğe uğramıştır. "Mikroarray" veya bioçip ürünleri bu gelişmelerden doğmuş, tıbbi araştırma ve ilaç geliştirme çalışmalarını hızlandırmıştır. Moleküler tıptaki gelişmelerle tıbbi laboratuvarlarda nükleik asit ve proteinlere bağlı testler, insan ve patojen genom çalışmalarından gelen bilgi ile in-vitro diagnostik (IVD) test ve cihazları için yeni kullanım alanları oluşmaktadır.

İnsan Genom Projesi dışında DNA çip teknolojisinin önemli bir katılımcısı farmasötik şirketlerdir. Birçok bioçip üreticisi, ilaç şirketleri ile stratejik ortaklık halindedir. İlaç geliştirmelere yönelik farmakogenomik çalışmalardaki hızlı ilerleme sayesinde, bireysel farmakogenetik endüstrisi tanı sektöründe hakimiyeti eline geçirecektir ve hastalıklarla ilişkili genlerdeki DNA değişikliklerinin saptanması (SNP analizleri) yakın gelecekte tıbbın merkezinde yer alacaktır. Moleküler taramalar; bireylerin hastalık yatkınlığının önceden belirlenmesi, erken teşhis, hastalığın seyrinin tahmin edilebilmesi ve en uygun tedavi seçeneğine yol gösterme açısından önemlidir. Bireyin doktor ofisinde veya hasta başı test olarak genetik profilinin belirlenmesi, bireye yönelik tedavi uygulamalarının da yakın gelecekte gerçekleşeceğini göstermektedir.

Geçtiğimiz yüzyılın sonlarında, moleküler tanı yöntemleri tahmin edildiği kadar beklenen büyüme eğilimine girmemiştir. Kısa dönem içinde, özellikle moleküler mikrobiyoloji pazarında, viral patojen saptanması, genotiplendirme ve kan taramaları alanlarında yıllık %20 civarında büyüme beklenmektedir. Etkenin erken tanısını, hastalık durumunun hızla saptanmasını ve erken tedavi kararının verilmesini sağlayacak daha hızlı yöntem

ihtiyacı, bu pazarı diğerlerine göre şimdilik önde götürmektedir. Moleküler tekniklerin kullanımını artıracak diğer faktörler ise; kolay ve otomatize sistem ihtiyacı, örnek hazırlığından analiz ve değerlendirmeye kadar geçerlilik ve güvenilirlik sorunu olmaksızın sonuç alınmasıdır. Ancak, diğer moleküler biyolojik teknikler gibi "mikroarray" test sistemleri de pazarda bulunmalarına ve artan ilgiye rağmen, geçerlilik, fayda ve maliyet analizlerinin çok iyi hesaplanmasını ve uygulamada ciddi düzenleme çalışmalarının yapılmasını gerektirmektedir. Ayrıca IVD endüstrisi, moleküler tanıda bir çeşit açık platforma doğru gitmek zorundadır. Zira klinik laboratuvarların varolan her test platformunu bünyesine alması pek mümkün değildir.

ETKEN MANTARLARIN KLİNİK ÖRNEKTE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE GÖSTERİLMESİ VE TANIMLANMASI

Doç.Dr. Ayşe Kalkancı

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

İnvaziv mantar enfeksiyonlarının görülme sıklığı, bağışık sistemi baskılanmış konak sayısındaki artış ile birlikte yükselmektedir. İnfeksiyon etkeni olan mantarlar sıklık sırasına göre mayalar, küfler ve dimorfik mantarlardır. Mayalardan *Candida* türleri kan kültürlerinin %8-15'inden izole edilmektedir. *Trichosporon* ve *Cryptococcus* türleri özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda enfeksiyon oluşturmaktadır. Küflerden başta *Aspergillus* türleri olmak üzere *Fusarium*, *Rhizopus* ve *Rhizomucor* türleri ile faehifomkoz etkeni esmer mantarlar izole edilmektedir. Özellikle hücrenel bağışık yanıtında yetersizlik olan hasta gruplarında dimorfik mantarlardan *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* izolasyonları bildirilmektedir¹⁻⁵.

Mantar enfeksiyonlarının tanısı klasik olarak kültürden etkenin izolasyonu ve tanımlanması, serolojik olarak mantar ürünlerinin gösterilmesi, histopatolojik preparatlarda mantarlara ait hiflerin veya hücrelerin görülmesi, radyolojik olarak özgül görüntülerin saptanması eşliğinde klinik bulgular ile konmaktadır⁶. Moleküler yöntemler, yüksek özgüllük ve duyarlılıkları ile son yıllarda bütün enfeksiyon hastalıklarında olduğu gibi mantar enfeksiyonlarında da tanı koydurucu avantajlar sunmaktadır^{7,8}. Özellikle kültürde üretilmeyen etkenlerin moleküler yöntemler kullanılarak gösterilmesi, tanıda önemli avantajlar getirmiştir. Etken kültürde üretilse bile tür tanımı yapılması için moleküler yöntemlerden faydalanılabilir⁹.

Derin dokularda enfeksiyon oluşturan mantarların kültürden izolasyonu genellikle %50 başarı ile mümkün olmaktadır¹⁰. Bu nedenle mantar enfeksiyonlarının tanısı; genellikle histopatolojik preparatlarda görülen özgül olmayan mantar elemanları ile serolojik ve radyolojik indirek tanı yöntemlerinin desteklediği klinik tanı ile kısıtlı kalmaktadır. Pek çok orguda tür hatta cins tanımı yapılamamaktadır³. Farklı etkenlerin neden olduğu mantar enfeksiyonları klinik veya radyolojik olarak birbirinden ayıramayabilir, ancak her etken antifungal duyarlılık açısından büyük farklılıklar göstermektedir. Bu açıdan bakıldığında, mantarların en azından cins düzeyinde tanımlanmaları gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Moleküler yöntemler, diğer tanı yöntemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda, bu gerekliliğe cevap verebilecek geniş olanaklar sunmaktadır^{11,12}.

İnvaziv mantar enfeksiyonları özel hasta gruplarında görülmektedir. Kemik iliği alıcılarında görülen invaziv enfeksiyonların %15-25'inden, solid organ alıcılarında görülen enfeksiyonların ise %5-42'sinden mantarlar sorumludur⁸. Bu enfeksiyonun mortalitesi %47-88 arasında değişmektedir¹⁰. Özel hasta gruplarında invaziv mantar enfeksiyonlarının önemi tartışılmazdır. Ancak moleküler yöntemlerin bu hastalık grubunda kullanımı, her laboratuvar için tek tek değerlendirilmelidir. Bir klinik mikrobiyoloji laboratuvarının hangi tanı testlerini yapacağına karar verecek olan mikrobiyoloji uzmanının, laboratuvarın bir işletme olarak konumunu düşünerek ve maliyet analizi yaparak sistem kurması gerekir. Bir mikrobiyoloji laboratuvarının

hizmet ettiği hasta grubu dikkate alınarak test profili düzenlenmelidir. Buna göre pratikte akılcı bir yaklaşım uygulanmalıdır. Bir referans laboratuvarı hizmeti yapılması hedefleniyor ve bütün mantarların izolasyonu ve tanımlanmasının yapılması gerekiyorsa farklı bir algoritim, rutin bir tanı laboratuvarında sadece en sık görülen etkenlerin tanımlanması hedefleniyorsa farklı bir algoritim düzenlenmelidir. Ülkemizde mantar infeksiyonlarının tanısında ve etkenlerin saptanmasında sınırsız hizmet veren bir referans laboratuvar bulunmamaktadır. İnvaziv mantar hastalıklarının tanımlanmasında da moleküler yöntemleri kullanabilen laboratuvar sayısı kısıtlıdır. Mantar infeksiyonlarının görülme sıklığı dikkate alınarak gelişmiş bir moleküler tanı laboratuvarında, birkaç basamakta tür tanımına ulaşılabilir. *Candida* ve *Aspergillus* türleri en sık izole edilen mantar etkenleridir. Buna göre bu mantarların cins düzeyinde ve mümkünse en sık görülen türler düzeyinde tanımlanmaları ilk hedef olmalıdır. Oluşturulacak tanı profilinde bağışık yetmezliği olan konaklarda sıklıkla rastlanan *Pneumocystis jirovecii* (eskiden *P.carinii*) mutlaka yer almalıdır. Bunun dışında kalan yüzlerce cinsi ve çok daha fazla türü, özel hasta gruplarında invaziv infeksiyon etkeni olabilir. Ancak bütün nadir görülen mantarlara özgül yöntemlerin hazırda bulundurulması akılcı değildir. Öyleyse klasik yöntemler yanında moleküler yöntemler ile mantar infeksiyonlarının tanısını koyabilmeyi amaçlayan bir mikrobiyoloji laboratuvarı, öncelikle *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* ve *P.jirovecii* için moleküler tanı testlerini uygulayabilmeli, daha az görülen etkenler için referans merkezlere başvurmayı tercih etmelidir.

Bu çerçevede öncelikle bugüne kadar yaşanan gelişim süreci özetlenecek, ardından en sık görülen üç etkene yönelik moleküler tanı yöntemleri ayrıntılarıyla değerlendirilecek, diğer türler için de olgu raporları eşliğinde tanı örnekleri verilecektir.

Mantarların tanısında kullanılan moleküler yöntemlerin gelişim süreci

Literatürde, mantarların moleküler tanısında kullanılan yöntemler, daha ziyade araştırma laboratuvarı deneyimi olarak sunulmaktadır. Gelişmiş moleküler yöntemler ile bugüne kadar bir klinik örnekten hiç izole edilememiş bir mantarın tanımlanması yapılabilmektedir. Aslında en önemli nokta, izole edilen mantar ile klinik tablonun ilişkilendirilmesidir. Bu nedenle, klinisyen laboratuvar işbirliğinin en önemli olduğu başlıklardan biri invaziv mikozların laboratuvar tanısıdır⁶. Yapılan çalışmalar moleküler yöntemlerin invaziv mantar infeksiyonunun klinik tablosu şekillenmeden 2-9 gün önce pozitif sonuç verdiğini göstermiştir¹³.

Son on yılda mantarların filogenetik bilgisinde büyük bir genişleme olmuştur. Yapılan ilk moleküler tanımlama çalışmaları olan, ribozomal DNA tekrar bölgesinin "restriction fragment length polymorphism" (RFLP) analizi yapıldığında *Candida* türlerinin farklı büyüklükte bantlar oluşturduğu gösterilmiştir. Hemen arkasından işaretlenmiş DNA problemlerinin kullanıldığı "Southern blot" yöntemi ile RFLP'nin duyarlılığı artırılmıştır^{14,15}. 1990'ların başından itibaren polimeraz zincirleme reaksiyonu (PCR) tekniği ile çok küçük miktardaki DNA'nın çoğaltılabilmesi ve kolaylıkla agaroz jelde görülebilmesi mümkün olmuştur. Böylece türe özgül DNA ürünlerinin çoğaltılması ve birbirine çok yakın türlerin ayrılabilmesi sağlanmıştır¹⁶⁻¹⁸. İki turlu "nested" PCR ile, ilk turda ITS gibi ortak bir bölgenin, ikinci turda türe özgül primerlerin kullanılması ile özgüllük daha da artırılmıştır¹⁹. İlk yapılan çalışmalarda cinse özgül PCR yaklaşımı uygulanmış, ancak son çalışmalar ITS gibi mantarlara ait ortak bölgelerden seçilecek "universal" pan-fungal primerlerin kullanılmasının daha yararlı olacağını ortaya koymuştur. Patojen varsa tür düzeyinde tanımlama için eşlik eden özgül testler geliştirilebilir²⁰.

Yüksek riskli hastalarda, tek bir yöntem ile hastaları hem taramak hem de tedavi takibi yapmak mümkün olabilmelidir. 2000'li yılların başından itibaren geliştirilen floresan işaretli problemlerin özgül DNA'ya bağlandıklarında çıkan enerjiyi ölçen TaqMan (Perkin Emler) veya Light Cycler (Roche Molecular Biochemicals) gibi cihazlar kullanılmaya başlanmıştır^{21,22}. Gerçek zamanlı PCR tekniği sayesinde 10fg/ml DNA gösterilebilmekte ve örnekteki fungal yük miktarı belirlenebilmektedir^{23,24}.

Son yılların en ilgi çekici konularından biri olan "microarray" (DNA yongaları) teknolojisi, mantar infeksiyonlarının tanısında da çok geniş olanaklar sunabilir. Seçilecek bölgelere özgü hibridizasyonlar oluştuğunda, bir tek çalışmada çok sayıda mantarın taranması mümkün olabilir^{25,26}. Böyle gelişmiş bir yöntem henüz rutin laboratuvarlar için uygun değildir, ancak yıllar içinde tekniğin yaygınlaştırılması mümkün olabilir.

Bundan sonraki bölümde en sık görülen etkenlere yönelik yöntemler özetlenecektir.

İnvaziv kandidoz

Kandidemi tanısında kullanılacak klinik örneğin serum veya kan mı olacağı konusunda farklı görüşler bulunmaktadır²⁷. Ancak kandideminin patogenezi düşünüldüğünde, tam kan örneğinde hücre içeren çökelek hazırlanarak mantara ait DNA araştırılmasının daha duyarlı olacağı anlaşılmaktadır. Derin doku kandidozunda biyopsi örneklerinde duyarlılık çok yüksektir. Ancak olgularda fungemi yoksa kandan DNA izole edilmesi olasılığı düşmektedir. Böyle bir tabloda, radyoloji desteğinde hepatik kandidoz ön tanısı koyan bir klinisyene, negatif PCR sonucunun, yalnızca negatiflik değil patogenezin doğal bir sonucu olduğunu açıklamak, klinik mikrobiyoloğun görevidir. *Candida* türleri normal vücut florasının değişmez üyeleri olduğu için, floral bölgelere alınan klinik örneklerde PCR yapılması tanı koydurucu değildir. Balgam, idrar, dışkı gibi örnekler *Candida* PCR testi için kabul edilmemelidir.

Klinik örnekten DNA eldesi için kullanılabilecek farklı temellere dayanan yöntemler bulunmaktadır:

1. Kimyasal maddeler ve ısı yardımı ile DNA eldesi
2. Filtrasyon temeline dayalı hazır kitler
3. Manyetik boncuk teknolojisi ve robotik sistemler

Kimyasal madde ve ısı kullanılan "in-house" yöntemler, laboratuvarların kendilerinin geliştirdikleri protokolleri içermektedir. Hiçbiri standardize değildir, uzun zaman alır ve kontaminasyon olasılığı vardır. Ancak ucuz olmaları nedeniyle az sayıda örnek ile çalışan laboratuvarlar için vazgeçilmez yöntemlerdir²⁸.

Filtrasyon temeline dayalı bütün ticari sistemler aslında viral DNA-RNA eldesi için geliştirilmiş hazır kitleri içermektedir. Her ne kadar üretici firma önerileri ökaryotik DNA eldesi için de kullanılabileceklerini göstermekte ise de, yaptığımız çalışmalarda duyarlılıklarının düşük olduğu saptanmıştır^{29,30}.

Manyetik boncukların kullanıldığı otomatize robotik sistemler çok sayıda örnek çalışan laboratuvarlar için önerilmektedir. Yöntem pahalıdır, ancak ökaryotik DNA eldesinde

filtrasyon temeline dayalı ticari kitlere belirgin üstünlüğü olduğunu gösteren yayınlar bulunmaktadır^{31,32}.

Candida PCR testi için hedef olarak kullanılabilir gen bölgeleri aktin geni, kitin sentaz geni, aspartil proteinaz genleri, p450 geni, ITS bölgesi, rRNA bölgesi olabilir³³. Klinik örnekten direk olarak tanı konabileceği gibi, kültürde etken izole edildiği ancak tanımlamanın doğrulanması gerektiği durumlarda, türe özgül primerler kullanılarak veya dizileme yapılarak sonuç elde edilebilir^{34,35}.

Einsele ve arkadaşları geliştirdikleri yöntemde 18S rRNA bölgesini hedef olarak kullanmışlardır³⁶. Bu araştırmacılar farklı gruplarda yöntemin duyarlılığını test etmişler; *Candida* ile kolonize olan 189 hastanın 3'ünde PCR ile pozitiflik saptarken, invaziv infeksiyon gelişen bütün fungemi olgularında pozitif sonuç elde etmişlerdir. Yöntem antifungal tedavinin takibinde de başarı ile kullanılmış ve saptama alt sınırı 1 cfu/ml mantar olarak belirlenmiştir³⁶. Martin ve arkadaşları ITS bölgesini çoğaltmış, ardından ters hibridizasyon "line probe assay" (LPA) ile tür ayırımını denemişlerdir. Aslında ITS bölgesi pek çok tür için ayırımı sağlayacak farklılığa sahiptir. Ancak *C.albicans* ile *C.dubliniensis* arasındaki homoloji nedeniyle ayırım güçleşmektedir. LPA alt sınırı agaroz jelden 10 kat az bulunmuş ve 2-10 cfu/ml olarak hesaplanmıştır³⁷.

İnvaziv aspergilloz

Aspergillus PCR testi, aspergilloz için duyarlı ve erken bir tanı belirteci olarak tanımlanmasına rağmen uluslararası standardizasyondan yoksundur. Düzenli olarak yapılan ardışık PCR testinin invaziv aspergilloz erken tanısında güvenilir olduğu ve birbirini izleyen birkaç örnekte negatif sonuç alınan hastalarda invaziv aspergillozun gelişmediği (negatif prediktif değer %92) saptanmıştır³⁸. Alman Hematoloji ve Onkoloji Derneği tarafından halen yürütülmekte olan bir çalışmada (IDEA Trial), haftada iki kez PCR testi yapılan AML ve kemik iliği alıcılarında, PCR pozitif bulunduğunda antifungal tedaviye başlanması ile, klinik tablo geliştiğinde başlanması arasında fark olup olmadığı incelenmektedir⁴. European Organization for Research and Treatment of Cancer / Invasive Fungal Infections Cooperatiye Group (EORTC/IFICG), invaziv mantar infeksiyonlarını; "tanısı kanıtlanmış (proven)", "muhtemel (probable)" ve "olası (possible)" olarak gruplamayı önermiş, ancak mikrobiyolojik kriterler arasına PCR'ı dahil etmemiştir³⁹. Bu nedenle PCR pozitifliğini "kesin" fungal infeksiyon olarak değerlendirmeden önce, klinik tablonun göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Kandidemi için geçerli olan tam kan örneği önceliği, *Aspergillus*'a bağlı fungemi için de uygulanmalıdır. Özellikle solunum sistemi örnekleri (balgam, bronkoalveoler lavaj, trakeal aspirat, akciğer biyopsisi) aspergilloz tanısında daha çok kullanılmaktadır⁴⁰. Küf mantarlarının yaşam alanlarında zaten var olması, testin amplikon ile kontaminasyonu riskini artırmaktadır. Bu nedenle örnek alımında ve PCR uygulamalarında dikkatli davranılmalıdır. Hem *Candida* hem *Aspergillus* türlerine yönelik ticari PCR sistemleri bulunmaktadır. Ancak pratik uygulamalarda, "in-house" yöntemlerden daha üstün oldukları gösterilmemiştir. *Candida* cinsi için kullanılan ve yukarıda bahsedilen DNA eldesi yöntemleri *Aspergillus* türleri için de kullanılabilir⁴¹.

Küfler yapı olarak mayalardan daha karmaşıktır. Bunun doğal sonucu olarak küflerden DNA eldesi daha zordur. Bitkilerden DNA eldesi için üretilen bir ticari kitin, *Aspergillus* kolonilerinden DNA eldesi için de başarılı olduğu bildirilmiştir⁴².

Aspergillus türleri için kullanılacak cinse özgül bölgeler; rRNA bölgesi, ITS bölgesi, alkalin proteaz geni, p450 geni ve mitokondriyal DNA bölgesidir^{43,44}. Bu bölgeleri hedef alan cinse ve türe özgül konvansiyonel PCR veya gerçek zamanlı PCR kullanılabilir. Ardından hibridizasyon problemlerinin kullanıldığı bütün amplifikasyon dışı teknikler veya LPA tekniği uygulanabilir^{36,37}.

Aspergillus türlerinin oluşturduğu invaziv infeksiyonlarda, kültürde etkenin izole edilme olasılığı *Candida* türlerinden daha düşük olduğu için, moleküler yöntemlerin aspergilloz tanısındaki yeri daha çok önem kazanmaktadır⁴⁵⁻⁴⁷.

Pnömosistoz

P.jirovecii nötropenik hasta grubunda önemli bir interstisyel pnömoni etkenidir. Kültürü yapılamadığı için tanısı mikroorganizmanın direk olarak ışık veya floresan mikroskopta gösterilmesi ve moleküler yöntemler ile sınırlıdır⁴⁸. Pnömosistoz tanısında kullanılacak klinik örnekler, hastalığın genellikle solunum sistemi ile sınırlı olmasına bağlı olarak solunum yolu örnekleridir. Solunum sistemi dışında dalak, karaciğer ve böbrekler nadiren tutulmaktadır. Mikroorganizma kanda serbest olarak dolaşmadığı için kan örneği tanıda kullanılmaz. Balgam veremeyen pediyatrik olgularda ağız çalkantı suyunun kullanılabilmesi bildirilmektedir. Ancak duyarlılık yüksek değildir⁴⁹. *P.jirovecii* PCR testi için ideal klinik örnek, bronkoalveoler lavaj sıvısıdır. Bunun yapılamadığı durumlarda balgam veya aspirat örnekleri kabul edilebilir. Ancak floral bölgelerden DNA eldesi sırasında duyarlılık düşmektedir. Son yıllarda mantar olarak sınıflandırılan bu mikroorganizmaya özgül DNA eldesi için hazır ticari sistem bulunmamaktadır. Literatürdeki bütün yayınlar "in-house" DNA izolasyonu ve filtrasyon temeline dayalı sistemlerin kullanıldığı çalışmaları içermektedir⁵⁰. Anabilim dalımızda kullanılan DNA eldesi yöntemi de laboratuvarımız tarafından geliştirilmiştir. Elde edilen DNA üzerinde amplifikasyon için hedef seçilebilecek bölgeler; mitokondriyal RNA üzerinde LSU (large subunit) bölgesi⁵¹ veya rRNA üzerindeki ITS bölgesidir. Yöntem olarak daha çok iki türlü düzenlenen konvansiyonel PCR veya gerçek zamanlı PCR kullanılmaktadır⁵². Pnömosistoz tanısı için hastanın klinik tanısı çok önemlidir. *P.jirovecii*'nin nötropenik hasta grubunda normal florada bulunabileceği unutulmamalıdır.

Diğer etkenler

Yaklaşık olarak 100 cins mantar, insanda hastalık etkeni olarak izole edilmiştir. En sık görülen *Aspergillus* ve *Candida* türleri dışındaki invaziv mikoz etkenlerinin tanısı için de PCR yöntemleri kullanılabilir^{8,53,54}. Sistemik dimorfik mantarlar olan *H.capsulatum*, *C.immitis* ve *B.dermatitidis* tanısında, Gen-Probe tarafından geliştirilen Accu-Probe sistemi yaygın olarak endemik bölgelerde kullanılmaktadır⁵⁵⁻⁵⁷. Kültürde üreyen mantar rRNA içerir. Problar ise kemoluminesan işaretli DNA olup, özgül rRNA ile hibridize olmaktadır. Oluşan ışımaya lüminometrede ölçülmektedir. Elbette kültürde bulunan yüksek nükleik asit miktarı klinik örnekte bulunamaz. Klinik örnek test edileceği zaman bu durum göz önünde bulundurulmalıdır.

Nadir olgulara yaklaşım

Doğada bulunan bütün mikroorganizmaların uygun koşullarda potansiyel patojen haline geçebileceği gibi, daha önce invaziv enfeksiyon etkeni olarak gösterilmemiş bir mantar da fungemi oluşturabilir^{58,59}. Bütün mikroorganizmaları tanıyabilecek tek

moleküler yöntem, ribozomal DNA'dan seçilecek gen bölgesinin dizilenmesi (sequencing) işlemidir. Ribozomal DNA'nın iki bölgesi mantarların tanımlanmasında daha çok kullanılmaktadır. Birincisi küçük ve büyük ribozomal alt ünitelerin arasında bulunan "internal transcribed spacer" (ITS) bölgesi, ikincisi de geniş (26S) ribozomal alt ünitenin D1/D2 bölgesidir. Bu bölgeler tür düzeyinde tanımlama için yeterli dizi farklılığına sahiptir¹³. Bir DNA dizisinin tanımlanması için, daha önce elde edilen veriler ile karşılaştırılması gerekmektedir. Askomiyetler ve bazidiyomiyetler ile siyah mayalar için, böyle bir bilgi temeli gen bankasında bulunmaktadır. LSU (large subunit) rDNA D2 bölgesinin dizilenmesini sağlayan ticari bir kit (Applied Biosystems MicroSeq D2) mevcuttur. Bu yöntem LSU D2 bölgesinden 300 bp'lik bir diziden sonuç alınmasını sağlar. Dizileme sonuçları analiz programları ve dizi kütüphanelerinin bilgileri ile karşılaştırılarak tanımlama yapılabilir. Ancak henüz yeterli veri toplanmadığı için bütün mantarların bu şekilde tanımlanmaları mümkün olamamaktadır⁶⁰. Böyle bir olanağın bütün laboratuvalarda bulunması beklenmemelidir. Ülke koşulları göz önüne alınarak belli merkezlerde otomatize dizileme cihazlarının bulunması ve buralardan yararlanmanın sağlanması gereklidir. Yılda yaklaşık 1000-1500 hastanın mantar enfeksiyonları açısından değerlendirildiği laboratuvarımızda, invaziv mantar enfeksiyonları yaklaşık olarak hastaların %10'unda tespit edilmektedir. Bu oranın gösterdiği yaklaşık 100-150 hastadan, 80-120 tanesinde klasik yöntemlerle ve moleküler yöntemler kullanılarak *P. jirovecii*, *Candida* ve *Aspergillus* türleri etken olarak izole edilmektedir. Bunun dışında kalan yaklaşık 30 hastanın %50'sinde (10-15 hasta) etken mantar moleküler yöntemlere gerek kalmadan, kültürde izole edilmektedir. Geriye sadece pan-fungal PCR sonucu pozitif bulunan, *Candida* ve *Aspergillus* PCR sonucu negatif, 10-15 hasta kalmaktadır. Bu olgularda antifungal tedavi başlanması ve tedavinin yine pan-fungal PCR ile takip edilmesi olguya yaklaşım açısından yeterli kabul edilmektedir.

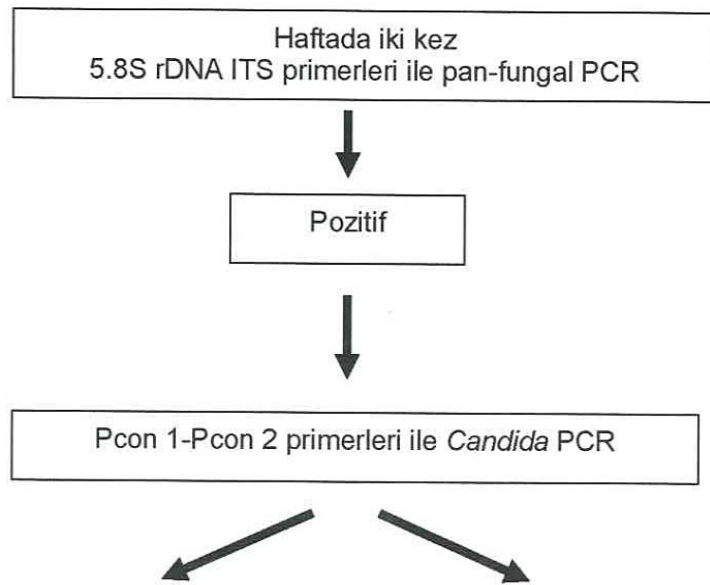
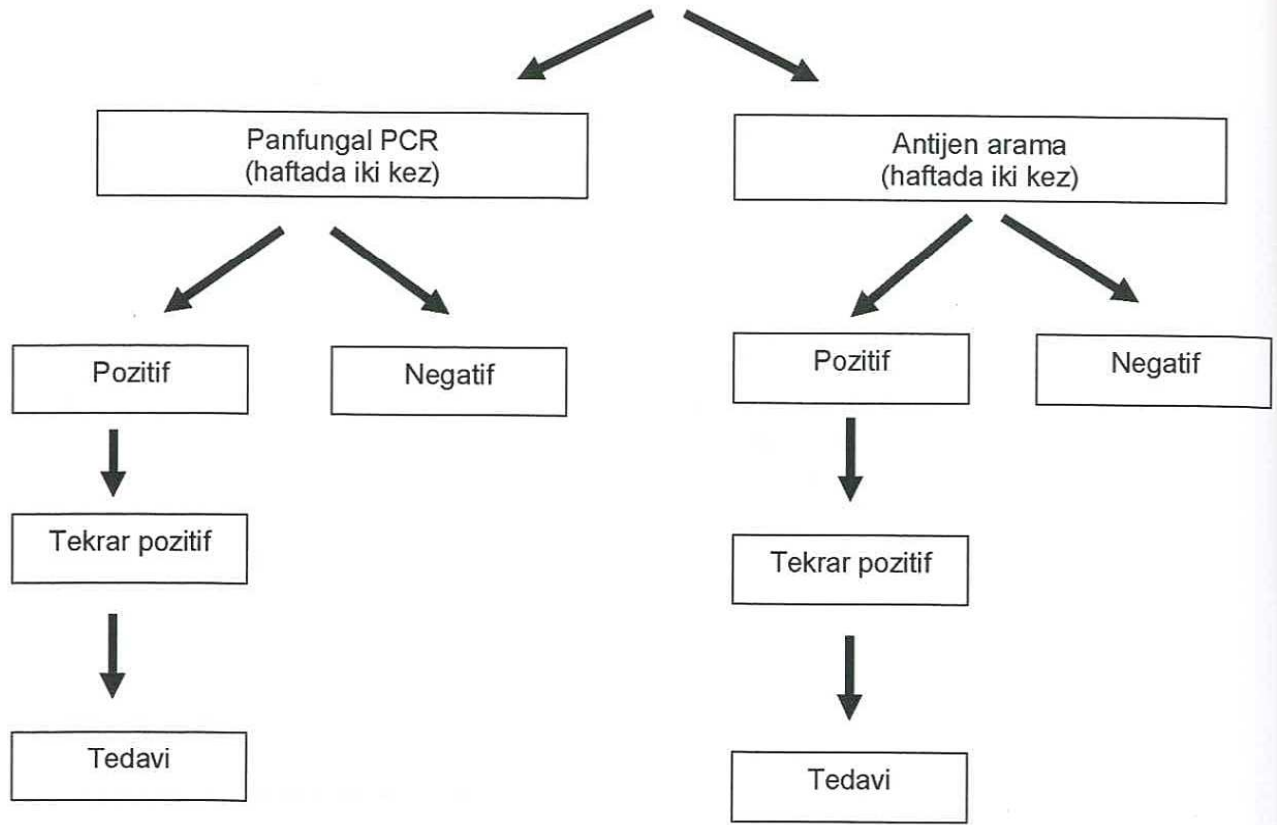
Sonuç

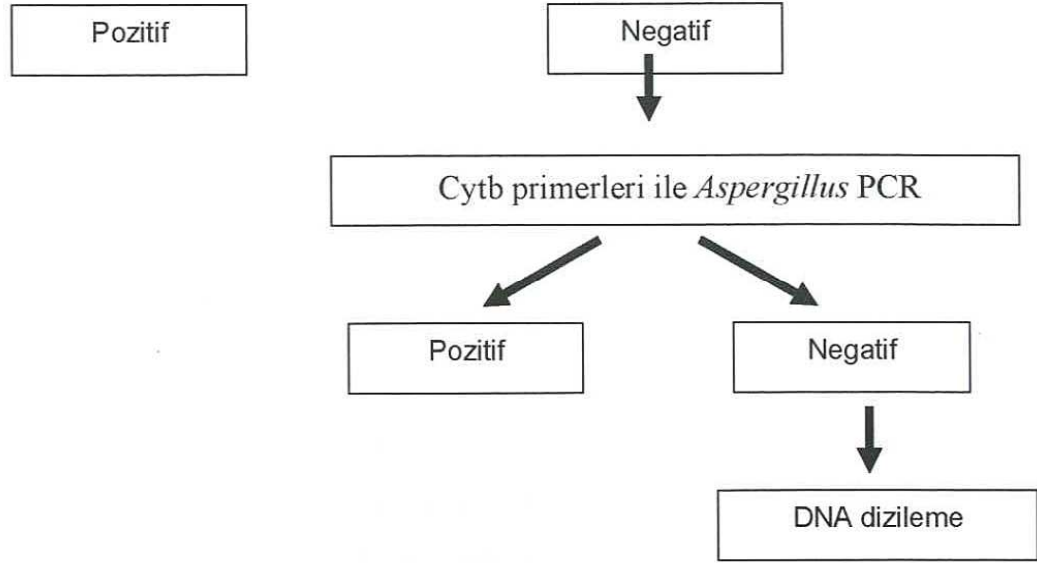
Mantar enfeksiyonlarının tanısı, klinik tanının farklı laboratuvar yöntemleri kullanılarak doğrulanmasını içermelidir. Tek bir yöntem tanının konmasında yeterli değildir. Moleküler yöntemlere bu açıdan bakıldığında tek başlarına değil ama birkaç yöntem ile birlikte kullanıldıklarında duyarlılık ve özgüllüklerinin arttığı bilinmektedir⁶¹⁻⁶³.

Mantar enfeksiyonlarının moleküler yöntemler kullanılarak erken tanısı ve izlenmesi, risk grubundaki hastalar için mortaliteyi azaltmaktadır. DNA eldesi için, kontaminasyonu en aza indiren manyetik boncukların kullanıldığı otomatize sistemler önerilmektedir. Amplifikasyonda kullanılacak primerlerin bütün mantarlar için ortak olan ITS gibi bölgelerden seçilmesi ve tarama ve izlemde kullanılması test maliyetini azaltmaktadır. Tür tanımı için ek bir PCR aşaması veya "real-time" teknolojisi içinde özgül prob ile hibridizasyon sonuçları kullanılabilir.

Bu önerilere göre tanıda kullanılabilecek bir şema örneği aşağıda verilmiştir.







KAYNAKLAR

1. Richardson MD: Changing patterns and trends in systemic fungal infections. J Antimicrob Chemother 2005; 56 (Suppl 1): i5-i11.
2. Patterson TF: Advances and challenges in management of invasive mycoses. Lancet 2005; 366: 1013-25.
3. Castagnola E, Caviglia I, Pistorio A, et al: Bloodstream infections and invasive mycoses in children undergoing acute leukemia treatment: A 13-year experience at a single Italian institution. Eur J Cancer 2005; 41: 1439--45.
4. Karthaus M, Cornely AA: Recent developments in the management of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies. Ann Hematol 2005; 84: 207-16.
5. Pfaller MA, McGinnis MR: The laboratory and Clinical Mycology, pp: 67-79. In: Anaissie E, McGinnis MR, Pfaller MA (eds), Clinical Mycology. 2002, Churchill Livingstone, New York.
6. Brandt ME, Warnock DW: Laboratory aspects of medical mycology, pp: 1-22. In: Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD (eds), Clinical Mycology. 2003. Oxford University Press, New York.
7. Lintock LA, Jones BL: Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. Bri J Haematol 2004; 126: 289-97.
8. Alexander BD: Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. Transplant Infect Dis 2002; 4 (Suppl 3): 32-7.
9. Çırak MY, Kalkancı A, Kuştimur S: Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98: 1027-32.
10. O'Shaughnessy EM, Shea YM, Witebsky FG: Laboratory diagnosis of

- invasive mycoses. *Infect Dis Clin North Am* 2003; 17: 135-58.
11. Schwesinger G, Junghans D, Schröder G, Bernhardt H, Knoke M: Candidosis and aspergillosis as autopsy findings from 1994 to 2003. *Mycoses* 2005; 48: 176-80.
 12. Bialek R, Konrad F, Kern J, et al: PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol* 2005; 58: 1180-4.
 13. Chemaly RF, Procop GW (eds): Molecular detection and characterization of fungal pathogens, pp: 551-9. In: *Molecular Microbiology Diagnostic principles and Practice*. 2004. ASM Press, Washington DC.
 14. Magee BB, D'Souza TM, Magee PT: Strain and species identification by restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal DNA repeat of *Candida* species. *J Bacteriol* 1987; 169:1639-43.
 15. Reagan DR, Pfaller MA, Hollis RJ, Wenzel RP: Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and a DNA probe. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2733-8.
 16. Niesters HG, Goessens WH, Meis JF, Quint WG: Rapid, polymerase chain reaction-based identification assays for *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 904-10.
 17. Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts GD: Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2913-9.
 18. Jordan JA: PCR identification of four medically important *Candida* species by using a single primer pair. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2962-7.
 19. Jaeger EE, Carroll NM, Choudhury S, et al: Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2902-8.
 20. Verweij PE, Meis JFGM: Microbiological diagnosis of invasive fungal infections in transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2000; 2: 80-7.
 21. Guiver M, Levi K, Oppenheim BA: Rapid identification of *Candida* species by TaqMan PCR. *J Clin Pathol* 2001; 54: 362-6.
 22. Loeffler J, Henke N, Hebart H, et al: Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 586-90.
 23. Spiess B, Buchheidt D, Baust C, et al: Development of a LightCycler PCR assay for detection and quantification of *Aspergillus fumigatus* DNA in clinical samples from neutropenic patients. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1811-8.
 24. Kasai M, Francesconi A, Petraitiene R, et al: Use of quantitative real-time PCR to study the kinetics of extracellular DNA released from *Candida albicans*, with implications for diagnosis of invasive Candidiasis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 143-50.
 25. Leinberger DM, Schumacher U, Autemieth IB, Bachman TT: Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4943-53.

26. Lievens B, Brower M, Vanacfter ACRC, et al: Quantitative assessment of phytopathogenic fungi in various substrates using a DNA microarray. *Environ Microbiol* 2005; 7: 1698-710.
27. Bougnoux M, Dupont C, Mateo J, et al: Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 925-30.
28. Kalkancı A, Kuştimur S, Güneş İ, Otlu B: Nötropenik hastalarda invaziv *Candida* infeksiyonunun polimeraz zincir reaksiyonu ile tanısı. *İnfeks Derg* 2003, 17: 171-4.
29. Aydoğan S, Eren A, Kalkancı A, Engin D, Kuştimur S: Kandan mantar DNA izolasyonu için önerilen hızlı bir ticari yöntemin değerlendirilmesi. 3. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, 2004, Ankara. Kongre Kitabı, s: 202.
30. Otlu B, Kalkancı A, Kuştimur S: *Candida* DNA'larının elde edilmesinde kullanılan iki farklı saflaştırma yönteminin karşılaştırılması. 30. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 2002, Antalya. Kongre Kitabı, s: 336.
31. Bretagne S: Molecular diagnostics in clinical parasitology and mycology: limits of the current polymerase chain reaction (PCR) assays and interest of the real-time PCR assays. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 505-11.
32. Fredricks DN, Smith C, Meier A: Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5122-8.
33. Ellepola ANB, Morrison CI: Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol* 2005; 43: 65-84.
34. Kalkancı A, Kokturk N, Senol E, et al: Could *Candida dubliniensis* be involved in lung fungal balls? *Rev Iberoamerican Micol* 2005; 22: 153-5.
35. Bozdayı G, Kalkancı A, Biri A, Kuştimur S: Çeşitli klinik örneklerden ID32 C kiti ile *Candida albicans* olarak belirlenen türlerin PCR ve klasik yöntemler ile yeniden adlandırılması. *Türk Klin Mikrobiyol Enfeks* 2003; 2: 1-5.
36. Einsele H, Hebart H, Roller G, et al: Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1353-60.
37. Martin C, Roberts D, van Der Weide M, et al: Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3735-42.
38. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW: Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 609-22.
39. Ascioğlu S, Rex JH, de Pauw B, et al, and Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer; Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 7-14.

40. Hizel K, Kokturk N, Kalkanci A, Ozturk C, Kustimur S, Tufan M: Polymerase chain reaction in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycoses* 2004; 47: 338-42.
41. Loffler J, Hebart H, Schumacher U, Reitze H, Einsele H: Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3311-2.
42. Aydoğan S, Kalkancı A, Kuştimur S: Bazı küf ve dermatofit kolonilerinden DNA eldesinde kullanılacak bir ticari saflaştırma yönteminin değerlendirilmesi. *Klin Lab Derg* 2005, Ocak-Şubat-Mart: 22-24.
43. Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, et al: Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1-3)-beta-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with haematological disorders. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2733-41.
44. Kami M, Fukui T, Ogawa S, et al: Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1504-12.
45. Bretagne S, Costa JM, Marmorat-Khuong A, et al: Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1164-8.
46. Bretagne S, Costa JM, Bart-Delabesse E, Dhedin N, Rieux C, Cordonnier C: Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1407-12.
47. Costa C, Costa JM, Desterke C, Botterel F, Cordonnier C, Bretagne S: Real-time PCR coupled with automated DNA extraction and detection of galactomannan antigen in serum by enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2224-7.
48. Güneş İ, Kalkancı A, Kuştimur S, Ergüven S, Özet G, Ekim N: *Pneumocystis carinii* pnömonisi tanısında metanamin gürnüleme, direk floresan antikor ve iki türlü polimeraz zincir reaksiyonu yöntemlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bül* 2004, 38: 105-12.
49. Nyamande K, Laloo UG, York D, Naidoo M, Irusen EM, Chetty R: Low sensitivity of a nested polymerase chain reaction in oropharyngeal washings for the diagnosis of pneumocystis pneumonia in HIV-infected patients. *Chest* 2005; 128: 167-71.
50. Durand-Joly I, Chabe M, Soula F, Delhaes L, Camus D, Dei-Cas E: Molecular diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 45:405-10.
51. Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M, et al: *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 245-50.
52. Flori P, Bellete B, Durand F, et al: Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. *J Med Microbiol* 2004; 53: 603-7.
53. Kobayashi M, Togitani K, Machida H, Uemura Y, Ohtsuki Y, Taguchi H:

Molecular polymerase chain reaction diagnosis of pulmonary mucormycosis caused by *Cunninghamella bertholletiae*. *Respirology* 2004; 9: 397-401.

54. Wheat LJ: Current diagnosis of histoplasmosis. *Trends Microbiol* 2003, 11: 488-94.
55. Hall GS, Pratt-Rippin K, Washington JA: Evaluation of a chemiluminescent probe assay for identification of *Histoplasma capsulatum* isolates. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3003-4.
56. Scalarone GM, Legendre AM, Clark KA, Pusater K: Evaluation of a commercial DNA probe assay for the identification of clinical isolates of *Blastomyces dermatitidis* from dogs. *J Med Vet Mycol* 1992; 30: 43-4.
57. Valesco M, Johnston K: Stability of hybridization activity of *Coccidioides immitis* in live and heat-killed frozen cultures tested by AccuProbe *Coccidioides immitis* culture identification test. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 736-7.
58. Kalkancı A, Kustimur S, Sucak GT, et al: Fulminating fungal sinusitis caused by *Valsa sordida*, a plant pathogen, in a patient immunocompromised by acute myeloid leukemia. *Med Mycol* 2006; 44 (baskıda).
59. Kustimur S, Kalkancı A, Çağlar K, Dizbay M, Aktaş F, Sugita T: Nosocomial fungemia due to *Trichosporon asteroides*: firstly described bloodstream infection. *Diag Microbiol Infect Dis* 2002; 43: 167-70.
60. McGinnis MR, Nunn GB (eds): Sequence based fungal identification and classification, pp: 561-8. In: *Molecular Microbiology Diagnostic Principles and Practice*. 2004. ASM Press, Washington DC.
61. Moreira-Oliveira MS, Mikami Y, Miyaji M, Imai T, Schreiber AZ, Moretti ML: Diagnosis of candidemia by polymerase chain reaction and blood culture: prospective study in a high-risk population and identification of variables associated with development of candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 721-6.
62. Erjavec Z, Verweij PE: Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. *Drug Resist Updat* 2002; 5: 3-10.
63. White L, Archer AE, Barnes RA: Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2181-7.

İNVAZİV MANTAR İNFEKSİYONLARINDA MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİNİN YERİ**Doç. Dr.M.Ali SARAÇLI***Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD. Etlik, ANKARA***Epidemiyolojik incelemelerde moleküler tekniklere gereksinim durumu**

Bazı fenotiplerin hem morfolojik hem de fizyolojik olarak birden fazla türde görülebilir olması yanında, yaşlanma veya kültür şartlarına bağlı olarak fenotipik karakteristiklerde görülen değişiklikler epidemiyolojik tiplendirmelerde yanıltıcı olabilmektedir. Serotipleme ve biyotipleme gibi fenotipik tekniklerde görülen tekrarlanabilirlik problemleri de, genotiplendirmenin özellikle epidemiyolojik çalışmalarda fenotipik yöntemlerin yerini almasına neden olmuştur. Örneğin, *Candida albicans* WO-1 kökeninde beyaz-gri koloni dönüşümü, geri dönüşümlü olarak ve kendiliğinden 10^{-3} sıklıkla ortaya çıkar ve biyotipleme ve serotiplemelerde tutarsız sonuçlara neden olur. Benzer fenotipik değişiklikler *C.glabrata*, *C.tropicalis* ve *Cryptococcus neoformans* için de bildirilmiştir¹. Moleküler ve genomik tiplendirme yöntemlerinin uygulama alanına sokulması ile fenotipik yöntemlerin yetersiz ayırım gücünden kaynaklanan dezavantajlar ortadan kaldırılmıştır. Bununla birlikte, DNA baz dizisinin herhangi bir tür için en doğru bilgiyi vermesine karşın, kromozom dışı genetik elemanlar olan plazmidler ve mini kromozomların da çok sabit olmadıkları, çevresel şartlara bağlı olarak kaybedilebilecekleri veya mutasyona uğrayabilecekleri akılda tutulmalı, çalışma sonuçları dikkatle yorumlanmalıdır²⁻⁴.

Epidemiyolojik amaçlı tiplendirmelerin en yaygın kullanım alanları;

- 1) Salgınların kaynağı ve yayılma yollarının belirlenmesi,
- 2) Antifungal tedavi sonrasında hastadan aynı mantar türünün tekrar izole edilmesi durumunda bunun bir relaps mı yoksa reenfeksiyon mu olduğunun belirlenmesi,
- 3) Hastane ortamındaki mikroorganizma klonlarının ortaya konması,
- 4) İnfeksiyon etkeni mikroorganizmanın enfeksiyon yöresine translokasyon sonrası mı ulaştıkları veya kolonize olmuş olan türün mü etken olduğunun belirlenmesi şeklinde özetlenebilir⁵.

Moleküler epidemiyolojik çalışmaların zemini

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 25S ve 18S bölgeleri sınırlı oranda değişkendirler ve sıklıkla taksonomik incelemelerde kullanılırlar. Buna karşılık, daha değişken olan "Internal Transcribed Spacer" (ITS) gen bölgeleri ise tanısal amaçlarla veya mikroevrimsel incelemeler için uygundur⁶. Pratiğe girmiş olan genotiplendirme yöntemlerinin sayısı her geçen gün artış göstermektedir. Araştırmacılar yöntemlerden hangisini kullanacaklarına karar verirken, söz konusu yöntemin tiplendirebilirliği, ayırım gücü, tekrarlanabilirliği, kullanım kolaylığı, kurulum maliyeti, sonuç verme süresi ve yorumlanma kolaylığı gibi bazı genel kabul görmüş kriterleri göz önünde bulundurmalıdırlar^{5,7}.

Etkin bir DNA tiplendirme yönteminin dört temel işlevi yerine getirebilmesi gereklidir;

- 1) Belirli bir türü mikroorganizmalar arasında tanımlayabilmelidir.
- 2) Bir türdeki evrimsel değişimleri saptayabilmelidir.
- 3) Birbirleri ile orta derecede ilinti gösteren türleri gruplayabilmelidir.
- 4) Birbiri ile ilişkisiz türleri ayırt edebilmelidir.

Genellikle moleküler tiplendirme yöntemlerinin büyük bir kısmı bir ve dördüncü, bir kısmı ise ilave olarak ikinci gereksinimi karşılarlarken, çok az metot üçüncü gereksinimi karşılayabilmektedir⁴.

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

- a) Her biri için allellerin incelenebileceği, birbirinden bağımsız, genetik belirteçler olarak adlandırılacak genomik bölgeler saptanmalıdır.
- b) 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.
- c) 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 taşıyacaktır⁸.

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

- a) 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.
- b) Seçilmiş olan bölge evrimsel baskı altında olmamalıdır. Aksi halde genetik ilişki konusunda yanlış yargı oluşturabilir.
- c) Belirteçteki mutasyonların geri dönüşüm ihtimali düşük olmalıdır. Örneğin, transpozonların bu amaçla seçilmesi hatalı olacaktır.
- d) Aynı mutasyonun iki farklı kökende ortaya çıkma ihtimali düşük olmalıdır. Aksi halde ataları farklı, ancak ortak karakteristikler yani homoplazi görülür ve yanlış yorumlara neden olur¹.

Moleküler fungal epidemiyolojide sık karşılaşılan sorunlar

Epidemiyolojik tiplendirmede karşılaşılan sorunların temel olarak iki ana nedeni vardır. Bunlardan birincisi, uygulanan yöntemin doğrudan kendisinin zayıf yönlerinden, diğeri ise mikroorganizmanın genom yapısından kaynaklanmaktadır. Epidemiyolojik tiplendirme amacıyla en çok başvurulan yöntemlerden birisi olan "Random amplification of polymorphic DNA (RAPD)" tekniğinde mikroorganizma genomu rasgele olarak çoğaltılır ve ortaya çıkan patern farklılıkları değerlendirilir. Kullanılan primerler, tiplendirilecek mikroorganizmanın genom bilgisine gereksinim olmaksızın tamamen rasgele olarak seçilebilecekleri gibi, genom içerisindeki belirli bölgelere yönelik (örneğin ITS bölgeleri ve çeşitli rDNA genleri) bilinçli olarak da seçilebilir⁹. RAPD tekniği, kullanılan Taq polimeraz enzimini üreten firma da dahil olmak üzere hemen her parametreden etkilenir ve bu sebeple tekrarlanabilirliği düşük bir yöntemdir. Standardize edilmediği

sürece laboratuvarlar arası kıyaslamada ya da bir veri tabanı oluşturulmasında başvurulması uygun değildir¹⁰.

Epidemiyolojik tiplendirme amacıyla uygulanan diğer önemli bir yöntem mikrosatellit ve minisatellit analizleridir. Klasik RAPD'ye göre daha yüksek ergime sıcaklıklarında gerçekleştirilen amplifikasyon reaksiyonlarında ve daha kısa gen bölgelerinin çoğaltılıyor olması, mikrosatellit analizlerinin güçlü yönünü oluşturur. Bu nedenle elde edilen sonuçlar daha yüksek tekrarlanabilirliğe sahiptir ve laboratuvarlar arası kıyaslamalara gidilebilir¹¹. 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. Ancak, mikrosatellit bölgeleri aşırı değişken olmaları dolayısıyla homoplazi yönünden dikkatle değerlendirilmelidirler. Aynı elektroforetik hareketlilikteki bandlara, diğer tekniklerde olduğu gibi dikkatle yaklaşılmalı ve gerçekten aynı olup olmadıkları ortaya konmalıdır¹.

Epidemiyolojik tiplendirme amacıyla; plazmid profil analizi, "restriction fragment length polymorphism (RFLP)", elektroforetik karyotipleme, "multi-locus sequence typing (MLST)" ya da "interrepeat" PCR (IR-PCR) yöntemleri de kullanılmaktadır¹²⁻¹⁶. Ancak, kromozom dışı genetik elemanlar olan plazmidler ve mini kromozomların da çok sabit olmadıkları, çevresel şartlara bağlı olarak kaybedilebilecekleri veya mutasyona uğrayabilecekleri akılda tutulmalı ve genotipik yöntemler de dikkatle yorumlanmalıdır²⁻⁴. MLST tekniğinde ise "housekeeping" genler olarak adlandırılan ve her hücrede ifade edildiği bilinen 6-7 gen bölgesinin baz dizisi çıkarılarak birbirleri ile kıyaslanır. Allelik farklılıklar ayrı "sekans tipleri" olarak ifade edilir. Bir tür için en doğru bilgiyi baz dizisinin vermesi nedeniyle, MLST tekrarlanabilirliği en yüksek ve veri bankası oluşturulmasında en uygun yöntem olarak görülmektedir⁷.

Bazen tiplendirme işlemlerinde sadece bir yöntemin uygulanması yeterli ayırım sağlayamaz ve ikinci bir moleküler yöntem daha başvurulması gerekebilir. Böylece ortaya çıkan patern farklılığının; tek bir suşta görülen kromozomal yeniden düzenlenme ile mi oluştuğu ya da farklılık gösteren paternin gerçekten yeni bir izolata mı ait olduğu aydınlatılmaya çalışılır. Örneğin, elektroforetik karyotipleme sonrası RAPD uygulanması gibi¹⁸.

Moleküler tiplendirmede karşılaşılan sorunların ikinci bölümü, doğrudan mikroorganizmanın genom yapısından kaynaklanabilmektedir. Mantarlara yönelik genotiplendirme çalışmalarında, bakteri ve virüslere göre daha fazla zorlukla karşılaşılan temel nedeni mantarların ökaryotik yapıda olmalarıdır. Fungal genotiplendirmede karşılaşılan temel farklılıklar, ökaryotlarda görülen doğal rekombinasyonlardan, bazı fungal patojenlerin diploid yapı göstermeleri dolayısıyla ortaya çıkan allelik değişikliklerden ve bazı mantarların dimorfik yapıda olmalarından doğmaktadır⁴. Ayrıca, *Ajellomyces capsulatus* gibi birçok mantar haploid (N) yapıdadır ve 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 (homotallik), *Ajellomyces capsulatus*, *A. dermatitidis* ve *Filobasidiella neoformans* gibi türler farklı eşeylere gereksinim duyarlar, yani heterotalliktirler. 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 ortaya çıkabilirler.

Bu açıdan bakıldığında, homotallik 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 edebilmeleridir¹⁹. 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 artırabilmek için polimorfik tek lokus yerine birden çok sayıda lokusun paralel olarak değerlendirilmesi gerekecektir^{1,8}. 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^{1,19}. Bu sebeplerle, tıbbi mikologların moleküler epidemiyolojik çalışmalara geçmeden önce, incelenecek mantarın üreme şekli ve genomik özellikleri ile ilgili bilgi sahibi olmaları bir zorunluluktur.

Kimi zaman ise, salgına neden olan alt mikroorganizma topluluğu, türün genel genomik yapısına çok yakın olabilir ve yeni moleküler teknikler bile farklılıklarının ortaya konmasında yetersiz kalabilirler²⁰.

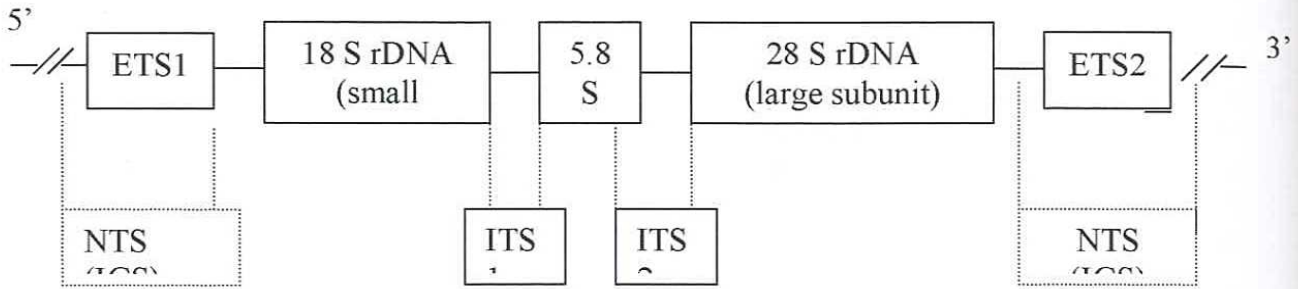
Sonuç ve Öneriler

Bugün için epidemiyolojik tiplendirmede kullanılan moleküler yöntemlerden hiçbirisi altın standart olarak kullanılması konusunda uzlaşmış dominant yöntem değildir. Her yöntem kendi avantajları ve dezavantajlarına göre değerlendirilmelidir⁴. Hatta her bir yöntem içerisinde bile amaca göre değişen düzenlemeler söz konusudur. Örneğin DNA problemleri kullanılarak yapılan epidemiyolojik incelemelerde, kullanılan probun hedefinin çok tekrarlanan ve aşırı değişkenlik gösteren bölgelerden seçilmiş olması, mutasyon saptanmasına yönelik incelemelerde uygunken, böyle bir prob seçimi birbiri ile orta ilişkili türlerin gruplanmak istendiği "cluster" analizleri için uygun değildir. Bu tür incelemeler için daha çok genom içerisinde az tekrar sayısına sahip hedeflere yönelik problemler kullanılır. Örneğin *C.albicans* için geliştirilmiş olan Ca3 probu "cluster", CARE-2 probu ise mutasyon analizleri için uygundur⁴.

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 köken bulunmaktadır. Çoklu köken taşıyıcılığının hasta yaşı ile birlikte arttığı da bildirilmiştir²¹. Bu nedenle, genotipleme çalışmalarının mutlaka tek koloni ekimlerinden yapılması ve genotipik incelemelerin aynı kökenin birden fazla kolonisi üzerinde ayrı ayrı gerçekleştirilmesi gerekli olmaktadır. Bir diğer önemli nokta ise örneklem sürecidir. Bu süre olabildiğince kısa tutulmalıdır. Çünkü, sınırlı bir bölgede bile yaklaşık beş yıllık bir süre içerisinde bir kökende ortaya çıkabilecek mikroevoimsel değişimler, genomik olarak farklı kökenlerin varlığını düşündürecek kadar fazla olabilir⁴. 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

birbirlerinden farklı olmaları kaçınılmaz olarak ortaya çıkar ve incelenen türün klonal olarak çoğaldığı gibi yanlış bir ön yargıya varılmasına neden olur¹⁹. Elektroforetik tiplendirmelerde karşılaşılan bir diğer problem ise, elektroforetik mobilitesi aynı olan bandların gerçekte baz dizilimi açısından aynı mı oldukları sorusudur. Bu sorunun cevabı, eğer alleller farklı restriksiyon kesim bölgeleri taşıyorsa RFLP yöntemi ile, taşıyorlarsa baz dizi analizi veya "Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP)" gibi ikinci bir yöntemle ortaya konabilir¹.

Son bir nokta ise, epidemiyolojik amaçlı tiplendirmelerin mutlaka bilgisayar destekli olarak incelenmesi ve bir veri bankasında saklanmasıdır. Ayrıca, literatürde mevcut çalışma sonuçları kıyaslanırken, kullanılan yöntem ve bu yöntemin özellikleri mutlaka dikkatle incelenmeli, yöntem farklılıkları durumunda kesin yorumlardan kaçınılmalıdır.



Şekil 1: Fungal rDNA gen kompleksinin fiziksel haritası (22 ve 23 no'lu kaynaklardan üretilmiştir)

KAYNAKLAR

1. Gil-Lamaignere 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.
2. Tang YW, Persing DH: Molecular detection and identification of microorganisms, pp: 215-44. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 1999, 7th ed. ASM Press, Washington DC.
3. Costa MRE, Lacaz CDS, Kawasaki M, Camargo ZP: Conventional versus molecular diagnostic tests. *Med Mycol* 2000; 38 (Suppl 1): 139-45.
4. Soll DR: The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 332-70.
5. Arbeit RD: Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms, pp: 190-208. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC (eds): *Manual of Clinical Microbiology*. 1995, 6th ed. ASM Press, Washington DC.
6. Guarro J, Gene J, Stchigel AM: Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 454-500.
7. Olive DM, Bean P: Principles and applications of methods for DNA-based typing of microorganisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1661-9.
8. Mc Ewen JG, Taylor JW, Carter D, et al: *Medical Mycology* 2000; 38 (Suppl.1): 189-97.

9. 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: 29-35.
10. Meunier JR, Grimont PAD: Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res Microbiol* 1993, 144: 373-9.
11. Botterel F, Desterke C, Costa C, Bretagne S: Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4076-81.
12. Wilson MJ, Williams DW, Forbes MD, et al: A molecular epidemiological study of sequential oral isolates of *Candida albicans* from terminally ill patients. *J Oral Pathol Med* 2001; 30: 206-12.
13. 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; 39:1657-60.
14. Vrioni G, Matsiota-Bernard P: Molecular typing of *Candida* isolates from patients hospitalized in an intensive care unit. *J Infect* 2001; 42: 50-6.
15. Dassanayake RS, Samaranayake YH, Samaranayake LP: Genomic diversity of oral *Candida krusei* isolates as revealed by DNA fingerprinting and electrophoretic karyotyping. *APMIS* 2000; 108: 697-704.
16. 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: 955-63.
17. Tavanti A, Davidson DA, Fordyce MJ, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC: Population structure and properties of *Candida albicans*, as determined by multilocus sequence typing. *J Clin Mic* 2005, 43: 5601-13.
18. Barton RC, van Belkum A, Scherer S: Stability of karyotype in serial isolates of *Candida albicans* from neutropenic patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 794-6.
19. Taylor JW, Geiser DM, Burt A, Koufopanou V: The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clin Mic Rev* 1999; 12: 126-46.
20. Tenover FC, Arbeit MD, Goering RV: How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18: 426-39.
21. 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.
22. Turin L, Riva F, Galbiati G, Cainelli T: Fast, simple and highly sensitive double-rounded polymerase chain reaction assay to detect medically relevant fungi in dermatological specimens. *European J Clin Invest* 2000; 30: 511-8.
23. Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME: Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol* 2002; 40: 87-109.

ANTİFUNGAL DİRENÇ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE SAPTANABİLİR Mİ?

Doç.Dr. Banu Sancak

*Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AbD. Sıhhiye
Ankara*

Son yıllarda, başta *Candida albicans* olmak üzere mantar enfeksiyonlarının görülme sıklığında gözle görülür bir artma meydana gelmiştir. Buna paralel olarak antifungal ilaç kullanımında ve dolayısıyla da bu ilaçlara karşı gelişen dirençte artış görülmektedir. Bu da mantar enfeksiyonlarının tedavisinde ciddi sorunlar yaratmaktadır. Buna bağlı olarak günümüzde direncin moleküler mekanizmaları ile ilgili araştırmalar ivme kazanmıştır.

Bugüne kadar birçok araştırmacı, klinik mantar izolatlarıyla yaptıkları çalışmalarda antifungal ilaçlara karşı gelişen direncin moleküler düzeydeki mekanizmalarını araştırmıştır. En fazla üzerinde çalışılan mantar *C.albicans* olmakla birlikte, *C.glabrata*, *C.tropicalis*, *C.dublınıensis* ve *C.krusei* izolatlarında da direnç mekanizmaları ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan çalışmaların özellikle azol grubu ilaçlar üzerinde yoğunlaşması nedeniyle bu yazıda bu gruba karşı gelişen direnç mekanizmaları üzerinde durulacaktır.

Direnç gelişimi zaman içinde birden fazla mekanizmayla adım adım gerçekleşmektedir. Moleküler düzeyde meydana gelen direnç değişiklikleri dört başlık altında toplanmaktadır.

1. İlacın hücre içinde birikiminin önlenmesi

Bilindiği gibi flukonazol, hücreden aktif olarak hücre dışına transport edilmektedir. Membran transport proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonundaki artma sonucunda ilacın dışarı atımında artış meydana gelmektedir. Hücrede ATP bağlayan kaset (ABC) üst ailesi proteinleri ve majör fasilitatör (MF) üst ailesi proteinleri olmak üzere iki farklı sınıf dışarı atım pompası bulunmaktadır. ABC taşıyıcı proteinleri, azol grubunda yer alan tüm ilaçları substrat olarak kabul ederken, MF taşıyıcı proteini ise sadece flukonazolü substrat olarak kabul etmektedir.

Birçok azol dirençli *Candida* türüyle *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus fumigatus* klinik izolatlarında, dışarı atım pompa genlerinin aşırı ekspresyonu nedeniyle ilacın hücre içinde yeterli yoğunluğa ulaşamadığı gösterilmiştir. İlacın hücre içi birikiminin azalması sonucunda flukonazole klinik direnç gösteren *Candida* türleri arasında *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.glabrata*, *C.krusei* ve *C.dublınıensis* yer almaktadır. Bugüne kadar *C.albicans*'da CDR1 ve CDR2, *C.glabrata*'da CgCDR1, CgCDR2 ve PDH1, *C.dublınıensis*'de CdCDR1 ve CdCDR2 olmak üzere çeşitli ABC üst ailesi proteinlerini kodlayan genler tanımlanmıştır. MF üst ailesi proteinleri genlerinden ise *C.albicans*'da CaMDR1, *C.dublınıensis*'de CdMDR1, *C.glabrata*'da CgMDR1 tanımlanmıştır. Flukonazol direnci gösteren *C.dublınıensis* klinik izolatlarında esas mekanizmanın, CdMDR1 ekspresyonunun artması olduğu düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda flukonazol dirençli *C.albicans* klinik izolatlarında duyarlı suşlara nazaran CDR1 mRNA seviyelerinde artış saptanmıştır. *C.albicans*'ta CDR1 geninin

inaktivasyonu sonucunda ise, hem hücre içi flukonazol seviyesi artmış hem de suşun flukonazol ve diğer azollere duyarlılığında artış meydana gelmiştir. Bu da bize CDR1 geninin çoklu ilaç direnç (multidrug resistance-MDR) geni olduğunu göstermektedir. MDR1 geni inaktivasyonunun ise, hücre içi flukonazol birikimine bir etkisi olmamış ve mutant suşların flukonazol duyarlılığında bir değişikliğe yol açmamıştır. *C.albicans*'ta CDR2 geninin inaktivasyonu ise hücre içi flukonazol birikimine yol açmaz. Ancak CDR1 mutantında, CDR2 de ek olarak inaktive edilirse, flukonazol duyarlılığında artma görülmektedir. İlginç olarak CDR1 mutant suşlarda CDR2 geninin aşırı ekspresyonu sonucunda flukonazol direnci ortaya çıkmıştır.

CDR1 geni, *Saccharomyces cerevisiae*'da bulunan PDR5 geninin homoloğudur. CDR1 genini taşıyan transformantlar, PDR5 mutanlığı olan *S.cerevisiae*'ya klonlanmış ve CDR1 genini taşıyan transformantların birçok ilaca karşı olan direncinde artış olduğu gözlenmiştir.

Bugün için azol dirençli klinik izolatlarda dirençte birden fazla mekanizmanın bir arada rol oynadığı düşünülmektedir. *C.glabrata* türlerinde ise tek başına CgCDR1, CgCDR2, CgSNQ2 gibi genlerin ekspresyonunda meydana gelen artışın azol direncine neden olabileceği ileri sürülmektedir. *C.albicans*' da CDR ailesinde CDR1 ve CDR2 dışında genler de bulunmaktadır. Fakat bugüne kadar yapılan çalışmalarda, CDR1 ve CDR2 dışındaki CDR ailesi üyelerinin flukonazol direncine yol açtığına dair herhangi bir delil bulunamamıştır.

C.albicans'ta flukonazol direncinde MDR1 geninin rolü ve regülasyonu

Flukonazol varlığında ERG11 geninin ekspresyonu indüklenirken, MDR1, CDR1 ve CDR2 dışı atım pompalarını kodlayan genler aynı koşullarda aktive olmaz. Fakat flukonazol dirençli *C.albicans* klinik izolatlarında, bu genler konstitütif olarak fazla miktarda eksprese edilirler. Dolayısıyla bu genlerin regülasyonunu sağlayan genlerde mutasyon olabileceği fikri öne sürülmüştür. Bu mutasyonların, ilgili genlerin ya promotor bölgelerinde ya da transregülatuar faktörlerinde olabileceği düşünülmüştür. MDR1 geninin ekspresyonuna bağlı flukonazol direnci gösteren *C.albicans* suşlarının, her iki MDR1 alelinin promotor bölgelerinin dizileri incelendiğinde, bu bölgede herhangi bir mutasyon gösterilememiştir. Bunun üzerine mutasyonun regülatör faktörlerde olabileceği düşünülmüş; bu durumun söz konusu olan diğer dışı atım pompaları için de geçerli olabileceği fikri ortaya atılmıştır. *C.albicans*'ta CAP1, FCR1, FCR2, FCR3 gibi regülatör faktörleri kodlayan birçok gen tanımlanmıştır. MDR1 geninin artmış ekspresyonunda regülatör faktörlerin rol alması, bilinmeyen başka genlerin de aktive olabileceğine dair yorumlara zemin oluşturmaktadır. MDR1 dışında başka genlerde de aktivasyon meydana geliyorsa, bunlar da flukonazol direncine neden olabilir.

2. Erg 11p' de değişiklikler

Hedef yapıdaki mutasyonlar sonucu meydana gelen ilaç bağlanmasındaki azalma ilaç direncine yol açan nedenlerden biridir. Azoller, 14 alfa demetilaz (Lanosterol demetilaz) enzimini inhibe ederek, mantarın sitoplazmik membranındaki majör sterol olan ergosterolün biyosentezini önlerler. Lanosterol demetilaz enzimi ise, hücrede ERG11 geni tarafından kodlanmaktadır. Azol grubu ilaçlar, Erg 11p proteininde (Lanosterol demetilaz) bulunan "hem" molekülüyle etkileşime girmektedir. Dolayısıyla bu enzimde meydana gelen aminoasit değişiklikleri, yani enzimi kodlayan gendeki nokta mutasyonları, ilacın hedefe olan afinitesini etkilemektedir.

G 129 A, Y 132 H, S 405 F, G 464 S, R 467 K'de meydana gelen aminoasit değişikliklerinin flukonazol direncine yol açtığı gösterilmiştir. Y 132 H, G464 S, R 467 K'de meydana gelen mutasyonlar sonucunda lanosterol demetilaz enzimine flukonazol afinitesi azalmaktadır. Birçok çalışmada flukonazol dirençli *C.albicans* suşlarının ERG 11 gen dizi analizleri ile flukonazol duyarlı suşların ERG 11 gen dizi analizleri karşılaştırılmış; bunun sonucunda flukonazol dirençli suşlarda F105L, E266D, K 287 R, G448 E, G450E, G464S aminoasit değişiklikleri saptanmıştır. Flukonazol duyarlı suşlarda ise bu aminoasit değişiklikleri saptanmamakla birlikte, K 128 T, K 147 R gibi aminoasit değişiklikleri tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu dizi değişiklikleri, sadece alelik varyasyonlar gösterebilir ve tek başına direnç ile ilişkili olduğunun kanıtı değildir.

ERG 11 genindeki mutasyonlarla flukonazol direnci arasındaki ilişki hakkında daha güçlü kanıtlar, aynı hastanın farklı epizodlarından elde edilen flukonazol dirençli ve duyarlı izolatların ERG 11 alellerinin DNA dizi analizlerinin birbiriyle kıyaslanmasıyla sağlanmıştır. R 467 K mutasyonu, flukonazol dirençli bir *C.albicans'* in her iki ERG 11 alelinde saptanmıştır. Aynı hastanın flukonazol duyarlı izolatında ise saptanamamıştır. Yine benzer olarak G464S mutasyonu, flukonazol direnci artmış izolatlarda ERG 11 alellerinde saptanmıştır. Her iki aminoasit de, ilacın bağlandığı "hem" bölgesine yakın yerleşimlidir. Aslında bu mutasyonlar, rastgele bir dağılım göstermemekte; 105-165, 266-287 ve 405-488 aralarında bulunan aminoasitlerde olmak üzere 3 "hot spot" bölgede toplanmaktadır. Dolayısıyla mutasyon büyük bir olasılıkla, "hem" bölgesinde meydana gelen yapısal veya fonksiyonel değişmeler sonucunda gerçekleşmektedir. ERG 11 genindeki mutasyon, heterozigottan homozigot haline dönüşürse ortaya çıkan direnç artmaktadır. Bu durum, G 464 S ve R 467 K mutasyonu olan klinik izolatlarda saptanmıştır. Genetik bulgular, R467K'dan iki kopya içeren hücrenin, tek alelede mutasyon gösteren hücreden önemli derecede daha dirençli olduğunu göstermektedir. Flukonazolün ortamda bulunması durumunda, bir ERG 11 alelinde olan mutasyonu takiben heterozigottan homozigot duruma geçiş indüklenmektedir.

3. ERG 11 geninin ekspresyonunun artması

ERG11 geninin ekspresyonunun artırılması, bazı *C.albicans* ve *C.glabrata* suşlarında gösterilmiştir. Ancak başka çalışmalarda da, azol dirençli *C.glabrata* izolatlarında ERG11 düzeylerinin ekspresyonunda önemli bir değişiklik saptanamamıştır. Dolayısıyla ERG11 geninin aşırı ekspresyonu, azollere direnç gelişiminde önemli bir rol oynamamaktadır.

4. Sterol kompozisyonunda değişme

Hücrede Erg 11 dışında diğer gen ürünlerine bağlı olarak sterol biyosentezinde başka değişimlerin de olabileceği düşünülmektedir. 14 alfa demetilaz enziminin flukonazol ile inhibisyonu sonucu sadece ergosterol miktarında azalma meydana gelmez, aynı zamanda mantar hücresinin üremesini inhibe eden bileşiklerin birikmesi de gerçekleşir. Mantarın üremesini inhibe eden bu sterol birikimini değiştirecek sterol biyosentezinde meydana gelen değişmeler, flukonazol direncine yol açabilir.

Erg 3, delta 5,6 desaturaz enzimini kodlayan gendir. 14-lanosterol demetilaz inhibe olunca, Erg 3p 14-metil ara ürünlerini, toksik bir sterol olan 14 metil ergosta 8, 24-dien 3, 6 diol'e çevirir. Delta 5,6 desaturaz (ERG 3) inaktivasyonu sonucunda, membrandaki sterol kompozisyonu değişir ve 14 alfa metil 3, 6 diol yerine 14 alfa metil fekosterol birikir. Bunun sonucunda mantar, ilacın etkisinden kurtulur ve flukonazol direnci meydana gelir. *C.albicans'*da ERG 3 geni delesyonunun, flukonazole dirençle

sonuçlandırıldığı gösterilmiştir. Hücrede ergosterol bulunmadığından dolayı, bu suşlarda azol direnci yanında amfoterisin B direnci de gelişmektedir. Yine yapılan başka bir çalışmada, itrakonazol dirençli 7 *C.dubliniensis* izolatında ERG 3 geni mutasyonu gösterilmiştir. ERG3 geninin delesyona uğratılınca ortaya çıkan yüksek azol direnci, maya türleri arasında farklılık göstermektedir. Örneğin ERG3 delesyon mutantları, *S.cerevisiae* ve *C.albicans*'da azol direnci yaratırken, *C.glabrata*'da bu durum gözlenmez.

Yukarıda anlatılan mekanizmaların hepsi *Candida* türlerinde azol direncine yol açabilmektedir. Yapılan birçok çalışmada, birden fazla mekanizmanın birarada kullanılması yoluyla basamak basamak flukonazol direnci gelişebileceği gösterilmiştir. Örneğin, flukonazol direncinde giderek artış saptanan bir seri *C.albicans* izolatında, MDR1, ERG 11 ve bir veya birkaç CDR geninde aşırı ekspresyonun yanısıra ERG 11 geninde R 467 K nokta mutasyonu da saptanmıştır. *C.albicans*'ta azol direnci gelişmesinde birden fazla mekanizma yer alırken, *C.glabrata*'da görülen azol direncinde sadece tek başına atım pompa genlerinin aşırı eksprese edilmesinin yer aldığı düşünülmektedir.

Azol direncinin varlığını saptamayı amaçlayan moleküler yöntemlerde, ya söz konusu genlerin ürünleri araştırılır veya bu genlerde ortaya çıkan mutasyonların varlığı denetlenir. Azol grubu ilaçların hedefi olan yapıları kodlayan genlerin ya da bu ilaçların hücreden dışarı atılımını sağlayan pompaları belirleyen genlerin ekspresyon düzeyleri RT-PCR tekniği ile saptanabilmektedir. Günümüzde oldukça yeni bir yöntem olan "DNA microarray" teknolojisinin kullanılması ile, aynı anda birden fazla sayıda genin aktivitesi incelenebilmektedir.

Bugüne kadar yapılan çalışmaların ışığında, azol dirençli izolatlarda, "ABC-transporter" veya "majör fasilitator" genleri ile birlikte başka genlerin de eşzamanlı regüle olduğu ve bu genlerin azol direncine katıldığı gibi düşünceler bulunmaktadır. "Microarray" çalışmaları, azol duyarlı ve dirençli suşlarda birlikte regüle olan genlerin tanımlanması için kullanılabilir. Birlikte regüle olan genlerin ekspresyonu, ortak regülatör elemanlar tarafından kontrol ediliyor olabilir. Bu hipotez ile uyumlu olarak CDR1 ve CDR2 genlerinin ekspresyonundaki artışın, "drug responsive element" (DRE) olarak adlandırılan ortak bir regülatör element ile yönetildiği gösterilmiştir. Bu element, belirtilen genlerin promotor bölgelerine yerleşmiştir. Yapılan bir çalışmada ilginç olarak, CDR2 gen ekspresyonu artmış olan bir izolatta, başka genlerde de ekspresyon artışı olduğu saptanmıştır. Bu genlerin üçünde (YPL 88, YOR 49, YLR 63) promotor bölgede DRE için bir bölge bulunmuştur. Bu bilgiler ışığında, gelecekte yapılacak olan "microarray" çalışmaları ile maskelenmiş olan diğer azol direnç mekanizmalarının da gün yüzüne çıkacağı yorumunda bulunmak mümkündür.

KAYNAKLAR

1. Akins RA: An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. Med Mycol 2005; 43: 285-318.
2. Bennet JE, Izumikawa K, Marr KA: Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1773-7.
3. Borst A, Raimer MT, Warnock DW, et al: Rapid acquisition of stable azole resistance by *Candida glabrata* isolates obtained before the clinical introduction of fluconazole. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 783-7.

4. Chandrasekar PH: Antifungal resistance in *Aspergillus*. *Med Mycol* 2005; 43 (Suppl I): 295-8.
5. Da Silva Ferreira ME, Colombo AL, Paulsen I, et al: The ergosterol biosynthesis pathway, transporter genes, and azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 2005; 43 (Suppl I): 313-9.
6. François IEJA, Aerts AM, Cammue BPA, et al: Currently used antimycotics: spectrum, mode of action and resistance occurrence. *Current Drug Targets* 2005; 6: 895-907.
7. Kontoyiannis DP, Lewis RE: Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* 2002; 359: 1135-44.
8. Looi CY, D'Silva EC, Seow HF, et al: Increased expression and hotspot mutations of the multidrug efflux transporter, CDR1 in azole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginitis patients. *FEMS Microbiol Letters* 2005; 249: 283-9.
9. Morschhauser J: The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1587: 240-8.
10. Pinjon E, Moran GP, Jackson CJ, et al: Molecular mechanisms of itraconazole resistance *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2424-37.
11. Prasad R, Kapoor K: Multidrug resistance in yeast *Candida*. *Int Rev Cytol* 2005; 242: 215-48.
12. Redding SW, Kirkpatrick WR, Saville S, et al: Multiple patterns of resistance to fluconazole in *Candida glabrata* isolates from a patient with oropharyngeal candidiasis receiving head and neck radiation. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 619-22.
13. Ruge E, Korting HC, Borelli C: Current state of three-dimensional characterisation of antifungal targets and its use for molecular modelling in drug design. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26: 427-41.
14. Sanglard D, Odds FC: Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 73-85.
15. Sanglard D: Resistance and tolerance mechanisms to antifungal drugs in fungal pathogens. *Mycologist* 2003; 17: 74-8.
16. Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, et al: Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 668-79.
17. St Georgiev V: Membrane transporters and antifungal drug resistance. *Curr Drug Targets* 2000, 1: 261-84.
18. Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, et al: Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 2004; 4: 369-76.
19. Yang Y-L, Lo H-J: Mechanisms of antifungal agent resistance. *J Microbiol Immunol Infect* 2001; 34: 79-86.

ANTİPARAZİTER İLAÇLARA KARŞI DİRENÇ MEKANİZMALARI

Prof.Dr.Mehmet Tanyüksel

Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD. Etilik, ANKARA

Parazitlerin iki büyük grubu olan protozoon ve helmintler, insan ve hayvanlardaki yaygın ve önemli pek çok infeksiyondan sorumludurlar. Bu parazitler, dünya nüfusunun yaklaşık 1/3'ünü tehdit etmekte ve Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) bildirdiği son rakamlara göre sadece protozoonlara bağlı olarak gelişen hastalıklardan yılda 2 milyondan fazla kişi yaşamını yitirmektedir. Malaria, leishmaniasis, trypanosomiasis yanında amebiasis, giardiasis ve trichomoniasis gibi anaerobik protozoon hastalıkları ile helmintlerin neden olduğu filariasis, schistosomiasis, onchocercosis dünyanın en önemli parazitler hastalıkları arasında yer almaktadır.

Antiparaziter ilaçların kullanılması, en önemli kemoterapötik sorunlardan biri olan ilaç direncini daha tehlikeli boyutlara taşımaktadır. Son yıllarda özellikle klorokin dirençli sıtma, leishmaniasis ve trypanosomiasis gibi hastalıklar başta olmak üzere pek çok parazite karşı gelişen ilaç direnci dikkati çekmektedir. Protozoon ve helmintlerde ilaç direncinin oluşması yanında yeni ilaçların geliştirilmesindeki yavaş ilerlemeler, önemli halk sağlığı problemlerine neden olmakta ve bu yönüyle bazı parazitler hastalıklarındaki antimikrobiyal direnç DSÖ'nün listesinde büyük bir sorun olarak yer almaktadır. Ayrıca, ilaç direncini ilaç duyarlılığındaki azalmadan ayırmak gereklidir. Özellikle veteriner parazitolojide önemli olan bu durum, ilaç direnci ile ilaç duyarlılığı azalmasının karıştırılmasına neden olmaktadır. İlaç etkinliğindeki başarısızlığın sadece dirence bağlı olarak gelişmediği göz ardı edilmemelidir. Diğer nedenler arasında; a) parazitler yaşam sikluslarının farklı evrelerden oluşması, b) cinsiyet farklılıkları, c) türlerin coğrafik değişiklik göstermeleri, d) farklı hayvan türlerinde aynı parazitlerin bulunması, e) parazitlerin farklı türleri gibi sebepler sayılabilir. Bununla birlikte yetersiz tedavi ve doz kullanımı, ilaç etkileşimleri, ilaç duyarlılıklarındaki farklılıklar da ilaç direnci ile karıştırılmaktadır.

İlaç Direnç Mekanizmaları

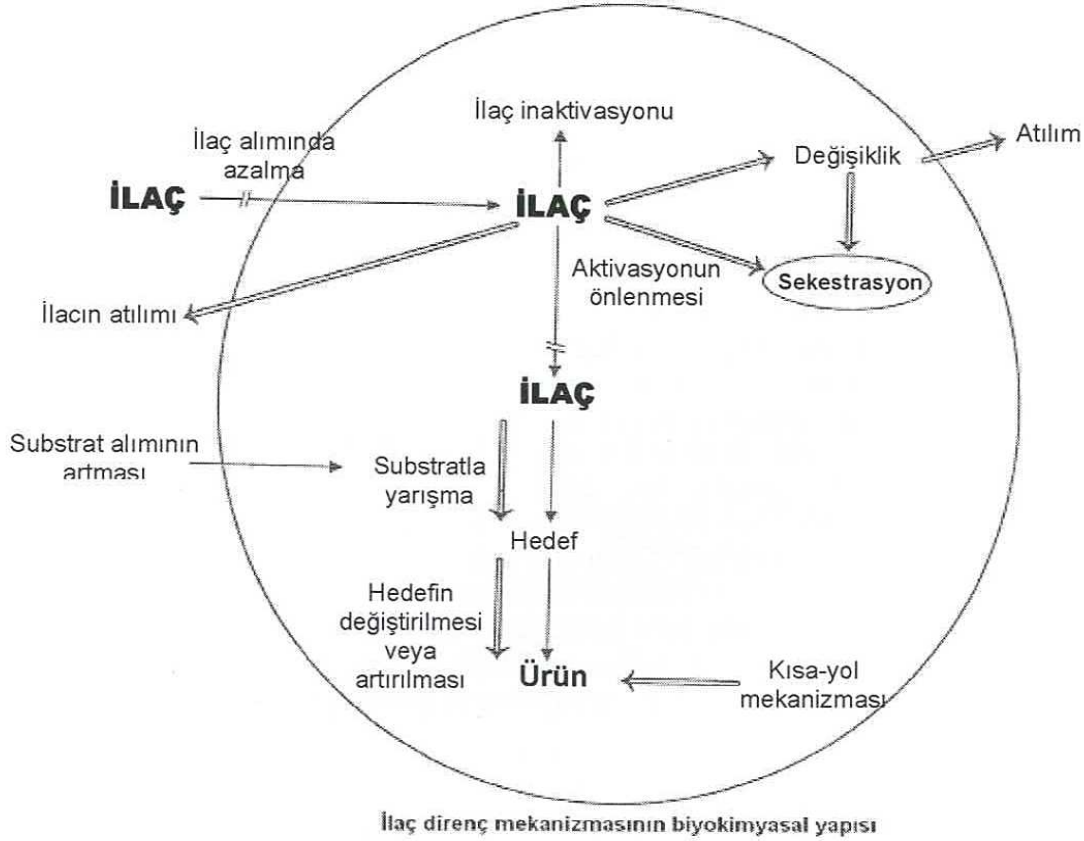
İlaç direncini oluşturan mekanizmalar; şu başlıklar altında toplanabilir (Şekil 1):

1. İlacın, parazit enzimleri ile etkisiz hale getirilmesi
2. İlacı duyarlı parazitler bölgelerinin değişmesi
3. İlacın parazit tarafından alınmasının azalması
4. İnhibe reaksiyonları önlemek için alternatif yollar geliştirilmesi
5. İlacı duyarlı hedef enzimlerin artan üretimi
6. Enzim substratlarının miktarının artması
7. Etkin olmayan ilaç kullanılması

Parazitlerin, ilaçların etkilerinden kurtulmak için çok çeşitli ve hassas biyokimyasal mekanizmaları vardır. Hücreler, ilacın etkilerinden kurtulabilmek için alternatif yollar ve sığınaklar geliştirmekte ve bunu da çoğunlukla ilacın etki sistemlerini modifiye ederek ya da hedef membran bileşimlerini değiştirerek yapmaktadır. Böylelikle

ilacın yok edici özelliğinden kurtulabilmektedir. Parazitler, kolaylıkla salgılarında kimyasal değişiklikler yaparak içine giren ilacın hedefe ulaşmasını engeller, etki mekanizmasını bozarak ilacın etkinliğini azaltabilir ya da tamamen yok edebilirler; hatta ilacı tamamen vücut dışına atabilir ya da hedef bölgeden daha uzak bölgelere gönderebilirler.

Bu modifikasyonlar; fizyolojik adaptasyonlar, dirençli ve dirençsiz parazitlerin karışık bulunduğu popülasyonda dirençli parazitlerin seçimi, seçimi izleyen spontan mutasyonlar ve gen yapılarının değişimi (gen amplifikasyonu) şeklindedir.



Şekil 1. İlaç direncinin biyokimyasal yapısı (8 no'lu kaynaktan alınmıştır)

a) İlacın hücre içine girişi azalır b) Hücre içindeki ilaç etkisi baskılanır c) İlaç hücre dışına atılır d) İlaçta şekillenen modifikasyonlar sonucu yine ilaç hücre dışına gönderilir veya belli bir bölgede hapsedilir e) Substratın hücre içine girişi artar. İlacın hedefe ulaşması hızlanır. Ancak hedefte değişiklik olur ya da amplifikasyon şekillenir ve "bypass" mekanizmalarla başka bölgelere gönderilir.

Parazitlerde direnç mekanizmaları, laboratuvar ve klinik çalışmalarla ortaya konulmuş ve in vitro çalışmalarla da bu bilgiler doğrulanmıştır. Özellikle in vitro çalışmalarında, direnç özelliği gelişmiş hücrelerle bu özellikleri gelişmemiş hücreler karşılaştırılarak direnç mekanizması hakkında çok önemli bilgilere ulaşılabilmektedir. Direncin klinik olarak tanımlanabilmesi ise daha zordur. Çünkü parazit popülasyonları heterojen bir yapıya sahiptir. Karşılaştırma için gerekli olan ve parazitin özelliklerini belirleyen genetik yapı mevcut olmayabilir. Ayrıca parazitin direnç fenotipi değişebilir ve parazit alt

popülasyonları oluşabilir. Laboratuvarında tanımlanan direnç mekanizmalarının klinik doğrulanmalarında daha çok polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve monoklonal antikorlar kullanılmaktadır.

Birçok protozoon türünde ilaç direnci görülmüştür. Ancak, sadece birkaç mekanizma bilinmektedir. Örneğin sıtma spontan mutasyonlar ana mekanizma olarak değerlendirilir. Bu mekanizma tek bir adımda oluşabileceği gibi birçok adımda da gerçekleşebilir. İlaç miktarı aralıklı olarak artan dozlarda verildiği zaman, direncin oluşması da farklı bir mutasyon gerektirir. Paraaminokinolin veya dihidroredüktazdan daha etkili olan 4-aminokinolinlere karşı oluşan dirençte kompleks mutasyonlar gerektiğinden, bu bileşime karşı oluşan direnç ise daha düşük ihtimallidir.

İlaç parazit içine girdiği zaman multifonksiyonel etkiye sahiptir. İlacın hücre içine taşınması ve hücrede konsantrasyonu, düşük afiniteli kırmızı hücrelerde ve parazitte bulunan yüksek afiniteli reseptör bölgeleri ile olmaktadır. Parazit direnci ile birlikte ilaç reseptörlerinin etki ve sayısında azalma olur ve böylece ilacın etkisini genelde 2/3 oranında düşürür. Parazitler, reseptörlerin azalmasını kompanse etmek için (reseptörler enerji için glukozun alındığı yerlerdir) metabolik değişime uğrar.

Dünyada yaygın bazı parazitler hastalıklardaki ilaç direnci ile ilgili bilgiler şu şekilde özetlenebilir:

Sıtma

Antimalaryal ilaç direnci, uygun dozlarda veya daha yüksek dozlarda kullanılan ilaca rağmen parazitin yaşamını sürdürmesi olarak tanımlanır. Günümüze kadar dört türün içinde sadece *P.falciparum* ve *P.vivax*'a karşı direnç bildirilmiştir. *P.falciparum*'un klorokine direncinin bildirilmesinden sonra in vivo ilaç cevabını ölçen testler geliştirilmiştir. DSÖ'nün sıtma tedavisinde önerilen normal dozuna karşı oluşan direnç durumlarının derecelendirmesi Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Antimalaryal ilaçlara karşı gelişen direncin derecelendirmesi

Yanıt	Önerilen sembol	Bulgu
Duyarlı	S	Tedavinin başlangıcından itibaren tekrarlamaksızın aseksüel paraziteminin temizlenmesi
Direnç	RI	Duyarlılıktaki gibi tedavinin başlangıcından itibaren 7-28 gün içerisinde aseksüel paraziteminin temizlenmesi ancak rekürensiz oluşması
	R II	7 gün içerisinde aseksüel parazitemide belirgin azalma ancak tam temizlenememe
	R III	Seksüel parazitemide değişiklik gözlenmemesi

İlaç direncinin belirlenmesinde, tedaviye rağmen parazitlerin yaşamını devam ettirmesi ve eritrositlerdeki şizogoni döneminin gelişmesi kriter olarak alınmaktadır. Direnç, ilaçların duyarlıklarının azalmasına neden olan spontan mutasyonların sonucunda gelişir. Tek nokta veya çok nokta mutasyonları şeklindedir. İlaç direncinin biyokimyasal mekanizması klorokin, antifolat ve atovakuonla daha iyi tanımlanmıştır. Klorokinde

direncin *dhfr*'de tek nokta mutasyonuna bağlı olarak geliştiği ve yedinci kromozoma lokalize olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarla klorokin duyarlılığı ve *pfmdr1* mutasyonu arasında bir ilişki kurulmaya çalışılmıştır. Klorokin direnci ile ilgili yapılacak çalışmalarda *pfcr1* ve *pfmdr1* markerlerinin kullanılması önerilmektedir. Özellikle *P.vivax* için klorokin direnci önemlidir ve ilk kez 1989 yılında Papua Yeni Gine'den bildirilmiştir. *P.falciparum*'un *pfmdr1* ve *pfmdr2* olmak üzere iki çoklu ilaç direnci (Multi-drug resistance; MDR) geni tespit edilmiştir ve büyük bir olasılıkla *pfmdr1* geninin sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Toxoplasma gondii'ye karşı da kullanılan atovakuon, sitokrom bc1 kompleksindeki elektron transportunu inhibe ederek etki eder. Bu ilaca karşı direncin sitokrom b geninde oluşan tek nokta mutasyonuna bağlı olarak geliştiği bildirilmiştir. Atovakuonun tek başına kullanıldığı zaman direncin hızlı bir şekilde geliştiği; ancak proquonil, tetrasiklin gibi ilaçlarla kombine kullanıldıklarında direncin daha yavaş geliştiği bildirilmiştir.

Leishmaniasis

Leishmaniasis ile ilgili son yıllardaki en önemli sorunlardan biri de ilaç direncidir ve in vitro çalışmalar, standart dozdan 100 kat daha fazla ilaç konsantrasyonlarının bile tolere edildiğini göstermiştir. Parazitin dirençli genlerinde ilaç birikiminde düşüş gözlenmiş ve bunun sebebinin ilaç girişindeki düşüşten mi yoksa ilaç atılımındaki yükselişten mi olduğu açıklanamamıştır. Beş değerli (pentavalan) antimonioollerin etki şekilleri tam olarak anlaşılammış olmasına rağmen, etkilerini glikolitik enzimlerin inhibisyonuyla gerçekleştirdikleri düşünülmektedir. *Leishmania spp*'da H bölgesi olarak bilinen bölgenin gen amplifikasyonunun nedeni bu antimonioollerdir. 800 kb'lik kromozom üzerindeki H lokusunun dirençten sorumlu genler içerdiği düşünülmektedir. Bu H bölgesinin amplifikasyonu, sitotoksik ilaçlara karşı yavaş yavaş bir savunma mekanizması oluşturmaktadır. Bu bölge için kodlanan proteinlerden biri de 2 ATP bağlama bölgesi bulunan, p-glikoproteini olarak bilinen ve enerji gerektiren transmembran bir pompadır. Hücre membranındaki pompa proteinlerinin sayısındaki artış, parazitin hücre içindeki ilaç konsantrasyonunda önemli düşümlere neden olmaktadır. İlk defa dirençli kanser hücrelerinde tanımlanmış olan p-glikoprotein, MDR'nin mekanizmasında sıkça karşımıza çıkmakta; metotreksat ve arsenite, H bölgesinde gen amplifikasyonuna neden olmaktadır. Bütün bunların sonucu olarak, H bölgesinin ilaç dirençli genleri içerdiği ve leishmaniasiste ilaç direncinden sorumlu olduğu görülmektedir. Dirençli bazı *Leishmania donovani* izolatlarında Pgp isimli glikoproteini kodlayan *Lmdr1* geni gibi genler tanımlanmıştır.

Tablo 2. *Leishmania spp*'da ilaç dirençli amplifiye genler

Amplifikasyona neden olan ilaçlar	Amplifiye genler	Direnç
Methotrexate	<i>dhfr-ts</i>	+
Methotrexate	<i>ltdh</i>	+
Arsenite	<i>ltpgpA</i>	+
Tunicamycin	<i>nagt</i>	+
DL- α -difluoromethylornithine	<i>odc</i>	-
Mycophenolic acid	<i>impdh</i>	-
Vinblastine	<i>ldmdr1</i>	+

Leishmania donovani promastigotlarına karşı amphotericin B direnci, HPLC metoduyla gösterilmiştir. Oral yolla kullanılan miltefosin direncinde yine aynı glikoprotein (Pgp) rol oynamakta, nokta mutasyonu ile miltefosin alımında azalma oluşmaktadır.

Trypanosomiasis

Pentamidin'in, mitokondride biriktiği ve etkisini dihidrofolat redüktaz (dhfr) inhibisyonu yaparak artırdığı tespit edilmiştir. Direnç olaylarında bu mitokondrial birikim olmamaktadır. P2'deki mutasyonlar adenosin ve melarsaprolun hedefe ulaşmasını azaltır. Ancak pentamidin, HAPT1'e yüksek affiniteli; LAPT1'e ise düşük affinitelidir. Bu taşıyıcılarla da hücre içine girebilir.

Trichomoniasis

Trichomonas'lara karşı direncin, glikolizin yapıldığı özel bir organel olan hidrogenozomlar içindeki enzim aktivitesinin azalmasına veya tamamen yok olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Metronidazol ve tinidazol arasında herhangi bir çapraz direnç olup olmadığı henüz açıklık kazanmamıştır. İlaç direnci çoğunlukla in vitro çalışmalarla tanımlanmıştır. Bu direnç, ilacın etkinliğini sağlayan proteinlerin modifiye olmaları sonucu etkinliklerinin azalmasından kaynaklanmaktadır. Direnç aerobik ve anaerobik mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Aerobik mekanizma hücre içi oksijen konsantrasyonunun artmasıyla ilgilidir. "Electron spin resonance spectroscopy" (ESR) çalışmalarıyla aerobik *T.vaginalis* direnci ispatlanmıştır.

G.intestinalis ve *E.histolytica* infeksiyonlarında da metronidazol direnci bildirilmektedir. Ayrıca *G.intestinalis* infeksiyonlarında acridine, quinacrine, nitrofuron, furozolidine ve benzimidazole, albendazole direncinden de bahsedilmektedir.

Toxoplasmosis

Plasmodium'larda olduğu gibi direnç, folat sentezinde yer alan enzimlerin bloke edilmesi ile gerçekleşir. İn vitro çalışmalarla *T.gondii*'de *dhfr-ts* geninde tek nokta mutasyonları ile pyrimetamin direncinin olduğu gösterilmiştir.

Anthelmintikler

Antihelmintik direnç; kitlesel tedavi, sık antihelmintik kullanımı, aynı grup antihelmintiklerin kullanımı ve yetersiz dozda ilaç kullanımı sonucu şekillenmektedir. Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda insanlarda *Schistosoma* türlerine karşı kullanılan praziquantele karşı direnç geliştiği bildirilmiştir. Aynı şekilde filarial nematodlara karşı kullanılan ivermektine karşı da direnç geliştiği vurgulanmaktadır. İn vitro çalışmalarla saptanan *O.volvulus*'ta görülen ivermektin direncine dikkat edilmesi gerektiği bildirilmektedir. Nematodlarda benzimidazol direncinin mekanizması ise tubulin bağlanmasındaki afinitenin kaybıyla ilgilidir.

KAYNAKLAR

1. Cowman AF: The P-glycoprotein homologues of *Plasmodium falciparum*: Are they involved in chloroquin resistance? 1991; 7: 70-5.
2. Edwards DI: Nitroimidazole drugs – action and resistance mechanisms II. Mechanisms of resistance. J Antimicrobial Chemother 1993; 31: 201-10.

3. Fidock DA, Sidhu ABS, Wellems TE: The molecular basis of *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance, pp: 153-64. In: Fairlamb AH, Ridley RG, Vial HJ (eds), *Drugs Against Parasitic Diseases: R&D Methodologies and Issues*. Section III. 2003. WHO/TDR, Geneva.
4. Leder K, Weller PF: Antiparasitic agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 2003. ASM Press, Washington DC.
5. Magill A, Panosian C: Making antimalarial agents available in the United States. *N Engl J Med* 2005; 353: 335-7.
6. Na B-K, Lee H-W, Moon S-U, et al: Genetic variation of the dihydrofolate reductase gene of *Plasmodium vivax* in Mandalay Division, Myanmar. *Parasitol Res* 2005; 96: 321-5.
7. Ouellette M, Papadopoulou B: Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. *Parasitol Today* 1993; 9: 150-3.
8. Ouellette M, Ward S: Drug resistance in parasites. In: Marr JJ, Nilsen TW, Komuniecki RW (eds), *Molecular Medical Parasitology*. 2003. Elsevier Science Academic Press, London.
9. Peek R, Van Gool T, Panchoe D, Greve S, Bus E, Resida L: Drug resistance and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* parasites from Suriname. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73: 833-8.
10. Sangster NC, Gill J: Pharmacology of anthelmintic resistance. *Parasitol Today* 1999; 15: 141-6.
11. White NJ: Drug resistance in malaria. *Br Med Bull* 1998; 54: 703-15.
12. Wellems TE: Molecular genetics of drug resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasitol Today* 1991; 7: 110-2.
13. <http://martin.parasitology.mcgill.ca/jimspage/biol/drugs.htm>

ANTİPARAZİTER İLAÇLARA KARŞI DİRENCİN SAPTANMASI

Prof.Dr. Metin Korkmaz

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir

Antiparaziter ilaçlara duyarlılık veya ilaçlara karşı direncin saptanmasına yönelik testler kabaca; in vivo testler, in vitro testler, hayvan modellerinde testler ve moleküler testler olmak üzere dört bölümde incelenebilir. Ek olarak olgu sunumları, olgu serileri veya pasif sürveyans gibi daha az yorucu yöntemler de antiparaziter direncin değerlendirilmesinde kullanılabilir. Antiparaziter direncin anlaşılmasına yönelik bu yöntemlerin birbirlerine rakip değil, aksine birbirlerini tamamlayıcı kaynak olarak değerlendirilmesi gerekir.

In vivo testler

Bu yöntemler semptomatik ve parazitemik hasta grubunun ilacın belli bir dozuyla tedavi edilmesi ve belli bir zaman diliminden sonra parazitolojik ve/veya klinik yanıtın değerlendirilmesine dayanır. In vivo testler, var olan bileşiğin doğrudan hasta üzerindeki klinik etkinliğini ölçer. Bu tür testler epidemiyolojik araştırmalarda uygulanabilir. Karmaşık teknik yöntemlere gereksinim duyulmadığından gelişmekte olan ülkelerde saha koşullarında gerçekleştirilmesi bir avantaj olarak değerlendirilebilir. Ancak in vivo testlerin yorumu, konağa (bağışık yanıtı veya ilaç alımı ve metabolizma farklılıkları) veya çevreye bağlı (örn. yeniden infeksiyon) etkenler nedeniyle sınırlıdır. Bu tür dış etkenler nedeniyle in vivo testlerin sonucu tam olarak antiparaziter ilaçlara karşı direnci yansıtamamakla birlikte, bu tür testler ilaç etkinliği hakkında en iyi bilgiyi verebilir.

Sıtma ilaç direnci konusundaki araştırmalar insanları infekte eden türler içinde özellikle en virulan ve direnç geliştirmeye eğilimli *Plasmodium falciparum* ile ilgilidir. İlaça dirençli sıtma konusunda ilk gözlemler genelde klinik gözlemler şeklinde oluşmuş ve daha sonra in vivo testler ile doğrulanmaya çalışılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 1973 yılında klorokin yanıtının değerlendirilebilmesi için 28 günlük izlem önermiş, in vivo ilaç duyarlılığı (S) ve direnç (R) gelişimine yönelik S ve R sınıflaması ile standardizasyon sağlamaya çalışmıştır. Zaman içinde izlem süresi kısalmaya başlamış (genelde 14 gün) ve 1996 yıllarına gelindiğinde ise klinik göstergelerin tedavi etkinliğini değerlendirmede parazitolojik iyileşme ile eşit tutulması önerilmiştir. 2003 yılında geliştirilen protokol ile tüm dünyada tek bir yöntem ve sınıflandırma şeması ile testlerin standardizasyonu hedeflenmiştir. Bu protokole parazitolojik başarısızlık tekrar sınıflandırma şemasına girmiş ve klinik olarak sıtma tanısı almış 5 yaşın altındaki çocuklar tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde göz önüne alınmıştır. Yaş konusundaki değişim, küçük çocuklarda tedaviye yanıtın daha büyük çocuklar veya erişkinlere göre daha düşük olmasına dayanmıştır. Ayrıca in vivo testler ile değerlendirilmeye alınacak hastalar için parazit yoğunluğu, düşük veya orta derecede sıtma görülen bölgelerde 1000-10.000 aseksüel parazit/ μ l iken sık görülen bölgeler için 2000-20.000 aseksüel parazit/ μ l olarak önerilmiştir.

Son yıllardaki çalışmalar, çiftlik hayvanlarında özellikle nematod popülasyonunda antihelmintik direncin yaygınlaştığına işaret etmektedir. Veteriner hekimlikte tedavi edilmiş veya edilmemiş hayvanların nekropsisi veya dışkıdaki yumurta sayısının azalması şeklindeki in vivo testlerin pahalı ve aynı zamanda zaman alıcı olması, alternatif testlerin geliştirilmesini hızlandırmıştır.

In vitro testler

Antiparaziter direncin değerlendirilmesine yönelik testler genelde hastanelerde rutin uygulanan antibiyotik duyarlılık testlerinin benzeridir.

Sıtma parazitlerinde ilaç etkinliği ve direncine yönelik in vitro testler uzun süreli kültürü yapılabilmesi nedeniyle *P.falciparum*'un aseksüel eritrositik evresine odaklanmıştır. Bu tür testlerde, venöz kan örneği ile alınan sıtma parazitlerinin kültürleri, 96 çukurlu mikrotitrasyon plaklarında yapılmakta ve test edilecek ilaç veya ilaçlar farklı dozlarda bu çukurlara konulmaktadır. Günümüzde bu amaçla temel olarak izotopik mikrotest, izotopik semimikrotest ve parazit sayısını değerlendirebilmek için mikroskopik inceleme gerektiren DSÖ mikrotesti olmak üzere üç in vitro test kullanılır. Tüm testler, 24-48 saatlik inkübasyondan sonra parazit gelişimini engelleyen ilaç konsantrasyonlarının belirlenmesini kapsar. Sıtmada ilaçlara karşı olan duyarlılığın saptanmasında "hızlı in vitro test" olarak tanımlanan yöntem de kullanılır. Bu yöntem birinci olarak, klorokine-dirençli parazitlerin aktif bir şekilde klorokini dışarı atması, klorokine-duyarlı parazitlerin ise ilacı biriktirmesi; ikinci olarak verapamil eklemesi sonrası klorokine-dirençli parazitlerin klorokini dışarı atamamaları gözlemine dayanır. Verapamil olsun veya olmasın radyoaktif işaretli klorokini biriktiren parazitler klorokine duyarlı iken, verapamil varlığında daha fazla klorokin tutan parazit klorokine dirençli olarak değerlendirilir.

Leishmania infeksiyonlarında ilaç direncine yönelik geleneksel testler; parazitin kültür ortamlarında ilaç varlığında çoğaltılması ve canlılığın doğrudan sayılması, [³H]timidin birleşmesi, *p*-nitrofenilfosfatın enzimatik hidrolizi veya 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT)'in değişimi ile değerlendirilir. [³H]timidin birleşmesi en duyarlı testlerden biri olmakla birlikte aşırı miktarda radyoaktif materyal ve sentilasyon sayıcısı gerektirir.

Trichomonas vaginalis infeksiyonlarında, hastalardan izole edilen parazitlerde ilaca karşı olan duyarlılık testlerinin günümüzde önemi daha da artmaktadır. Metronidazol direncinin değerlendirilmesine yönelik in vitro testlerin, hastada iki kür standart tedaviden sonra başarısızlık saptandığında uygulanması önerilir. *T.vaginalis*'in metronidazole duyarlılık testi, ilaç varlığında parazitin hareketliliğini değerlendirme şeklindeki basit bir testtir. Ancak bu tür yöntemlerde asıl güçlük, hasta örneklerinden parazitin izolasyonu sırasında karşımıza çıkmaktadır. Akseni *Trichomonas* kültürü, farklı konsantrasyonlarda dimetil sülfoksit içinde çözölen metronidazol ile karşılaştırılır ve 48 saat sonra parazit hareketinin gözlenmediği en düşük konsantrasyon minimal letal konsantrasyon (MLC) olarak değerlendirilir. Aerobik MLC'nin 100 µg/ml veya anerobik MLC'nin 3.1 µg/ml den yüksek saptanmış olması dirence işaret eder.

Giardia intestinalis akseni izolatları, mikroplak yöntemi ile in vitro testlerde direnç ve duyarlılık açısından değerlendirilebilir. Bu tür yöntemlerde, parazitin ilaçlı ortamda yüzeye yapışma özelliğini kaybetmesi (Meloni yöntemi) veya daha sonra ilaçsız ortamdaki subkültürde üretilebilmesi (Hill yöntemi) değerlendirme kriteri olarak alınır.

Entamoeba histolytica'ya karşı ilaç direnci ciddi bir sorun gibi gözükmemekle birlikte, ilaçların gelişigüzel kullanılması tedavi ajanlarının minimal inhibitör konsantrasyonlarında (MIC) artışa neden olabilir. *E.histolytica* ve *E.dispar* izolatlarının antiparaziter ilaçlara karşı duyarlılığı, in vitro testlerde nitrobluetetrazolium (NBT) indirgeme yöntemi ile değerlendirilebilir. Mikrotitrasyon plaklarında seri sulandırımı yapılmış, farklı konsantrasyonlardaki ilaçlar üzerine belli sayıda parazit konularak parazitlerin canlılığı NBT indirgemesi ile ölçülür. Bu in vitro test, canlı olmayan parazitlerin NBT'yi metabolize edememesi ve dolayısıyla koyu mavi renkli formazan oluşturulmaması ilkesine dayanır. *E.histolytica* duyarlılık testlerinde ayrıca [³H]timidin birleşmesinden yararlanılabilir.

Veteriner hekimlikte, özellikle helmint infeksiyonlarında olmak üzere, in vivo testlerin pahalı ve zaman alıcı olması nedeniyle, alternatif olarak geliştirilen yumurtadan çıkış testi veya larval gelişim testi gibi in vitro testler daha hızlı ve daha az iş gücü istediği için özellikle antihelmintik direncin prevalansını değerlendirmede yaygın kabul görmüştür. In vitro testler en fazla benzimidazol direncinin değerlendirilmesinde kullanılmış, pirantel veya makrosiklik laktonların değerlendirilmesinde ise yeterli duyarlılıkta bulunmamışlardır.

Hayvan modelleri

Bu tür testler, hayvan modellerini kullanarak in vivo testlerin gerçekleştirilmesi şeklindedir. Bu nedenle in vivo testler gibi çeşitli dış faktörlerden etkilenir. Konağın bağışık yanıtı, laboratuvarında üretilen hayvanlar kullanıldığında aza indirilmiş olsa da ya da doğal hayvan-parazit ilişkisi sağlanmasa da konağa ait diğer faktörler devam edebilir. Hayvan modellerine dayanan testler özellikle in vitro koşullarda çoğaltılmayan parazitlerin ilaçlara karşı duyarlılıklarının değerlendirilebilmesi için olanak sağlar.

Özellikle helmint infeksiyonlarına yönelik hayvan modellerine sık rastlanılır. Örneğin *Schistosoma japonicum* için domuzların iyi bir model olabileceği ve ilaç etkinliğinin değerlendirilmesinde kullanılabileceği belirtilmektedir.

Moleküler yöntemler

Günümüzde moleküler yöntemler antiparaziter direncin değerlendirilmesinde gittikçe artan bir öneme sahip olmaktadır. İlaç direncinden potansiyel olarak sorumlu olabilecek gen bölgelerinin tanımlanmaya başlanması bu alandaki gelişmeleri hızlandırmıştır. Bu tür yöntemlerin en önemli avantajları; az miktarda genetik materyale gereksinim duyulması, canlı parazite gerek duyulmaması, konak ve çevre koşullarından bağımsız olması ve kısa sürede çok sayıda örneğin çalışılabilmesi şeklinde sıralanabilir. Moleküler yöntemlerde, karmaşık düzenekler ile eğitilmiş personele gerek duyulması ve sınırlı sayıda ilaç için tanımlanmış olması ise en önemli dezavantajlardır.

Sıtımda klorokin direnci ile çeşitli genlerdeki (*pfcr1*, *mdr1*, *cg2* gibi) özgül nokta mutasyonları arasında bir ilişki kurulmaktadır. Benzer şekilde antifolatlara karşı oluşan direnç, dihidrofolat redüktaz ve dihidropteroat sentetaz genlerinde mutasyon ile ilişkilendirilmektedir. Ancak sıtımda tanımlanan mutasyonlar ile ilaç direnci arasındaki ilişkiyi doğrulamak, özellikle birden fazla gen bölgesinde direnç ve çok sayıda mutasyon olduğunda güç olabilir. İlaç direnci ile genetik göstergeler arasındaki ilişkinin önemi yeterince aydınlatılmamış olmakla birlikte, bu göstergeler mutasyona-özgül PCR veya PCR ardından RFLP (restriction fragment length polymorphism) analizi, dizi analizi veya floresan problara dayanan moleküler yöntemler gibi standart yöntemler ile saptanabilmektedir.

T.vaginalis moleküler epidemiyolojik araştırmalarında elde edilen veriler, metronidazol direnci ile genetik göstergeler arasında bir ilişki olduğunu işaret etmektedir. Klinik örneklerde *T.vaginalis*'e özgül bir virusun saptanmış olması ve "internal transcribed spacer" (ITS) genlerinde özellikle 66. sıradaki nükleotidde mutasyon saptanmış olmasının metronidazol direnci ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bulgular, diğer araştırmacılar tarafından doğrulanmamış olmakla birlikte PCR yöntemi ile metronidazol direncinin değerlendirilebilmesi, akselik kültür yöntemlerine gereksinim duyulmaması ve doğrudan hasta örneklerinden çalışılabilmesi nedeniyle ilgi çekici olabilir.

E.histolytica'ya yönelik moleküler araştırmalarda, çeşitli proteinlerin (*E.histolytica* P-glikoproteinleri) veya gen bölgelerinin (poly-A-polimeraz geni) antiparaziter direnç ile

ilişkili olabileceği düşünülmele birlikte, bu tür araştırmaların daha çok patogenezin anlaşılmasına yönelik olduğu dikkat çekmektedir.

Moleküler yöntemler antihelmintik direncin değerlendirilmesinde de gittikçe artan bir öneme sahip olmaktadır. Araştırmalar, antihelmintik direncin anlaşılabilmesi için moleküler, ekolojik ve epidemiyolojik yöntemleri kapsayan multidisipliner yaklaşımın önemli olduğunu göstermektedir. Helmintlerin kültürü ve izolasyonlarındaki güçlükler göz önüne alındığında, bu tür yöntemlerin gelecekte çok daha fazla uygulama alanı bulabileceği düşünülebilir.

Benzimidazol (BZ) direncinden genelde beta-tubulin 1 izotipindeki 200. amino asit mutasyonunun sorumlu tutulması, çeşitli PCR yöntemlerinin geliştirilebilmesi ve uygulanmasına olanak sağlamıştır. Bu tür araçlar, BZ direncinin saptanmasının yanı sıra helmint popülasyonu içindeki BZ-dirençli alellerin seçimini etkileyen antihelmintik kullanımını ve veterinerlikte hayvan yetiştiriciliğini etkileyen faktörlerin değerlendirilebilmesini de sağlar.

KAYNAKLAR

1. Adagu IS, Nolder D, Warhurst DC, Rossignol JF: In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. J Antimicrobial Chemother 2002; 49:103-11.
2. Bansal D, Sehgal R, Chawla Y, Mahajan RC, Malla N: In vitro activity of antiamebic drugs against clinical isolates of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Ann Clin Microbiol Antimicrobial 2004; 3: 27.
3. Banuelos C, Orozco E, Gomez C, et al: Cellular location and function of the P-glycoproteins (EhPgps) in *Entamoeba histolytica* multidrug-resistant trophozoites. Microb Drug Resist 2002; 8: 291-300.
4. Bickii J, Basco LK, Ringwald P: Assessment of three in vitro tests and an in vivo test for chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. J Clin Microbiol 1998; 36: 243-7.
5. Cruz A, Isaura Sousa M, Azeredo Z, et al: Comparison between two common methods for measuring *Giardia lamblia* susceptibility to antiparasitic drugs in vitro. Acta Trop 2003; 88:131-5.
6. Garcia-Vivas J, Lopez-Camarillo C, Azuara-Liceaga E, Orozco E, Marchat LA: *Entamoeba histolytica*: cloning and expression of the poly(A) polymerase EhPAP. Exp Parasitol 2005; 110: 226-32.
7. Johansen MV, Bogh HO, Nansen P, Christensen NO: *Schistosoma japonicum* infection in the pig as a model for human schistosomiasis japonica. Acta Trop 2000; 76: 85-99.
8. Sangster N, Batterham P, Chapman HD: Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis. Int J Parasitol 2002; 32: 637-53.
9. Snipes LJ, Gamard PM, Narcisi EM, Beard CB, Lehmann T, Secor WE: Molecular epidemiology of metronidazole resistance in a population of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates. J Clin Microbiol 2000; 38: 3004-9.
10. von Samson-Himmelstjerna G: Molecular diagnosis of anthelmintic resistance. Vet Parasitol 2006; 136: 99-107.

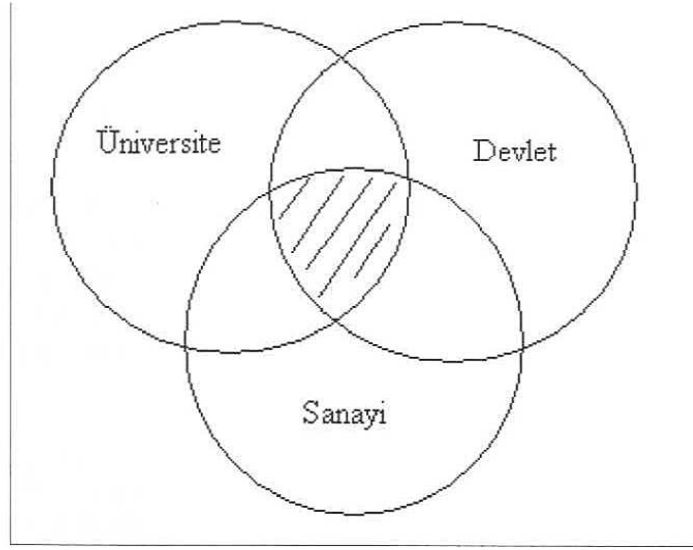
BIYOTEKNOLOJİDE ÜNİVERSİTE-SANAYİ İŞBİRLİĞİ
Dr. Serdar Tuncer
Metis

Genel bir tanım olarak biyoteknoloji, insanlığa faydalı ürünler üretilmesi ve sorunların çözülmesinde biyolojik sistem ve süreçlerin kullanılması olarak tarif edilebilir. Genetik tabanlı sağlık ürünleri, nanomakineler ve yüksek enerjili piller ile birlikte geleceğin en önemli ürünleri arasındadır. Genetik tabanlı sağlık ürünlerini de kapsayan biyoteknoloji ise, gelecek bin yılın teknolojisi olarak gösterilmektedir. Biyoteknoloji ile bağlantılı sektörlerin en büyük payına sahip olan sağlık sektöründe aşı, ilaç, diagnostik test geliştirme yanında biyoinformatik, biyoçip, biyomateryaller gibi sürekli gelişmekte olan alanlar bulunmaktadır. Bu sunumda konferansın içeriğine ve katılımcılara daha yakınlığı nedeniyle invitro diagnostik (IVD) sektöründe üniversite-sanayi işbirliğinin organizasyon yöntemleri hakkında bilgi ve örnekler verilecektir.

Biyoteknoloji günümüzde uluslararası rekabetin en yüksek olduğu sektörlerden kabul edilebilir. Rekabetin tarihçesine bakıldığında; 60'lı yıllar üretim, 70'li yıllar maliyet, 80'li yıllar kalite, 90'lı yıllar hız-kapasite ve en son olarak günümüzde bilgi üstünlüğüne odaklanmıştır. Bilgi, kompleks ve maliyeti yüksek öğrenme sürecinde araştırma ve yenilik (inovasyon) ile elde edilebilir. İnovasyon bilginin ekonomik bir faydaya dönüştürülmesidir. İnovasyon süreci ise, yeni teknolojinin öğrenilip özümsemesi sonrası, bütün ekonomik faaliyet alanlarına difüzyonun gerçekleştirilip bir üst aşamada üretme-geliştirme yeteneğinin kazanılması ve bütün bu altyapının yeni ürünler ve üretim yöntemlerine dönüştürülmesinden oluşmaktadır. Geleneksel ürünlere yönelik kurumlarda kompleks olmayan üretim süreçlerinde, düşük maliyet ve esnek üretim sistemiyle küçük ölçeklerde kalmaktadır. Teknoloji takibi yapılan üretimler ise; esnek çalışma üniteleri kullanılarak kısa sürelerde iyi kalite kontrol ve yönetim sistemi kullanarak yeni ürünlerin düzenli tedarik/üretim ve servis ilişkilerini koruyarak, çok yönlü çalışma ve çalışan kültürü oluşturmuş ve belli oranda Ar-Ge yapan kuruluşlarda gerçekleştirilmektedir. Teknoloji yaratan firmalar, ilk hareketi yaratan sanayi lideridir; yüksek düzeyde ve riskli Ar-Ge yatırımı yapmışlardır, standartlar ve uluslararası düzenlemeler oluşturularak rakiplerine teknik engel oluşturur ve patent aracılığı ile taklitleri engellerler.

Diğer sektörlerde olduğu gibi biyoteknolojide de kurumsal yapılanmada birbirini tamamlayan üç kritik kitle vardır. Kitlelerden birinde üniversiteler, enstitüler, araştırma kuruluşları ve profesyonel örgütlerden oluşan bilgi kaynağı, ikincisinde toplumsal gereksinim, finans ve hukuksal düzenlemelerden oluşan resmi organizasyonlar mevcuttur. Bu iki kitlenin insanlığa katma değer yaratması ve toplumun her kesimine ulaşması ise üreticiler aracılığı ile olabilmektedir. Günümüzde bu kitleler arasında teknoloji ve bilginin topluma faydalı ürüne dönüşmesinde en etkin yol üniversite-sanayi işbirliğidir. Bunun gerçekleştirilmesi, ulusal inovasyon sistemi ve teknolojiye yönelik ekonomik stratejilere bağlıdır. Günümüzde, rekabet ve gelişme hızının büyüklüğü nedeniyle temel ve takiben uygulamalı araştırmalardan devam ederek geliştirme ve üretim operasyonuna kadar giden klasik lineer ürün geliştirme sistemi yerine, yukarıda bahsettiğimiz devlet-üniversite-sanayi üçlüsünün birlikte hareket ettiği organizasyonlar rekabet kapasitesine sahip, kalıcı ve söz sahibi olabilecektir.

İşbirliğinde üçlü sarmal



Üniversite-sanayi işbirliğinden bahsederken her iki kitlenin özelliklerini bilmek gerekir. Üniversite, evrensel işleyişi ve problemlerin kaynağını anlamak için zaman endişesi taşımadan, uzun süreli araştırmalar yapar ve bilgisini topluma açar. Elde ettiği bilginin kullanım riskini de taşımaz. Sanayi ise, rekabet üstünlüğü sağlamak için araştırmalarda hakimiyeti ve bilgiyi kendisine ait olacak şekilde risklerin sorumluluğunu da alır. Disiplinlerarası bilgi paylaşımı yerine, disiplinlerüstü hayatın diğer aktörleri ve günlük hayat ile yakın ilişkiler kurarak üretmek üniversitelerin yeni yaklaşımıdır. Mevcut üniversite yaklaşımlarında problem çözümleri akademik kaygılar ve çerçeveler üzerine kurulmaktadır, disiplinler, homojen ve hiyerarşik kurum içi organizasyonu bozmamaya eğilimli ve kendi iç kontrol sistemine sahiptir. Sanayi ile işbirliği yapması durumunda, problemler uygulama kaygıları çerçevesinde çözüm arayışına, heterojen disiplinlerüstü paylaşım ve sürekli değişkenlik göstermeye eğilimli esnek organizasyonlar ile sosyal beklentileri karşılayacak bir eksternal kontrol sistemi ile yürütülebilir. Farklı bilgi ve yeteneklerin akademik merak ötesinde uygulamaya yönelik süreklilik sağlayacak çözümler ile uğraşması, organizasyonda heterojen yapılanma, problemleri erken tespit etme kapasitesi, toplum yararlarına öncelik verilmesi ve bunların ölçülebilir olmasına hassasiyet gösterilmesi gerekmektedir. Bu çeşit bir organizasyon, üniversitenin de yer aldığı sanayi ve devletin bulunduğu büyük bir organizasyonu gerektirmektedir. Problem tespitinden başlayarak bilginin üretilmesi, toplumsal fayda ve refaha ulaşıncaya kadar kesintisiz işlemlerini sağlamak bilgi-yaşam döngüsünü en verimli hale getirecektir.

Üniversite-sanayi işbirliğinin ortak amaçları; yeni ve önemli araştırma alanlarını yeniden belirlemek, bilim ve sanayi arasında uzun vadeli işbirliğini geliştirmek, rekabet öncesi araştırma işbirliğini teşvik etmek, gömülü bilgiyi geniş kitlelerde kullanılabilir ve kalıcı hale getirmek, kritik bilgi yoğunluğuna odaklanmayı sağlamak ve Ar-Ge işbirliğine rehberlik etmek olarak sayılabilir. Bu amaçların gerçekleştirilmesinde işbirliği merkezleri ülke ekonomisine katkı açısından büyük önem arz etmektedir. Böylece endüstriyel Ar-Ge kapasitesi artar, uygulamalı araştırmalar ve kritik işbirlikleri sağlanır, uluslararası işbirliklerde aranan yapı olurlar, ulusal Ar-Ge planlarının hayata geçmesinde ve iyi Ar-Ge yönetimi ile kültürünün gelişmesini sağlarlar.

Örnek olarak, in-vitro araştırmada kullanılan immünodiagnostik bir test protokolünü veya yeni bir molekölü laboratuvarı diagnostik pazara çıkarmak için, çok çeşitli inter-disipliner yetenek ve tecrübelerle sahip olmak gerekir. Bunlar biyokimya, immünoloji, elektronik, mühendislik, polimer gibi teknik uzmanlıklardan, kalite kontrol, kalite güvence ve hukuksal düzenlemelere, değişik skalalarda üretim ve işleme tecrübeleri, teknoloji transferi, paketleme, pazarlama ve dağıtım bilgi ve tecrübelerini gerektirmektedir. Klinik diagnostiklerde ayrıca klinik araştırma tecrübeleri de gerekecektir. Bir IVD aşağıdaki aşamaları geçtikten sonra pazara çıkabilir:

1. Laboratuvar prototip testin gerçekleştiği başlangıç Ar-Ge
2. Teknolojinin gözden geçirilmesi ve tasarım seçimi
3. Teknik özelliklerin belirlenmesi
4. Son tasarımın yapılması ve test edilmesi
5. Klinik denemeler
6. Tasarım revizyonları ve test edilmesi
7. Faz üretim ve ürünün piyasaya çıkması

Bu fazlardan geçerek bir IVD'nin ticarileşmesi 3-4 yıl sürmektedir. Faz 2-7 arasındaki maliyet yaklaşık 3-10 milyon YTL'ye çıkmaktadır. Varolan bir test sistemi veya cihaz formatı üzerinden gidildiğinde ise, bu maliyetler doğal olarak düşmekte ve süre 10-15 aya düşmektedir. Eğer yeni bir cihaz geliştirilecek ise, cihaz modifikasyonu veya yeni tasarıma göre, 1-10 milyon YTL ek masraf olacaktır. Uluslararası şirketler dışında, bir kurumun işbirliği yapmadan bu fazları açarak hedefe ulaşma olasılığı tahmin edilebileceği gibi düşüktür.

Yukarıda örneği verilen yapılabilecek işbirliklerinde üniversite; kendisi için araştırma finansı sağlamış, kamu yararında servis misyonunu yerine getirmiş, anlamlı problemler belirlemiş, fakültelerine yeni tecrübe alanları açmış, bölgesel ekonomik gelişmeye katkı sağlamış ve mezunlarına yeni iş alanları yaratmış olacaktır. Endüstri ise işbirliği sayesinde, üniversite araştırma altyapısına ve kendisinde olmayan laboratuvar uzmanlıklarına erişmiş, mevcut teknolojilerini geliştirip yenilenmesine olanak sağlamış ve rekabet öncesi araştırma olanaklarını sağlayıp araştırma kapasitesini artırmış olacaktır.

Diğer teknolojilerden farklı olarak biyoteknoloji ürünlerinde yatırım, geri dönüşü çok uzun sürer ve girişimciyi uzaklaştırır. Bu nedenle biyoteknolojik işbirliği organizasyonlarında uzun vadeli (10-20 yıl) planlama çok önemlidir. İşbirliğinde başarı; karşılıklı güven, birbirlerinin beklenti ve gereksinimlerinin farkında olmak, ilişkilerde saygı ve esneklik, amaçlar ve rollerin iyi tanımlanmış olması, uygun anahtar personellerin uygun yetkilerle atanması, şeffaf bütçe veya fon temini, fikri mülkiyet ve yayım hakları konusunda anlaşma altyapısının oluşturulması, çalışma ve araştırmaların finansal yönüyle profesyonel anlamda yürütülmesi, anlaşmazlıkların çözümüne yönelik metodların oluşturulması ve başarıların ödüllendirilmesi gibi faktörlere bağlıdır. Devlet-üniversite-sanayi organizasyonu veya altyapısı gerçekleştirilemiyor ise, gelişme ivmesi katlanarak artmakta olan biyoteknoloji alanında ölkemiz bilim veya sanayisi yalnız kalan aktörlerin çabaları ile yürütülecektir. Ancak bu çabalar, kalıcılığın belirsizliği ve topluma geri dönüş azalma riskini taşıyacak ve bu aktörler çok az kaynakla mucizelerle çalışmaya devam edecektir.

4. ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

25 – 28 Eylül 2006
SHERATON OTEL & CONVENTION CENTER
ANKARA

**SÖZEL SUNUMLAR
26 NİSAN 2006 ÇARŞAMBA**

Nazal Poliplerde Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Mantarların Araştırılması

Hülya Eyigör¹, Mete Eyigör², Ceren Günel³, Berna Gültekin², Sema Başak⁴, Neriman Aydın²

¹Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz AD, Isparta.

²Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Aydın.

³Aydın Menderes Hastanesi Kulak Burun Boğaz Kliniği, Aydın.

⁴Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz AD, Aydın.

Nazal polipozis, yaklaşık olarak toplumda %4 oranında görülen etiyoloji ve patogenezini tam olarak anlayamamış bir hastalıktır. Mantarların da etiyolojide rol oynadığı düşünülmektedir. Bu çalışmanın amacı nazal polipli hastalarda kültür ve PCR ile mantarların araştırılmasıdır.

Aydın Devlet Hastanesi ve Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalında nazal polipozis nedeniyle opere edilen toplam 23 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Operasyon öncesinde eküyon çubuğu ile sürüntü örneği alınarak kültür yapılmıştır. Daha sonra sitoloji fırçası ile orta meatustan alınan örnek ile operasyonda alınan nazal polip örneğine PCR uygulanmıştır. Öncelikle yeterli miktarda örnek alımını kontrol etmek için GJB2 (CX26a24) TCT TTT CCA GAG CAA ACC GCC ve GJB2 (CX26b589) GCC TTC GAT GCG GAC CTT C primerleri ile PCR uygulanmıştır. İkinci aşamada mantar saptanması için ITS 3 GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC ve ITS 4 TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC primerleri kullanılarak PCR uygulanmıştır. PCR ile bant görülen örnekler ABI Prism Model 310 (Applied biosystems, CA) ile dizi analizi yapılmıştır.

Kültür sonucunda hiçbir örnekte mantar üretilmemiştir. Toplam 23 fırça örneğinin 22'sinde (%95.6) ve 23 polip örneğinde GJB2 primerleri ile yapılan PCR pozitif bulunmuştur. ITS3 ve ITS4 primerleri ile yapılan PCR sonucunda, fırça örneklerinin tümü negatif bulunurken, doku örneklerinin 2'sinde (%8.7) bant oluşumu gözlenmiştir. Bu örnekler yapılan dizi analizi sonrasında *Cladosporium cladosporioides* ve *Cladosporium tonuissimum* olarak isimlendirilmiştir.

Çalışmamızda nazal polipli hastalarda düşük oranda mantar saptanmıştır. Ancak bu hastalığın etiyolojisinde mantarların da akla getirilmesi ve daha geniş çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

SBÇ-2

Hepatit Delta Virus İnfeksiyonlarında Konağa Ait Sitokin Gen Polimorfizmleri

*Zeynep Ergül¹, Cihan Yurdaydın¹, Kendal Yalçın², A. Aslan Ergül¹, Hakan Bozkaya¹,
Özden Uzunalımoğlu¹, A. Mithat Bozdayı¹*

¹Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji BD, Hepatoloji Enstitüsü, Ankara.

²Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji BD, Diyarbakır.

Bu çalışmada, kronik delta hepatit patogenezinde, konağa ait genetik faktörlerin de rol oynayabileceği öngörüsüyle, infeksiyonlarda yer alan başlıca sitokin genlerine ait gen polimorfizmleri [İnterlökin 10 (IL10; -1082; IL10; -627), interferon gamma (IFN γ ; +874) ve tümör nekroz faktör alfa (TNF α ; -308)] araştırılmıştır.

Çalışmaya, kronik delta hepatitli 69 hasta (49 E, 20 K; yaş ortalaması: 36 \pm 11 yıl), HBsAg pozitif 119 hasta (65 HBeAg negatif kronik hepatit, 45 HBeAg pozitif kronik hepatit, 10 HBeAg negatif inaktif taşıyıcı; 85 E, 34 K; yaş ortalaması: 38 \pm 12 yıl) ve anti-HBs pozitif doğal bağışıklık edinmiş 86 kişi (20 E, 66 K; yaş ortalaması: 49 \pm 11 yıl) alınmıştır. Polimorfizm çalışmaları PCR-RFLP yöntemi ile yapılmıştır. Çalışılan polimorfizmler ve gen ekspresyonları arasındaki ilişki istatistik analizinde kullanılmıştır.

Kronik delta hepatitli hastaların, HBsAg pozitif hastalara göre daha düşük IFN gamma ve IL-10 üretimi gösterdiği, anti-HBs pozitif hastalara göre de düşük IL-10 üretimi gösterdiği saptanmıştır. TNF α -308 polimorfizmi için gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

IL-10 üretiminin fazla olması HBV'ye karşı doğal bağışıklığın oluşumunda kolaylaştırıcı, IL-10 üretiminin az olması kronik delta hepatiti oluşumunu kolaylaştırıcı etki yapabilir. IL-10 genel anlamda hücrel immün yanıtı azaltır, o nedenle bu bulgu kronik delta hepatitin agresif seyriyle ilgili olabilir. INF- γ üretiminin az olması kronik hepatit B infeksiyonunu kolaylaştırıcı, INF- γ üretiminin az olması kronik hepatit D infeksiyonunu zorlaştırıcı etki yapabilir.

**KRONİK HBV İNFEKSİYONLU HASTALARIN SERUMUNDA GERÇEKTEN HBV
cccDNA VAR MI?**

*Zeynep Ergül, Şahin Çoban, Ramazan İdilman, Özden Uzunalımoğlu, Cihan Yurdaydın,
A.Mithat Bozdayı*

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji BD, Hepatoloji Enstitüsü, Ankara.

Kronik HBV enfeksiyonlu hastaların serumlarında cccDNA varlığını gösteren bazı çalışmalar olmasına rağmen, bu konu halen açıklığa kavuşmamıştır. Serumda cccDNA varlığını gösteren pozitif sonuçların, deneysel hatalardan kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Bu çalışmanın amacı, kronik HBV enfeksiyonlu hastaların serumlarında cccDNA'nın var olup olmadığını doğrulayacak bir yöntem geliştirmektir.

Kronik hepatit B enfeksiyonlu 14 hastanın karaciğer biyopsi ve serum örnekleri daha önce yayınlanmış bir yöntemle cccDNA'nın tespiti için kullanıldı. Bu yöntem, HBV DNA'nın kısmi tek zincirli bölgesinin ATP bağımlı Dnaz ile uzaklaştırılmasına ve HBV DNA'nın bu kısmi tek zincir bölgesini hedef alan gerçek zamanlı PCR deneyine dayanmaktadır. Yöntem, örnekte yalnızca cccDNA amplifikasyonuna izin vermektedir. Bu çalışmada, amplifikasyon için kullanılan bölgeye denk gelen HBV cccDNA'nın çift zincirli bölgesini kesen bir restriksiyon endonükleaz (Rsa1) kullanarak yeni bir yöntem tasarlanmıştır. Serum örneği, sadece Rsa1 veya ekstraktların ATP bağımlı Dnaz ile muamele edilmesini takiben Rsa1 ile kesilmiştir. Hipotezimiz; cccDNA'dan kaynaklanan pozitif bir sonucun, Dnaz ile muamele edilen örneklerin Rsa1 ile kesilmesinden sonra hiçbir pozitif sinyalin tespit edilmemesi üzerine kurulmuştur. Bu hipotez; hem HBV tüm genomunu taşıyan bir plazmidin hem de ekstraksiyonu yapılmış karaciğer biyopsi örneklerinin kesilmesiyle test edilmiştir.

Bütün biyopsi örnekleri ile 14 hastanın 9'unun serumunda cccDNA saptanmıştır. Bu pozitif sonuçların cccDNA'dan kaynaklandığını doğrulamak için gerçek zamanlı PCR deneyinin hedef dizisini ortadan kaldıran Rsa1 kullandığında, 9 hastanın 4'ünün serumunda cccDNA tamamen ortadan kaybolurken, kalan 5 hastada anlamlı derecede azalması pozitif sonuçların gerçekten çift zincirli bir DNA'dan kaynaklandığını doğrulamıştır. cccDNA düzeyleri, serumdaki kısmi sarmal (relaxed circular) HBV DNA düzeylerinden 2-3 log daha düşük bulunmuştur.

Bu çalışma, kronik HBV enfeksiyonlu hastaların serumlarında bulunan cccDNA'nın varlığını işaret eden verilerin, gerçekten serumda dolaşan HBV cccDNA'dan kaynaklandığını göstermektedir.

SBC-4

shRNA ile Hepatit B Virus Replikasyonunun In-Vitro Olarak Baskılanması: HBV Tedavisinde Yeni Bir Strateji

Handan Kayhan, Ersin Karataylı, A. Reşat Türkyılmaz, Cihan Yurdaydın, A.Mithat Bozdayı

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji BD, Hepatoloji Enstitüsü, Ankara.

RNAi (RNA interference: RNA çatışması) kısaca diziye özgül mRNA degradasyonu olarak tanımlanabilir. RNAi işlemi siRNA'larla (small interfering RNA: küçük engelleyici RNA molekülleri) başlar ve aktif bir gen transkriptinin (mRNA) susturulması (gene silencing) ile sonuçlanır. Bu moleküller çok özgül olduklarından hedef mRNA dışında başka mRNA'ları yıkıma uğratmazlar. Bu çalışmada, RNAi yöntemi ile HBV replikasyonunun in-vitro olarak baskılanmasının gösterilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, HBV mRNA dizilerine özgül, 21 nükleotid uzunluğunda, X, kor ve yüzey genlerini hedef alan üç siRNA tasarlanmıştır. Bu siRNA'lar, shRNA (small hairpin RNA) ekspresyonu sağlamak için klonlanmıştır. İlk olarak siRNA'ların pENTR/U6 vektörüne ligasyonu yapılmış, elde edilen bu vektör kompetan *E.coli*'ye transforme edilmiştir. Klonlama, dizi analizi ile onaylanmıştır. shRNA'ların HBV üzerindeki etkisini görmek için, stabil HBV ekspresyonu ve replikasyonunun yapıldığı insan hepatoma hücre hattı HepG.2.2.15 kullanılmıştır. Transfeksiyon katyonik lipozomlarla gerçekleştirilmiştir. shRNA transfeksiyonlarının HBV replikasyon düzeyine etkisi kantitatif gerçek zamanlı PCR yöntemi ile değerlendirilmiştir. HBV yüzey antijeni düzeyleri HBsAg ELISA kiti ile ölçülmüştür.

Viral DNA düzeyi ikinci, üçüncü, dördüncü, beşinci ve altıncı günlerde ölçülmüştür. Viral DNA sentezi altı gün boyunca baskılanmıştır. Baskılama üçüncü günde %77, dördüncü günde %79, beşinci günde %78 ve altıncı günde %58 oranında gerçekleşmiştir.

HBV replikasyonunun in-vitro olarak shRNA'lar kullanılarak başarı ile baskılanabileceği bu çalışma ile gösterilmiştir. Bu baskılama RNAi'nin HBV'ye karşı potansiyel bir tedavi aracı olarak yararlı olabileceğini göstermektedir.

Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi'nde İzole edilen Difteri Dışı *Corynebacterium* Türlerinin Tiplendirilmesi

Serpil Ercis, Nazlı Gürkan Aydın, Özgen Eser, Gülşen Haşçelik

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Ankara.

Nadir olarak infeksiyon etkeni kabul edilen bakterilerin bir kez izole edilmesi, hastane infeksiyonları arasında salgın olarak kabul edilmektedir. Hastanemizde onüç aylık bir dönem içinde birbiriyle ilişkili servislerde aynı *Corynebacterium* türlerinin yakın tarihlerde tanımlanması üzerine olası bir salgın düşünülmüştür. Bu amaçla bu suşlara fenotipik ve genotipik tiplendirme yapılması planlanmıştır.

1 Ocak 2005-31 Ocak 2006 tarihleri arasında 22 hastanın (12 devamlı bakım, 8 servis, 2 poliklinik) klinik örneklerinden izole edilen ve Phoenix system (Becton Dickinson, USA) ile tanımlanan 26 *Corynebacterium* suşu (14 *C.striatum*, 6 *C.pseudodiphtheriticum*, 4 *C.amycolatum/minuttissimum*, 2 *C.amycolatum*) çalışmaya alınmıştır. *Corynebacterium* türleri en çok solunum yolu örneklerinden (derin trakeal aspirat: 11, bronkoalveolar lavaj: 5, plevra sıvısı: 3, balgam: 2) izole edilmiştir. Bu örneklerle ait yaymalar incelenerek infeksiyon etkeni veya kolonize olduklarına karar verilmiştir. Tüm izolatların 19 antibiyotiğe karşı disk difüzyon yöntemi ile duyarlılık paternleri belirlenmiştir. ERIC-2 primeri ile ERIC-PCR yöntemi uygulanarak kolonize ve infeksiyon etkeni olan izolatlar arasında genotipik benzerlik araştırılmıştır. Farklı türler arasında 5-11 bant farkı bulunurken, aynı tür içinde birbiriyle ilişkili infeksiyon veya kolonizasyonlardan izole edilen suşların aynı veya yakın ilişkili olduğu saptanmıştır. Aynı tür olarak tanımlanan, farklı servis ve örneklerden izole edilen suşların ise genotipik olarak farklı olduğu belirlenmiştir. Genotipik olarak yakın ilişkili izolatların antibiyotik duyarlılık paternlerinin de benzer olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmada, özellikle solunum yolu infeksiyonu ile ilişkili örneklerden izole edilen 14 *C.striatum* suşunun fenotipik ve genotipik olarak aynı bulunması salgın varlığını göstermiştir. Çalışmamızın sonuçlarına göre, difteri dışı *Corynebacterium* türlerinin özellikle yoğun bakım hastalarından gelen klinik örneklerde ardarda izole edilmesinin salgın açısından uyarıcı olması gerektiğine karar verilmiştir.

***Candida norvegensis*, *Candida inconspicua* ve *Candida krusei* Türlerinin Birbirinden Ayrımında Fenotipik Yöntemlerin ve Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzim Analizinin Kullanımı**

Dilek Menemenlioğlu, Nazlı Gürkan Aydın, Banu Sancak, Şehnaz Alp, Sevtap Arıkan

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

Candida cinsi mantarların tür düzeyinde tanımlanmasında en sık kullanılan yöntem, asimilasyon profillerini saptamaya dayalı bir sistem olan ID 32C (bioMerieux, Fransa)'dir. Ancak bu test, *Candida norvegensis*, *C.inconspicua* ve *C.krusei* türlerinin birbirinden ayrımında yetersiz kalmaktadır. Tür düzeyindeki ayırım, tedavi seçeneğinin belirlenmesinde önem taşımaktadır, çünkü *C.norvegensis* ve *C.inconspicua* flukonazole değişen oranlarda direnç gösterirken, *C.krusei* doğal dirençlidir. Bu çalışma, *C.norvegensis*, *C.inconspicua* ve *C.krusei* türlerinin birbirinden ayrımında, fenotipik ve genotipik testlerin karşılaştırılması amacıyla planlanmıştır.

Çalışmaya, Ocak 1998-Şubat 2006 tarihleri arasında standart mikolojik yöntemlerle izole edilmiş 30 suş ve *C.krusei* ATCC 6258 dahil edilmiştir. Fenotipik tanımlama, izolatların Sabouraud dekstroz agardaki (SDA) morfolojik görünümüleri, aromatik koku oluşturmaları, ID 32C ile saptanan asimilasyon profilleri, eskülini hidrolize etme özellikleri ve mısır unlu Tween 80 besiyerindeki mikroskopik görünümüleri değerlendirilerek yapılmıştır. Genotipik tanımlama ise *Hinfl* restriksiyon enzimi kullanılarak, REAG (genomik DNA'nın restriksiyon enzim analizi) yöntemi ile yapılmıştır.

Suşların 7'si SDA'da mat, krem renkli, 22'si ise parlak, bej renkli, aromatik kokulu koloniler oluşturmuştur. Mat, krem renkli morfolojik görünüme sahip olan suşlar, asimilasyon profillerine göre "*C.norvegensis/inconspicua* veya *C.krusei*" olarak; parlak, bej renkli morfolojik görünüme sahip olan suşlar ise "*C.norvegensis/inconspicua*" olarak tanımlanmıştır. "*C.norvegensis/inconspicua* veya *C.krusei*" olarak tanımlanmış izolatların eskülin hidrolizleri negatif, "*C.norvegensis/inconspicua*" olarak tanımlanmış izolatların ise eskülin hidrolizleri pozitif bulunmuştur. Mısır unlu Tween 80 besiyerindeki mikroskopik görünümüleri 7 izolat için "bol psödohif ve yassı blastospor"; 21 izolat için "sadece yassı blastospor"; 1 izolat için "yassı blastospor ve psödohif" olarak değerlendirilmiştir. Bu fenotipik özellikler, mat, krem renkli olan 7 suşun *C.krusei*; parlak, bej renkli olan 22 suşun ise *C.norvegensis* olduğunu düşündürmüştür. REAG incelemesi sonucunda, fenotipik olarak *C.krusei* olduğu düşünülen 7 izolatta elde edilen en büyük bant 6.2 kb; *C.norvegensis* olduğu düşünülen 22 izolatta ise 3.3 kb olarak saptanmıştır. *C.krusei* ATCC 6258 için elde edilen en büyük bant ise 6.2 kb olarak bulunmuştur. REAG incelemesi sonucunda *C.inconspicua* ile uyumlu bant paterni olan suş saptanmamıştır.

Fenotipik yöntemler, *C.norvegensis*, *C.inconspicua* ve *C.krusei* ayrımında önemli bir yere sahiptir, ancak bu yöntemlerin birarada değerlendirilmeleri gerekmektedir. *Hinfl* enzimi kullanılarak uygulanan REAG yöntemiyle bu üç tür için daha önce rapor edilen en büyük bant büyüklüğü, *C.norvegensis* için 3.29 kb, *C.inconspicua* için 7.63 kb ve *C.krusei* için 6.22 kb olarak bildirilmiştir (Fujita S, Hashimoto T, Int J Syst Evol Microbiol, 2000;50:1381). Çalışmamız sonucunda, en büyük bant büyüklüğünün 3.3 kb olarak bulunması *C.norvegensis* türü için, 6.2 kb olarak bulunması ise *C.krusei* türü için tanımlayıcı bir özellik olarak düşünülmüştür. Dolayısıyla REAG yöntemi, bu üç türün ayrımında tek başına kullanılabilecek bir yöntem olarak umut vermektedir.

4. ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

25 – 28 Eylül 2006
SHERATON OTEL & CONVENTION CENTER
ANKARA

POSTER SUNUMLARI

4. ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

25 – 28 Eylül 2006
SHERATON OTEL & CONVENTION CENTER
ANKARA

26 NİSAN 2006 ÇARŞAMBA POSTER SUNUMLARI - VİRUS-

Batı Nil Virusu'nun Saptanmasında VecTest © Uygulamaları

Koray Ergünay¹, Nurdan Özer², Fatih Mehmet Şimşek², Sinan Kaynaş²,
Şemsettin Ustaçelebi¹

¹Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

²Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ekoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Son yıllarda Batı Nil virusu epidemiyolojisinde izlenen değişiklikler, özellikle sivrisinek ve kuş örneklerinde virus aktivitesinin gösterilmesinde sahada kullanılacak yöntemlerin önemini artırmıştır. VecTest©, Batı Nil virusu antijenlerinin saptanması için geliştirilen bir immünokromatografik hızlı tanı testidir. Bu çalışmada Güneydoğu Anadolu bölgesinden elde edilen sivrisineklerde VecTest uygulaması ve sonuçlarının sunulması amaçlanmıştır.

Çalışmada, Harran ve Yenice bölgelerinden elde edilen 2420 *Culex pipiens* türü sivrisinek değerlendirilmiştir. Ağız aspiratörü ile sahadan toplanan sivrisinekler tür ayrımı yapıldıktan sonra 25-50 bireylik alikotlara ayrılmış ve üreticinin önerileri doğrultusunda VecTest uygulanmıştır. Elde edilen pozitif sonuçlar ise gerçek zamanlı PCR ile doğrulanmıştır.

Toplam 170 birey içeren (%7) 4 havuzda VecTest pozitif olarak izlenmiş, ancak bu sonuçlar modifiye RNA ekstraksiyonu sonrasında aynı örneklerle uygulanan gerçek zamanlı PCR ile doğrulanmamıştır. Bu nedenle test sonuçlarının diğer Flaviviruslarla olan çapraz reaksiyona bağlı olduğu düşünülmüştür.

PCV-2

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile HBV DNA Kantitasyonu ve HBV DNA YMDD Motif Mutasyonu Analizi

Harun Ağca¹, Arzu Sayiner¹, Aylin Şengönül¹, İlkay Şimşek², Mesut Akarsu²

¹Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Inciraltı, İzmir.

²Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Inciraltı, İzmir.

Kronik B hepatiti tedavisinde kullanılan lamivudine karşı, tedavi süresindeki uzamaya paralel olarak artan oranda direnç gelişmektedir. Çalışmamızın amacı, aynı testte HBV DNA kantitasyonu ve lamivudin direncine neden olan YMDD motif analizini sağlayacak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminin geliştirilmesidir.

Çalışmamızda, "bi-probe" yöntemine dayalı gerçek zamanlı PCR ve erime ısısı analizi kullanılmıştır. Bu amaçla, bir adet Cy5 ile işaretli hibridizasyon probu kullanılmış ve PCR karışımına SYBR Green I boyası eklenmiştir. Geliştirilen test ile kronik B hepatiti nedeniyle izlenen ve lamivudin kullanmakta olan 21 hastaya ait 39 serum örneği incelenmiştir. Gerçek zamanlı PCR ile HBV DNA kantitasyonu için VQC kalite kontrol serumlarına dayalı eksternal kantitasyon eğrisi yöntemi kullanılmıştır. Test sonuçları YMDD mutasyonu açısından Inno-LiPA HBV DR (Innogenetics, Belçika) ve dizi analizi ile, HBV DNA kantitasyonu açısından Real Art HBV DNA RG (Artus, Almanya) sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Testin kantitasyon aralığı 3×10^3 - 3×10^7 kopya/ml olarak belirlenmiştir. Ortalama erime tepe noktası ısıları; YMDD için $59.29 \pm 0.40^\circ\text{C}$, YVDD için $55.11 \pm 0.14^\circ\text{C}$ ve YIDD için $52.91 \pm 0.43^\circ\text{C}$ olarak belirlenmiştir. Yöntemde kantitasyonun alt sınırı olan 3000 kopya/ml seviyesinin üzerinde HBV DNA içeren örneklerde YMDD motif mutasyonu saptama açısından duyarlılık, dizi analizi esas alındığında %88, LiPA yöntemi esas alındığında %83 olarak belirlenmiştir. Örneklerdeki HBV DNA kantitasyonu, geliştirilen test ve Real-Art kiti ile yapılmış ve sonuçlar birbiri ile uyumlu bulunmuştur.

Gerçek zamanlı PCR ve erime ısısı analizine dayalı geliştirilen testin, duyarlılığı yüksek, LiPA ve dizi analizi ile uyumlu, kolay uygulanabilir, hızlı, ekonomik ve YMDD mutasyon analizi ile HBV DNA kantitasyonunu aynı çalışmada belirleyebilen bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Beyin Omurilik Sıvısında Üç Farklı PCR Yöntemi ile HSV DNA Saptanması

Imre Altuđlu¹, Ayşın Zeytinođlu¹, Hadiye Şirin², Nur Yüceyar², Selda Erensoy¹

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, İzmir.

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji AD, İzmir.

HSV'ye bağlı santral sinir sistemi infeksiyonlarının özgül ve hızlı tanısında, beyin omurilik sıvısında (BOS) HSV DNA'sının polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temeline dayalı moleküler yöntemlerle araştırılması yararlıdır. Bu çalışmada, HSV gB PCR- digoksinin saptama yöntemi (gB PCR-dig) ile ticari gerçek zamanlı PCR testleri LightCycler (LC) ve Robogene HSV1/HSV-2 saptama kitlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya HSV-DNA testi için yollanan 28 BOS örneği alınmıştır. DNA izolasyonu ticari bir ekstraksiyon kit (RTP DNA/RNA virus mini kit, Invitek, Almanya) ile yapılmıştır. Örneklerin tümüne gB bölgesinin amplifikasyonu temeline dayanan PCR uygulanmıştır. Amplifiye ürünlerinin saptanması amacıyla "dig-detection" kit (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılmıştır. Pozitif sonuç elde edilen örneklerde, HSV-1 ve HSV-2 ayırımı için *pol* primerleri ve DNA sekanslama kiti (Applied Biosystems, CA) kullanılarak ABI 310 Genetik analizör (Perkin Elmer, USA) ile dizi analizi yapılmıştır. Aynı örnekler, LC cihazında LC HSV1/2 Detection kit (Roche Diagnostics, Almanya) ile ve ABI Prism 7000 sekans saptama sistemi (Applied Biosystems, ABD) kullanılarak "RoboGene HSV-1 and HSV-2 Detection Kit"leri (Roboscreen, Research Development Section, Leipzig, Almanya) ile test edilmiştir. LC HSV-1/2 kiti ile olumlu bulunan örneklerde, "erime eğrisi" analizi ile tiplendirme yapılmıştır.

Sonuç olarak, gB PCR-dig yöntemi ile 4 örnek pozitif olarak bulunurken, bu örneklerin 3'ü LC HSV1/2 kiti, biri Robogene HSV-1 kiti ile pozitif sonuç vermiştir. LC negatif, gB PCR-dig pozitif örnekte, *pol* PCR ile sonuç alınamaması ve hastanın klinik değerlendirmesinin HSV ensefaliti ile uyumlu olmaması nedeniyle, gB PCR-dig sonucu yalancı pozitiflik olarak kabul edilmiştir. Diğer ikisi, erime eğrisi analizi ve *pol* dizi analizi ile HSV-1 olarak tanımlanmıştır. *Pol* dizi analizi ile HSV-1 olarak tanımlanan bir örnekte erime eğrisi analizi ile tiplendirme yapılamamıştır.

Klinik bulgular ve *pol* dizi sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, gB PCR-dig'in bir örnekte yalancı pozitiflik verdiği ve LC kitinin, gerçek pozitif üç örneği saptayabildiği gözlenmiştir. Robogene testi iki örnekte HSV DNA pozitifliğini saptayamamıştır. Çalışılan örnek grubunda, HSV ensefaliti özgül tanısında değerlendirilen testler içinde en etkin testin LC HSV 1/ 2 olduğu belirlenmiştir.

Isparta'da Hepatit B Virus Genotip Dağılımı

*Selçuk Kaya, Emel Sesli Çetin, Buket Cicioğlu Arıdoğan, Süleyman Önal,
Mustafa Demirci*

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta.

Ülkemizde yapılmış olan kısıtlı sayıdaki çalışmada, hepatit B virus (HBV) yaygın genotipinin D olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada, hem Isparta bölgesinde HBV genotip profilini tespit ederek ülkemiz için yeni genotip verilerinin sağlanması, hem de genotip ile bulaşma yolları ve hastalığın prognozu arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya HBV enfeksiyonu olan 135 kişi dahil edilmiştir. Hastalar bulaşma yolları ve hastalık bulguları yönünden sorgulanarak karaciğer enzimlerinden ALT ve AST seviyeleri ölçülmüştür. HBV genotipleri, EIA (Institute of Immunology Co, Ltd, Tokyo, Japan) yöntemiyle üretici firma talimatları doğrultusunda hiçbir değişiklik yapılmadan çalışılmıştır.

Hastaların %51.1'inde HBV için bulaşma yolu saptanamamıştır. Bununla birlikte hastaların %38.5'inde kan yolu ile bulaş en sık rastlanan olası bulaşma yolu olarak belirlenmiştir. HBV Genotip EIA ile 135 örneğin 124'ü genotiplendirilebilmiştir. Bunların 115'i (%85.1) genotip D veya E (preS2 subtip ksu), 6'sı (%4.4) genotip A (subtip su), 2'si (%1.4) genotip C (subtip ks) ve biri (%0.7) genotip F (subtip k) olarak saptanmıştır.

Sonuç olarak, bölgemizde genotip D en sık rastlanan HBV genotipi olmuş, genotip dağılımı ile hastalığın şiddeti ve bulaş yolları arasında bir ilişki saptanamamıştır.

Aseptik Menenjitli Hastaların BOS Örneklerinde Enterovirus ve Herpesvirusların PCR Yöntemiyle Araştırılması

Esmâ Saatçi Deniz¹, Selma Gökahmetoğlu¹, Mustafa Öztürk², Yusuf Özbal¹, Mehmet Doğanay³

¹Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

²Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri.

³Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri.

Aseptik menenjit birçok nedene bağlı olarak gelişebilen, inflamatuvar bir meninks hastalığıdır. Epidemiyolojik ve virolojik araştırmalarda, aseptik menenjitli hastaların %55-70'inde etyolojik etkenin viruslar olduğu belirlenmiştir. Enteroviruslar ve herpesviruslar aseptik menenjitlerin en sık etkenleri arasında yer almaktadır.

Bu çalışmada, aseptik menenjitli hastaların BOS örneklerinde hücre kültürü ve PCR yöntemleri ile enterovirus, herpes simpleks virus (HSV), varicella-zoster virus (VZV) ve sitomegalovirus (CMV) araştırılması amaçlanmıştır.

Mart 2004-Haziran 2005 dönemleri arasında, Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Hastaneleri kliniklerinde takip edilen aseptik menenjit ön tanılı 30 hastanın BOS örneği çalışmaya dahil edilmiştir. HSV-DNA, VZV-DNA, CMV-DNA "in house" PCR ile; enterovirus RNA'sı ise gerçek zamanlı PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Enterovirus ve HSV izolasyonu için Hep-2 hücre kültürü kullanılmıştır.

Çalışmaya alınan hastaların 15'inde (%50) HSV-DNA pozitif bulunmuş, örneklerin hiçbirisinde CMV-DNA, VZV-DNA ve enterovirus RNA'sı gösterilememiştir. HSV-DNA pozitif bulunan örneklerin 8'inde hücre kültürü çalışması yapılabilmiş, Hep-2 hücre kültürüne ekilen örneklerin 7'sinde HSV'e özgü sitopatik etki izlenmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda, aseptik menenjit ön tanılı hastaların yarısında etken olarak HSV DNA'sı gösterilmiştir.

PÇV-7

Düşük Düzeyde Saptanan Anti HCV Pozitifliğinde HCV RNA Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Ilhan AFŞAR, Aslı Gamze ŞENER, Berna Gönül, Nükhet KURULTAY

Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Yeşilyurt, İzmir.

Enzim immunoassay (EIA) testi, hepatit C virus (HCV) infeksiyonunun tanısında en sık kullanılan tanı yöntemidir. Kullanım kolaylığı ve düşük maliyeti tercih nedenidir. EIA testinde üçüncü ve dördüncü kuşak testler yalancı negatifliği önlemede başarılı olmasına karşın, yalancı pozitiflikler karşımıza çıkabilmektedir. Çalışmamızda, daha önce HCV tanısı almamış düşük düzeyde anti-HCV pozitifliği saptanan bireylerdeki HCV RNA düzeylerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada, 2005 yılında HCV RNA bakılan 693 hasta incelenmiş ve anti-HCV düzeyi düşük (S/Co:<5) olan hastalar değerlendirilmiştir. Anti-HCV; kemilüminesan VITROS anti-HCV assay version 3.0 (Ortho-Clinical Diagnostics) ile çalışılmış, HCV RNA düzeyleri ise kantitatif olarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile saptanmıştır. Nükleik asit eldesi, hasta serumlarından 200 µl örnek RoboGene® Quantification kit (Roboscreen, Germany) kullanılarak ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır. HCV RNA'nın saptanması için, 20 µl (miks, primer ve TaqMan prob) (Roboscreen, Germany) ve 5 µl ekstraksiyon ürünü karışımı ABI prism 7700 (Applied, Biosystems, Foster City, CA) ile çalışılmıştır.

HCV RNA'sı çalışılan 693 olgu içinde anti-HCV düzeyi düşük (S/Co:<5) olan 44 hastadan üçünde HCV RNA pozitifliği saptanmıştır. Bu üç hastada HCV RNA düzeylerinin; 5.4×10^1 , 8.2×10^1 ve 2.4×10^2 olduğu izlenmiştir.

Sonuç olarak, duyarlılığı yüksek olan sistemlerde düşük düzeyde yalancı pozitifliklere rastlanmaktadır. Bu tür sonuçların moleküler testlerden önce EIA tekniği ile çalışan başka sistemlerde çalışılmasının zaman ve ekonomik kayıpları önleyeceği düşünülmektedir.

SSPE'li Hastaların Serum ve BOS Örneklerinde Virusların Taranması ve Sitokin Ölçümleri

Yasemin Bulut¹, Nimet Kabakuş², Ahmet Gödekmerdan³, Neşe Kurt⁴, Mehmet Yapar⁵

¹Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Elazığ

²Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Çocuk Hastalıkları, Çocuk Nörolojisi BD, Elazığ.

³Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji AD, Elazığ.

⁴Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Elazığ.

⁵GATA Viroloji BD, Ankara.

Subakut sklerozan panensefalit (SSPE) patogeneğinde, kızamık virusu yanında diğer virusların ve sitokinlerin de rol oynayabileceğini gösteren çalışmalar vardır. Bu çalışmada, SSPE tanısı konmuş hastalarda bazı virusların varlığı ve sitokin düzeylerinin araştırılması amaçlanmıştır.

SSPE'li 10 hastanın BOS ve serum örneklerinde (toplam 20 örnek); HSV tip 1 ve tip 2, CMV, EBV, VZV, HHV 6 ve 7, JCV, BKV ve SV40 nükleik asitlerinin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmış ve aynı örneklerde IL-4 ve IFN-gama ölçümleri yapılmıştır.

Örneklerinin tümünde RT-PCR ile kızamık virus RNA'sı pozitif bulunmuş; beş hastanın hem BOS hem de serum örneğinde aynı zamanda eşlik eden diğer bir virusa ait nükleik asit varlığı PCR ile saptanmıştır (Tablo). Hasta örneklerinde ölçülen IL-4 ve IFN-gama düzeyleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Yaş/Cins	Aşılanma durumu	Kızamık infeksiyonu geçirme	Şikayetlerin başlama süresi	SSPE evresi	Viral genom pozitifliği	
					BOS	Serum
8/E	Aşılanmış	Bilinmiyor	3 ay	1	HSV 1	HSV 1
6/K	Aşılanmış	Geçirmemiş	4 ay	3B	CMV	CMV
9/E	Bilinmiyor	Bilinmiyor	3 ay	2B	HSV 2	HSV 2/EBV
8/E	Aşılanmış	Geçirmiş	3 ay	3B	-	EBV/VZV
5/E	Aşısız	Bilinmiyor	2 ay	2B	CMV	CMV
6/E	Bilinmiyor	Bilinmiyor	1 ay	2A	-	VZV
5/E	Aşısız	Geçirmiş	4 ay	2A	-	BKV
7/E	Aşılanmış	Geçirmiş	2 ay	2A	-	HSV1/HSV2
7/K	Aşısız	Geçirmiş	6 ay	2A	-	-
7/E	Aşısız	Geçirmiş	15 gün	2A	HSV 1	HSV1

Sonuç olarak, SSPE'in seyrine başka viral infeksiyonların da eşlik edebileceği ve bu durumun patogeneze katkısının olabileceği; IL-4 ve IFN-gama'nın ise patolojik süreçteki katkısının aydınlatılması için ileri çalışmalara gerek olduğu kanısına varılmıştır.

AKUT ALT SOLUNUM YOLU İNFEKSİYONU OLAN BEBEKLERDE SOLUNUM VİRUSLARININ PCR İLE ARAŞTIRILMASI

Yasemin Bulut¹, Yaşar Şen², Ahmet Gödekmerdan³, Şükran Özdiller², Zülal Aşçı Toraman¹

¹Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Elazığ.

²Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Çocuk Hastalıkları AD, Elazığ.

³Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji AD, Elazığ.

Akut alt solunum yolu infeksiyonu (ASYİ) olan bebeklerde, bu bölgeden aspirasyonla örnek elde etmek hastaya acı verir ve risklidir. Ayrıca, örnek almak için ekipmana ve yetişmiş personele de ihtiyaç vardır. Solunum viruslarının patogenezinin dolayısı, alt solunum sistemi viral infeksiyonlarında, özellikle akut olgularda, nazal örneklerle teşhise gidilmesi alternatif bir yaklaşım olarak değerlendirilebilir. Bu çalışmanın amacı, ASYİ olan bebeklerin nazal akıntı örneklerinde solunum viruslarının varlığının belirlenmesidir.

Çalışmada, ASYİ olan 45 bebekten alınan nazal akıntı örneklerinde, revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile respiratory syncytial virus (RSV), parainfluenza virus 3 (PIV-3) ve influenza virus A ve B RNA'ları ve PCR ile adenovirus DNA varlığı araştırılmıştır. Ayrıca, bu hastalardan alınan serum örneklerinde virüslara özgül IgM antikorları da çalışılmıştır.

Sonuç olarak, örneklerin 28'inde (%62.2) tek bir virusa ait nükleik asit varlığı saptanmış, 9'unda (%20) ise birden fazla virus genomu tespit edilmiştir. Dolayısıyla, 37 olgunun (%82.2) bu virüslerin en az biriyle enfekte olduğu izlenmiştir. Bebeklerde akut dönemde alınan kan örneklerinin 23'ünde (%51.1) en az bir virusa karşı IgM pozitifliği belirlenmiştir. Serolojik testlerle, 7 bebekte (%15.5) karışık infeksiyon varlığı saptanmıştır. Gerek IgM pozitifliği gerekse viral genom araştırmaları sonunda, bu çocukların en fazla influenza virus B ve RSV ile enfekte oldukları görülmüştür.

Çalışmanın verileri ışığında, akut seyirli alt solunum yolu infeksiyonuna neden olan solunum viruslarının belirlenmesinde, nazal örneklerde amplifikasyon tekniğinin uygulanmasının hızlı, pratik ve duyarlı bir yaklaşım olduğu düşünülmüştür.

IL-10 1082 Promotor Polimorfizmi ve HPV-33 Pozitifliği Arasındaki İlişkilerin Araştırılması

Yasemin BULUT¹, Ebru ETEM², Nusret AKPOLAT³, Halit ELYAS², Fügen YARKIN⁴

¹Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Elazığ.

²Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, Elazığ.

³Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji AD, Elazığ.

⁴Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Adana.

Sitokinler pek çok hastalığın patogeneğinde ve immün cevapta büyük öneme sahiptir. IL-10, immün düzenleyici bir sitokin olup infeksiyon hastalıklarının gelişmesinde önemli rol oynar. Bu çalışmada prostat kanserinde IL-10 gen promotor polimorfizmi ve insan papillomavirus (HPV)-33 gen pozitifliği arasındaki ilişkilerin araştırılması amaçlanmıştır.

Yirmi prostat kanseri (PK), 22 prostatik intraepitelial neoplazi (PIN) ve 21 benign prostatik hiperplazi (BPH) olmak üzere çalışmaya toplam 63 hasta dahil edilmiştir. BPH'lar kontrol olarak kabul edilmiştir. IL-10 1082 polimorfizminin belirlenmesinde "Amplifikasyon Refractory Mutation System" (ARMS) kullanılmıştır. HPV-33 pozitifliğini ve IL-10 1082 polimorfizmini araştırmak için yapılan "nested" polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve ARMS yöntemlerinde gerekli olan DNA'lar, bu hastalara ait parafin bloklardan alınan kesitlerden proteinaz K enzimi ve klasik fenol-kloroform ekstraksiyonu ile elde edilmiştir. HPV-33 için viral DNA'ları belirlemede birinci PCR'da universal primerler kullanılırken, ikinci PCR HPV-33'e özgül primerlerle gerçekleştirilmiştir.

PK olgularının 8'inde (%40), PIN olgularının 6'sında (%27.3) ve BPH olgularının 3'ünde (%14.3) olmak üzere toplam 63 örneğin 17'sinde (% 26.9) HPV-33 pozitifliği tespit edilmiştir. IL10 1082 "wild" 2 örnekte, heterozigotlarda 5 örnekte ve polimorfizm için homozigotlarda 10 örnekte HPV-33 pozitifliği belirlenmiştir.

IL10 1082 gen polimorfizmi açısından PIN, PK ve BPH arasında anlamlı ilişki bulunmazken ($p>0.05$), HPV-33 pozitifliği ve IL-10 1082 A aleli arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p<0.05$). IL-10 G aleli, genin yüksek ekspresyon düzeyi ile, A aleli ise orta ve düşük ekspresyon düzeyi ile beraberlik göstermektedir. Bu da immün cevapta yetersizliğe yol açmaktadır. PIN ve PK oluşumunda A aleli ve HPV-33 birlikteliğinin hastalığın etiolojisinde rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Hepatit B Virus DNA Kantitasyonunda Cobas AmpliPrep/TaqMan HBV DNA Testinin Değerlendirilmesi

Eylem Karataş, Tuba Karataş, Selda Erensoy

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

Bu çalışmada, hepatit B hastalarının yönetiminde anlamlı olan HBV DNA miktarının belirlenmesi için geliştirilmiş tam otomatik nükleik asit eldesi ve ardından gerçek zamanlı PCR temelli Cobas AmpliPrep/TaqMan (CAP/CTM) sisteminin (Roche Molecular Systems, ABD) performansının değerlendirilmesi ve klinik laboratuvarlarda kullanılmakta olan performansı belirlenmiş Versant HBV DNA 3.0 testi (Bayer Diagnostics, ABD) ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Sistemin tekrarlanabilirliğini ve doğrusalığını değerlendirmek için, aynı sistem ile 484.000 kopya/ml ($5.68 \log_{10}$) bulunan bir örneğin 1/10'luk altı sulandırımı beş kez çalışılmıştır. Duyarlılığının sınanması için ise, 1000 kopya/ml olan VQC (Hollanda) referans serumu 1000, 750, 500, 375, 250, 125 ve 62.5 kopya/ml olacak şekilde üçer kez çalışılmıştır. Versant 3.0 ile karşılaştırmak için 56 serum örneği (37'si bDNA dinamik aralık sınırları içinde) çalışmaya alınmış ve tüm değerlerin logaritması alınarak değerlendirme yapılmıştır. CAP/CTM çalışması için 1 ml örnek gerekli olup, EDTA'lı plazma önerilmesine karşın çalışmada serum örnekleri kullanılmıştır (1IU=5.82 k/ml).

Serum sulandırılmasında eğilim kat sayısı (R^2) 0.995, tekrarlar arasında farklar 0.16-0.51 log (CV= %1-7) olarak bulunmuştur. VQC çalışmasında CAP/CTM'in 375 k/ml'ye kadar kantitasyon yaptığı, 62.5 k/ml'yi ise saptadığı görülmüştür. 1000 k/ml'nin altında logaritmik fark 0.17-0.28, $R^2=0.79$ 'dur. Versant 3.0 ile <2000 k/ml olan 5 örneğe (5/17) CAP/CTM değer vermiş; iki sisteme ait sonuçlar arasındaki fark 0.01-1 \log_{10} k/ml (ortanca 0.34) R^2 0.93; CV %0.1-%19 olarak hesaplanmıştır.

Sonuç olarak, tam otomatize CAP/CTM sistemi çalışma grubunda güvenilir ve yoğun klinik laboratuvarlar için uygun bulunmuştur. Ancak klinik çalışma sonuçları ile rutin kullanımdaki güvenilirliği ve duyarlılığın klinik anlamı kanıtlanmalıdır. Versant 3.0 sistemi ile sonuçların uyumlu olmasına rağmen, aynı hastanın izleminde sonuçların birbirine çevrilmesi henüz uygun değildir.

HBV DNA Kantitasyonunda b-DNA ile Gerçek Zamanlı PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Selma Gökahmetoğlu, Esmâ Saatçi Deniz, Yusuf Özbal, M. Altay Atalay

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

HBV DNA belirlenmesi için çeşitli moleküler yöntemler uygulanmaktadır. Farklı sistemlerden elde edilen sonuçların değerlendirilmesi için karşılaştırmalı çalışmalar yapılmalıdır. Bu çalışmada, HBV DNA kantitasyonunda b-DNA yöntemi (HBV DNA versant 3.0, Bayer) ile gerçek zamanlı PCR yönteminin (Iqcyclus, Biorad) karşılaştırılması amaçlanmıştır.

HBV DNA toplam 223 serum örneğinde her iki yöntemle de araştırılmıştır. b-DNA yöntemi kit prosedürüne uygun olarak çalışılmıştır. Gerçek zamanlı PCR yönteminde, örneklerden DNA izolasyonu "QIAamp MinElute Kit"i ile (Qiagen), amplifikasyon işlemi de "Flurion HBV QNP" (İontek) kiti kullanılarak hazırlanan PCR karışımı içinde Iqcyclus cihazında yapılmıştır. b-DNA yönteminin dinamik aralığı $2 \times 10^3 - 10^8$ kopya/mL, gerçek zamanlı PCR yönteminin dinamik aralığı ise $10^3 - 10^7$ kopya/mL'dir. Gerçek zamanlı PCR ve bDNA yöntemleri ile sırasıyla; 200 kopya/mL ve 2000 kopya/mL altında olan sonuçlar negatif olarak kabul edilmiştir. İstatistiksel analiz için Pearson korelasyon testi uygulanmıştır.

HBV DNA 67 örnekte her iki yöntemle de negatif bulunmuştur. b-DNA yöntemi ile HBV-DNA negatif olan 56 örneğin gerçek zamanlı PCR yöntemi ile 28'i 1000 kopya/mL altında; 7'si 1000-2000 kopya/mL arasında; 21'i ise 2000 kopya/mL üzerinde saptanmıştır. b-DNA yöntemi ile HBV-DNA miktarı 2000 kopya/mL üzerinde bulunan 9 örneğin; gerçek zamanlı PCR yöntemi ile 2'sinin 1000 kopya/mL altında, 7'sinin ise 200 kopya/mL altında olduğu belirlenmiştir. b-DNA yöntemi ile HBV DNA miktarı 10^8 kopya/mL üzerinde bulunan 17 örneğin 16'sı gerçek zamanlı PCR ile 10^7 kopya/mL üzerinde; biri ise 10^6 kopya /mL olarak belirlenmiştir. Her iki yöntemle kantitatif sonuç alınan 74 örneğin değerleri karşılaştırıldığında, sonuçların birbirleri ile uyumlu olduğu görülmüştür (Pearson korelasyon katsayısı = 0.859, $p < 0.001$).

Türk Hastalarda İnsan Papillomavirus Tip 16'nın L1 ve LCR Bölgelerinin DNA Dizisi ve Filogenetik Analizi

Gülendam Bozdayı¹, Bora Doğan¹, Serdar Tuncer², A.Reşat Türkyılmaz³, Aydan Biri⁵, Yusuf Kemaloğlu⁴, Seyyal Rota¹

¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Ankara.

²Metis Bioteknoloji Ltd, Ankara.

³Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hepatoloji Enstitüsü, Ankara.

⁴Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz AD, Ankara.

⁵Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları AD, Ankara.

Bu çalışmada, farklı dokulardan izole edilen insan papillomavirus (HPV) tip16 genomunda yer alan L1 ve LCR bölgelerinin DNA dizisi incelemesi, filogenetik analizlerinin yapılarak ülkemize ait verilerin dünya verileri ile karşılaştırılması ve farklı patolojilerin etiyojisinde rol oynayan HPV 16 dağılımlarının saptanması amaçlanmıştır.

Çalışmaya, HPV tip 16 pozitif bulunan 15 servikal sürüntü örneği ile 17 larenks kanserli hastanın biyopsi örneği dahil edilmiştir. Örneklerden HPV DNA, ekstraksiyon kiti (Qiagen, DNA mini kit, Germany) kullanılarak elde edilmiştir. Amplifikasyon ile L1 bölgesi ve LCR bölgesi çoğaltılmıştır. "Nested" gerçek zamanlı PCR, HPV 16 DNA'sına özgül prob ile Light Cycler (Roche Diagnostics, Germany) cihazında çalışılmıştır. HPV tip 16 pozitif bulunan örneklerin DNA dizisi analizi yapılmıştır (Visible Genetics, Canada). GenBANK/EMBL/DDBJ bilgi bankalarında bulunan ana HPV genotiplerini temsil eden L1 ve LCR dizileri, bu çalışmada elde edilen 32 HPV DNA dizisi L1 ve LCR dizileri ile karşılaştırılmıştır. Filogenetik karşılaştırma, <http://www.megasoftware.net> adresinden indirilen MEGA3 paket programı ile "Kimura 2-düzeltilmesi" kullanılarak "distance matrix/UPGMA analizi ("bootstrapping 1000" replikat sonrası) ile yapılmıştır.

HPV DNA dizileri L1 bölgesi için Afrika ve Amerika izolatlarından ayrı ve iki adet Avrupa dizisinin bulunduğu grupta kümeleşme göstermiş, ancak hem larenks kanserli hastalardan izole edilen hem de servikal sürüntüden izole edilen HPV dağılımında anlamlı bir kümeleşme bulunamamıştır. Bununla beraber, HPV LCR bölgesinin filogenetik çözümü sonucunda, Türk hastalarda izole edilen HPV'ler Afrika, Amerika ve Avrupa dizilerinden farklı 2 grupta anlamlı bir şekilde kümeleşmiş, daha da önemlisi 15 servikal sürüntüden izole edilen HPV'nin 12'si sadece bir grupta kümelenmiştir.

Türk hastalardan elde edilen HPV'lerin, gen bankasından alınan dünyadaki diğer coğrafik bölgelere ait gen dizilerinden farklı bir grupta kümeleştiği gösterilmiştir. HPV tip 16'nın farklı alt genotiplerinin farklı doku infeksiyonlarına ve patolojilere neden olabileceği bu çalışmada gösterilmektedir.

Hepatit C Virus Genotiplerinin Inno-Lipa ve Sekans Analizi İle Belirlenmesi

Mustafa Altındış, Orhan Cem Aktepe, Zafer Çetinkaya, İhsan Hakkı Çiftçi

Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Afyonkarahisar.

Filogenetik analizler, hepatit C virus (HCV)'un 6 genotip ve 80'den fazla alttipinin olduğunu göstermektedir. Bir toplumdaki HCV genotiplerinin nispi sıklığı durağan olmayıp, çalışılan grup, infeksiyonun kazanıldığı yaş ve bulaş yollarına göre değişebilmektedir. Kronikleşme süreci ve tedaviye dirençte farklılıklar oluşturan genotiplerin tedaviye başlanmadan önce belirlenmesi klasik protokollere girmiştir. Bu çalışmada farklı kliniklerde belirlenen HCV pozitif olguların genotiplerinin, bir "line probe" yöntemi olan Inno-Lipa (INNO-LiPA HCV II, Innogenetics, BE) ve referans yöntem olan sekans analiz yöntemi (9700 Sequence Detection System, AB ve AB 310) ile araştırılması amaçlanmıştır.

Donörlerden (n: 5), hemodiyaliz hastalarından (n: 15), hastane personelinden (n: 1) ve kronik hepatit C'li olgulardan (n: 9) alınan toplam 30 HCV RNA pozitif serumda,, HCV genotipleri, protokollere uygun olarak Inno-Lipa ve sekans analizi yöntemleri ile araştırılmıştır. Inno-Lipa için HCV RNA'nın 5'non-coding bölgesi hedeflenerek RT PCR'da çoğaltılmış ve "line prob"ları ile genotiplendirilmiştir. Sekans inceleme sisteminde ise, NS5B bölgesi PCR protokolleri ile amplifiye edilerek "Cycle Sequencing" ile genotipik varyasyonlar değerlendirilmiştir. Inno-Lipa ile 3 farklı genotip saptanırken (1b %93; 1a %3.3 ve karışık tip %3.3); sekans ile bunların 29'u 1b (%26.7), biri ise (%3.3) 1a olarak belirlenmiştir. Yaş, cins, tranfüzyon öyküsü ve diyalize girme gibi değişkenlerin HCV genotip dağılımıyla istatistiksel bir ilişkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak, HCV genotiplemede her iki yöntemin de koşullara göre uygun olabileceği kanısına varılmıştır.

Ülkemizde Tanımlanmış İlk “Vaccine Escape” Mutasyon Olgusu

Tufan Kutlu¹, Lebriz Yüksel Soycan², Ersin Karataylı³, Ahmet Reşat Türkyılmaz³, Cihan Yurdaydın³, A.Mithat Bozdayı³

¹İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Çocuk Hastalıkları AD, İstanbul.

²Haliç Üniversitesi, İstanbul.

³Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji BD, Hepatoloji Enstitüsü, Ankara.

Hepatit B virus infeksiyonlarının önlenmesinde en önemli strateji yeni doğanların aşılmasıdır. Ülkemizde HBV aşısı ancak 1990’lı yılların sonunda Ulusal Aşı Programı’na alınmıştır. Toplumsal aşılama etkinliklerin önemli ve bilinen bir sonucu da “vaccine escape” mutasyonların ortaya çıkması ve aşılamaya rağmen bu kişilerin HBV ile infekte olabilmesidir. Bununla beraber, Ulusal Aşı Programı’nda kullanılan aşilar ile yapılan aşılama sonucunda ülkemizde ne kadar ve hangi “vaccine escape” mutasyon ve HBV infeksiyonu geliştiği bilinmemektedir. Bu çalışmada aşılmasına rağmen “vaccine escape” mutasyon gelişimine bağlı olarak kronik B hepatiti olan bir olguda elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

Hasta, 7 yaşında bir erkek çocuktur. Yenidoğan döneminde 3 doz aşı ile aşılanmış ve 3.5 yaşında ALL tanısı almıştır. Yapılan tetkiklerde HBsAg negatif, anti-HBs pozitif bulunmuştur. İndüksiyon ve konsolidasyon gibi yoğun yatarak yapılan tedavilerin sonunda da antijen negatif iken, ilk olarak idame tedavisi alırken, yapılan kontroller sırasında HBsAg pozitif, (anti-HBs:146 IU) olarak saptanmıştır. Ayrıca, HbeAg pozitif, anti-HBc negatif, HBV-DNA 229 pg olarak belirlenmiştir. Hastanın kemoterapisi tamamlandığında, karaciğer biyopsisi yapılmış ve anti-HBV tedaviye alınmıştır. Hastanın antiviral tedavi öncesinde alınan serumunda tüm HBV genomu PCR ile çoğaltılmış ve bir TA vektörüne klonlanmıştır. Altı adet klonda yapılan yüzey geni DNA dizi analizi sonucunda, hastada yüzey geni “a” epitopunda P142S VE G145A mutasyonları saptanmıştır.

Bizim bilgilerimize göre bu olgu, ülkemizde ilk kez dökümente edilen “vaccine escape” mutasyon olgusudur. Hastada tanımlanan mutasyon paterninin literatürde en sık karşılaşılan patern olduğu görülmüştür.

Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Yönteminin BK Virus İnfeksiyonlarının Tanısında Kullanımı

Derya Mutlu¹, Dilek Çolak¹, Uğur Yavuzer², Murat Tuncer³, Sema Akman⁴, Bahar Akkaya⁵, Hüseyin Koçak³, Hadiye Demirbakan¹, Ayfer Gür Güven⁴, Gülten Karpuzoğlu⁵, Meral Gültekin¹

¹ Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Antalya.

² Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD, Antalya.

³ Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Nefroloji BD, Antalya.

⁴ Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Nefroloji AD, Antalya.

⁵ Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji AD, Antalya.

Bu çalışmada, gerçek zamanlı PCR yönteminin renal transplantasyon sonrasında gelişebilen, kronik seyirli ve ilerleyici nitelikteki BK virus nefritinin tanısında kullanılması amaçlanmıştır.

Renal transplantasyon yapılan ve BK virus nefriti şüphesi bulunan üç hasta çalışmaya dahil edilmiş ve hastaların idrar ve plazma örneklerinde BK virus DNA'sı gerçek zamanlı PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Viral nükleik asit ekstraksiyon kiti (High pure viral nucleic acid kit, Roche Mannheim, Germany) kullanılarak, hastalardan eş zamanlı alınan plazma ve idrar örneklerinden DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı amplifikasyon işlemi Rotor-Gene (Corbett-Research, Australia) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Amplifikasyon sırasında pBR322 plazmidi içerisine klonlanan Dunlop suşunun tüm dizisini içeren pBKV (ATCC 45025) ile, UV spektrofotometre kullanılarak onar katlık değişen konsantrasyonlarda plazmid içeren beş standart hazırlanmıştır. Virusun VP-1 bölgesi içerisindeki 83 baz çiftlik alan amplifiye edilmiştir. Hedef bölgeye ait sinyal deteksiyonu 5' ve 3' uçları sırasıyla FAM ve TAMRA işaretli Taq-man probu kullanılarak yapılmıştır. PCR inhibitörü varlığı, G6PDH geni içerisinde yer alan bölgenin amplifikasyonu ve amplifiye edilen bölgenin 5' ve 3' uçları sırasıyla BHQ3 ve Cy5 işaretli Taq-Man probuyla deteksiyonu ile test edilmiştir. İdrar örnekleri aynı zamanda Decoy hücrelerinin varlığının araştırılması amacı ile sitosantrifüj edildikten sonra Papanicolau boyasıyla boyanıp ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir.

İdrar örneklerinin tamamında Decoy hücrelerine rastlanmıştır. BK virus DNA'sı iki hastanın idrar örneklerinde sırasıyla 3.9×10^8 kopya/mL ve 1.4×10^9 kopya/mL, plazma örneklerinde sırasıyla 1.6×10^5 kopya/mL ve 1.1×10^4 kopya/mL düzeylerinde saptanmıştır. BK virus ilişkili nefrit için önerilen eşik değerlerin üzerinde olan viral yük düzeylerinin saptandığı bu iki hastanın böbrek biyopsi örneklerinde de BK virus nefropatisi ile uyumlu bulgular elde edilmiştir. Diğer hastanın idrar ve plazma örneklerinde sırasıyla 9.6×10^5 kopya/mL ve 3×10^3 kopya/mL değerleri bulunmuştur.

Organ nakli yapılan merkezlerde renal transplantasyon alıcılarında giderek önemi artan BK virus infeksiyonlarına yönelik tanı testlerinin geliştirilip, tanı ve taramaya yönelik bir algoritmanın oluşturulması gereklidir. Bundan sonraki aşamada Türkiye'ye ait BK virus izolatlarının sekans çeşitliliğinin ortaya konması, kantitasyon sonuçlarına güvenilirliği artıracak bir faktör olacaktır.

PÇV-17

Hematolojik Malignitesi, Solid Tümörü Olan veya Kök Hücre Transplantasyonu Yapılan Pediatrik Hastalarda Parvovirus B19 İnfeksiyonlarının Prospektif İzlemi: Ön Çalışma

Derya Mutlu¹, Alphan Küpesiz², Dilek Çolak¹, Volkan Hazar², Gözde Öngüt¹, Gülsün Tezcan², Gül Aydın¹, Akif Yeşilipek², Meral Gültekin¹

¹ Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

² Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Hematoloji Onkoloji Anabilim Dalı, Antalya.

Erişkin ve pediatrik yaş grubunda hematolojik malignitesi, solid tümörü olan veya kök hücre transplantasyonu (KHT) yapılan birçok bireyde kronik Parvovirus B19 enfeksiyonu tanımlanmıştır. Bu hasta grubunda kemoterapi sırasındaki enfeksiyonlar, lökopenik relapsları ya da tedavi ile indüklenen sitopenileri taklit edebileceğinden tanı karışıklıklarına, gereksiz kan transfüzyonlarına veya tedavinin gereksiz yere kesilmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle bu hasta grubunda Parvovirus B19 enfeksiyonlarının hızlı tanı ve tedavisi çok önemlidir. Bu çalışmada; Parvovirus B19 enfeksiyonları açısından serolojik yöntemler ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile bir yıllık izleme alınan hematolojik malignitesi, solid tümörü olan ya da KHT yapılan pediatrik yaş grubundaki hastaların ilk altı aylık sonuçlarının sunulması amaçlanmıştır.

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Onkoloji Bilim Dalı tarafından takip edilmekte olan lösemi, solid tümör tanısı alan ya da KHT yapılan 28 hastadan aylık periyodlarla plazma örnekleri alınmıştır. Bu hastalara ait toplam 107 plazma örneğinde Parvovirus B19 IgM (Novum Diagnostica, Dietzenbach, Germany) ve IgG (Focus Diagnostics, California, USA) antikoru mikroyELISA ile; Parvovirus B19 DNA'sı ise hem ticari (Light-cycler, Roche, Mannheim, Germany) hem de "in-house" PCR yöntemleri ile araştırılmıştır.

Yirmisekiz hastanın 16'sında (%57.1) sadece Parvovirus B19 IgG, bir hastada sadece Parvovirus B19 IgM (%3.6), bir hastada da Parvovirus B19 IgG ve IgM birlikte bulunmuştur. Hastaların farklı zamanlarda yapılan IgG testlerinde farklı sonuçlar elde edilmiştir. Beş hastanın ilk örneklerinde ticari kit ile çalışılan PCR yöntemi ile Parvovirus B19 DNA'sı 250-1124 kopya/mL arasında değişen düzeylerde pozitif saptanırken, "in-house" PCR metoduyla bu örnekler negatif bulunmuştur. Bu hastaların takip eden dönemlerde alınan örneklerinde ne ticari kit ile ne de "in-house" PCR yöntemi ile Parvovirus B19 DNA'sı saptanmamıştır. PCR ile pozitiflik saptanan dört hastanın laboratuvar değerlerinde ve klinik bulgularında Parvovirus B19 enfeksiyonunu düşündüren bulguya rastlanmazken, Parvovirus B19 DNA düzeyi 1124 kopya/mL olan hastanın hemoglobin ve hematokrit düzeylerinde belirgin düşme saptanmış ve bu dönemde hastanın ateşli olduğu kaydedilmiştir.

Sonuç olarak, malignitesi olan veya KHT yapılan hastalarda, Parvovirus B19 enfeksiyonlarının tanısında serolojik yöntemler yetersiz kalmaktadır. Bu hastaların Parvovirus B19 enfeksiyonu açısından izleminde kantitatif ve duyarlılık düzeyi yüksek moleküler yöntemler tercih edilmelidir.

Hepatit C'li Hastalarda Viral Yük ile Malondialdehid ve Antioksidan Enzimlerin İlişkisi

Selçuk Kaya

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Isparta.

Bu çalışmada hepatit C virus (HCV) ile infekte hastalarda, virus yükü ile antioksidan enzimler ve lipoperoksidasyon (LPO) ürünü olan malondialdehid (MDA) seviyeleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya; HCV infeksiyonuna yönelik tedavi almamış anti-HCV (Axsym, Abbott Laboratories, USA) ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GeneAmp 7700 Sequence Detector System, Perkin Elmer) ile HCV RNA'sı pozitif 50 kişi ile kontrol grubu olarak sağlıklı ve gönüllü 40 kişi dahil edilmiştir. Çalışma grubu ayrıca HCV RNA kopya sayısına göre, 10^3 kopya/ml'den az olanlar (n=12) grup 1; $1-9.9 \times 10^3$ kopya/ml (n=6) olanlar grup 2; $1-9.9 \times 10^4$ kopya/ml (n=8) olanlar grup 3 ve 10^5 ve üzeri kopya/ml sayısı olanlar (n=24) grup 4 şeklinde 4 alt gruba ayrılmıştır.

Bütün hastaların eritrosit katalaz, superoksid dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GP) aktiviteleri ile serum MDA seviyeleri araştırılmıştır. Katalaz Aebi metodu; SOD Woolliams ve arkadaşlarının metodu; GP Paglia ve Valentine'nin metodu ve MDA Draper ve Hadley'in tiyobarbitürik asit reaktivitesi metodu kullanarak ölçülmüştür. İstatistiksel değerlendirme, Kruskal Wallis, Mann Whitney U, t test yöntemleri ile yapılmış ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

HCV ile infekte hasta grubunda, kontrol grubuna göre SOD ve GP düzeylerinde azalma, katalaz ve MDA düzeylerinde artış tespit edilmiş; bu değişiklikler katalaz hariç, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bununla birlikte, viral yüklerine göre alt gruplar değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Sonuç olarak bulgularımız, viral yük ile antioksidan savunma sistemi ve LPO ürünü olan MDA arasında bir ilişki bulunmamasına rağmen, HCV infeksiyonlu hastalarda antioksidan enzim aktivitelerinde düşüklük ile oksidatif stresin göstergesi olan MDA seviyelerinde anlamlı bir artışın olduğunu göstermiştir.

Hepatit B Virus (HBV) Serolojisinde Salt Anti-HBc Pozitifliğinin Okült HBV İnfeksiyonu Yönünden Önemi

Aslı Gamze Şener¹, İlhan Afşar¹, Sevin Kırdar², Nükhet Kurultay¹

¹Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir.

²Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Aydın.

Okült hepatit B virus (HBV) infeksiyonu, HBsAg negatifliği ile seyreden HBV infeksiyonudur. Bu olgular, HBV'nin bulaşma potansiyeli yanı sıra, hepatokarsinom gelişme riski ve kronik hepatit C infeksiyonunun ilerlemesi ile tedaviye yanıtını etkileyebilmesi yönünden de önemlidir. Bu hastaların çoğunda anti-HBs ve/veya anti-HBc pozitifdir. HCV infeksiyonuyla okült HBV infeksiyonunun birlikte bulunduğu olgularda, kronik HCV infeksiyonunun seyri değişmektedir. Bu amaçla çalışmamızda, laboratuvarımıza kabul edilen 240 hasta serumu salt anti-HBc pozitifliği ve viral genom yükü yönünden retrospektif olarak incelenmiştir.

HBV DNA ve HCV RNA, RoboGene® Quantification kit (Roboscreen, Germany) ile ekstraksiyonu yapıldıktan sonra gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi, ABI prism 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) ile çalışılmıştır. Kullanılan moleküler yöntemde HBV DNA ve HCV RNA, QCMD 2005 kalite kontrol programı tarafından denetlenmiştir. Serolojik göstergeler ise, VITROS (Orthoclinical Diagnostics) kemilüminesan immunassay yöntemi ile belirlenmiştir.

Hastalardan 11'i (%4.6); HBsAg, anti-HBs, HBeAg ve anti-HBe negatif iken yalnız anti-HBc pozitif olarak bulunmuştur. Bu hastalardan 9'u (%81.8) erkek, 2'si (%18.2) kadındır. HBV DNA düzeyi, 11 hastanın 8'inde (%72.7) 10^3 genom/ml, birinde (%9.1) 10^4 genom/ml iken, 2 hastada (%18.2) viral genom saptanmamıştır. HBV DNA düzeyi 10^3 genom/ml olan 8 hastanın 2'sinde (%25) HCV RNA 10^4 genom/ml olarak belirlenmiştir. İncelenen 11 hastadan 7'sinin gastroenteroloji polikliniğine başvurdukları ve transaminaz yüksekliği (62-71 U/L) nedeniyle araştırıldığı, 2 hastanın acilde, 2 hastanın da nöroloji servisinde yatarak tedavi gören hastalar olduğu saptanmıştır. Geniş hasta grupları ile yapılmış çalışmalara gerek duyulmakla birlikte çalışmamızda, yalnız anti-HBc pozitifliği bulunan hastalarda diğer biyokimyasal göstergelerle birlikte HBV DNA ve HCV RNA'nın da belirlenmesinin gerekebileceği vurgulanmıştır. Salt anti-HBc pozitifliği, yalancı pozitiflik olabileceği gibi HBV infeksiyonu veya HCV infeksiyonu ile birlikte okült HBV infeksiyonunu gösterebilir.

Sonuç olarak salt anti-HBc pozitifliği ile birlikteliği görülebilen okült HBV infeksiyonu varlığı akılda tutulmalıdır. Bulaştırıcılık yönünden bölgemizde bir halk sağlığı sorunu olarak bu olguların tanımlanmasına yönelik ileri çalışmalara gereksinim vardır.

**Kronik Hepatit C Tedavisine Yanıtı Belirlemede TNF-Alfa (308, 238) ve
IL-10 (-1082, -627) Gen Polimorfizminin Rolü**

*Burcu Aksoy¹, Cihan Yurdaydın², Filiz Emir², Ramazan Idilman², Özden Uzunalımoğlu²,
Hakan Bozkaya², A.Mithat Bozdayı²*

¹Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.

²Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü, Ankara Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji BD, Ankara.

Hepatit C enfeksiyonu seyrinde, doğuştan ve edinsel immün sistem başlıca belirleyicidir. Kronik hepatit C'de standart tedavi olan interferon + ribavirin kombinasyon tedavisine cevabı belirleyen ilaç dışı unsurlar, virusa (genotip) ve konakçıya aittir. Bu anlamda, konakçıya ait doğuştan immün sistemin genetik temeli önemli olabilir. Kronik C hepatit'li hastalarda konağa ait genetik faktörlerden çeşitli sitokinlere ait gen polimorfizmleri araştırılması yürütülmektedir. Bu çalışmada, tümör nekrozis faktör-alfa (TNF) ve interlökin-10 (IL-10) ile ilgili ön sonuçlar sunulmaktadır.

Çalışmaya, toplam 60 adet (33 erkek, 27 kadın; ortalama yaş: 54 yıl) pegli veya pegsiz interferon-ribavirin kombinasyon tedavisi görmüş ve tedavi sonu takipleri olan hasta alınmıştır. Hastalardan 31'inde (14 kadın, ortalama yaş: 51 yıl) kalıcı cevap varken, 29'unda (13 kadın, ortalama yaş: 56 yıl) kalıcı cevap yoktur. TNF için 308 ve 238, IL-10 için -1082 ve -627 pozisyonlarındaki gen polimorfizmleri PCR-RFLP yöntemi ile çalışılmıştır. TNF-308, TNF-238, IL-10-1082, IL-10-627 bölgelerinde, tedaviye cevap veren 31 hastanın sırasıyla 29'unda, 27'sinde, 28'inde ve 29'unda ilgili bölgeler amplifiye edilmiştir. Aynı bölgeler için tedaviye cevap vermeyen 29 hastanın sırasıyla 28'inde, 28'inde, 27'sinde ve 28'inde sonuca ulaşılmıştır.

Düşük TNF salınımı ile birlikte olan -308 GG genotipi tedaviye cevap veren ve vermeyen hastaların sırasıyla 24'ünde (%82) ve 22'sinde (%76) saptanmıştır. Yine düşük IL-10 salınımı ile birlikte olan -1082AA ve -627AA genotipleri tedaviye cevap veren ve vermeyenlerde sırasıyla 11 (%39)-15 (%54) ve 6 (%21)-1 (%3) olarak bulunmuştur (tüm veriler için gruplar arası p>0.05). Sekresyon paterni tarif edilmemiş TNF-238 lokalizasyonuna ait genotiplerde de tedavi cevabına göre bir farklılık saptanmamıştır.

Bu ön sonuçlar, en azından incelenen bölgeler itibariyle, TNF ve IL-10 gen polimorfizminin kronik hepatit C tedavisine cevabı belirlemede rolünü desteklememektedir, ancak hasta sayısının azlığı göz önünde tutulmalıdır.

Lamivudin Tedavisi Sırasında Gelişen ve Adefovir Dipivoxil Tedavisine Çapraz Direnç Gösteren Yeni Bir Mutasyon Paterni

Ersin Karataylı, Selim Karayalçın, Handan Kayhan, A. Reşat Türkyılmaz, Cihan Yurdaydın, A. Mithat Bozdayı

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji BD, Hepatoloji Enstitüsü, Ankara.

Yeni nükleozid analoglarının geliştirilmesi ile ilaç direncinin kontrolü ve önlenmesi HBV infeksiyonlarının antiviral tedavisinde en önemli sorunsallardan biri olarak ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada, kronik B hepatitli bir hastada lamivudin tedavisi altında gelişen bir mutasyon paterninin, hastanın adefovir dipivoxil ile tedavisinde primer yanıtızlığa neden olduğu gösterilmiştir.

Hasta, HBeAg pozitif, anti-HBe negatif, 44 yaşında erkek hastadır. Hasta, 1999 yılında yapılan karaciğer biyopsisinde HAI:6 olarak saptanmış ve 9 ay, 9MU/TIW IFN tedavisi almış, yanıtız olduğundan, lamivudin 100 mg/g monoterapi ile devam edilmiştir. Lamivudin tedavisi süresince ALT normal düzeylerine düşmüş ve HBV replikasyonunda inhibisyon sağlanmıştır. Tedavinin 19. ayında klinik fenotipik direnç saptanmıştır. Adefovir dipivoxil, 10 mg/g, lamivudin tedavisine antiviral tedavinin 44. ayında eklenmiştir. Adefovir, 14 aydan fazla kullanılmasına rağmen ALT normalizasyonu ve HBV viral yükünde herhangi bir azalmaya neden olmamıştır. Bu dönemler içinde elde olan serum örneklerinden HBV *pol* bölgesi PCR ile çoğaltılmış ve bir TA vektörüne klonlanarak her bir örnekten 8-10 klonun DNA dizi analizi yapılmıştır. Yabancı tip ve A181X+M204I mutasyonunu taşıyan HBV tüm genomu, bir ekspresyon vektörüne klonlanmış ve Huh7 hücrelerine transfeksiyonundan sonra adefovir dipivoksil ve lamivudinle *in vitro* fenotipleme analizi yapılmıştır.

Hastada, lamivudin tedavisi altında fenotipik direnç geliştirdiği 19.ayda A181X+M204I ve L180M+M204S paternleri saptanmıştır. Daha sonraki değerlendirmelerde A181X+M204I ve doğal tip sekansları saptanmıştır. Bu patern, adefovir tedavisi altında da devam etmiştir. Yabancı tip HBV genomu *in vitro*'da lamivudin ve adefovir ile tamamen baskılanırken, A181X+M204I mutasyon paternini taşıyan HBV tüm genomunun, sırasıyla 4.53 ± 0.63 ve 5.51 ± 0.32 HBV DNA'nın ortalama log kopya sayıları ile adefovir ve lamivudine dirençli olduğu gösterilmiştir.

Lamivudin tedavisi sırasında gelişen A181X+M204I mutasyon paterninin adefovir tedavisine çapraz direnç göstererek primer yanıtızlık oluşturduğu *in vitro* fenotipleme çalışmasıyla gösterilmiştir.

HCV RNA Kantitasyonunda Versant HCV RNA 3.0 (bDNA) Testinin Performansının Değerlendirilmesi: Ön Çalışma

Imre Altuđlu¹, Pınar Şamlıođlu¹, Hatice Şahin², Selda Erensoy¹

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, İzmir.

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Eğitimi AD, İzmir,

Kronik C hepatitli hastaların tedavi takibinde HCV RNA yükünün saptanması önemlidir. HCV kantitasyonu için farklı yöntemler bulunmaktadır. Bu çalışmada Versant HCV RNA 3.0 (bDNA) testinin (Bayer HealthCare, ABD) performansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Laboratuvarımıza HCV yükünün belirlenmesi için gönderilen ve COBAS Amplicor HCV Monitor v 2.0 (Roche Molecular systems, ABD) testi ile çalışılmış 23 hasta örneği ve kantitasyonu bilinen 11 adet kalite kontrol serum örneği çalışmaya alınmıştır. Versant HCV RNA testinin tekrarlanabilirliğinin değerlendirilmesi amacıyla, 10 hasta örneği ile 10 kalite kontrol örneği farklı testlerde ve bir hasta örneği ile bir kalite kontrol serum örneği de aynı testte tekrarlanmıştır.

COBAS Amplicor ile 21 hasta örneği pozitif, iki hasta örneği negatif olarak bulunurken, Versant HCV RNA testinde 20 örnek pozitif, üç örnek de alt sınır olarak kabul edilen 3.200 kopya/ml'nin altında saptanmıştır. Değerleri 3.800 ile 3.800.000 kopya/ml arasında değişen kalite kontrol serum örneklerinden 3.800 kopya/ml olanların sonuç değerleri, Versant HCV RNA testi ile 3.200 kopyanın altında bulunmuştur. COBAS Amplicor ve bDNA testindeki değerler karşılaştırıldığında, logaritmik farkın 0 ile 1.3 (median 0.3, ortalama 0.44) arasında değiştii gözlenmiştir. Aynı örnekler için iki farklı Versant HCV RNA çalışması arasındaki logaritmik farkın 0 ile 0.5 (median 0.2, ortalama 0.25) arasında olduğu belirlenmiştir.

Bu ön çalışmanın sonuçları, Versant HCV RNA testinin, dinamik aralığı geniş ve tekrarlanabilirliği yüksek bir test olduğunu göstermiştir. Ancak iki test arasındaki logaritmik değişkenlik nedeniyle hasta izleminde farklı testlerden elde edilen sonuçların birbirine dönüştürülmesi uygun değildir.

4. ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

25 – 28 Eylül 2006
SHERATON OTEL & CONVENTION CENTER
ANKARA

27 NİSAN 2006 PERŞEMBE POSTER SUNUMLARI - BAKTERİ, PARAZİT, MANTAR—

**İmmün Yetmezlikli Bir Hastada Yaygın
Mycobacterium bovis BCG İnfeksiyonunun Laboratuvar Tanısı**

Cengiz Çavuşoğlu¹, Pınar Akıncı¹, Ilknur Söyler¹, Nuri Bayram², Fadıl Vardar²

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir.

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Bornova, İzmir.

Mycobacterium tuberculosis kompleks üyesi mikobakterilerden biri olan *Mycobacterium bovis* BCG, *M.bovis*'in 13 yıl boyunca 230 kez pasajlanmasıyla elde edilmiştir. *M.bovis* BCG dünyanın birçok ülkesinde ve Türkiye'de BCG aşısı olarak kullanılmaktadır. BCG aşısı sağlıklı bireylerde süpüratif lenfadenit gibi lokal komplikasyonlara neden olurken, immün yetmezlikli hastalarda yaygın enfeksiyonlara yol açabilmektedir.

Üç aylıkken BCG aşısı yapılan 9 aylık bir erkek bebek; makülopapüler döküntü, hepatosplenomegali, aksiller ve servikal bölgede lenfadenomegali yakınmalarıyla başvurmuştur. Olgunun aksiller lenf dokusundan hazırlanan preparatların Kinyoun ve auramine-rhodamine boyamalarında aside dirençli basil görülmüştür. Ayrıca, örnekte TMA yöntemiyle (Gen-Probe MTD) *M.tuberculosis* kompleks RNA'sı saptanmıştır. Örnekten yapılan kültürlerde, 31.5 günlük inkübasyonun ardından MB/BacT (bioMérieux) besiyerinde, 4. haftada ise Löwenstein Jensen (Salubris AŞ, İstanbul) besiyerinde aside dirençli basil üremiştir. Üreyen bakteri PCR-revers hibridizasyon yöntemiyle (GenoType®Mycobacterium CM) *M.tuberculosis* kompleks olarak tanımlanmıştır. Bakterinin 4 ve 7 günlük pirazinamidaz testleri negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu bulgular ışığında *M.bovis* olarak tanımlanan izolatta *M.bovis* ve *M.bovis* BCG ayırımı için PCR-revers hibridizasyon yöntemi (GenoType®MTBC) kullanılmış, test sonunda *M.bovis* BCG'e özgü, karakteristik bant paterni saptanmıştır. Olguda, altta yatan primer hastalığı araştırmak amacıyla yapılan tetkiklerde, homozigot interferon gama reseptör defekti belirlenmiştir.

İmmün sistemin hücresel komponentinin etkilendiği immün yetmezlik olgularında mikobakterilerin yol açtığı yaygın infeksiyonlara karşı duyarlılığın arttığı bilinmektedir. Bu nedenle özellikle BCG aşısının ardından gelişen lokal veya yaygın mikobakteriyel infeksiyonlarda *M.bovis* BCG de etken olarak düşünülmesi ve hastalar immün yetmezlik yönünden araştırılmalıdır.

PBP-2

Hastanemizde İzole Edilen İlk İmipeneme Dirençli *Bacteroides fragilis*: Fenotipik ve Genotipik İrdeleme

Nurver (Toprak) Ülger¹, Cenk Aral², Arzu Ilki¹, Ayşe Özer², Güner Söyletir¹

¹ Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

² Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

Bacteroides fragilis, sıklıkla polimikrobiyal infeksiyonlardan izole edilen önemli bir anaerop patojendir. Pek çok antibiyotiğe direnç gösteren bu bakteri, karbapenemler, metronidazol, kloramfenikol, beta laktam-beta laktamaz inhibitörleri gibi sınırlı sayıda antibiyotiğe duyarlıdır. Özellikle Uzakdoğu ülkeleri başta olmak üzere, metallo-beta-laktamaz oluşturarak karbapenemlere direnç geliştiren suşlar bildirilmektedir. Karbapenemazların üretimi *cfiA* geni tarafından kodlanmakta, genin yüksek düzeyde ekspresyonu hemen önünde yer alan "insertion sequence" (IS) elementleriyle gerçekleşmektedir.

Rutin laboratuvarımızda izole edilen bir *B.fragilis* suşu agar dilüsyon yöntemiyle imipeneme dirençli bulunmuştur. Bu suşta metallo-beta-laktamaz varlığını tespit etmek için EDTA'lı imipenem E-test stripi kullanılmış; imipenem MİK değeri 48 µg/ml iken, EDTA varlığında MİK değeri 8 kattan fazla düşüş göstermiştir. Fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz pozitif olan izolatta, *CfiA-1* ve *CfiA-2* primerleri kullanılarak PCR ile direnç geni varlığı araştırılmış ve pozitif bulunmuştur. İzole edilen DNA örneklerinde *cfiA* geni ve onun 5-"upstream" bölgesinin amplifikasyonu sonrası yapılan dizi analizi sonuçları "NCBI Blast" ile incelendiğinde dizinin *B. fragilis cfiA* geni ile uyumlu olduğu ve IS1187 elementi ile birlikte bulunduğu görülmüştür. Elde edilen dizi analizi sonuçlarından *cfiA* aminoasit dizisi çıkartılmış ve standart *cfiA* aminoasit dizisi ile uyumlu olduğu teyit edilmiştir.

Sonuç olarak *cfi A* geninin hemen yanında bir mobil gen olan IS elementinin bulunması direnç geninin başka bakterilere geçebilme özelliğini göstermektedir. Bu bilgiler, gelecekte imipeneme dirençli *B.fragilis*'in sayısında artış olasılığını ve antibiyotik direnç paterninin yakından takip edilmesinin gerektiğini düşündürmektedir.

Pigment Oluşturan İki Mikobakteri İzolatı: Yeni Mikobakteri Türleri Olabilir Mi?

Cengiz Çavuşoğlu

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir.

Mikobakterilerin tanımlanması için önceki yıllarda biyokimyasal testler ve hücre duvarı lipid analizleri kullanılmaktaydı. Son yıllarda özellikle 16S rRNA geni dizi analizinin kullanıma girmesiyle mikobakterilerin tanımlanmasında önemli ilerlemeler sağlanmış, son yıllarda çok sayıda yeni mikobakteri türü bulunmuş ve yeni taksonomik gruplar tanımlanmıştır.

Sunulan çalışmada iki farklı hastanın balgam örneğinden soyutlanan iki mikobakteri izolatı (*Mycobacterium sp.* G1368 ve *Mycobacterium sp.* E498); biyokimyasal özellikleri (üreme hızı, üreme ısısı, pigment oluşturma, nitrat indirgeme, tellürit indirgeme, üreaz, pirazinamidaz, arilsülfataz, Tween 80 hidrolizi, ısıya dirençli katalaz ve semikantitatif katalaz), antibiyotik duyarlılıkları (amikasin, siprofloksasin, klaritromisin, doksisisiklin, imipenem, trimetoprim-sülfametoksazol), HPLC ile hücre duvarı lipid analizleri, 65-kDa'luk ısı şok proteini (*hsp65*) ve 16S rRNA geni dizi analizleri temel alınarak tanımlanmıştır.

Mycobacterium sp. G1368'nin *hsp65* geninin parsiyel DNA dizi analizinin *Mycobacterium sp. variant* MS430 ile %99, 16S rRNA geninin dizi analizinin *Mycobacterium duvalii* ile %98; *Mycobacterium sp.* E498'in *hsp65* geninin parsiyel dizi analizinin *Mycobacterium novocastrense* strain CIP105546 ile %95, *Mycobacterium holsaticum* AJ310469 ile %94, 16S rRNA geni dizi analizinin ise *Mycobacterium moriokaense* DSM 44221T ve *Mycobacterium fallax* AF480600 ile %99 dizi homolojisi gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca izolatların kendilerine özgü fenotipik özellikleri olduğu ve HPLC paternlerinin daha önce tanımlanmış hiçbir mikobakteri türü ile homoloji göstermediği belirlenmiştir.

Sonuç olarak hastalardan birer kez izole edilen ve hastalıkla ilişkili oldukları kanıtlanamayan bu izolatlara, mikobakterilerin taksonomisindeki son yıllardaki görüşler doğrultusunda yeni tür isimleri verilmemiştir. Ancak fenotipik ve genotipik özellikleri tanımlanan bu izolatlar, yeni mikobakteri türleri olarak değerlendirilmiştir.

Hızlı Rifampisin ve İsoniazid Direnci Saptayan Genotype®MTBDR Testinin Performansının Değerlendirilmesi

Cengiz Çavuşoğlu, Ajda Turhan, Pınar Akıncı, İlknur Söyler

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir.

Son yıllarda rifampisin (RIF) ve izoniazid (INH) direncinden sorumlu *rpoB* ve *katG* genlerindeki mutasyonların saptanması için, DNA dizi analizi ve revers hibridizasyon testleri gibi çeşitli moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Genotype®MTBDR (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) testi *Mycobacterium tuberculosis*'de *katG* ve *rpoB* bölgesinde sık görülen mutasyonları saptayan, revers hibridizasyon temelli yeni bir kittir. Sunulan çalışmada bu testin performansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada birinci seçenek antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığı daha önce 7H10 agar proporsiyon yöntemi ile belirlenmiş, *rpoB* geni mutasyonları ve Inno-LiPA Rif.TB paternleri bilinen 37'si aynı zamanda INH'a dirençli olan toplam 41 RIF'e dirençli *M.tuberculosis* suşu incelenmiştir. Genotype®MTBDR testi için multipleks PCR ile çoğaltılan *katG* ve *rpoB* genleri, şeritlerde bulunan özgül DNA problemleriyle hibridize edilmiş ve oluşan bant paternleri değerlendirilmiştir. Ayrıca, Genotype®MTBDR testi ile *katG* mutasyonu saptanan suşlarda *katG* geninin DNA dizi analizi yapılmıştır. Genotype®MTBDR testiyle, RIF'e dirençli 41 izolatın 39'unda (%95) RIF direnci doğru olarak saptanırken, iki izolat duyarlı olarak tanımlanmıştır. Gln-490-His mutasyonu olan izolat Inno-LiPA Rif.TB testiyle de duyarlı olarak saptanırken, 514-515'de Arg insersiyonu olan diğer izolatta Inno-LiPA Rif.TB ile $\Delta S1$, $\Delta S2$ direnç paterni saptanmıştır. Genotype®MTBDR ile ayrıca 37 INH'a dirençli izolatın 27'sinde (%73) *katG* mutasyonu (INH direnci) belirlenmiştir. Bu izolatların tümünde *katG* genindeki mutasyonlar DNA dizi analiziyle de doğrulanmıştır. Genotype®MTBDR testiyle, Inno-LiPA Rif.TB ile saptanabilen bir insersiyon mutasyonu tanımlanamamıştır. Bu dezavantajına karşın, Genotype®MTBDR testi de *katG* genindeki mutasyonları saptayabilmektedir.

Sonuç olarak bizim bulgularımız, Genotype®MTBDR testinin çoğul dirençli tüberkülozun tanısında yararlı olabileceğini göstermektedir.

Tüberküloz Hastalığının Tanısında Ehlich Ziehl Neelsen Boyama, BACTEC 460 TB ve MTD Gen Prob Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Sevim MEŞE, Tuncer ÖZEKİNCİ, Selahattin ATMACA, Kadri GÜL

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Diyarbakır.

Tüberkülozun kontrolünde en önemli aşama, aktif olgulara erken ve doğru tanı konulmasıdır. Son yıllarda mikobakterilerin hastalık örneklerinden kısa sürede saptanması için radyometrik ve kromatografik sistemler, nükleik aside dayalı moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Bu çalışmada Ehlich Ziehl Neelsen (EZN) boyama ve MTD yöntemleri, altın standart olarak kabul edilen BACTEC 460 TB sistemiyle karşılaştırılmıştır.

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na tüberküloz ön tanısı almış hastalardan gönderilen toplam 305 örnek (100 balgam, 7 bronkoalveolar lavaj, 74 beyin omurilik sıvısı, 34 idrar, 17 mide açlık sıvısı, 29 plevral mai, 26 asit mai, 10 yara, 4 perikardial mai, 3 eklem sıvısı, 1 nefrostomi) çalışılmıştır. Örnekler homojenizasyon, dekontaminasyon, nötralizasyon işlemlerinden sonra; EZN, BACTEC 460 TB ve MTD-Gen-Probe yöntemleriyle incelenmiştir. Elde edilen veriler ile BACTEC radyometrik kültür sistemi referans alınarak EZN ve MTD yöntemleri için validite değerleri hesaplanmıştır.

EZN yönteminin duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif prediktif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla solunum yolu örneklerinde %83.3, %95, %50, %98.9, solunum yolu dışındaki örneklerde ise %18.2, %98.4, %40, %95.3; MTD yöntemi için bu oranlar sırasıyla solunum yolu örneklerinde %83.3, %94, %45.5, %98.9 ve solunum yolu dışındaki örneklerde %54.5, %88.2, %21.4 ve %97 olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, EZN, MTD ve BACTEC 460 TB yöntemlerinin iyi kalitede prosedür ve kontrollü çalışılma ile kombine kullanımının, tüberküloz hastalığına erken ve doğru tanı konulması bakımından önemli bir aşama olabileceği kanısına varılmıştır.

Türkiye’de İki Olguda *Entamoeba moshkovskii* Varlığı

Mehmet Tanyüksel¹, Mustafa Ulukanlıgı², Zeynep Güçlü¹, Engin Araz¹, Özgür Kuru¹,
William A Petri, Jr³

¹GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Tıbbi Parazitoloji BD, Ankara.

²Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Şanlıurfa.

³Virginia Üniversitesi, Enfeksiyon Hastalıkları Bölümü, Charlottesville, Virginia, ABD.

Entamoeba moshkovskii, kist ve trofozoit formları ile *Entamoeba histolytica* ve *Entamoeba dispar*’dan ayırt edilemeyen, önceleri de serbest yaşayan amipler olarak düşünülen bir amip türüdür. İnsanlarda fazlaca bildirilmeyen ve hastalık yapma konusunda kesin kanıtları bulunmayan *E.moshkovskii*’nin tanısı, günümüzde sadece moleküler yöntemlerle mümkündür. Ülkemizde ishal ya da dizanteri yakınmaları olanlarla birlikte asemptomatik hastalarda, invaziv özellik gösteren *E.histolytica*’ya *E.moshkovskii*’nin morfolojik benzerliği nedeniyle yanlış tanı ve gereksiz tedavi riski bulunmaktadır.

Farklı tanı yöntemlerinin (mikroskopik bakı, *E.histolytica* özgül antijen ELISA, dipstik test, PCR) kullanılmasıyla amebiyazisin prevalansını hedefleyen çalışmada, iki dışkı örneğinde *E.moshkovskii* PCR pozitifliği bulunmuştur. Dışkı örneklerinden DNA ekstraksiyonu sonrası, *E.moshkovskii*’ye özgül “nested” SSU rDNA PCR ürünlerinin *Xho* I restriksiyon enzim ile kesilmesiyle elde edilen ürünler referans suş ile benzerlik göstermiştir. Olgulardan birisi 2 yaşındaki kız çocuğu, diğeri 36 yaşındaki bayan hastada ishal, halsizlik ve kilo kaybı yakınma/belirtileri bulunmakta idi. Dışkının mikroskopik bakısında *E.histolytica*’ya benzer yapılar görülmemiş olmasına rağmen, her iki hastada da aynı zamanda *E.histolytica* özgül antijen ELISA testi pozitif bulunmuştur. Aynı konakta *E.histolytica* ve *E.moshkovskii*’nin birlikte bulunması ve ülkemizde *E.moshkovskii*’nin ilk kez saptanmış olması özgündür.

Amebiyazisde moleküler temelli çalışmaların önemi ve bazı hastalarda da *E.moshkovskii*’nin varlığının göz ardı edilmemesinin, ülkemiz amebiyazis epidemiyolojik bilgilerine katkı sağlayacağı muhakkaktır.

Multipleks PCR Yöntemi Mide Biopsilerinde Bulunan *Helicobacter pylori* Suşlarının Genotip Analizi İçin Avantajlı Bir Yöntem Midir?

Bora Kazım Bölek, Barık Salih

Fatih Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İstanbul.

Helicobacter pylori, kronik gastrit ve peptik ülser hastalıklarının etkeni olup mide kanserinde de önemli bir rol oynar. Bu çalışmanın amacı, multipleks PCR yöntemiyle *H.pylori*'nin *cagA* ve *vacA* genotiplerini analiz etmek ve bunların hastalık sonuçlarıyla ilişkisini ortaya koymaktır.

Çalışmada 54 hastadan izole edilen *H.pylori* [35 duodenum ülseri (DÜ), 7 mide ülseri (MÜ), 10 gastrit ve 2 tane mide kanseri hastası] suşu incelemeye alınmıştır. CLO ve PCR testleri için her hastanın antrumundan 2 biopsi alınmış ve *cagA*, *vacA* *s1*, *s2*, *m1* ve *m2* bölgelerine özel 3 set primer kullanılarak multipleks PCR yapılmıştır.

H.pylori; 35 DÜ hastasının 30'unda (%85.7), 7 MÜ hastasının tamamında (%100), 10 gastrit hastasının 7'sinde (%70) tanesinde saptanmıştır. *CagA* geni, 30 DÜ hastasının 26'sında (%86.6) pozitif bulunmuştur. Bunların 13'ü *s1/m1*, 4'ü *s1/m2*, 6'sı *s2/m2* ve 3'ü *s2/m1* genotipine sahiptir. *CagA* negatif 4 DÜ hastasının genotipleri ise *s1/m2* olarak belirlenmiştir. Mide ülseri hastalarının 5'i (%71.4) *cagA* pozitif bulunmuş; bunların 2'sinde *s1/m2* ve 3'ünde *s2/m2* genotipi belirlenmiştir. İki *cagA* negatif MÜ hastası ise *s2/m2* genotipine sahiptir. Gastrit hastalarının 4'ü (%57) *cagA* pozitif bulunmuş; bunların 3'ünün *s1/m2*, birinin ise *s2/m1* genotipine sahip olduğu izlenmiştir. *H.pylori cagA-vacA-s1* genotipi ile peptik ülser hastalıkları arasında önemli bir ilişki bulunmaktadır.

Multipleks PCR yönteminin muhtelif *H.pylori* genotiplerinin tek seferde belirlenmesinde, tek primerle 2 alelin tespit edilmesinde, genlerin kısmi ve tam delesyonlarının saptanmasında, genotip-hastalık ilişkisinin analizinde bir çok faydası bulunmaktadır. Ayrıca bu yöntem, hem zaman açısından hem de ekonomik bakımdan verimlidir.

***Helicobacter pylori*'nin İzositrat Dehidrogenaz Enzimi, İmmünojenik Potansiyele Sahip Olup Gastrit ve Ülser Hastalarının Normal Vakalardan Ayırt Edilmesini Sağlayabilecek Bir Antijendir**

Niyaz Ahmed¹, M. Abid Hussain¹, Shaik A. Naveed², Irshad Ahmed², S. Manjulata Devi¹, Barık Salih³, Leonardo A. Sechi⁴, Francis Megraud⁵

¹Pathogen Evolution Group, Centre for DNA Fingerprinting and Diagnostics (CDFD), Hyderabad 500076, India.

²Centre for Liver Research and Diagnostics, Deccan College of Medical Sciences and Allied Hospitals, Hyderabad, India.

³Fatih Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji/Mikrobiyoloji Bölümü, İstanbul.

⁴Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione Microbiologia Sperimentale e Clinica, Facoltà di Medicina, Università Degli Studi de Sassari, Viale S. Pietro, 07100 Sassari, Italy.

⁵INSERM ERI 10 and Centre National de Référence des Campylobacters et Hélicobacters, Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Pellegrin, Université Victor Segalen Bordeaux 2, France.

Gastrit ve peptik ülserle neden olan *Helicobacter pylori*, ayrıca mide kanserinde risk faktörü olarak düşünülen bir bakteridir. İmmünojenik proteinlerden yararlanılarak yapılan, özgül ve invaziv olmayan yöntemler *H.pylori*'nin neden olduğu peptik hastalıkların tanısında kullanılmaktadır. Bu çalışmada, *H.pylori*'nin önemli bir proteini olan "isocitrate dehydrogenase"nin (ICD) immünojenik potansiyeli belirlenmiş ve serolojik tanıda kullanımı gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada *H.pylori*'nin ICD proteininin amino asit sekansı, yüksek antijenik özellik taşıyan immünojenik epitoplara "in silico" analizinde kullanılmıştır. Daha sonra *icd* geni klonlanarak *E.coli*'de eksprese edilmiş ve saflaştırılarak homojenize edilmiştir. Kendi hazırladığımız ELISA yönteminde, rekombinant ICD antijen olarak kullanılmış ve 90 gastrit/ülser hastası ile 22 normal kişinin (toplam 119) serumlarında antikor varlığı araştırılmıştır. Bu yöntem ayrıca *C.jejuni* tarafından infekte edilmiş olan ve kontrol grubu olarak kullanılan 7 hastaya da uygulanmıştır.

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında *H.pylori* ICD proteininin infekte olmuş hastalarda yüksek miktarda antikor üretimine neden olduğu saptanmıştır. Kontrol grubunda hiçbir pozitifliğin saptanmaması, bu antikor üretiminin *H.pylori*'ye özgül olduğunu göstermiştir. Üre soluk testi negatif çıkan vakalarda ve asemptomatik vakalarda da antikor pozitifliğine rastlanmamıştır.

Sonuç olarak, *H.pylori* ICD proteini gelecek vaat eden, teşhis amaçlı bir antijen olarak, hastaların ve suşların genetik coğrafyasına bakılmaksızın kullanılabilir.

2002-2005 Yılları Arasında İzole Edilen Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının Moleküler Epidemiyolojisi

Alper Tekeli¹, Esra Koyuncu¹, Iştar Dolapçı¹, Özay Arıkan Akan², Z. Ceren Karahan¹

¹Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

²Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İbn-i Sina Hastanesi Merkez Bakterioloji laboratuvarı, Ankara.

Bu çalışmada 2002-2005 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina hastanesinde yatan hastalardan izole edilen metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatlarının; kromozomal kaset tipleri (SCCmec), aksesuar gen regülatör (*agr*) tiplendirimi ve toksin gen özellikleri ile, PFGE paternlerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

“Mini-Api” (BioMerieux) yöntemi ile MRSA tanısı konulan 134 suş çalışmaya alınmıştır. Bu suşların *mecA* ve Panton Valentine Lökosidin (PVL) genleri standart PCR yöntemi ile, kromozomal kaset tipleri, *agr* tipleri ve toksin genlerinin varlığı multipleks PCR ile çalışılmış, suşlar PFGE ile de tiplendirilmiştir.

Çalışılan 134 suşun hepsi *mecA* pozitif olarak bulunmuştur. 134 suşun 87’si (%64.9) PVL pozitif olarak saptanmıştır. İzolatlar kromozomal kaset tipleri açısından incelendiğinde, 109 izolat (%81.3) tip 3 olarak saptanmıştır. Toksin genlerinden en sık stafilokokkal enterotoksin A (85 izolat, %63.4) görülmüştür. İzolatların *agr* tipleri incelendiğinde, 134 izolatın 119’u (%88.8) *agr* tip I olarak saptanmıştır. PFGE paternleri açısından suşlar arasında tek bir hakim klonun varlığı göze çarpmaktadır.

Bu çalışmada, hastanemizde izole edilen MRSA suşlarının genotipik özellikleri ortaya konulmuştur. Türkiye çapında baskın olan MRSA klonun tanımlanması için geniş çaplı ve çok merkezli çalışmalara ihtiyaç vardır

PBP-10

BOS Örneklerinde *Mycobacterium tuberculosis* Saptanmasında Gerçek Zamanlı PCR, Kültür ve Mikroskopik Yöntemlerin Karşılaştırılması

Canan Külah, Füsün Beğendik Cömert, Elif Aktaş, Nagehan Özlü, Osman Aydın

Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak.

Tüberküloz menenjit, tanı ve tedavisindeki güçlükler ve ciddi komplikasyonları ile önemli bir sağlık problemidir. Erken ve doğru tanı morbidite ve mortaliteyi azaltmaktadır. Bu nedenle, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek hızlı laboratuvar tanı yöntemlerinin kullanılması gerekmektedir.

Çalışmamızda, Şubat 2003-Aralık 2005 tarihleri arasında laboratuvarımıza tüberküloz menenjit ön tanısı ile gönderilen 27 beyin omurilik sıvısı (BOS) örneği retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirmede standart kültür referans yöntem olarak kabul edilmiştir. Tüm örneklerin Löwenstein Jensen'e (LJ) ekimi yapılmış, ayrıca ikinci kültür vasatı olarak Mycobacteria-Growth Indicator Tube (MGIT, Beckton Dickinson) kullanılmıştır. Mikroskopik inceleme için Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) ve auromin-rhodamin boyama yöntemleri kullanılmıştır. DNA izolasyonu için proteinaz K çözültisi eklenerek bir gece 56°C'de bekletilen örnekler, klasik fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. *M.tuberculosis* DNA'sı, IS6110 gen bölgesine yönelik primerler ve prob kullanılarak, ABI 7700 (PE Biosystems) cihazında gerçek zamanlı PCR yöntemi ile amplifiye edilmiştir.

Çalışan 27 örneğin tümünün mikroskopik değerlendirmeleri *Mycobacterium* açısından negatif olarak bulunmuştur. Örneklerin ikisinde (%7.4) kültürde üreme saptanmıştır. Bir örnekte LJ' de, diğesinde ise MGIT'da üreme olmuştur. PCR yöntemi örneklerin ikisinde (%7.4) pozitif sonuç verirken, kültür pozitif olan iki örnekte negatif sonuç vermiştir. Bu testin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif belirleyicilik değerleri sırasıyla; %0, %92, %0, %92 olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak, tüberküloz menenjitinin laboratuvar tanısında mikroskopi ve nükleik asit çoğaltma yöntemlerinin, mutlaka kültür yöntemleriyle birlikte yapılması ve değerlendirilmesi gereklidir. Yöntemlerin uygunluğu ve uyumluluğu çok sayıda örnek üzerinde çalışılarak test edilmelidir.

Çevresel Enterokoklarda Makrolidlere ve Linkozamidlere Direnç Mekanizmaları

Erman Oryaşın¹, Gamze Başbülbul¹, Halil Bıyık¹, Sevin Kırdar², Neriman Aydın², Bülent Bozdoğan²

¹Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Aydın.

²Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Aydın.

İnsanlarda ve hayvanlarda normal barsak florasında yer alan enterokoklar, dışkı ile çevreye yayılabilir ve çevre şartlarına dayanabilmesi nedeniyle çevreden tekrar hayvanlara ve insanlara bulaşabilir. Çoğunlukla çoklu antibiyotik direncine sahip olan enterokoklar direnç geni transferinde de önemli rol oynarlar.

Aydın merkez ilçe sınırları içerisinde yer alan arıtım tesislerinin giriş ve çıkış sularından, Menderes nehrinden ve tarımsal amaçlı kullanılan su kanallarından alınan su örnekleri ile bu sular ile beslenen tarımsal araziden alınan toprak örnekleri gibi çeşitli çevresel ortamlardan izole edilen 23 enterokokdan 14'ü (%61) eritromisine dirençli bulunmuştur. Bu çalışmada çevreden izole edilen eritromisine dirençli enterokoklarda direnç mekanizmaları, *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *msr(A)* ve *mef(A)* genlerinin varlığı PCR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Tüm izolatlarda klindamisine inaktivasyon yoluyla direnç varlığı Gots' testi ile çalışılmıştır.

Eritromisine dirençli 14 enterokoktan 5'inde *erm(B)* geni saptanmıştır. Test edilen suşların hiçbirisinde *erm(A)*, *erm(C)*, *msr(A)* ve *mef(A)* genleri bulunamamıştır. Çevreden izole edilen 23 suştan 4'ünün klindamisini inaktive ettiği gözlenmiştir. Klindamisini inaktive eden 4 suştan 3'ünün aynı zamanda *erm(B)* geni de taşıdığı PCR ile tespit edilmiştir.

Çevreden izole edilen enterokoklarda yüksek oranda makrolid direnci saptanmıştır (%61). Enterokoklarda yaygın olarak bulunan *erm(B)* geni dirençli suşların %36'sında saptanmış, diğer suşlarda bilinen direnç genleri bulunamamıştır. Klindamisine inaktivasyonla direnç sağlayan genin tespiti ve *erm(B)* taşımayan dirençli suşlardaki mekanizmanın belirlenmesi için ileri çalışmalar gerekmektedir.

Chlamydia trachomatis Tanısında Üretral Sürüntü ve İlk Akım İdrar Örneklerinde Real-time PZR ve DFA Metodlarının Karşılaştırılması

Ayla Özcan¹, Derya Mutlu¹, Asil Öztekin³, Orçun Çelik², Dilara Öğünç¹, Gözde Öngüt¹,
Tibet Erdoğan², Filiz Günseren³, Dilek Çolak¹

¹Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

²Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Antalya.

³Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

Çalışmanın amacı *Chlamydia trachomatis* tanısında kullanılan üretral sürüntü ve ilk akım idrar örneklerinde direk floresan antikor (DFA) ve real-time polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) metodlarının karşılaştırılmasıdır.

Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Üroloji Polikliniği'ne üretrit semptomlarıyla başvuran ve klinik muayene ile non-gonokoksik üretrit ön tanısı alan 37 erkek hastadan ilk akım idrar ve sonrasında üretral sürüntü örneği toplanmıştır. Alınan sürüntü örneklerinde DFA metodu ile (Fluorotect Chlamydia-Omega Diagnostics, İngiltere) *C.trachomatis* antijeni, idrar örneklerinde ise real-time PZR metodu ile (RealArt™ *C.trachomatis* PCR Kits-Artus, Almanya) *C.trachomatis* DNA'sı araştırılmıştır.

Otuzyedi olgunun 28'inde (%75.6) DFA ve PZR testi negatif olarak bulunmuştur. DFA negatif bir hastada PZR inhibitörü saptanmıştır. Bir olguda ise hem PZR hem DFA pozitif bulunmuştur. Kalan yedi olguda DFA pozitif ama PZR negatif olarak değerlendirilmiştir. Yapılan istatistiksel analizde "Fischer's exact" p değeri 0.22 bulunmuştur.

Sonuç olarak bu çalışmada, PZR'nin DFA'ya üstünlüğü saptanmamıştır (p=0,22). PZR negatif, DFA pozitif olguların doğrulanması için ileri tanımlama testleri yapılması gerekmektedir. İki test arasındaki uyumu araştırmak için aynı örneklerle ve daha fazla hasta grubunda çalışmalar yapılması gereklidir.

***Helicobacter pylori* Klinik İzolatlarında *cagA* Prevalansı**

Zeynep Sarıbaş¹, Hülya Demir², Incinur Saltık Temizel², Halis Şimşek³,
Hasan Özen², Yakut Akyön Yılmaz¹

¹Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Ankara.

²Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatri AD, Gastroenteroloji Ünitesi, Ankara.

³Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Gastroenteroloji Ünitesi, Ankara.

Helicobacter pylori, mide mukozasında kolonize olan, mikroaerofilik, spiral şekilli bir bakteridir. Kolonizasyonun yanı sıra, *H.pylori*'nin kronik atrofik gastrit ve peptik ülserle neden olduğu gösterilmiştir. Gastrik adenokarsinoma için de risk faktörü olarak kabul edilmektedir. *cagA* geni (cytotoxin-associated-gene; sitotoksinle ilişkili gen) pozitif *H.pylori* suşlarıyla enfeksiyonun, gastrik kanser için risk oluşturduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, *H.pylori* klinik izolatlarında *cagA* geninin PCR ile saptanması amaçlanmıştır.

Çalışma, 1997-2003 yılları arasında izole edilmiş, erişkin ve çocuk hastalara ait 198 stok suş ile gerçekleştirilmiştir. Bu izolatlardan, setil trimetil amonyum bromid (CTAB) yöntemi kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. F1 ve B1 primerleri kullanılarak *cagA* geninin 348 baz çiftlik bölgesi çoğaltılmıştır (Gen Bankası no: L11714, pozisyon 1231 ve 1578 R). Pozitif kontrol olarak, *H.pylori* NCTC 11637 standart suşu, negatif kontrol olarak distile su kullanılmıştır. PCR ürünleri, %1.3 agaroz jel elektroforezinin ardından, etidyum bromürle boyanarak görünür hale getirilmiştir. Jel, UV ışık kaynağının üzerinde incelenmiştir.

Sonuç olarak, 198 izolatın 116'sında (%58.6) *cagA* geni pozitif olarak saptanmıştır. Bu bulgu, hastanemizdeki erişkin ve çocuk hastalara ait *H.pylori* klinik izolatlarında, önemli bir virulans faktörü olan *cagA* prevalansını göstermesi açısından değerlidir.

Mikobakterilerin Tür Düzeyinde Tanımlanması Amacıyla Üç Yöntemin Karşılaştırılması

Alpaslan Alp¹, Gülnur Tarhan², Zeynep Sarıbaş¹, İsmail Ceyhan²

¹Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

²Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Tüberküloz Referans Laboratuvarı, Ankara.

Mycobacterium tuberculosis dışındaki mikobakterilerin (NTM; non-tuberculous mycobacteria) hızlı bir şekilde tanımlanabilmeleri, doğru tedavi yaklaşımlarının sağlanması açısından çok önemlidir. Bu çalışmanın amacı, tüm mikobakteri türlerinin kısa bir sürede tür düzeyinde tanımlanmasının sağlanması amacıyla rutin olarak kullanılacak bir yöntemin belirlenmesidir.

Bunun için, BACTEC 460 sisteminde mikobakteriyel üreme olarak saptanmış suşlardan, NAP testi sonucunda NTM olarak tanımlanan suşlar kullanılmıştır. Bu suşlara PCR-restriksiyon enzim analizi yöntemi, GenoType Mycobacterium strip test (Hain Lifescience, Almanya) ve MycoType-All kiti (Salubris AŞ, İstanbul) uygulanarak tür düzeyinde tanımlanmaları sağlanmıştır. Restriksiyon enzim analizi *hsp65* geninin PCR sonrasında BstII ve HaeIII restriksiyon enzimleri ile kesilmesiyle yapılmıştır. GenoType Mycobacterium strip testi için, hedef bölgenin PCR ile çoğaltılmasından sonra, özel stripler üzerine aktarma işlemi yapılarak, her stripte bant veya bantların oluşma yerine göre incelenen suşun hangi mikobakteri türüne ait olduğu belirlenmiştir. MycoType-All kiti ile tanımlama üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda yapılmış, sonuçların değerlendirilmesi kit içeriğinde bulunan Myker B ve Myker H isimli iki farklı molekül ağırlık standardı ile yapılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 35 mikobakteri izolatu üç yöntemle de tanımlanmaya çalışılmıştır. Sonuçlar karşılaştırıldığında, suşların 28'inde NTM isimlendirmelerinin aynı olduğu görülmüştür. Yedi NTM türünde ise farklı sonuçlara ulaşılmıştır. Bu suşların tanımlanmaları için *hsp65* geninin DNA dizi analizi yapılmıştır. DNA dizi analizi sonuçları incelendiğinde; 4 NTM izolatu için klasik PCR-restriksiyon enzim analizi yöntemi ile, 2 NTM izolatu için MycoType-All kiti ile ve bir NTM izolatu için de GenoType Mycobacterium strip testi ile uyumsuz sonuç elde edildiği görülmüştür.

Bu çalışmada, tür düzeyinde mikobakteri tanımlanmasında üç yöntemin de rutin kullanıma uygun olduğu, ancak hazır tanımlama kitlerinin, standardizasyon sağlanabilmesi açısından daha uygun oldukları sonucuna varılmıştır.

Üç Farklı Mikobakteriyel DNA İzolasyon Yönteminin Karşılaştırılması

Alpaslan Alp, Şehnaz Özyavuz Alp, Zeynep Sarıbaş, Gülşen Hasçelik

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

Mikobakteri infeksiyonlarında tanının kısa bir sürede konabilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle moleküler yöntemler günümüzde değerli tanı araçları haline gelmişlerdir. PCR öncesinde uygulanan DNA izolasyon aşaması, kullanılan testin duyarlılığını etkileyen en önemli basamaklardan biridir. Bu çalışmada mikobakteri infeksiyonlarının tanısında kullanılan PCR yöntemlerinin verimliliğini etkileyebilecek üç DNA izolasyon yöntemi karşılaştırılmıştır.

Bu amaçla kaynatma yöntemi, MagNA Pure LC otomatize izolasyon sistemi (Roche Applied Science, Germany) ve Magtration 12GC (Precision System Science, Germany) otomatize izolasyon sisteminin duyarlılıkları, dört farklı mikobakteri türünün seri dilüsyonları hazırlanarak test edilmiştir. Bunun için öncelikle, *M.tuberculosis* H37Ra standart suşu, *M.tuberculosis* hasta izolatu, *M.phlei* ve *M.smegmatis* kültürlerinden 0.5 McFarland bulanıklığında mikobakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu süspansiyonlardan, Tris EDTA tamponu içinde sekiz adet 10^{-1} seri dilüsyon yapılmıştır. Bu dört mikobakteri türünün seri dilüsyonlarına üç yöntemle de DNA izolasyonu uygulanmıştır. Daha sonra PCR ile, tüm mikobakterilerde bulunan *hsp65* genine özgül primerler kullanılarak 441 baz çiftlik bölge çoğaltılmıştır.

Elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırıldığında, bant gözlenebilen en düşük dilüsyon oranı, 10^{-5} ile MagNa Pure ve Magtration sistemleriyle izolasyon yapılan H37Ra suşunda saptanmıştır. H37Ra suşunun kaynatma yöntemi ile izolasyonunda ise ancak 10^{-2} dilüsyonda bant gözlenebilmiştir. *M.tuberculosis* izolatında MagNa Pure sistemi, Magtration sistemi ve kaynatma yöntemiyle sırasıyla 10^{-4} , 10^{-3} ve 10^{-1} dilüsyonlarda bant gözlenmiştir. *M.smegmatis* ve *M.phlei* suşlarında ise amplifikasyon sırasıyla 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-2} ve 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} dilüsyonlarında gözlenmiştir.

Çalışma sonucunda, MagNa Pure sistemi ile daha düşük miktarlardaki DNA'nın saptanabildiği, kaynatma yöntemiyle ise ancak yüksek miktarlardaki DNA'nın saptanabildiği görülmüştür. Bu nedenle rutin PCR uygulamalarında hem daha duyarlı olmaları nedeniyle, hem de standardizasyon sağlanabilmesi için, otomatize izolasyon sistemlerinin kullanılmasının uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

PBP-16

Balgam Örneklerinde *Mycobacterium tuberculosis* DNA'sının Beş Farklı Ekstraksiyon Metodu Kullanılarak "In-House" PCR Yöntemiyle Değerlendirilmesi

Gölnur Tarhan¹, İsmail Ceyhan¹, Hülya Şimşek¹, Serdar Tuncer²

¹Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara.

²METİS Biyoteknoloji Limited Şirketi, Ankara.

Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri tüberküloz infeksiyonlarının hızlı tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde rutin tanı amacı ile kullanılan pek çok yöntem ve ticari kit bulunmaktadır. Bu yöntemlerin duyarlılığını ve özgüllüğünü etkileyen en önemli basamaklardan biri klinik örneklerden DNA izolasyonudur.

Çalışmamızda klinik ve radyolojik bulgular ile tüberküloz ön tanısı almış tedavi öncesi 50 hastadan alınan balgam örneklerinde DNA izolasyonu; standart NALC-NaOH yöntemiyle dekontaminasyon-homojenizasyon ve konsantrasyon işlemi sonrasında kaynatma, tek basamaklı proteinaz K sindirimi, katı faz absorpsiyon (QIAamp), guanidin izotiyosiyanat lizis ve izopropanol presipitasyonu (Heliosis, METİS) ve DNA presipitasyon (Epicentre Technologies) temeline dayanan beş farklı ekstraksiyon yöntemi ile yapılmıştır. DNA örnekleri, *Mycobacterium tuberculosis*'in IS6110 bölgesine özgül primerler kullanılarak "in-house" PCR yöntemi ile çoğaltılmış, PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar, klinik bulgular ve kültür (Löwenstein-Jensen) yöntemi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak testlerin pozitiflik saptama oranı; kaynatma yöntemi ile %21, tek basamaklı proteinaz K, guanidin izotiyosiyanat lizis ve izopropanol presipitasyonu yöntemleri ile %38, DNA presipitasyon yöntemi ile %41 ve katı faz absorpsiyonu yöntemi ile %57 olarak saptanmıştır.

Kardeş Kistik Fibrozisli Hastalardan Enfeksiyon Etkeni Olarak İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Moleküler Tiplendirmesi

Olca Özçakır¹, Özgen Eser¹, Ebru Yalçın², Deniz Doğru², Zayre Erturan³, Burçin Şener¹, Uğur Özçelik², Nural Kiper²

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Ankara.

² Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi, Göğüs Hastalıkları AD, Ankara.

³İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Çapa, İstanbul.

Staphylococcus aureus kistik fibrozisli (KF) hastalarda gelişen solunum yolu enfeksiyonlarında sıklıkla ilk izole edilen patojendir. KF'li hastalar en az 1-2 yıl aynı *S.aureus* suşu ile enfekte veya kolonize olabilmektedir. KF'li hastalarda *S.aureus* suşları aile içi yayılım göstermektedir. Bu çalışmada amaç *i*) kardeş KF hastalarından izole edilen *S.aureus* suşlarının genotiplerinin belirlenmesi, *ii*) olgularda saptanan *S.aureus* izolatlarının izlem süresince genetik çeşitliliğinin saptanması, *iii*) kardeşler arası ve hastalar arası bulaş varlığının araştırılmasıdır.

Altı çift KF'li kardeşten izole edilen toplam 27 *S.aureus* suşu çalışmaya alınmıştır. *S.aureus* suşları Gram-boyama, katalaz ve koagülaz testleri ile tanımlanmıştır. DNA izolasyonu ve saflaştırılması için CTAB (cetyltrimethyl-ammonium bromide) yöntemi uygulanmıştır. Moleküler tiplendirme amacıyla kullanılan AP (Arbitrarily primed)-PCR yönteminde M13 ve ERIC (Enterobacterial repetitive intergenic consensus)-PCR yönteminde ERIC-2 primeri kullanılmıştır.

Dört çift kardeş birer, diğer iki çift kardeş ise her biri üç ve üzerinde olmak üzere toplam 19 enfeksiyon episoduna sahip bulunmuştur. ERIC-PCR yöntemi sonucunda dört çift KF'li kardeşin kendi içlerinde aynı suş ile enfekte oldukları gözlenmiştir. Birden çok izolata sahip olguların aynı genotipteki izolatu 7 ay–9 yıl süre ile taşıdıkları izlenmiştir. Farklı kardeş grupları arasında çapraz bulaşı destekleyecek bir bulguya rastlanmamıştır.

Kardeş KF'li hastaların aynı genotipte *S.aureus* suşlarıyla enfekte olmaları, enfeksiyon kaynağının aynı olduğunu veya enfeksiyon etkeninin bir kardeşten diğerine bulaştığını göstermektedir. Farklı genotipte *S.aureus* izolatu olan hastalarda bazı genotiplerin uzun süreli kolonizasyonu, belli genotiplerin solunum yoluna adaptasyonunun diğerlerine göre daha başarılı olduğunu düşündürmektedir.

Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilokoklarda *mecA* Gen Varlığının Araştırılması

İhsan Hakkı Çiftçi, Zafer Çetinkaya, Orhan Cem Aktepe, Mustafa Altındiş

Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar.

Stafilokoklar, nozokomiyal patojen olarak hastanede yatan hastalarda mortalite ve morbiditenin major nedenlerinden biridir. Sıklıkla hastane kökenli suşların penisilin bağlayan protein 2 (PBP2) değişimleri ile tüm beta-laktam ajanlara karşı direnç geliştirdiği bilinmektedir. Stafilokoklarda metisilin direncinin belirlenmesinde, dirençin heterojen olması ve düşük seviyede de dirençli suşların bulunması nedeniyle konvansiyonel duyarlılık testleri yetersiz kalabilmektedir. Ayrıca metisilin dirençli stafilokok suşların giderek artması, laboratuvarlarda dirence sahip suşların doğru, hızlı ve düşük maliyetlerle saptanmasını gerektirmektedir. Stafilokoklarda metisilin direncinin belirlenmesinde altın standart, düşük afiniteli PBP2a'yı kodlayan *mecA* gen bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile gösterilmesidir.

Çalışmamızda, metisilin direnci oksasilin disk difüzyon yöntemiyle belirlenen stafilokoklarda *mecA* gen varlığı PCR ile araştırılmıştır. Bakterilerden DNA izolasyonu klasik fenol-kloroform yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen DNA'larla yapılan PCR çalışmalarında 533 baz çiftlik *mecA* gen bölgesine özgül primerler kullanılmış ve elde edilen ürünler %1 agaroz jelde görüntülenmiştir. Metisilin direnci oksasilin disk difüzyon yöntemiyle belirlenen 30 metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* izolatının tamamında *mecA* gen varlığı saptanmış, metisilin direnci göstermeyen 10 koagülaz negatif stafilokok suşunun hiçbirinde ise *mecA* geni bulunmamıştır.

Sonuç olarak, disk difüzyon yöntemi ile dirençli bulunan suşların hepsi PCR ile de dirençli bulunarak doğrulanmış, disk difüzyon sonuçları PCR sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

Hastanemizde İzole Edilen Vankomisin Dirençli *Enterococcus faecium* İzolatlarının Moleküler Analizi

Abdullah Kılıç, Zeynep Şenses, Hakan Aydoğan, Ahmet Başustaoğlu

GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, 06018, Etlik, Ankara.

Enterokok türleri sağlıklı kişilerin normal florasında bulunmasına rağmen, endokardit, kan akımı ve üriner sistem infeksiyonlarına neden olmaktadır. Bu tür infeksiyonların tedavisinde vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptid grubu antibiyotikler kullanılmaktadır. Son zamanlarda ülkemizde vankomisin dirençli enterokokların (VDE) neden olduğu infeksiyonların sayısında artışlar olmuştur. VDE’lerde yedi farklı direnç geni tanımlanmış olmasına rağmen Türkiye’de en sık VanA tip fenotipik direnç gösterilmiştir.

Çalışmamıza, hastanemizde 2000-2004 yılları arasında biri beyin omurilik sıvısı, diğerleri ise kan kültürlerinden olmak üzere farklı hastalardan izole edilen dört *Enterococcus faecium* suşu dahil edilmiştir. İzolatların Kirby-Bauer disk difüzyon testi ile vankomisin ve teikoplanine dirençli olduğu ve VanA fenotip olduğu gösterilmiştir. Daha sonra izolatların “pulsed field gel electrophoresis” (PFGE) ile genotiplendirilmesi ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile direnç genleri araştırılmıştır. PFGE ile izolatların Tenover kriterlerine göre birbirlerine benzemedikleri ve PCR ile VanA tip direnç geni taşıdıkları tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, hastanemizde VanA genotip VDE’ler sporadik olarak infeksiyonlara neden olmaktadır. İzolatlar arasındaki genotipik ilişkinin gösterilmesi özellikle dirençli mikroorganizmalar ile ortaya çıkan infeksiyonların izlenmesinde önemlidir.

Alangüllü (Aydın) Jeotermal Kaynağından İzole Edilen Termofilik Bakterilerin 16S rRNA Analizi ile Tanımlanması

Gamze Başbülbul, Erman Oryaşın, Halil Bıyık, Kubilay Metin, Bülent Bozdoğan

Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Aydın

Günümüzde çoğu filogenetik araştırma RNA temel alınarak yapılmakta ve Eucarya, Archaea ve Bacteria üyelerine ait pek çok rRNA sekansları yayınlanmış bulunmaktadır. 16S rRNA; tüm bakterilerde bulunması, işlevsel olarak sabit olması ve hem oldukça korunmuş hem de değişken kısımlar içermesi nedeniyle filogenetik ilişkilerin çalışılmasında en iyi kaynaktır.

Bu çalışmada, Alangüllü jeotermal sularından izole edilen ve fenotipik testlere göre farklı oldukları düşünülen 5 izolatın 16S rRNA dizi analizi yapılmıştır. İzolatların tümü termofilik, katalaz pozitif, endosporlu basillerdir. *Bacillus sp.D3*, *Bacillus sp. D4* ve *Bacillus sp. 1* olarak adlandırılan suşlar Gram değişken; *Bacillus sp. 3* Gram negatif ve *Bacillus sp. 4* Gram pozitif özellik göstermektedir. Ayrıca suşlar bazı biyokimyasal özellikler açısından birbirlerinden farklılık göstermişlerdir. *Bacillus sp.3* ve *Bacillus sp.4* numaralı izolatlar, DSMZ (German Resource Centre for Biological Material) merkezi tarafından ribotiplendirilmiştir. Kesin tür tanısı yapılamayan bu 5 termofilik suşun DNA'ları izole edilerek 16S rRNA'yı kodlayan gen universal primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmış ve sekans analizi yapılmıştır. Elde edilen sekans sonuçları veri tabanı ile karşılaştırılmış ve tüm suşlar *Geobacillus caldxylosilyticus* ile %99.3 oranında benzer bulunmuştur. PFGE kullanılarak yapılan moleküler epidemiyolojik çalışmada total DNA'ları Smal ile kesildikten sonra 5 suştan 4'ü aynı bant profiline sahipken birinde 3 bant farklılığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak, çevre kaynaklı bakterilerin tür düzeyinde tanısında 16S rRNA sekans analizi kullanılabilecek geçerli bir yöntemdir.

Parafine Gömülmüş Arşiv Dokulardan Nükleik Asit Ekstraksiyonu İçin Standart Fenol-Kloroform ve Spin Kolonlu Ticari Bir Yöntemin Karşılaştırılması

Koray Ergünay¹, Pınar Yurdakul¹, Gaye Güler Tezel², Esra Büber³, Erdem Karabulut⁴, Şemsettin Ustaçelebi¹

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Ankara.

³ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara.

⁴ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Ankara.

Parafine gömülmüş arşiv doku örnekleri, formalin gibi fiksatiflerin nükleik asitler üzerine olan olumsuz etkileri nedeniyle moleküler testler için optimal olmayan örnekler olarak tanımlanmaktadır. Bununla birlikte, taze doku elde etme imkanının bulunmadığı veya arşiv dokuların sayı ve özelliklerinin önem kazandığı durumlarda, bu örnekler de moleküler yöntemlerle değerlendirilmektedir. Bu çalışmada formalinle fikse parafine gömülmüş dokularda iki farklı nükleik asit ekstraksiyon yönteminin etkinliği karşılaştırılmaktadır.

Çalışmada testis germ hücreli tümörleri ve germ hücre aplazilerinden oluşan toplam 20 doku örneği incelenmiştir. Uygulanan standart deparafinizasyon ve doku parçalama işlemlerinden sonra, örnekler eş zamanlı olarak fenol kloroform yöntemi ve "High Pure Viral Nucleic Acid Kit®" (HPVNA, Roche Diagnostics, Almanya) ile nükleik asit ekstraksiyonuna alınmıştır. Önerilen standart protokollerle gerçekleştirilen uygulama sonunda, örneklerdeki DNA miktarı ve saflığı 260 ve 280 nm'de spektrofotometrik ölçümler ve Parvovirus B19 internal kontrol (Roche Diagnostics, Almanya) saptanması ile değerlendirilmiştir.

Fenol-kloroform (F-K) yönteminden elde edilen DNA miktarları HPVNA kit ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0.018$). F-K yöntemiyle saflaştırılan örneklerin 17'sinde, HPVNA kit ile saflaştırılan örneklerin ise 12'sinde Parvovirus B19 internal kontrol pozitif olarak izlenmiştir. Örneklerde protein kontaminasyonu ve RNA saflaştırılması açısından ise HPVNA kit avantajlı görünmektedir. Sonuç olarak, parafine gömülmüş dokulardan HPVNA kit ile nükleik asit ekstraksiyonu uygulanırken örneğin bölünerek önerilen miktarda farklı kolonlarda saflaştırmaya alınmasının; F-K yönteminde nükleik asitlerin daha saf olarak elde edilmesi gereken durumlarda ise protokolda modifikasyonlar yapılmasının uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

Multipleks PCR Yöntemi ile Stafilokoklarda Metisilin Direncinin Moleküler Yöntemlerle Saptanması ve SCCmec Tiplendirmesi

Emine Sevgican¹, Cüneyt Özakin², Melda Sınırtaş², Suna Gedikoğlu²

¹Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları AD, Bursa.

²Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Bursa.

SCCmec olarak adlandırılan genomik adacıklarda, *mecA* geninin yanı sıra diğer antimikrobiyal ajanlara dirençten sorumlu genler, insersiyon sekansları da yer alır. SCCmec tipleri, içerdikleri sınıf *mec* gen kompleksi ve *ccr* gen kompleksine göre düzenlenir. Bu çalışmada, kan kültür örneklerinden izole edilen metisiline dirençli stafilokok suşlarında *mecA* gen varlığının araştırılması ve SCCmec tiplendirmesinin yapılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya, üniversitemiz Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları AD, Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda BACTEC 240 Hemokültür sisteminde (BD; Becton Dickinson Company Sparks, USA) izole edilen ve Phoenix (BD) sistemi ile tanımlanan 100 adet MRSA ile 100 adet metisiline dirençli KNS suşu alınmıştır. Multipleks PCR yönteminde, Oliveria ve arkadaşları (Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 2155) tarafından kullanılan primerler ile aynı tüp içinde hem *mecA* gen varlığı araştırılmış hem de SCCmec tiplendirmesi yapılmıştır.

Çalışmamızda, 2 *S.aureus* ve 6 KNS suşunda *mecA* geni saptanamamıştır. *mecA* geni saptanan 98 MRSA suşundan 93'ünde 209, 243, 303 ve 414 baz çiftlik bantlar oluşmuş, 5'inde ise *mecA* geni varlığına rağmen SCCmec tiplendirmesi yapılamamıştır. *mecA* geni saptanan KNS'larda da SCCmec tiplendirmesi başarılı olmamıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda, SCCmec tiplendirmesinde 93 MRSA suşunda saptanan bantların Oliveira ve arkadaşlarının sınıflamasına göre tip III SCCmec'i temsil ettiği saptanmış, ancak bu araştırmacıların kullandığı primerler kullanılarak KNS'larda elde edilen sonuçların, bilinen SCCmec tipleri ile uyum göstermediği belirlenmiştir. Dolayısıyla, multipleks PCR sonrası oluşan bantlar incelendiğinde aynı bant fenotiplerini gösteren bu suşların, farklı yöntemler ile irdelenmesinin yararlı olacağını sonucuna varılmıştır.

Helicobacter pylori Suşlarının “Cag Pathogenicity-Island” ve Diğer Virulan Gen Bölgelerinin Genetik Profili

Barık Salih¹, M. Fatih Abasıyanık¹, Niyaz Ahmed²

¹Fatih Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İstanbul.

²Pathogen Evolution Group, Laboratory of Molecular and Cell Biology, Centre for DNA Fingerprinting and Diagnostics (CDFD), Hyderabad, India.

Helicobacter pylori'nin genomik çeşitliliği, infeksiyon ve hastalıklara neden olan virulan etkenlerin fonksiyonunu ve antijenik özelliğini etkilemektedir. Bu çalışmanın amacı “cag pathogenicity-island” (PAI)'ın içindeki ve dışındaki farklı gen dağılımının genetik profilini çıkarmaktır.

Yirmi biri gastrit, 14'ü peptik ülser (PÜ) olan 35 Türk hastanın *H.pylori* suşları PCR yöntemiyle incelenmiştir. Bakteri genomunun 3' uç bölgesi, *cagA* geni, promoter bölgesi, *cag* PAI'nın sol uç tarafındaki bölge ile sağ tarafındaki en uç bölge, *cagE*, *cagT* genleri, 5' uç bölgesi (LEC), “plasticity region open reading frames” (ORFs), *oipA* (Hp0638) ile *vacA* alelleri, ilgili primerler tarafından taranmış ve *cag* PAI'nın profili çıkarılmıştır.

Cag PAI'nın içindeki ve dışındaki bölgelerde kısmi ve tam delesyonlar saptanmıştır. Gastrit ve PÜ hastalarında sırasıyla, *cag* PAI'nın sol tarafında LEC1 (%9.5 ve %4.8) ve LEC2 (%14.3 ve %14.3), *cagT* (%33.3 ve %28.6), *cagE* (%28.6 ve %28.6) ve *cagA* promoter bölgelerinde (%19.0 ve %42.9) kısmi delesyonlar görülmüştür. Gastritli hastaların %57.1'inde, PÜ hastalarının ise %92.9'unda *cagA*'ya rastlanmıştır. Birçok suşun ilgili *cagRJ* genlerinde kısmi veya tam delesyonlar belirlenmiştir. *OipA* (Hp0638) geni; PÜ suşlarının %92.9'unda, gastrit suşlarının ise %80.9'unda baskın tip olarak bulunmuştur. “Plasticity region” JHP912 ve JHP931 ORF'ları, PÜ suşlarında daha baskın olarak tespit edilirken, diğer bölgelerde herhangi bir farklılık görülmemiştir. *vacA* s1a-m1a PÜ suşlarında daha baskın olarak tespit edilirken, s2m2 çoğunlukla gastritlilerde görülmüştür.

Yapılan ayrıntılı analiz, *cag*-PAI bölgesinin içindeki ve dışındaki bazı genlerde tam veya kısmi delesyonlar olduğunu ortaya koymuştur. Bu genlerden bazılarının, daha tehlikesiz suşlara nazaran PÜ suşlarında daha baskın bir şekilde bulunması, infeksiyonun yayılmasında ve ortaya çıkmasında *H.pylori*'nin genetik çeşitliliğinin çok güçlü bir etkisi olduğunu ortaya çıkartmıştır.

PBP-24

Risk Gruplarında Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle *Coxiella burnetii* Saptanması

Mete Eyigör, Şükrü Kırgan, Berna Gültekin, Senem Yaman, Serten Tekbıyık, Neriman Aydın

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Aydın.

Coxiella burnetii, bir meslek hastalığı olan Q hummasının etkenidir. Bu çalışmanın amacı daha önce serolojik olarak incelediğimiz risk gruplarında PCR yöntemi ile *C. burnetii*'nin araştırılmasıdır.

Q humması için risk grubunda bulunan hepsi erkek toplam 92 kişi (30 veteriner hekim, 30 hayvan bakıcısı, 32 kasap) çalışmaya alınmıştır. ELISA ve IFA yöntemleriyle (Vircell, Spain) *C. burnetii* antikorları araştırılan kişilerin serum örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapılmış (DNA extraction kit, Fermantas, Kanada) ve daha sonra Trans1: 5'-TGGTATTCTTGCCGATGAC-3', Trans 2: 5'-GATCGTAACTGCTTAATAAACCG-3' özgül primerleri kullanılarak *C. burnetii* varlığı PCR yöntemiyle araştırılmıştır.

ELISA ile *C. burnetii* IgM antikorları 12 olguda (%13) pozitif, 8 olguda (%8.7) şüpheli pozitif, IgG antikorları 32 olguda (%34.8) pozitif, 9 olguda (%9.7) şüpheli pozitif olarak saptanmıştır. Toplam 41 olguya uygulanabilen IFA testiyle *C. burnetii* faz II IgG pozitifliği 39 (%42.3) olguda saptanırken, toplam 20 kişiye uygulanabilen IFA faz II IgM testi 7 (%7.6) olguda pozitif saptanmıştır. PCR sonucunda veteriner grubundan 1, celep grubundan 2, kasap grubundan 1 olmak üzere toplam 4 (%4.3) olguda pozitiflik saptanmıştır. PCR pozitif hastaların serolojik profili tabloda verilmiştir.

Yaş	Meslek	ELISA		IFA			
		IgM	IgG	IgM Faz I	IgM Faz II	IgG Faz I	IgG Faz II
31	Veteriner	Neg	Poz	Çalışılmadı	Çalışılmadı	Neg	Neg
43	Celep	Poz	Poz	Neg	Neg	Neg	Poz
23	Kasap	Poz	Neg	Neg	Neg	Çalışılmadı	Çalışılmadı
43	Celep	Poz	Neg	Neg	Poz	Çalışılmadı	Çalışılmadı

Altın standart olarak IFA testi önerilmesine rağmen, çalışmamızda ELISA sonuçları PCR sonuçları ile daha uyumlu bulunmuştur. Bölgemizde serolojik ve moleküler yöntemlerle pozitiflik saptanması nedeniyle, özellikle risk gruplarında, atipik pnömoni, granülomatöz hepatit ve nedeni bilinmeyen ateş olgularında *C. burnetii*'nin de ayırıcı tanıda yer alması gerektiğini düşünmekteyiz.

***Pneumocystis jirovecii* Pnömonisi Tanısına Yönelik
Polimeraz Zincir Reaksiyonu Uygulaması**

Elife Berk, Sibel Aydoğan, Ayşe Kalkancı, Semra Kuştımur

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Pneumocystis carinii yeni adı ile *Pneumocystis jirovecii* bağışıklık sistemi baskılanmış konakta ölüm oranı yüksek interstisyel plazma hücreli pnömoni etkenidir. *P.jirovecii* pnömonisinde (PcP) tanı yöntemi olarak, çeşitli boyalar ile boyanan örneklerde etkenin gösterilmesi, direkt immün floresan yöntemi ile kistlerin gösterilmesi ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı PcP tanısında kullanılan iki türlü PCR (nPCR) yöntemimizin değerlendirilmesidir.

2005 yılında çeşitli kliniklerden gelen balgam, bronkoalveolar lavaj (BAL), ağız çalkantı suyu (AÇS), endotrakeal aspirat (ETA) olmak üzere toplam 321 klinik örnek değerlendirilmiştir. Hastalardan alınan örneklerde önce mukolitik olarak 1.4 dithiothreitol (DTT) kullanılmış, DNA eldesi için parçalama tamponu olarak (50mM KCl, 15mM Tris HCl, %0.5 Non-idet P40) ve 10 µl proteinaz K (10 mg/ml) kullanılmıştır. Daha sonra fenol-kloroform-izoamil alkol ile saflaştırma yapılmıştır. Saf DNA üzerinde ribozomal RNA'nın alt subünitinin (LSU rRNA) çoğaltılması hedeflenmiştir. Bunun için birinci turda dış primerler olarak pAZ102 E, pAZ102 H ve ikinci turda iç primer olarak pLE 1 ve pLE 2 kullanılmıştır. Birinci turda 340 baz çiftlik, ikinci turda 193 baz çiftlik ürünler görülmüştür.

Çalışılan örneklerin 20'sinde (%6.2) nPCR ile pozitif sonuç alınmıştır. Pozitif bulunan 20 örneğin yedisi balgam, yedisi BAL, dördü AÇS, ikisi ETA örnekleridir. Pozitif örneklerin elde edildiği hastaların tamamında TMP-SMZ tedavisinde tam klinik yanıt elde edilmiştir.

Sonuç olarak, PcP tanısında nPCR uygulamasının ucuz, kolay uygulanabilen ve hızlı bir yöntem olarak erken tanıda önemli olduğu düşünülmüştür.

PBP-26

Nazal Polip Gelişiminde Mantarlarının Rolünün Moleküler Yöntemler Kullanılarak Gösterilmesi

Utku Aydil¹, Ayşe Kalkancı², Alper Ceylan¹, Elife Berk², Semra Kuştimur¹, Sabri Uslu²

¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları AD, Ankara.

²Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara.

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından (no: 01/2005-81) desteklenen bu çalışmanın amacı; nazal polip gelişiminde hangi mantar türlerinin etkili olduğunu gösterebilmek için kültür, seroloji ve moleküler yöntemlerin karşılaştırmalı olarak kullanılmasıdır.

Kronik rino-sinüziti olan 30 nazal polipli hasta ile 18 polip bulunmayan kontrol hastasından serum, nazal sürüntü ve doku biyopsisi örnekleri ameliyathane koşullarında alınmıştır. Doku örneklerinde mantarların varlığının gösterilmesi için pan-fungal polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve DNA dizilemesi yapılmıştır. Gerçek zamanlı PCR'da, internal transcribed spacer (ITS) primerleri kullanılmıştır. DNA varlığı, SYBR Green kullanılan erime eğrisi analizi ile gösterilmiştir. Mantar DNA'sı görülen örneklerde DNA dizilemesi otomatik dizileme cihazı ile yapılmıştır (Metis Biyoteknoloji, Ankara). Hasta serum örneklerinde ve doku yıkama sıvısında *Aspergillus* galaktomannan antijeni ELISA (Platelia *Aspergillus*, BioRad, Fransa) ve biyopsi örneklerinde kültür ile mantar elemanları aranmıştır.

Hasta grubundaki 30 olgudan 15'inde (%50) ve kontrol grubundaki 18 olgudan ikisinde (%11) mantarların varlığı panfungal PCR ile gösterilmiştir (p=0.016).

Yöntem	Hasta		Kontrol		p değeri
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	
Mikroskopi (Sürüntü)	14	16	1	17	0.008
Kültür (Doku)	8	22	0	18	0.018
ELISA(Doku)	9	21	2	16	>0.05
PCR ve dizileme	15	15	6	12	>0.05
Toplam	15	15	2	16	0.016

Hasta grubunda, doku biyopsi örneklerinin sekizinde kültürden küf mantarları izole edilmiştir (1 *Aspergillus flavus*, 2 *A.niger*, 1 *Aspergillus spp*, 1 *Cladosporium sp*, 2 *Penicillium spp*, 1 *P.crysogenum*). Pan-fungal DNA'sı pozitif bulunan 15 hasta örneğinde ve kontrol grubundan iki örnekte DNA dizileme sonucuna göre tür tanımları yapılmıştır. Bu örneklerden ikisi *Aspergillus spp*, biri *A.flavus*, biri *A.japonica*, ikisi *A.niger*, biri *Cladosporium spp*, biri *Debaryomyces hansenii*, biri *Neurospora crassa*, ikisi *Penicillium spp*, biri *P.crysogenum*, dördü *Pichia spp*, biri *Ustilago maydis* olarak tanımlanmıştır.

Nazal polipli olgulardaki mantar kolonizasyonu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Nazal polip etiyolojisinde mantarların rolü olabileceği vurgulanmıştır.

İnvaziv Mantar İnfeksiyonlarının Tanısında Pan-Fungal Moleküler Yaklaşım

Sibel Aydoğan, Elife Berk, Ayşe Kalkancı, Semra Kuştimur

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Son yıllarda invaziv fungal infeksiyonların görülme sıklığı dramatik olarak artmıştır. Bu infeksiyonların erken ve doğru tanısı, hastalığın mortalitesini azaltmaktadır. Tanıda klasik yöntemlerin yetersiz kaldığı görülmektedir.

Bu çalışmanın amacı, pan-fungal bir yaklaşım ile gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR), galaktomannanı saptamaya yönelik hazırlanmış ELISA testi eşliğinde, hastalarda fungal infeksiyonların tanısı ve izlemine katkısını değerlendirmektir.

Çalışmaya, 2005-2006 yılları arasında laboratuvarımıza gönderilen 215 hastaya ait 428 örnek (kan, bronkoalveolar lavaj, doku biyopsi örnekleri) dahil edilmiştir. Serum ve bronkoalveolar lavaj örneklerinde galaktomannan antijen tespiti Platelia Aspergillus (BioRad, Fransa) kiti ile yapılmış, tam kan örneklerinde real time PCR (Metis Biyoteknoloji, Ankara) kullanılarak mantarların DNA'sı gösterilmiştir. Pan-fungal PCR için; "internal transcribed spacer" (ITS) bölgesini çoğaltan ITS1 ve ITS4 primerleri birinci turda, ITS1 ve ITS2 primerleri ikinci turda kullanılmıştır.

Toplam 428 örneğin 41'inde (%9.5) galaktomannan antijen pozitifliği, 49'unda (%11.4) da pan-fungal PCR pozitifliği saptanmıştır. PCR pozitif olan 49 örneğin 9'unda (%18.3) galaktomannan antijeni pozitifdir. Bu sonuç, hepsi nötropenik olan bu dokuz hastanın klinik ve radyolojik bulguları ile birlikte değerlendirildiğinde, invaziv aspergilloz olasılığını akla getirmiştir.

Sonuç olarak, invaziv mantar infeksiyonlarının erken tanısı, gereksiz antifungal tedavi uygulamasını azaltmak açısından önemlidir. Dolayısıyla moleküler yöntemlerin standart laboratuvar tanı yöntemleri (direk mikroskopik inceleme, histopatolojik inceleme, kültür, direk antijen tespiti) ile birlikte uygulanması, tanıya hızlı, duyarlı ve özgül bir yaklaşım sağlayacaktır.

4. ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

25 – 28 Eylül 2006
SHERATON OTEL & CONVENTION CENTER
ANKARA

POSTER İNDEKSİ

26 NİSAN 2006 ÇARŞAMBA / POSTER SUNUMLARI

POSTER NO	KONU BAŞLIĞI	SAYFA NO
PÇV-1	Batı Nil Virusu'nun Saptanmasında VecTest Uygulamaları Koray Ergünay ¹ , Nurdan Özer ² , Fatih Mehmet Şimşek ² , Sinan Kaynaş ² , Şemsettin Ustaçelebi ¹ 1Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. 2Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ekoloji Anabilim Dalı, Ankara.	177
PÇV-2	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile HBV DNA Kantitasyonu ve HBV DNA YMDD Motif Mutasyonu Analizi Harun Ağca ¹ , Arzu Sayiner ¹ , Aylin Şengönül ¹ , İlkay Şimşek ² , Mesut Akarsu ² 1Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İnciraltı, İzmir. 2Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı, İnciraltı, İzmir.	178
PÇV-3	Beyin Omurilik Sıvısında Üç Farklı PCR Yöntemi ile HSV DNA Saptanması İmre Altuğlu ¹ , Aysin Zeytinoğlu ¹ , Hadiye Şirin ² , Nur Yüceyar ² , Selda Erensoy ¹ 1Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, İzmir. 2Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji AD, İzmir.	179
PÇV -4	Isparta'da Hepatit B Virus Genotip Dağılımı Selçuk Kaya, Emel Sesli Çetin, Buket Cicioğlu Arıdoğan, Süleyman Önal, Mustafa Demirci Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta.	180
PÇV -5	Aseptik Menenjitli Hastaların BOS Örneklerinde Enterovirus ve Herpesvirusların PCR Yöntemiyle Araştırılması Esmâ Saatçi Deniz ¹ , Selma Gökahmetoğlu ¹ , Mustafa Öztürk ² , Yusuf Özbal ¹ , Mehmet Doğanay ³ 1Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri. 2Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri. 3Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri.	181

PÇV -7	<p>Düşük Düzeyde Saptanan Anti HCV Pozitifliğinde HCV RNA Düzeylerinin Değerlendirilmesi</p> <p>İlhan AFŞAR, Aslı Gamze ŞENER, Berna Gönül, Nükhet KURULTAY</p> <p>Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Yeşilyurt, İzmir.</p>	182
PÇV -8	<p>SSPE'li Hastaların Serum ve BOS Örneklerinde Virusların Taranması ve Sitokin Ölçümleri</p> <p>Yasemin Bulut¹, Nimet Kabakuş², Ahmet Gödekmerdan³, Neşe Kurt⁴, Mehmet Yapar⁵</p> <p>1Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Elazığ 2Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Çocuk Hastalıkları, Çocuk Nörolojisi BD, Elazığ. 3Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji AD, Elazığ. 4Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Elazığ. 5GATA Viroloji BD, Ankara.</p>	183
PÇV -9	<p>Akut Alt Solunum Yolu İnfeksiyonu Olan Bebeklerde Solunum Viruslarının PCR İle Araştırılması</p> <p>Yasemin Bulut¹, Yaşar Şen², Ahmet Gödekmerdan³, Şükran Özdiller², Zülal Aşçı Toraman¹</p> <p>1Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Elazığ. 2Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Çocuk Hastalıkları AD, Elazığ. 3Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji AD, Elazığ.</p>	184
PÇV -10	<p>IL-10 1082 Promotor Polimorfizmi ve HPV-33 Pozitifliği Arasındaki İlişkilerin Araştırılması</p> <p>Yasemin BULUT¹, Ebru ETEM², Nusret AKPOLAT³, Halit ELYAS², Fügen YARKIN⁴</p> <p>1Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Elazığ. 2Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, Elazığ. 3Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji AD, Elazığ. 4Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Adana.</p>	185
PÇV -11	<p>Hepatit B Virus DNA Kantasyonunda Cobas AmpliPrep/TaqManHBV DNA Testinin Değerlendirilmesi</p> <p>Eylem Karataş, Tuba Karataş, Selda Erensoy</p> <p>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir</p>	186

PÇV -12	HBV DNA Kantitasyonunda b-DNA ile Gerçek Zamanlı PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması Selma Gökahmetoğlu, Esmâ Saatçi Deniz, Yusuf Özbal, M. Altay Atalay Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.	187
PÇV -13	Türk Hastalarda İnsan Papillomavirus Tip 16'nın L1 ve LCR Bölgelerinin DNA Dizi ve Filogenetik Analizi Gülendam Bozdayı1, Bora Doğan1, Serdar Tuncer2, A.Reşat Türkyılmaz3, Aydan Biri5 , Yusuf Kemaloğlu4, Seyyal Rota1 1Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Ankara. 2Metis Bioteknoloji Ltd, Ankara. 3Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hepatoloji Enstitüsü, Ankara. 4Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz AD, Ankara. 5Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları AD, Ankara.	188
PÇV -14	Hepatit C Virus Genotiplerinin Inno-Lipa ve Sekans Analizi İle Belirlenmesi Mustafa Altındış, Orhan Cem Aktepe, Zafer Çetinkaya, İhsan Hakkı Çiftçi Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Afyonkarahisar.	189
PÇV -15	Ülkemizde Tanımlanmış İlk "Vaccine Escape" Mutasyon Olgusu Tufan Kutlu1, Lebriz Yüksel Soyca2, Ersin Karataylı3, Ahmet Reşat Türkyılmaz3, Cihan Yurdaydın3, A.Mithat Bozdayı3 1İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Çocuk Hastalıkları AD, İstanbul. 2Haliç Üniversitesi, İstanbul. 3Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji BD, Hepatoloji Enstitüsü, Ankara.	190

PÇV -16	<p>Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Yönteminin BK Virus İnfeksiyonlarının Tanısında Kullanımı</p> <p>Derya Mutlu¹, Dilek Çolak¹, Uğur Yavuzer², Murat Tuncer³, Sema Akman⁴, Bahar Akkaya⁵, Hüseyin Koçak³, Hadiye Demirbakan¹, Ayfer Gür Güven⁴, Gülten Karpuzoğlu⁵, Meral Gültekin¹</p> <p>1 Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Antalya. 2 Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD, Antalya. 3 Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Nefroloji BD, Antalya. 4 Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediyatrik Nefroloji AD, Antalya. 5 Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji AD, Antalya.</p>	191
PÇV -17	<p>Hematolojik Malignitesi, Solid Tümörü Olan veya Kök Hücre Transplantasyonu Yapılan Pediyatrik Hastalarda Parvovirus B19 İnfeksiyonlarının Prospektif İzlemi: Ön Çalışma</p> <p>Derya Mutlu¹, Alphan Küpesiz², Dilek Çolak¹, Volkan Hazar², Gözde Öngüt¹, Gülsün Tezcan², Gül Aydın¹, Akif Yeşilipek², Meral Gültekin¹</p> <p>1 Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya. 2 Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediyatrik Hematoloji Onkoloji Anabilim Dalı, Antalya.</p>	192
PÇV -18	<p>Hepatit C'li Hastalarda Viral Yük ile Malondialdehid ve Antioksidan Enzimlerin İlişkisi</p> <p>Selçuk Kaya</p> <p>Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Isparta.</p>	193
PÇV -19	<p>Hepatit B Virus (HBV) Serolojisinde Salt Anti-HBc Pozitifliğinin Okült HBV İnfeksiyonu Yönünden Önemi</p> <p>Aslı Gamze Şener¹, İlhan Afşar¹, Sevin Kırdar², Nükhet Kurultay¹</p> <p>1Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir. 2Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Aydın.</p>	194

PÇV -20	Kronik Hepatit C Tedavisine Yanıtı Belirlemede TNF-Alfa (308, 238) ve IL-10 (-1082, -627) Gen Polimorfizminin Rolü Burcu Aksoy ¹ , Cihan Yurdaydın ² , Filiz Emir ² , Ramazan İdilman ² , Özden Uzunalımoğlu ² , Hakan Bozkaya ² , A.Mithat Bozdayı ² 1Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara. 2Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü, Ankara Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji BD, Ankara.	195
PÇV -21	Lamivudin Tedavisi Sırasında Gelişen ve Adefovir Dipivoxil Tedavisine Çapraz Direnç Gösteren Yeni Bir Mutasyon Paterni Ersin Karataylı, Selim Karayalçın, Handan Kayhan, A. Reşat Türkyılmaz, Cihan Yurdaydın, A. Mithat Bozdayı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji BD, Hepatoloji Enstitüsü, Ankara.	196
PÇV -22	HCV RNA Kantitasyonunda Versant HCV RNA 3.0 (bDNA) Testinin Performansının Değerlendirilmesi: Ön Çalışma İmre Altuğlu ¹ , Pınar Şamlıoğlu ¹ , Hatice Şahin ² , Selda Erensoy ¹ 1Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, İzmir. 2Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Eğitimi AD, İzmir,	197

27 NİSAN 2006 PERŞEMBE / POSTER SUNUMLARI

POSTER NO	KONU BAŞLIĞI	SAYFA NO
PBP-1	İmmün Yetmezlikli Bir Hastada Yaygın Mycobacterium bovis BCG İnfeksiyonunun Laboratuvar Tanısı Cengiz Çavuşoğlu ¹ , Pınar Akıncı ¹ , İlknur Söyler ¹ , Nuri Bayram ² , Fadil Vardar ² 1Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir. 2Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Bornova, İzmir.	199
PBP-2	Hastanemizde İzole Edilen İlk İmipeneme Dirençli Bacteroides fragilis: Fenotipik ve Genotipik İrdeleme Nurver (Toprak) Ülger ¹ , Cenk Aral ² , Arzu İlki ¹ , Ayşe Özer ² , Güner Söyletir ¹ 1 Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul. 2 Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.	200
PBP-3	Pigment Oluşturan İki Mikobakteri İzolatı: Yeni Mikobakteri Türleri Olabilir Mi? Cengiz Çavuşoğlu Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir.	201
PBP-4	Hızlı Rifampisin ve İzoniazid Direnci Saptayan Genotype MTBDR Testinin Performansının Değerlendirilmesi Cengiz Çavuşoğlu, Ajda Turhan, Pınar Akıncı, İlknur Söyler Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir.	202
PBP-5	Tüberküloz Hastalığının Tanısında Ehlich Ziehl Neelsen Boyama, BACTEC 460 TB ve MTD Gen Prob Yöntemlerinin Karşılaştırılması Sevim MEŞE, Tuncer ÖZEKİNCİ, Selahattin ATMACA, Kadri GÜL Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Diyarbakır.	203

PBP-6	<p>Türkiye’de İki Olguda Entamoeba moshkovskii Varlığı</p> <p>Mehmet Tanyüksel¹, Mustafa Ulukanlıgil², Zeynep Güçlü¹, Engin Araz¹, Özgür Koru¹, William A Petri, Jr³</p> <p>¹GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Tıbbi Parazitoloji BD, Ankara. ²Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Şanlıurfa. ³Virginia Üniversitesi, İnfeksiyon Hastalıkları Bölümü, Charlottesville, Virginia, ABD.</p>	204
PBP-7	<p>Multipleks PCR Yöntemi Mide Biopsilerinde Bulunan Helicobacter pylori Suşlarının Genotip Analizi İçin Avantajlı Bir Yöntem Midir?</p> <p>Bora Kazım Bölek, Barık Salih</p> <p>Fatih Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İstanbul.</p>	205
PBP-8	<p>Helicobacter pylori’nin İzositrat Dehidrogenaz Enzimi, İmmünojenik Potansiyele Sahip Olup Gastrit ve Ülser Hastalarının Normal Vakalardan Ayırt Edilmesini Sağlayabilecek Bir Antijendir</p> <p>Niyaz Ahmed¹, M. Abid Hussain¹, Shaik A. Naveed², Irshad Ahmed², S. Manjulata Devi¹, Barık Salih³, Leonardo A. Sechi⁴, Francis Megraud⁵</p> <p>¹Pathogen Evolution Group, Centre for DNA Fingerprinting and Diagnostics (CDFD), Hyderabad 500076, India. ²Centre for Liver Research and Diagnostics, Deccan College of Medical Sciences and Allied Hospitals, Hyderabad, India. ³Fatih Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji/Mikrobiyoloji Bölümü, İstanbul. ⁴Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione Microbiologia Sperimentale e Clinica, Facoltà di Medicina, Università Degli Studi de Sassari, Viale S. Pietro, 07100 Sassari, Italy. ⁵INSERM ERI 10 and Centre National de Référence des Campylobacters et Hélicobacters, Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Pellegrin, Université Victor Segalen Bordeaux 2, France.</p>	206
PBP-9	<p>2002-2005 Yılları Arasında İzole Edilen Metisilin Dirençli Staphylococcus aureus Suşlarının Moleküler Epidemiyolojisi</p> <p>Alper Tekeli¹, Esra Koyuncu¹, İştah Dolapçı¹, Özay Arıkan Akan², Z. Ceren Karahan¹</p> <p>¹Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. ²Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İbn-i Sina Hastanesi Merkez Bakteriyoloji laboratuvarı, Ankara.</p>	207

PBP-10	<p>BOS Örneklerinde Mycobacterium tuberculosis Saptanmasında Gerçek Zamanlı PCR, Kültür ve Mikroskopik Yöntemlerin Karşılaştırılması</p> <p>Canan Külah, Füsün Beğendik Cömert, Elif Aktaş, Nagehan Özlü, Osman Aydın</p> <p>Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak.</p>	208
PBP-11	<p>Çevresel Enterokoklarda Makrolidlere ve Linkozamidlere Direnç Mekanizmaları</p> <p>Erman Oryaşın¹, Gamze Başbülbul¹, Halil Bıyık¹, Sevin Kırdar², Neriman Aydın², Bülent Bozdoğan²</p> <p>1Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Aydın. 2Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Aydın.</p>	209
PBP-12	<p>Chlamydia trachomatis Tanısında Üretral Sürüntü ve İlk Akım İdrar Örneklerinde Real-time PZR ve DFA Metodlarının Karşılaştırılması</p> <p>Ayla Özcan¹, Derya Mutlu¹, Asil Öztekin³, Orçun Çelik², Dilara Ögünç¹, Gözde Öngüt¹, Tibet Erdoğdu², Filiz Günseren³, Dilek Çolak¹</p> <p>1Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya. 2Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Antalya. 3Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.</p>	210
PBP-13	<p>Helicobacter pylori Klinik İzolatlarında CagA Prevalansı</p> <p>Zeynep Sarıbaş¹, Hülya Demir², İncinur Saltık Temizel², Halis Şimşek³, Hasan Özen², Yakut Akyön Yılmaz¹</p> <p>1Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Ankara. 2Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatri AD, Gastroenteroloji Ünitesi, Ankara. 3Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Gastroenteroloji Ünitesi, Ankara.</p>	211

PBP-14	<p>Mikobakterilerin Tür Düzeyinde Tanımlanması Amacıyla Üç Yöntemin Karşılaştırılması</p> <p>Alpaslan Alp¹, Gülnur Tarhan², Zeynep Sarıbaş¹, İsmail Ceyhan²</p> <p>1Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. 2Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Tüberküloz Referans laboratuvarı, Ankara.</p>	212
PBP-15	<p>Üç Farklı Mikobakteriyel DNA İzolasyon Yönteminin Karşılaştırılması</p> <p>Alpaslan Alp, Şehnaz Özyavuz Alp, Zeynep Sarıbaş, Gülşen Hasçelik</p> <p>Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.</p>	213
PBP-16	<p>Balgam Örneklerinde Mycobacterium tuberculosis DNA'sının Beş Farklı Ekstraksiyon Metodu Kullanılarak "In-House" PCR Yöntemiyle Değerlendirilmesi</p> <p>Gülnur Tarhan¹, İsmail Ceyhan¹, Hülya Şimşek¹, Serdar Tuncer²</p> <p>1Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara. 2METİS Biyoteknoloji Limited Şirketi, Ankara.</p>	214
PBP-17	<p>Kardeş Kistik Fibrozisli Hastalardan İnfeksiyon Etkeni Olarak İzole Edilen Staphylococcus aureus Suşlarının Moleküler Tiplendirmesi</p> <p>Olca Özçakır¹, Özgen Eser¹, Ebru Yalçın², Deniz Doğru², Zayre Erturan³, Burçin Şener¹, Uğur Özçelik², Nural Kiper²</p> <p>1 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Ankara. 2 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi, Göğüs Hastalıkları AD, Ankara. 3İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Çapa, İstanbul.</p>	215
PBP-18	<p>Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilokoklarda mecA Gen Varlığının Araştırılması</p> <p>İhsan Hakkı Çiftçi, Zafer Çetinkaya, Orhan Cem Aktepe, Mustafa Altındış</p> <p>Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar.</p>	216

PBP-19	<p>Hastanemizde İzole Edilen Vankomisin Dirençli Enterococcus faecium İzolatlarının Moleküler Analizi</p> <p>Abdullah Kılıç, Zeynep Şenses, Hakan Aydoğan, Ahmet Başustaoğlu</p> <p>GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, 06018, Etlik, Ankara.</p>	217
PVP-20	<p>Alangüllü (Aydın) Jeotermal Kaynağından İzole Edilen Termofilik Bakterilerin 16S rRNA Analizi ile Tanımlanması</p> <p>Gamze Başbülbul, Erman Oryaşın, Halil Bıyık, Kubilay Metin, Bülent Bozdoğan</p> <p>Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Aydın</p>	218
PBP-21	<p>Parafine Gömülmüş Arşiv Dokulardan Nükleik Asit Ekstraksiyonu İçin Standart Fenol-Kloroform ve Spin Kolonlu Ticari Bir Yöntemin Karşılaştırılması</p> <p>Koray Ergünay¹, Pınar Yurdakul¹, Gaye Güler Tezel², Esra Büber³, Erdem Karabulut⁴, Şemsettin Ustaçelebi¹</p> <p>1 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. 2 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Ankara. 3 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara. 4 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Ankara.</p>	219
PBP-22	<p>Multipleks PCR Yöntemi ile Stafilokoklarda Metisilin Direncinin Moleküler Yöntemlerle Saptanması ve SCCmec Tiplendirmesi</p> <p>Emine Sevgican¹, Cüneyt Özakin², Melda Sınırtaş², Suna Gedikoğlu²</p> <p>1Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları AD, Bursa. 2Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Bursa.</p>	220

PBP-23	<p>Helicobacter pylori Suşlarının "Cag Pathogenicity-Island" ve Diğer Virulan Gen Bölgelerinin Genetik Profili</p> <p>Barık Salih1, M. Fatih Abasıyanık1, Niyaz Ahmed2</p> <p>1Fatih Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İstanbul. 2Pathogen Evolution Group, Laboratory of Molecular and Cell Biology, Centre for DNA Fingerprinting and Diagnostics (CDFD), Hyderabad, India.</p>	221
PBP-24	<p>Risk Gruplarında Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Coxiella burnetii Saptanması</p> <p>Mete Eyigör, Şükrü Kırcan, Berna Gültekin, Senem Yaman, Serten Tekbıyık, Neriman Aydın</p> <p>Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Aydın.</p>	222
PBP-25	<p>Pneumocystis jirovecii Pnömonisi Tanısına Yönelik Polimeraz Zincir Reaksiyonu Uygulaması</p> <p>Elife Berk, Sibel Aydoğan, Ayşe Kalkancı, Semra Kuştimur</p> <p>Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.</p>	223
PBP-26	<p>Nazal Polip Gelişiminde Mantarlarının Rolünün Moleküler Yöntemler Kullanılarak Gösterilmesi</p> <p>Utku Aydil1, Ayşe Kalkancı2, Alper Ceylan1, Elife Berk2, Semra Kuştimur1, Sabri Uslu2</p> <p>1Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları AD, Ankara. 2Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara.</p>	224
PBP-27	<p>İnvaziv Mantar İnfeksiyonlarının Tanısında Pan-Fungal Moleküler Yaklaşım</p> <p>Sibel Aydoğan, Elife Berk, Ayşe Kalkancı, Semra Kuştimur</p> <p>Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.</p>	225

4. ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

25 – 28 Eylül 2006
SHERATON OTEL & CONVENTION CENTER
ANKARA

İNDEKS

SOYAD, AD	SAYFA NO
ABACIOĞLU, H.	16
ABASIYANIK, M. F.	221
AFŞAR, İ.	182, 194
AĞCA, H.	178
AHMED, İ.	206
AHMED, N.	206, 221
AKAN, Ö. A.	207
AKARSU, M.	178
AKINCI, P.	199, 202
AKKAYA, B.	191
AKMAN, S.	191
AKPOLAT, N.	185
AKSOY, B.	195
AKTAŞ, E.	208
AKTEPE, O. C.	189, 216
ALP, A.	59, 212, 213
ALP, Ş.	174, 213
ALTINDIŞ, M.	189, 216
ALTUĞLU, İ.	179, 197
ARAL, C.	200
ARAZ, E.	204
ARIDOĞAN, B. C.	180
ARIKAN, S.	174
ATALAY, M. A.	187
ATMACA, S.	203
AYDIN, G.	192
AYDIN, N.	169, 209
AYDIN, N.	222
AYDIN, N. G.	173, 174
AYDIN, O.	208
AYDİL, U.	224
AYDOĞAN, H.	217
AYDOĞAN, S.	223, 225
BADUR, S.	32
BAŞAK, S.	169
BAŞBÜLBÜL, G.	209, 218
BAŞUSTAOĞLU, A.	217
BAYRAM, N.	199
BERK, E.	223, 224, 225
BIYIK, H.	209, 218
BİRİ, A.	188
BOZDAYI, A. M.	51, 91, 170, 171, 172, 190, 195, 196
BOZDAYI, G.	188
BOZDOĞAN, B.	48, 209, 218
BOZKAYA, H.	170, 195
BÖLEK, B. K.	205
BULUT, Y.	183, 184, 185
BÜBER, E.	219

CEYHAN, İ.	212, 214
CEYLAN, A.	224
CÖMERT, F. B.	208
ÇAVUŞOĞLU, C.	109, 201, 202
ÇELİK, O.	210
ÇETİN, E. S.	180
ÇETİNKAYA, Z.	189, 216
ÇİFTÇİ, İ. H.	189, 216
ÇOBAN, Ş.	171
ÇOLAK, D.	63, 191, 192, 210
DEMİR, H.	211
DEMİRBAKAN, H.	191
DEMİRCİ, M.	180
DENİZ, E. S.	181, 187
DEVI, S. M.	206
DOĞAN, B.	188
DOĞANAY, M.	181
DOĞRU, D.	215
DOLAPÇI, İ.	207
ELYAS, H.	185
EMİR, F.	195
ERCİS, S.	173
ERDOĞDU, T.	210
ERENSOY, S.	89, 179, 186, 197
ERGÜL, A. A.	170
ERGÜL, Z.	170, 171
ERGÜNAY, K.	177, 219
ERTURAN, Z.	215
ESEN, N.	55
ESER, Ö.	173, 215
ETEM, E.	185
EYİGÖR, H.	169
EYİGÖR, M.	169, 222
GEDİKOĞLU, S.	220
GÖDEKMERDAN, A.	183, 184
GÖKAHMETOĞLU, S.	181, 187
GÖNÜL, B.	182
GRASER, Y.	104
GÜÇLÜ, Z.	204
GÜL, K.	203
GÜLTEKİN, B.	169, 222
GÜLTEKİN, M.	191, 192
GÜNEL, C.	169
GÜNSEREN, F.	210
GÜVEN, A. G.	191
HASÇELİK, G.	173, 213
HASDEMİR, U.	119
HAZAR, V.	192
HUSSAIN, M. A.	206

İDİLMAN, R.	171, 195
İLKİ, A.	200
KABAKUŞ, N.	183
KALKANCI, A.	132, 223, 224, 225
KARABULUT, E.	219
KARAHAN, Z. C.	207
KARATAŞ, E.	186
KARATAŞ, T.	186
KARATAYLI, E.	172, 190, 196
KARAYALÇIN, S.	196
KARPUZOĞLU, G.	191
KAYA, S.	180, 193
KAYHAN, H.	172, 196
KAYNAŞ, S.	177
KEMALOĞLU, Y.	188
KILIÇ, A.	117
KIRDAR, S.	194, 209
KIRKAN, Ş.	222
KİPER, N.	215
KOCAGÖZ, S.	125
KOCAGÖZ, T.	115
KOÇAK, H.	190
KORKMAZ, M.	160
KORU, Ö.	204
KOYUNCU, E.	207
KURT, N.	183
KURULTAY, N.	182, 194
KUŞTİMUR, S.	223, 224, 225
KUTLU, T.	190
KÜLAH, C.	208
KÜPESİZ, A.	192
LECLERCQ, R.	45
LINSCOTT, A. J.	105
MEGRAUD, F.	206
MENEMENLİOĞLU, D.	174
MEŞE, S.	203
METİN, K.	218
MİDİLLİ, K.	101
MUTLU, D.	191, 192, 210
NAAS, T.	86
NAVEED, S. A.	206
ORYAŞIN, O.	209, 218
ÖĞÜNÇ, D.	210
ÖNAL, S.	184
ÖNGÜT, G.	192, 210
ÖZAKIN, C.	220
ÖZBAL, Y.	181, 187
ÖZCAN, A.	66, 210
ÖZÇAKIR, O.	215

ÖZÇELİK, U.	215
ÖZDİLLER, Ş.	184
ÖZEKİNCİ, T.	203
ÖZEN, H.	211
ÖZER, A.	200
ÖZER, N.	177
ÖZLÜ, N.	208
ÖZTEKİN, A.	210
ÖZTÜRK, M.	181
PETRI, W. A.	204
PINAR, A.	40
ROTA, S.	188
SALİH, B.	205, 206, 221
SANCAK, B.	150, 174
SARAÇLI, M. A.	144
SARIBAŞ, Z.	211, 212, 213
SAYINER, A. A.	75, 178
SECHI, L. A.	206
SERTÖZ, R. Y.	98
SEVGİCAN, E.	220
SINIRTAŞ, M.	220
SOYCAN, L. Y.	190
SÖYLER, İ.	199, 202
SÖYLETİR, G.	200
ŞAHİN, H.	197
ŞAMLIOĞLU, P.	197
ŞARDAN, Y. Ç.	37
ŞEN, Y.	184
ŞENER, A. G.	182, 194
ŞENER, B.	215
ŞENGÖNÜL, A.	178
ŞENSES, Z.	217
ŞİMŞEK, F. M.	177
ŞİMŞEK, HALİS	211
ŞİMŞEK, HÜLYA	214
ŞİMŞEK, İ.	178
ŞİRİN, H.	179
TANYÜKSEL, M.	155, 204
TARHAN, G.	212, 214
TEKBİYİK, S.	222
TEKELİ, A.	207
TEMİZEL, İ. S.	211
TEZCAN, G.	192
TEZEL, G. G.	219
TORAMAN, Z. A.	184
TUNCER, M.	191
TUNCER, S.	128, 165, 188, 214
TURHAN, A.	202
TÜRKYILMAZ, A. R.	172, 188, 190, 196

ULUKANLIGİL, M.	204
USLU, S.	224
USTAÇELEBİ, Ş.	177, 219
UZUNALIMOĞLU, Ö.	170, 171, 195
ÜLGER, N. T.	200
VARDAR, F.	199
YALÇIN, E.	215
YALÇIN, K.	170
YAMAN, S.	222
YAPAR, M.	183
YARKIN, F.	185
YAVUZER, U.	191
YENEN, O. Ş.	26
YEŞİLİPEK, A.	192
YILMAZ, G.	101
YILMAZ, Y. A.	211
YURDAKUL, P.	219
YURDAYDIN, C.	170, 171, 172, 190, 195, 196
YÜCEYAR, N.	179
ZEYTİNOĞLU, A.	82, 179