



Ankara Mikrobiyoloji Derneği



Hacettepe Üniversitesi
Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve
Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi

24-28 Haziran 2008

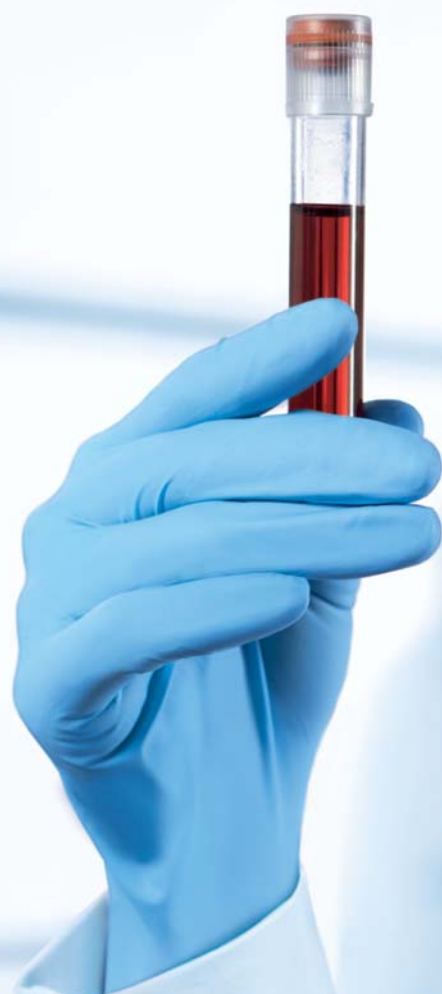
Bilkent Otel ve Konferans Merkezi,
Ankara



Program ve
Bildiri Özetleri Kitabı

Molecular diagnostics sample and assay technologies by QIAGEN

Advance healthcare



Rely on QIAGEN molecular diagnostics sample and assay technologies for:

- Preanalytical sample preparation
- Pathogen detection assays*
- HLA and haplotyping*
- Comprehensive service and support
- Automated sample preparation

Contact QIAGEN today or visit www.qiagen.com/goto/MDx.

ATQ



Sample & Assay Technologies

5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi

24-28 Haziran 2008
Bilkent Otel ve Konferans Merkezi, Ankara

Program ve Bildiri Özetleri Kitabı



5. Ulusal Moleküler ve
Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi

24-28 Haziran 2008
Bilkent Otel ve Konferans Merkezi, Ankara

Organizasyon Sekreterliği



Kubaba Turizm Seyahat Acentası
Güniz Sokak No: 32 / 1-2 06700 Kavaklıdere Ankara
Tel: 0312 467 00 44 / 45 / 47

Basım Tarihi
2008

Grafik Tasarım ve Uygulama
İnova | www.inovatasarim.com



“Beni görmek demek mutlaka yüzümü görmek demek değildir. Benim fikirlerimi, benim duygularımı anlıyorsanız ve hissediyorsanız bu yeterlidir.”



İÇİNDEKİLER

KURULLAR	VII
GENEL BİLGİLER	VIII
KONGRE ve KURS PROGRAMI	X
24 Haziran 2008	XI
25 Haziran 2008	XII
26 Haziran 2008	XII
27 Haziran 2008	XIII
28 Haziran 2008	XIV
KONFERANSLAR	1
KNF1	2
Her şeyin bir sonu var; immün yanıtın da.. Görevini tamamlayan immün yanıt nasıl duruyor? Prof. Dr. Selim Badur	
KNF2	7
Moleküler biyolojide kullanılan yaşamın akıllı robotları Prof. Dr. Tanıl Kocagöz	
KNF3	11
SeptiFast: A new rapid and sensitive PCR method for the detection and identification of bacterial and fungal pathogens in the blood. Gorm Lisby, MD, PhD	
KNF4	12
Genomic Analyzer Dr. Rick Tearle	
KNF5	13
Biyosensörler Prof. Dr. Hüseyin Avni Öktem	
MİNİ KONFERANS	15
MKF	
İnsan papillomavirus aşılarında son durum Prof. Dr. Dürdal Uş	
AKŞAM GÖSTERİMİ	21
AG	
Büyük Patlamadan Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi'ne Saçılan Yıldız Tozları Prof. Dr. Tanıl Kocagöz	
UZMANIYLA TARTIŞALIM	23
UT	
Moleküler tiplendirme yöntemlerinin hastane enfeksiyonlarının kontrolündeki yeri Prof. Dr. Prof. Dr. Rıza Durmaz	24
Moleküler tiplendirme yöntemlerinin hastane enfeksiyonlarının kontrolündeki yeri: Güncel bilgiler ışığında genel bir bakış Y. Doç. Dr. Çağatay Acuner	28

PANELLER	45
PNL1: Moleküler yöntemlerin mikolojiye katkıları	
Moleküler yöntemlerin maya mantarlarının taksonomisine getirdikleri	46
Doç. Dr. Ayşe Kalkancı	
Mantarların genotiplendirme çalışmalarında güncel durum	49
Prof. Dr. Nedret Koç	
Fungal virülans faktörlerinin moleküler temelleri	55
Prof. Dr. Mine Yücesoy	
PNL2: Moleküler yöntemlerde kalite kontrol ve akreditasyon	
Laboratuvarda akreditasyon sürecine genel bakış	63
Prof. Dr. Hakan Abacıoğlu	
Moleküler testlerde yöntem onayı ve kalite kontrol	64
Doç. Dr. Arzu Sayiner	
Laboratuvar akreditasyonunda altyapı	66
Y. Doç. Dr. Alpay Özbek	
PNL4: Kan merkezlerinde moleküler yöntemlerin kullanımı	
Tarama testlerinde moleküler yöntemler	69
Uzm. Dr. Banu Pelit Kılıç	
İmmünohematolojik testlerde moleküler yöntemler	71
Doç. Dr. İdil Yenicesu	
PNL5: Moleküler yöntemlerin parazit enfeksiyonlarındaki değeri	
İmmün sistemi baskılanmış hastalarda toxoplasmosis tanısında moleküler yöntemler	77
Prof. Dr. Yüksel Gürüz	
Leishmaniasis tanısına ve ülkemizdeki parazitlerin tür tayinine moleküler yaklaşım	78
Prof. Dr. Seray Özensoy Toz	
Moleküler yöntemlerin trichomoniasis tanısına getirdiği yenilikler	82
Doç. Dr. Hatice Ertabaklar	
PNL6: Önem kazanan bazı mikroorganizmaların Türkiye ve dünyadaki moleküler epidemiyolojisinde güncel durum	
Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>	85
Doç. Dr. Abdullah Kılıç	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	91
Doç. Dr. M. Ali Saraçlı	
İnsan papillomavirusları	96
Y. Doç. Dr. Kenan Şener	
<i>Entamoeba histolytica</i>	104
Prof. Dr. Mehmet Tanyüksel	
PNL7: Bulaşıcı hastalıkların sürveyansında moleküler yöntemlerin yeri ve önemi	
Bulaşıcı hastalıkların sürveyansında moleküler yöntemler neden gerekli?	109
Y. Doç. Dr. Alper Akçalı	
Dünyada ve ülkemizde gıda ve su kaynaklı enfeksiyonların sürveyansında moleküler epidemiyolojik yöntemler	113
Uzm. Dr. Belkıs Levent	
SÖZEL BİLDİRİLER	119
POSTER BİLDİRİLER	129
KONGREYE DESTEK VEREN KURULUŞLAR	173
YAZAR DİZİNİ	175

KURULLAR

DÜZENLEME KURULU

Onursal Başkan	Ayfer Günalp
Başkan	Gülşen Haşçelik
Genel Sekreter	Dürdal Us
Bilimsel Sekreter	Banu Sancak
Sayman	Ahmet Pınar
Üyeler	Sevtap Arıkan
	Burçin Şener
	Alpaslan Alp
	Zeynep Sarıbaş

BİLİMSEL KURUL

Hakan Abacıoğlu
 Yurdanur Akgün
 Ruhi Alaçam
 Hande Arslan
 Selim Badur
 Mithat Bozdayı
 Dilek Çolak
 Rıza Durmaz
 Serpil Ercis
 Selda Erensoy
 Sibel Ergüven
 Murat Ertürk
 Suna Gedikoğlu
 Dolunay Gülmez
 Meral Gültekin
 Tanıl Kocagöz
 Metin Korkmaz
 Fatih Köksal
 Ayhan Kubar
 Cumhuri Özkuyumcu
 Seyyal Rota
 Mehmet Ali Saraçlı
 Güner Söyletir
 Mehmet Tanyüksel
 Alper Tekeli
 Serdar Tuncer
 Ferda Tunçkanat
 Emel Tümbay
 Şemsettin Ustaçelebi
 Serhat Ünal
 Yakut Akyön Yılmaz

GENEL BİLGİLER

Kurs Tarihi

24-25 Haziran 2008

Kurs Merkezi

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı Laboratuvarları Morfoloji
Binası, Sıhhiye-Ankara

Kongre Tarihi

25-28 Haziran 2008

Kongre Merkezi

Bilkent Otel ve Konferans Merkezi,
Bilkent-Ankara

Kongre Dili

Kongre resmi dili Türkçe'dir.

Kongrenin Web Adresi

www.molekulermikro2008.org

Kredilendirme

5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongremiz, Türk Tabipler Birliği "Sürekli Tıp Eğitimi (STE)" Kredilendirme Kurulu tarafından "20.5" kredi puanı ile kredilendirilmiştir. Bu krediler ile ilgili TTB-STE formlarını kongre çantası içerisinde bulabilirsiniz. Formlar doldurulduktan sonra kongre kayıt ve danışma masasında bulunan TTB-STE Kredilendirme kutusuna bırakılmalıdır.

Not: Kurul tarafından kredilendirilen kongremiz tıp doktorlarını kapsamaktadır. Doldurulacak formların sadece tıp doktorları tarafından değerlendirilmesi konusunda gerekli hassasiyetin gösterilmesi rica olunur.

Kongre Danışma ve Kayıt Masası Çalışma Saatleri

25 Haziran 2008 Çarşamba	08:00-18:00
26 Haziran 2008 Perşembe	08:00-18:00
27 Haziran 2008 Cuma	08:00-13:00
28 Haziran 2008 Cumartesi	08:00-15:30

Sözlü Bildiriler

Sözlü bildiriler aşağıda bildirilen gün ve saatler arasında Ana Toplantı Salonu'nda sunulacaktır. Sözlü bildirisi bulunan sunum sahiplerinin kongreye katıldıkları ilk gün sunumlarını taşınabilir belleklerinde ya da CD'de kongre merkezi'nde hazırlanacak olan "Sunum Kontrol Merkezi"ne kontrol ettirerek teslimi rica olunur.

Sözlü Bildiri Günleri

26 Haziran 2008 Perşembe	08:30 – 09:00
27 Haziran 2008 Cuma	08:30 – 09:00
28 Haziran 2008 Cumartesi	08:30 – 09:00

Sunum Saatleri

Poster Tartışmaları

Kongremizde poster bildirileri "e-poster" olarak sunulacaktır. Posterleri incelemek üzere, e-poster alanını **25 Haziran 2008** tarihinden itibaren Sakarya Salonu 3'de ziyaret edebilirsiniz. Poster tartışmaları **26 Haziran 2008 Perşembe, 12:00-13:00** ve **28 Haziran 2008 Cumartesi, 12:30-13:30** saatleri arasındaki öğle yemekleri esnasında bilgisayar başında yapılacaktır. Poster bildirisine sahip katılımcılarımızın, poster tartışmalarına katılmak üzere yukarıda belirtilen gün ve saatlerde, e-poster alanında hazır olmasını önemle rica ederiz.

E-Poster Nedir, Avantajları Nelerdir?

E-poster, yıllardır basılı olarak hazırlanan ve kongre merkezlerinde panolara asılarak sergilenen poster bildirilerin aksine, elektronik ortamda hazırlanıp, kongre merkezinde kurulu bilgisayar terminalleri ile katılımcıların bilgisine sunulan bir yazılım uygulamasıdır. E-poster'ler internet ortamında saklanabilir, istenilen zamanlarda ve yerlerde ulaşılabilir biçimde arşivlenebilirler. Bilimsel programların yoğunluğu nedeniyle incelenemeyen poster bildiri çalışmaları bu sayede katılımcılar tarafından ve kongreye katılma imkanı bulunmayan kişilerce her zaman takip edilebilir.

E-poster'in en önemli avantajı hazırlayıcısına herhangi bir maddi külfet getirmemesidir.

Sergi Alanları

Sergi alanı **25 Haziran 2008** tarihi itibarı ile sabah 08:00 akşam 19:00 saatleri arasında Sakarya Balo ve Konferans Salonu fuayesinde **28 Haziran 2008** tarihine kadar açık olacaktır.

Yaka Kartları

Tüm katılımcı, refakatçi ve ticari firma temsilcilerine, kategorilerine uygun yaka kartı dağıtımı, kongre kayıt masasında gerçekleştirilecektir. Yaka kartı bulunmayan katılımcıların kongre aktivitelerine katılımları mümkün olamayacaktır. Yaka kartlarının kongre boyunca tüm bilimsel ve sosyal aktivitelerde takılması gerekmektedir.

Katılım Sertifikası

Tüm katılımcılara, kongre katılım sertifikaları **26 Haziran 2008** tarihinden itibaren kongre kayıt masasından dağıtılmaya başlanacaktır. Bu tarihten önce ayrılacakların, posta adreslerini kayıt masasına bildirmeleri ya da bir başkasının alabilmesi için yazılı yetki vermeleri rica olunur.

Ulaşım

24-28 Haziran 2008 tarihleri arasında her sabah saat 08:00'da Mithatpaşa Caddesi Gürkent Otel'den ve ardından Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi önünden Bilkent Otele servis kaldırılacaktır. Ayrıca bilimsel program saatlerine göre Şehir Merkezi - Bilkent Otel ve Bilkent Otel - Şehir Merkezi arasında servis hizmeti de sağlanacaktır. Bu saatleri gösteren bilgilendirme panosunu toplantı salonu fuayesinde bulabilirsiniz.

Beypazarı Gezisi ve Akşam Yemeği

Kongre gezisi, 27 Haziran 2008 Cuma günü öğle yemeği paketlerinin alınmasının ardından

Bilkent Otel ve Konferans Merkezi'nin önünden, Ankara'nın şirin ilçesi Beypazarı'na kaldırılacak otobüslerle başlayacaktır.

Bağevi Anadolu Mutfağı

Adres: Gazi Gündüzalp İş Merkezi Otoparkı
Yanı 17/A 06730 Beypazarı / Ankara
Telefon: 0 312 763 40 20

Varışta ilçe içinde yapılacak panoramik bir gezinin ardından, katılımcılarımıza alışverişi için serbest zaman bırakılacaktır. Kongre yemeği saat 17:30'da *Beypazarı Bağevi Anadolu Mutfağı*'nda otantik bir akşam yemeği tarzında alınacaktır. Ankara'ya dönüş için otobüsler saat 20:30'da restoran önünden hareket edecektir.

Beypazarı Gezisi ve akşam yemeğine tüm kongre katılımcılarımız davetlidir. Geziye katılımınızı bildirmediyseniz kayıt masasına bildirmeniz önemle rica olunur.

Teknik Destek

Kongre süresince sunumlarınızın çalışmasında herhangi bir sıkıntı yaşamamanız için, sunumlarınızı taşınabilir belleklerinize ya da CD'ye "Microsoft Office" altında çalışan programlarda hazırlamanızı ve yedeklerini kongrede yanınızda bulundurmanızı rica ederiz. Sunum sahiplerinin kongreye katıldıkları ilk gün sunumlarını taşınabilir belleklerinde ya da CD'de kongre merkezi'nde hazırlanacak olan "Sunum Kontrol Merkezi"ne kontrol ettirerek, teslimi rica olunur. Sunumlarında kendilerine ait dizüstü bilgisayarını (laptop) kullanmak isteyen konuklarımız sunum yapacakları salonda mutlaka önceden cihazlarını kontrol ettirmelidir.

Kongre süresince salonlarda slayt makinesi ve tepegöz kullanılmayacak; tüm salonlarda dizüstü (laptop) ve görüntüleme cihazları hazır olacaktır.

KURS VE KONGRE PROGRAMI

KURS PROGRAMI

Düzenleyenler: Doç. Dr. Ahmet Pınar
Doç. Dr. Özgen Eser
Yrd. Doç. Dr. Alpaslan Alp
Yrd. Doç. Dr. Zeynep Sarıbaş
Yrd. Doç. Dr. Koray Ergünay

24 HAZİRAN 2008, SALI

Real-time PCR Kursu

*Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve
Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları*

SAAT	DERS/PRAİİK	ANLATAN/SORUMLU
09:00 - 09:30 (TEORİK)	PCR ve Real-time PCR yöntemleri konusunda genel bilgi	Doç. Dr. Ahmet Pınar
09:30 - 10:15 (TEORİK)	Klinik örnek toplama, işleme, hücre parçalama ve nükleik asit saflaştırma yöntemleri	Doç. Dr. Özgen Eser
10:15 - 10:45	ÇAY-KAHVE MOLASI	
10:45 - 11:45 (PRAİİK)	Tüm Gruplar: Tam otomatize MagNa Pure Sistemine klinik örneklerin yüklenmesi	Doç. Dr. Özgen Eser
10:45 - 11:45 (PRAİİK)	Tüm Gruplar: Tam otomatize MagNa Pure Sistemine klinik örneklerin yüklenmesi	Doç. Dr. Özgen Eser
12:30 - 13:30		
13:30 - 14:15 (TEORİK)	İnternal ve eksternal kontroller	Yrd. Doç. Dr. Koray Ergünay
14:15 - 15:15 (PRAİİK)	A Grubu: Klinik örnek işleme, hücre parçalama ve saflaştırma	Doç. Dr. Özgen Eser
	B Grubu: Real-time PCR için reaksiyon karışımı hazırlama	Yrd. Doç. Dr. Koray Ergünay
	C Grubu: Amplifikasyon programlama ve izleme	Yrd. Doç. Dr. Alpaslan Alp
15:15 - 15:45	ÇAY-KAHVE MOLASI	
15:45 - 16:45 (PRAİİK)	A Grubu: Real-time PCR için reaksiyon karışımı hazırlama	Yrd. Doç. Dr. Koray Ergünay
	B Grubu: Amplifikasyon programlama ve izleme	Yrd. Doç. Dr. Alpaslan Alp
	C Grubu: Klinik örnek işleme, hücre parçalama ve saflaştırma	Doç. Dr. Özgen Eser
16:45 - 17:45 (PRAİİK)	A Grubu: Amplifikasyon programlama ve izleme	Yrd. Doç. Dr. Alpaslan Alp
	B Grubu: Klinik örnek işleme, hücre parçalama ve saflaştırma	Doç. Dr. Özgen Eser
	C Grubu: Real-time PCR için reaksiyon karışımı hazırlama	Yrd. Doç. Dr. Koray Ergünay

25 HAZİRAN 2008, ÇARŞAMBA**Real-time PCR Kursu**

*Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve
Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları*

SAAT	DERS/PRAĐİK	ANLATAN/SORUMLU
09:00-09:30 (TEORİK)	Kantitatif real-time PCR	Doç. Dr. Ahmet Pınar
09:30-10:00 (TEORİK)	Real-time PCR ile mutasyon saptanması	Yrd. Doç. Dr. Zeynep Sarıbaş
10:00-10:30 (TEORİK)	Klinik laboratuvarlarda real-time PCR deneyimi	Yrd. Doç. Dr. Alpaslan Alp
10:30-11:00	ÇAY-KAHVE MOLASI	
11:00-11:30 (PRAĐİK)	A Grubu: Real-time PCR ile kantitasyon	Doç. Dr. Ahmet Pınar
	B Grubu: Real-time PCR ile mutasyon saptanması	Yrd. Doç. Dr. Zeynep Sarıbaş
	C Grubu: Değişik real-time PCR format ve cihazları	Yrd. Doç. Dr. Alpaslan Alp
11:30-12:00 (PRAĐİK)	A Grubu: Real-time PCR ile mutasyon saptanması	Yrd. Doç. Dr. Zeynep Sarıbaş
	B Grubu: Değişik real-time PCR format ve cihazları	Yrd. Doç. Dr. Alpaslan Alp
	C Grubu: Real-time PCR ile kantitasyon	Doç. Dr. Ahmet Pınar
12:00-12:30 (PRAĐİK)	A Grubu: Değişik real-time PCR format ve cihazları	Yrd. Doç. Dr. Alpaslan Alp
	B Grubu: Real-time PCR ile kantitasyon	Doç. Dr. Ahmet Pınar
	C Grubu: Real-time PCR ile mutasyon saptanması	Yrd. Doç. Dr. Zeynep Sarıbaş
12:30-13:30	ÖĞLE YEMEĞİ VE BİLKENT OTELE TRANSFER	

KONGRE PROGRAMI

08.30 - 13:45 KAYIT

14.00 - 14.30 AÇILIŞ

14.30 - 15.30 KONFERANS 1

- Her şeyin bir sonu var; immün yanıtın da.. Görevini tamamlayan immün yanıt nasıl duruyor?
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Şemsettin Ustaçelebi
Konuşmacı: Prof. Dr. Selim Badur

15.30 - 16.00 KLASİK MÜZİK DİNLETİSİ

16.00 - 16.30 KAHVE ARASI

16.30 - 17.30 KONFERANS 2

- Moleküler biyolojide kullanılan yaşamın akıllı robotları
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Suna Gedikoğlu
Konuşmacı: Prof. Dr. Tanıl Kocagöz

18.30 - 20.30 AÇILIŞ KOKTEYLİ

Becton Dickinson'un Katkılarıyla

20.30 - 21.30 AKŞAM GÖSTERİMİ

- Büyük Patlamadan Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi'ne Saçılan Yıldız Tozları
Konuşmacı: Prof. Dr. Tanıl Kocagöz

26 HAZİRAN 2008 PERŞEMBE

08.30 - 09.00 SÖZLÜ BİLDİRİLER

Oturum Başkanları: Prof. Dr. Rıza Durmaz, Y. Doç. Dr. Alpaslan Alp

S1 - OXA-58 üreten karbapeneme dirençli *Acinetobacter baumannii* salgın suşlarının tanımlanması

(C.Külah, M.Mooij, F.Beğendik Cömert, E.Aktaş, G.Çelebi, N.Özlu, P.Savelkoul)

S2 - Antibiyotik kullanımına bağlı ishaller hastalarda *Clostridium difficile* kökenlerinin toksin genlerinin araştırılması
(U.Deniz, N.Ulger, B.Aksu, G.Söyletir)

S3 - *Helicobacter pylori* virülans faktörleri ve konak interlökin-1 polimorfizminin prognoza etkisi
(E.Yula, D.Pekmezci, H.Yerhan, B.Kantarçeken, F.Köksal)

09.00 - 10.30 PANEL 1

- Moleküler yöntemlerin mikolojiye katkıları
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Sevtap Arıkan
- Moleküler yöntemlerin maya mantarlarının taksonomisine getirdikleri
Konuşmacı: Doç. Dr. Ayşe Kalkancı
- Mantarların genotiplendirme çalışmalarında güncel durum
Konuşmacı: Prof. Dr. Nedret Koç
- Fungal virülans faktörlerinin moleküler temelleri
Konuşmacı: Prof. Dr. Mine Yücesoy

10.30 - 11.00 KAHVE ARASI

11.00 - 12.00 KONFERANS 3

- SeptiFast: A new rapid and sensitive PCR method for the detection and identification of bacterial and fungal pathogens in the blood.
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Güner Söyletir
Konuşmacı: Gorm Lisby, MD, PhD
(Roche Diagnostics Katkılarıyla)

12.00 - 13.00 YEMEK ARASI - POSTER TARTIŞMA

13.00 - 14.30 PANEL 2

- Moleküler yöntemlerde kalite kontrol ve akreditasyon
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Hakan Abacıoğlu
- Laboratuvar akreditasyon sürecine genel bakış
Konuşmacı: Prof. Dr. Hakan Abacıoğlu
- Moleküler testlerde yöntem onayı ve kalite kontrol
Konuşmacı: Doç. Dr. Arzu Sayiner
- Laboratuvar akreditasyonunda altyapı
Konuşmacı: Y. Doç. Dr. Alpaz Özbek

14.30 - 15.30 UZMANIYLA TARTIŞALIM

- Moleküler tiplendirme yöntemlerinin hastane enfeksiyonlarının kontrolündeki yeri
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Rıza Durmaz
- Moleküler tiplendirme yöntemlerinin hastane enfeksiyonlarının kontrolündeki yeri
Konuşmacı: Prof. Dr. Rıza Durmaz
- Moleküler tiplendirme yöntemlerinin hastane enfeksiyonlarının kontrolündeki yeri:
Güncel bilgiler ışığında genel bir bakış
Konuşmacı: Y. Doç. Dr. Çağatay Acuner

15.30 - 16.00 KAHVE ARASI**16.00 - 16.30 MİNİ KONFERANS**

- İnsan papillomavirus aşılarında son durum
Oturum Başkanı: Prof. Dr. **Xxxx Xxxxx Xxxxx**
Konuşmacı: Prof. Dr. Dürdal Us

16.30 - 18.00 PANEL 3

Moleküler tanıda yeni ticari sistemler
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Burçin Şener

Katılımcı Firmaların Tanıtımı

- **Abbott Molecular**
Tailor Made Solutions for Molecular Diagnostics
Dr. Anke Coblenz-Korte
Marketing Manager Infectious Diseases
Europe, Middle East, and Africa
- **Ayka Ltd. Şti.**
“Affymetrix GeneChip Mikroarray Sistemi ve Kullanım Alanları”
Eda Şeyma Kepenek, MSc.
- **Biobak**
“Mikrodizilim Sistemleri (Microarrays)”
Prof. Dr. Yavuz TAGA
- **EUROIMMUN Türkiye**
“EUROIMMUN de yenilikler”
Bio. Ayten Öz
- **Medtek A.Ş.**
Fluorion: Türkiye’de Üretilen İlk IVD-CE’li Real-time PCR Kitler
Dr. Onur Bilenoglu

27 HAZİRAN 2008 CUMA**08.30 - 09.00 SÖZLÜ BİLDİRİLER**

Oturum Başkanları: Prof. Dr. Sesin Kocagöz,
Doç. Dr. Banu Sancak

S4 - Optik okuyuculu elektroforez sistemi ve otomatik molekül büyüklüğü belirleyicisi
(T.Kocagöz, E.Mozioğlu, S.Öktem, D.Engin, Y.Sezen)

S5 - *Mycobacterium tuberculosis* klinik izolatlarında kinolon direncinin klasik ve moleküler yöntemlerle saptanması
(E.Ruh, Z.Sarıbaş, A.Alp)

S6 - Vajinal kandidozlu hastalardan izole edilen *Candida albicans* suşlarında adezyon genlerinden ALS, HWP ve SAP ifadesinin gösterilmesi
(T.Nas, A.Kalkancı, I.Fidan, K.Hızıl, S.Bolat, S.Yolbakan, E.Yılmaz, S.Özkan, S.Kuştimur)

09.00 - 10.00 PANEL 4

- Kan merkezlerinde moleküler yöntemlerin kullanımı
Oturum Başkanı: Uzm. Dr. Ramazan Uluhan
- Tarama Testlerinde moleküler yöntemler
Konuşmacı: Uzm. Dr. Banu Pelit Kılıç
- İmmünohematolojik testlerde moleküler yöntemler
Konuşmacı: Doç. Dr. İdil Yenicesu

10.00 - 11.00 KONFERANS 4

- Genomic Analyzer
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Seyyal Rota
Konuşmacı: Dr. Rick Tearle
(*Makro Katkılarıyla*)

11.00 - 11.30 KAHVE ARASI**11.30 - 12.30 SOSYAL KONFERANS**

Bedenim hayatımın neresinde duruyor?
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Ayfer Günel
Konuşmacı: Prof. Dr. Ahmet İnam

12.30 - 13.00 ÖĞLE YEMEĞİ**13.00 BEYPAZARI GEZİSİ VE AKŞAM YEMEĞİ**

Roche Diagnostics’in Katkılarıyla
Beypazarı gezisi için hareket
(Tüm katılımcılarımız davetlidir)

28 HAZİRAN 2008 CUMARTESİ**08.30 - 09.00 SÖZLÜ BİLDİRİLER**

Oturum Başkanları : Prof. Dr. Alper Tekeli,
Doç. Dr. Ahmet Pınar

S7 - Mersin'de lamivudin ve adefovir ile tedavi edilmekte olan kronik hepatit B'li hastalarda ilaç direncine sebep olan HBV polimeraz mutasyonlarının gümüş boyama tabanlı "Cycle-Sequencing" metodu ile araştırılması (M.S.Serin, F.E.Bekiroğlu, S.Tezcan, G.Aslan, O.Sezgin, E.Altıntaş, G.Emekdaş, M.Ülger, S.Polat)

S8 - Kan bağışçıların anti-HCV tarama ve doğrulaması için akış: Çok merkezli bir çalışma (A.E.Karakoç, R.Berkem, H.Irmak, A.P.Demiröz, İ.Yenicesu, N.Ertuğrul, Ö.Arslan, S.Kemahlı, S.Yılmaz, O.Özcebe, A.Kara, G.Özet, Z.C.Açıkgöz, T.Açıkgöz)

S9 - Şanlıurfa *Plasmodium vivax* suşlarının PCR ile tiplendirilmesi ve circumsporozoit protein (CSP) gen farklılıkları (F.Y.Zeyrek, M.F.Yüksel, A.Taylan Özkan, H.Dağcı, G.Snounou)

09.00 - 10.30 PANEL 5

- Moleküler yöntemlerin parazit enfeksiyonlarındaki değeri
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Sibel Ergüven
- İmmün sistemi baskılanmış hastalarda toxoplasmosis tanısında moleküler yöntemler
Konuşmacı: Prof. Dr. Yüksel Gürüz
- Leishmaniasis tanısına ve ülkemizdeki parazitlerin tür tayinine moleküler yaklaşım
Konuşmacı: Prof. Dr. Seray Özensoy Toz
- Moleküler yöntemlerin trichomoniasis tanısına getirdiği yenilikler
Konuşmacı: Doç. Dr. Hatice Ertabaklar

10.30 - 11.00 KAHVE ARASI**11.00 - 12.30 PANEL 6**

- Önem kazanan bazı mikroorganizmaların Türkiye ve dünyadaki moleküler epidemiyolojisinde güncel durum
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Ayhan Kubar
- Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*
Konuşmacı: Doç. Dr. Abdullah Kılıç
- *Cryptococcus neoformans*
Konuşmacı: Doç. Dr. M.Ali Saraçlı
- İnsan papilloma virusları
Konuşmacı: Y. Doç. Dr. Kenan Şener
- *Entamoeba histolytica*
Konuşmacı: Prof. Dr. Mehmet Tanyüksel

12.30 - 13.30 ÖĞLE YEMEĞİ - POSTER TARTIŞMASI**13.30 - 14.30 PANEL 7**

- Bulaşıcı hastalıkların süveyansında moleküler yöntemlerin yeri ve önemi
Oturum Başkanı: Doç. Dr. Mustafa Ertek
- Bulaşıcı hastalıkların süveyansında moleküler yöntemler neden gerekli?
Konuşmacı: Y. Doç. Dr. Alper Akçalı
- Dünyada ve ülkemizde gıda ve su kaynaklı enfeksiyonların süveyansında moleküler epidemiyolojik yöntemler
Konuşmacı: Uzm. Dr. Belkıs Levent

14.30 - 15.30 KONFERANS 5

- Biyosensörler
Oturum Başkanı: Prof. Dr. Meral Gültekin
Konuşmacı: Prof. Dr. Hüseyin Avni Öktem

15.30 - 16.00 KAPANIŞ



Konferanslar

KNF1

HER ŞEYİN BİR SONU VAR; İMMÜN YANITIN DA... GÖREVİNİ TAMAMLAYAN İMMÜN YANIT NASIL DURUYOR?

Prof. Dr. Selim BADUR

İstanbul Tıp Fakültesi, Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı, Çapa 34390, İstanbul.

İmmün sistemin, “istenmeyen yabancı saldırganı” yıkıma uğratarak, ortamdaki uzaklaştırdıktan sonra daha fazla ve gereksiz yere çalışmasını önlemek için bir dizi mekanizma uyarınca durdurulduğunu; böylece gereksiz yere işlevini sürdürmesi sonucunda ortaya çıkacak olumsuzlukların engellendiğini biliyoruz. Son 20 yıldır, savunma sistemimizin nasıl çalıştığı incelenerek, hem doğal direnç hem de özgül yanıtın efektör mekanizmaları ayrıntılarıyla ortaya konmuş, bu araştırmalar sürerken işlevini tamamlayan sistemi hangi parametrelerin ve hangi yollardan kesintiye uğrattığı daha iyi anlaşılmıştır. Bu yazıda immün yanıtı “durduran” belli başlı molekülleri ve mekanizmaları ele alarak, immün yanıtın nasıl sonlandırıldığına bakacağız.

Yıllar önce immün sistemin yabancı “düşmana” karşı nasıl saldırdığı incelenirken, sistemin kendimize özgü (self) antijenlere yanıt vermeme özelliği ve tolerans mekanizması da ayrıntıları ile irdelenmiştir. Örneğin timusda T lenfositlerinin gelişme sürecinde, “self” antijenlere özgü hücreler yıkıma uğrayarak immün yanıtın “kendimize” zarar verme olasılığı, **negatif seleksiyon** uyarınca işin başından yok edilmektedir. Böylece henüz lenfositlerin olgunlaşma aşamasında otoimmün hastalıklara neden olabilecek gelişmeler önlenmekte; bir diğer tanımlamayla immün yanıtın gereksiz ve zarar verecek şekilde çalışmasının önüne geçilmektedir. Buna karşın ortadan kaldırılması gereken yabancı antijene karşı yanıt oluşturacak hücreler yollarına devam etmekte ve “temizleme” görevlerini kademeli olarak yerine getirmektedirler. Timositlerin timusda olgunlaşması aşamasında, 10^{15} kadar farklı $\alpha\beta$ reseptörünün oluşumuna yol açacak olan T hücre reseptörlerinin (THR) çeşitliliği, genlerin rastlantısal düzenlenmesi sonucu oluşmaktadır. Bu esnada kazandıkları reseptörleri eksprese etmeye başlayan hücreler, iki aşamalı seleksiyon işlemine tabi tutulurlar: bireyin kendi (self) MHC moleküllerini tanıyamayan ya da kendi MHC’leri oluğuna yerleşmiş otoantijenlerini tanıma özelliğine sahip hücreler, **negatif seleksiyon** olarak adlandırılan bir süreçte yıkıma uğramaktadırlar. Böylece sadece kendine ait MHC’lerin oluğuna yerleşmiş yabancı antijeni tanıyabilen reseptörlere sahip hücreler yollarına devam ederek olgunlaşmalarını tamamlayacaklardır. Bu seleksiyon sürecinde timositlerin %90-95’i yıkıma uğrar. Söz konusu gelişmede timusun stromal hücrelerinden olan epitelyal hücreler, dendritik hücreler (DC) ve makrofajlar ile, endojen glukokortikoidlerin rolü vardır. Kısaca özetlemeye çalıştığım **negatif seleksiyon** aşamasında, zararlı olabilecek ya da işe yaramayacak hücreler apoptozis uyarınca yıkıma uğrarlar. Bu nedenle **negatif seleksiyon** ve **apoptozis** gelişmelerini, immün sistem hücrelerinin olgunlaşma aşamasında devreye giren bir “durdurma” süreci olarak ele almak hatalı olmaz. Doku homeostazının muhafazası için gerekli bir gelişme olan **apoptozis**, istenmeyen hücrelerin yıkımını sağlayan fizyolojik bir olaydır. “İstenmediğini anlayan” (!) hücre, kendi yıkımına neden olacak bir dizi efektör protein sentezler ve bu nedenle, apoptozisi “hücre intiharı” olarak değerlendirilmek doğru bir yaklaşımdır¹.

Benzer şekilde, doğal direncin önemli bir yapıtaşı olan doğal öldürücü hücreler (natural killer; NK hücreleri), farklılaşmış hücreleri (kansereleşen ya da bir virüs ile enfekte olan) perforin ve gran-

zimleri aracılığı ile yıkıma uğratmanın yanı sıra, immün yanıtta önemli işlevlere sahip çeşitli sitokinleri (IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , IL-5, IL-10 gibi) salgılayarak ve nihayet DC'lerin aktivasyonuna katkı sağlayarak görev yaparlar². Bu tip önemli işlevlere sahip NK'ların etkinliklerini, yüzeylerinde yer alan bir dizi **aktivatör** ve **inhibitör reseptör** düzenler³. “Killer Ig-like” homodimerleri, CD94/NKG2 lektin benzeri heterodimerleri ve Ly49 lektin benzeri homodimerleri, NK hücrelerinin **inhibitör reseptörlerini** oluştururlar ve enfekte olmamış ya da NK'ların “ilgi alanına” girmeyen hücrelere (örneğin MHC-I taşıyanlara) saldırılarını engellerler. Bu tip bir özellik, NK hücrelerinin etki gösterip göstermemelerini belirleyen ve bir açıdan NK'ların **inhibisyonuna** yol açan mekanizmalar olarak değerlendirilir.

Sırada doğal direncin önemli bir yapı taşı olmasının yanı sıra, özgül yanıtın hem humoral hem de hücresel koldan etkinliğinde düzenleyici rolü olan **kompleman sistemi** var. Acaba etki ettiği hücreler üzerinde “membran atak kompleksi” (MAK) adı verilen delikler açarak hücrelerin lizisine yol açan ya da aktivasyonu sürecinde oluşan ara ürünler ile (C3a, C5b gibi) inflamasyon ve fagositoya katkı sağlayan, ayrıca sonraki aşamada devreye girecek özgül yanıtı yönlendiren **kompleman sistemi** nasıl durmaktadır? Üç farklı yoldan (klasik, alterne ve lektin aktivasyon yolları) aktive olabilen sistem yaklaşık 30 adet inaktif yapı taşından meydana gelir. Bu yapı taşları arasında sistemin gereksiz yere çalışarak organizmaya zarar vermesini engelleyen bir dizi **regülatör molekül** de yer alır. Sistemin aşırı ve gereğinden uzun çalışması doku ve hücrelere zarar vereceğinden, **kompleman aktivasyonu regülatörleri** (regulators of complement activation; RCA) olarak tanımlanan bu proteinler organizmayı korumakla görevlendirilmişlerdir. Bu moleküllere örnek olarak plazmada bulunan faktör H ve C4bp'yi, membranlarda yer alan kompleman reseptörü-1 (CR1/CD35) gibi reseptörleri ve nihayet membran kofaktör proteinlerini (MCP, CD46) sayabiliriz. Söz konusu moleküller, sistemin yapı taşları arasındaki ilişkiyi keserek komplemanın aktivasyon döngüsünde önemli ve hayati bir aşama olan C3 konvertaz oluşumunu engellerler. Aynı RCA'lar, serin proteaz etkinliğine sahip faktör I kofaktörü işlevi görerek, enzimatik yoldan C4b ve C3b gibi yapı taşlarını inaktif bileşenlere dönüştürürler. Benzer bir aktivite, DAF (CD55) üzerinden ancak bu kez enzimatik olmayan yoldan gerçekleşir ve sonuçta C3 konvertaz yapı taşları inaktive olurlar⁴. Sonuçta “decay-accelerating activity” ve “cofactor activity” olarak tanımlanan iki farklı inhibisyon mekanizmasının harekete geçmesi ile kompleman sisteminin devre dışı kalması söz konusudur ve bu inhibisyon mekanizmalarından birinde ortaya çıkacak aksaklık, hemolitik üremik sendrom gibi bazı patolojilerin gelişimine neden olur⁵.

Gelelim doğal direnç kapsamında ele alınan ve immün sistemde hücreler arası iletişimi sağlayan **sitokinlerin** çalışma düzenine.. İmmünokompetan hücrelerin çoğalmalarında, farklılaşmalarında ve uyarılarak etkinlik göstermelerinde görev yapan bu moleküller, hedef aldıkları hücrelerin yüzey reseptörlerine bağlanarak hücre içinde sinyal ileti mekanizmasını aktive ederler. Kısaca **SOCS proteinleri** adı verilen bir grup molekül ise, “sitokin sinyal transdüksiyon regülatörleri” olarak görev yaparlar ve sinyal iletimine farklı aşamalarda müdahale ederek sitokinlerin aktivitelerini durdururlar⁶. **SOCS ailesinden proteinler** günümüzde sekiz grup altında toplanmaktadır: CIS ve **SOCS1-SOCS7**. Söz konusu moleküllerin etkinliklerine örnek vermek gerekirse; SOCS1 ve 3'ün, Toll benzeri reseptörler (Toll-like receptors, TLR) üzerinden, DC olgunlaşma ve aktivasyon aşamasına müdahale ederek inhibisyonuna yol açtığını, aynı molekülün tip I ve II interferonların (IFN) antiviral ve proinflatuvar etkinliğini bozduğunu ve nihayet IL-12 ve IL-4'ün rol oynadığı T_H 1/2 farklılaşmasına engel olarak CD4⁺ hücre aktivitesini engellediğini söyleyebiliriz⁷. Bu arada yaşlanma sürecinde gözlenen immün sistem fonksiyonlarındaki zayıflamalarda, SOCS protein aktivitesindeki artışın rolü olduğu,

özellikle nötrofil fonksiyonlarını uyaran GM-CSF gibi bir sitokin etkinliğinin, yaşlanma sürecinde SOCS proteinlerince baskılanmasının söz konusu olduğu bildirilmiştir⁸.

Biraz da immün yanıtın ileri aşamalarında devreye girecek olan özgül bağışıklığa ve işlevlerini tamamlayan yapı taşlarının hangi mekanizma uyarınca devre dışı kaldıklarına bakalım. Özgül yanıtın merkezinde, kendilerine bir antijen sunan hücre (ASH) tarafından “takdim edilen” antijen uyarısını alan **CD4⁺ T lenfositlerinin (T_h) aktivasyon aşaması** bulunmaktadır. Bu nedenle “orkestra şefi” işlevi gördüğü söylenen T_h’lar, farklı sitokin paternleri üreterek, diğer immünokompetan hücrelerin uyarılmasında merkezi bir rol üstlenmişlerdir. Savunma sistemi açısından bu denli önemli bir işleve sahip olan T_h’ların aktivasyon sürecinde; bir yandan ASH’lerin MHC-II molekülleri oluğunda kendilerine sunulan işlenmiş antijen uyarısına (1. sinyal), öte yandan yine ASH’ler ile aralarında kurulacak kostimülasyon bağlantılarına (2. sinyal) gerek vardır. Kostimülatör moleküller dendiğinde T_h’ların yüzeyindeki CD28 reseptörü ile ASH üzerindeki B7-1 (CD80) ve B7-2 (CD86) reseptörleri ilk sırada yer alır. Nitekim MHC-II aracılığı ile antijen sunumu yapılsa bile, CD28 eksikliğinde anergi tablosu ya da apoptozis uyarınca yıkım söz konusu olur ve T_h uyarısı gerçekleşmez. Aktivasyon için gerekli olan CD28 reseptörü, işlevini tamamlayan T hücresi üzerindeki yerini CTLA-4 (CD152) molekülüne bıraktığında, T_h’lerin artık uyarı sinyali alamadıkları ve devre dışı kaldıkları saptanmıştır⁹. CD28 molekülü ile %30 oranında homoloji gösteren **CTLA-4 reseptörünün** devreye girmesi, sonuçta immün yanıtın sonlanmasına yol açar. CTLA-4’ün, T_h’lerin aktivasyonu için ortamda bulunması gereken IL-2 üretimini ve IL-2 reseptör ekspresyonunu baskılayarak, ayrıca T hücrelerinin gelişimini G1 fazında bloke ederek etki gösterdikleri kabul edilir. Bu mekanizmalar dışında CTLA-4’ün; T hücre reseptörünün (THR) işlevini bozarak, THR-CD28 arasındaki ilişkiye müdahale ederek ve nihayet CD28 sinyalini etkisiz kılarak inaktivasyona yol açabileceği de öne sürülmüştür¹⁰. Son olarak **B7:CD28 ailesinden** “programlanmış ölüm reseptörü-1” (programmed death-1, PD-1) ve iki ligandının (PD-1L ve PD-2L) etkileşiminin immün yanıt inhibisyonuna neden olduğu saptanmış; söz konusu ilişkinin HIV başta olmak üzere bir dizi enfeksiyon hastalığında T_c etkinliğini baskılayarak süregelen sürecin başlamasına neden olduğu kabul edilmiştir¹¹. B7:CD28 ailesi olarak tanımlanan reseptör grubunda, T hücre aktivasyonu ve tolerans olaylarını düzenleyen ICOS ve BTLA gibi başka üyeler de bulunmaktadır. Bunlardan BTLA’lar, B lenfositlerinin immün regülasyonunda, ICOS’lar ise T hücre bağımlı B lenfosit yanıtında ve T hücre toleransında etkili olurlar^{12,13}.

Özgül yanıtın işleyişi sadece CTLA-4 örneğindeki gibi bazı reseptörlerin devreye girmesi ile sonlanmaz. İmmünokompetan hücreler arasında, yıllar önce süpresör T lenfositleri olarak adlandırılmış olan, günümüzde ise **regülatör T hücreleri (T_{reg})** olarak isimlendirilen bir grup hücre yer alır¹⁴. 1995 yılında ilk kez CD4⁺ hücrelerin %10’unda IL-2R α zinciri (CD25) taşıyan özel bir grup saptanmış ve otoreaktif T hücrelerini denetleme özellikleri belirlenmiştir. Daha sonra T_{reg} olarak isimlendirilen bu grup hücrenin homojen bir topluluk olmadığı; bir bölümün (**doğal T_{reg}**’ler) direkt olarak timustan kaynaklanırken, bir diğer grubun (**uyarı sonucu oluşan T_{reg}**’ler) naif CD4⁺ veya CD8⁺ hücrelerden antijen ile temas sonrası ortaya çıktıkları gösterilmiştir. Doğal olanların CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ fenotipinde oldukları anlaşılmış; antijen ile uyarı sonrası beliren CD4⁺ CD25⁺ hücrelerin ise kendi aralarında T_h3 ve T_R1 olarak iki grupta toplanarak adlandırılmalarına karar verilmiştir¹⁵. Söz konusu hücrelerin bazı özelliklerine baktığımızda; bir transkripsiyon faktörü olan FOXP3’ün **doğal T_{reg}**’lerin önemli bir yüzey markırı olduğu, bu hücrelerin CD25⁺ T hücre proliferasyonunu inhibe ettikleri ve etkilerini yüzeylerinde taşıdıkları inhibisyon reseptörünün (CTLA-4) yanı sıra, salgıladıkları TGF- β ve IL-10 üzerinden gerçekleştirdikleri görülmektedir. Adı geçen sitokinlerin üretimi T_h3 ve T_R1 hü-

releri için de geçerli bir özelliktir ve bunlar aracılığı ile T_H1 , T_H2 ve $CD8^+$ hücrelerin baskılanmasına yol açarlar. Bu arada T_{reg} etkinliğinin sitokinler üzerinden gerçekleşmesinin yanı sıra, söz konusu hücrelerin TLR aşamasına müdahale ederek de inhibisyon yapabilecekleri ileri sürülmüştür¹⁶.

Regülatör hücreler dendiğinde sadece T hücre grubu düşünülmemelidir. Son yıllarda kısaca NKT olarak tanımlanan özel bir T hücre grubunun da otoimmün reaksiyonları önlemede devreye girdikleri; bu hücrelerin klasik olarak NK hücrelerinde bulunan yüzey reseptörlerinin yanı sıra THR'üne de sahip oldukları saptanmıştır¹⁷. Benzer şekilde T hücre aktivasyonuna etki eden **regülatör NK etkinliği** saptanmış ve IL-10 salgılayıcı özelliği ile karakterize bu grup hücre ilk kez Deniz ve arkadaşları¹⁸ tarafından tanımlanmıştır. Regülatör etkinliğe sahip B hücrelerinin (B_{reg}) de, immün süpresyona yol açan IL-10 ve TGF β salgılayarak, tolerans gelişiminde rol oynadıkları gösterilmiştir¹⁹.

Yukarıda değindiğimiz belli başlı **regülatör reseptör ve hücreler** dışında: miyeloid hücreler yüzeyinde yer alan “sinyal-regülasyon protein ailesinin” (signal-regulatory protein family; **SIRP**) regülatör proteinler olarak görev yaptıkları²⁰; anerjik T hücrelerinde eksprese olan anti-proliferatif gen ailesinden **Tob geninin** T hücre proliferasyonunu ve sitokin transkripsiyonunu baskılamada rol oynadığı²¹; antijen bağlama özelliğine sahip Fc γ reseptörlerinin (**Fc γ R**), antikorlar ile birleşerek, immün kompleksler üzerinden immün yanıt regülasyonunda etkili oldukları²²; **semaforinler** denilen yeni saptanan bir grup immünoregülatör proteinin, immün sistemin işleyişinde organizatör görevi yaptıkları saptanmıştır²³. ve nihayet doğal direnç aktivasyonunda görev yapan **TLR**’lerin, bazı özel koşullarda, **negatif regülatör mekanizmaları** başlatmada rolleri olduğu bildirilmiştir²⁴.

Sonuç olarak yıllardan beri efektör mekanizmaları üzerinde durulan ve bizleri “yabancı saldırısına” karşı koruyan **immün sistemin** işlevini tamamlamasını takiben, bir dizi **molekül-reseptör-hücre grubunca** durdurulduğu ve işlevsiz kılındığı anlaşılmakta, bu tür regülasyon etkinliğine sahip parametreler konusundaki bilgi birikimi her geçen gün daha da zenginleşmektedir.

Kaynaklar

1. Galmiche A, Zychlinsky A. Apoptosis, pp: 132-9. In: Kaufmann SHE, Steward MW (eds), Topley Wilson's Immunology. 2005, 10th ed. ASM Press, London.
2. Andoniou CE, Andrews DM, Delgi-Esposti M. Natural killer cells in viral infection: more than just killing. Immunol Rev 2006; 214: 239-50.
3. Kirwan SE, Burshtyn DN. Regulation of natural killer cell activity. Current Opinion Immunol 2007; 19: 46-54.
4. Lee S-H, Jung JU, Means RE. Complementing viral infection: mechanisms for evading innate immunity. Trends Microbiol 2003; 11: 449-52.
5. Kavanagh D, Richards A, Atkinson J. Complement regulatory genes and hemolytic uremic syndromes. Annu Rev Med 2008; 59: 293-309.
6. Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling and immunity. Nature Immunol 2003; 4: 1169-76.
7. Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. Nature Rev Immunol 2007; 7: 454-65.
8. Tortorella C, Simone O, Piazzolla G, Stella I, Antonaci S. Age-related impairment of GM-CSF-induced signalling in neutrophils: role of SHP-1 and SOCS proteins. Ageing Res Rev 2007; 6: 81-93.
9. Alegre M-L, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. Nature Rev Immunol 2001; 1: 220-8.
10. Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. Annu Rev Immunol 2006; 24: 65-97.
11. Sauce D, Almeida JR, Larsen M, et al. PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status. AIDS 2007; 21: 2005-13.
12. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. Annu Rev Immunol 2005; 23: 515-48.

13. Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nature Immunol* 2003; 4: 670-9.
14. Shevach EM. CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nature Rev Immunol* 2002; 2: 389-400.
15. Mills KHG. Regulatory T cells: friends or foe in immunity to infections? *Nature Rev Immunol* 2004; 4: 841-55.
16. Suttmoller RPM, Morgan ME, Netea MG, Grauer O, Adema GJ. Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol* 2006; 27: 387-93.
17. La Cava A, Van Kaer L, Shi F-D. CD4⁺ CD25⁺ T_{reg} and NKT cells: regulators regulating regulators. *Trends Immunol* 2006; 27: 322-7.
18. Deniz G, Erten G, Küçüksezer UC, et al. Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses. *J Immunol* 2008; 180: 850-7.
19. Mauri C, Ehrenstein MR. The short history of regulatory B cells. *Trends Immunol* 2007; 29: 34-40.
20. Barclay AN, Brown MH. The SIRP family of receptors and immune regulation. *Nature Rev Immunol* 2006; 6: 457-64.
21. Tzachanis D, Freeman GJ, Hirano N, et al. Tob is a negative regulator of activation that is expressed in anergic and quiescent T cells. *Nature Immunol* 2001; 2: 1174-82.
22. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature Rev Immunol* 2008; 8: 34-47.
23. Suzuki K, Kumanogoh A, Kikutani H. Semaphorins and their receptors in immune cell interactions. *Nature Immunol* 2008; 9: 17-23.
24. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LAJ. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nature Rev Immunol* 2005; 5: 446-58.

KNF2

MOLEKÜLER BİYOLOJİDE KULLANILAN YAŞAMIN AKILLI ROBOTLARI: ENZİMLER

Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ

Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

Enzimlerin başlangıcı, yaşamın başlangıcı; “RNA dünyası”

Dünyada yaşamın nasıl başladığı tartışmaları 1970’li yıllarda sürerken, Walter Gilbert önemli bir düşünce öne sürdü. Yaşamı başlatan kendi kendini çoğaltabilen bir molekül olmalı idi. Bu molekül RNA idi. Bu kurama “RNA dünyası” adı verildi¹. Günümüzde laboratuvarlarda ribonükleotidleri birleştirerek RNA oluşturan RNA molekülleri yapılabilmekte. Bugün tüm hücrelerde protein sentezini yapan yine ribozomlardaki RNA’lardır. Enzim işlevi bulunan bu RNA’lara ribozim adı verilmiştir². Günümüzde hücrelerde, başta ribozomlar olmak üzere, ribozimlerin hala çeşitli enzim işlevlerini yürütmesine karşın, hücredeki enzimlerin büyük çoğunluğunu artık proteinler oluşturmaktadır. Büyük olasılıkla aminoasitleri birbirine bağlayan ribozimlerin ortaya çıkması ile başlayan bu serüven, proteinlerin enzim olma konusunda RNA’lardan daha başarılı olmaları nedeniyle hücrelerde bu işlev büyük oranda proteinler tarafından üstlenilmiştir. RNA’nın sadece dört çeşit nükleotid, proteinlerin ise yirmi farklı aminoasitten oluştuğu düşünülürse, proteinlerin çok daha fazla çeşitte ve şekilde oluşturabileceği moleküllerin ve bunların içereceği kimyasal grupların, farklı işlevde birçok enzimin daha kolay ortaya çıkartılabilmesi evrimsel gelişmeye daha uygun düşmektedir.

Yaşamın akıllı robotları

Enzimler aslında işlerini büyük bir doğruluk ve hız içerisinde yapan robotlardır. Her enzim için tanımlanmış özgül bir tepkime vardır. Bu tepkimeden başka tepkimeyi gerçekleştirmez. Enzim bu kimyasal tepkimeyi gerçekleştirirken kendisi değişmeden kalır. Kendi haline bırakıldığında gerçekleşme olasılığı düşük olan, bu nedenle de çok uzun sürecek tepkimelerin kolayca gerçekleşmesini sağlar. Her kimyasal tepkime, gerçekleşebilmek için aktivasyon enerjisine gereksinim duyar. Enzimler aktivasyon enerjisi miktarını düşürerek tepkimenin kolayca gerçekleşmesini ve hızlanmasını sağlarlar³.

Hücre metabolizması seri üretim yapan bir fabrika gibi çalışır. Arka arkaya dizilmiş robotlar molekülleri şekilden şekile sokarak hücrelerin yapıtaşlarını oluştururlar. Genetik bilgi kullanılarak ribozomlar ve bunlar tarafından da yapısal proteinler ve enzimler yapılır. Enzimler ise hücreyi oluşturacak yapıtaşlarının tamamının yapımını sağlarlar.

Robotlar hızlıdır ve yorulmazlar

Enzimler çok hızlı robotlardır. Karmaşık bir iş olan doğru eşleşmeyi denetleyerek, DNA yapımını yürüten polimeraz, yeni zincire saniyede 1000 nükleotid ekler. Asetilkolinesteraz sinapslarda bir saniyede 25.000 asetilkolin molekülünü parçalayarak yeni bir iletinin geçebilmesi için gerekli ortamı hazırlar. Hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalayan katalaz enzimi saniyede 40.000.000 molekülün dönüşümünü gerçekleştirir⁴. Böylece hücreler için ölümcül olan bu oksijen radikali hızla ortadan kaldırılmış olur. Sonuç olarak hücrelerin yaşamlarını sürdürebilmeleri için tepkimelerin büyük bir hızla gerçekleştirilmesi gerekir. Enzimlerin en önemli işlevlerinden biri bu tepkimeleri hızla gerçekleştirmektir.

Ortam koşullarına uyum gösteren robotlar

Enzimler programlanabilir robotlardır. Örneğin mide mukoza hücrelerinde üretilen, proteinleri parçalayan enzim, pepsin, hücre içerisinde iken aktif bölgesini baskılayan bir parça ile pepsinojen şeklinde bulunur. Mide içerisine geçtiğinde ortamdaki asit etkisi ile bu baskılayıcı parça enzimin aktif merkezinden ayrılarak, enzimin çalışmaya başlamasını sağlar. Allosterik enzimler, aktif merkezlerinin dışında bir yere bir madde bağlandığında aktive ya da inhibe olan enzimlerdir. Glikolitik yolda yer alan enzimler bu tür bir otomatik kontrol altındadır. Örneğin hücrede ATP derişimi arttığında fosfofrüktokinaza bağlanarak bu enzimin çalışmasını, böylece glikolitik yolağın durdurulmasını sağlar. Enerjisi azalan hücrede AMP artınca, bu da fosfofrüktokinaza bağlanarak enzimi yeniden aktive eder⁴.

Biyoteknolojide kullanılan robotlar

Enzimlerin yapıları ve işlevleri belirlendikçe, biyoteknolojinin de en önemli araçları haline gelmiştir. Burada, daha çok biyoteknolojide yaygın olarak kullanılan bu akıllı robotlara yer verilecektir.

Polimerazlar: Hücrelerin en temel enzimlerinden olan polimerazlar, nükleotidleri kullanarak yeni DNA ve RNA molekülünün yapılmasını sağlarlar. Kalıp zincir kullanılarak yeni DNA zinciri yapılmasından temel olarak DNA polimeraz III sorumludur. Diğer DNA polimerazlara göre çok daha hızlıdır. Bu enzim, 1956 yılında DNA polimeraz I'i bulan Arthur Kornberg'in oğlu Thomas Kornberg ile Malcolm Gefter tarafından 1970 yılında tanımlanmıştır. Polimerizasyon dışında 3'-5' doğrulama (proof-reading) işlevi de olduğu için, oldukça hatasız DNA sentezi yapar. DNA polimeraz I, 5'-3' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. DNA sentezinin DNA polimeraz tarafından başlatılabilmesi için sentezlenmiş olan RNA primerlerini ortadan kaldırır ve yerine DNA sentezi yapar. DNA polimeraz II'nin ise oluşabilecek DNA zedelenmelerini onardığı saptanmıştır. DNA polimerazlar, doğrudan tek zincirli DNA'yı kullanarak DNA sentezi başlatamazlar. Varolan bir zincirin 3' ucuna nükleotid ekleyerek yeni zinciri oluşturabilirler^{5,6}. Bu özellikleri, deney tüpünde istenen bir bölgenin özgül olarak çoğaltılmasını sağlayan polimeraz zincirleme tepkimesi yönteminin geliştirilmesini sağlamıştır. Bu yöntemde zincirlerin her döngüde birbirinden ayrılması için tüpler 95°C'ye dek ısıtıldığından, kullanılması gereken enzimlerin bu sıcaklığa dayanıklı olması gereksinimi ortaya çıkmış ve ısıya dayanıklı Taq (*Thermus aquaticus*), Pfu (*Pyrococcus furiosus*) ve Vent (*Thermococcus litoralis*) polimerazları kullanıma girmiştir⁷. (Yazının sonunda bu enzimlerin geliştirilmesi için yapılan çalışmalardan da söz edilecektir.)

RNA polimerazlar (RNA polimeraz I, II ve III) 12 altünitesi olan enzimlerdir. DNA'dan RNA yapılmasını sağlarlar. RNA yapımı başlayacağı sırada altüniteler transkripsiyon faktörleri aracılığı ile DNA üzerinde toplanırlar. RNA polimeraz I, rRNA; RNA polimeraz II, mRNA ve gen ekspresyonu kontrolünde yer alan küçük RNA'lar (mikroRNA, siRNA); RNA polimeraz III ise 5S rRNA ve tRNA yapımından sorumludur⁸.

Tersine transkriptaz ("reverse transcriptase"), tek zincir RNA'dan çift zincirli DNA oluşturabilen bir enzimdir. Retroviruslarda bulunan bu enzim, tek zincir RNA'yı kalıp olarak kullanarak DNA sentezi yapar. DNA oluşurken bir yandan da enzimin üzerinde bulunan RNAz H aktivitesi gösteren birim RNA'yı parçalayarak ortadan kaldırır. Yapılmış olan tek zincir üzerinde yeni DNA sentezi yapan enzim bunu çift zincirli DNA haline getirir⁹.

DNA ligaz, künt uçlu çift zincirli DNA parçalarını birbirine ekleyebildiği gibi, birbirine yapışkan uçlar ile tutunan tek zincirleri de birbirine bağlayabilen bir enzimdir. İki zincir arasındaki fosfodiester bağlarını kurar.

Restriksiyon enzimleri, kısa DNA dizilerini tanıyarak çift zincirli DNA'yı kesen enzimlerdir. DNA'yı içte bir bölgeden kestikleri için restriksiyon endonükleaz adı da verilmektedir. Restriksiyon enzimlerinin, bakterileri bakteriyofajlara karşı korumak için evrimleştiği düşünülmektedir. Bugüne dek bakterilerde 3600 kadar restriksiyon enzimi saptanmış, bunların toplam 250 kadar farklı DNA dizisini tanıyarak kesebildiği belirlenmiştir. Bakterilerin %25 kadarının en az bir restriksiyon enzimine sahip olduğu düşünülmektedir¹⁰⁻¹². *Neisseria gonorrhoeae*'da 7 farklı restriksiyon enzimi saptanmıştır¹³.

Restriksiyon enzimleri bakterileri, kendilerini enfekte eden bakteriyofajlara karşı korur. Bunu bakteriyofaj DNA'sındaki özgül DNA dizilerini tanıyıp bu diziden DNA'yı keserek gerçekleştirirler. Restriksiyon enzimleri ilk bulunduğu anda, hemen akla nasıl olup da bu enzimlerin bakterinin kendi DNA'sını kesmediği sorusu gelmiştir. Metilaz enzimlerinin bulunması ile sorunun yanıtı ortaya çıkmıştır. Her bakteri bulundurduğu restriksiyon enziminin mutlaka bir metilaz eşini de taşımaktadır. (EcoRI ve EcoRI metilaz çifti gibi). Bu enzimlerin genleri, kromozomal DNA veya plazmid üzerinde yan yana yer almaktadır. Restriksiyon enziminin hemen önünde bu genin ekspresyonunu kontrol eden bir bölge bulunmaktadır. Tüm bu gen bölgesine restriksiyon/modifikasyon sistemi adı da verilmektedir. Bazı enzimlerde hem restriksiyon hem de metilaz aktivitesi bir arada bulunabilmektedir. Metilaz, restriksiyon enziminin kestiği diziyi tanıyarak bu bölgedeki sitozin veya adenine metil grubu takar. Bu şekilde değiştirilmiş DNA'lar restriksiyon enzimi tarafından kesilemez. Bakteriler çoğalırken kendi DNA'sını metilledikten sonra oluşturdukları restriksiyon enzimleri ile kendilerini enfekte eden virusların DNA'larını keserek onların çoğalmasını engellerler¹⁴.

Diğer hücre robotları: Metabolik enzimler

Birçok hücre, basit bir glukoz molekülünden kendisi için gerekli yapı taşlarının tamamını yakınına yapabilir ve bu işlemleri yürütebilmek için gerekli enerjiyi de elde edebilir. Tüm bu işlevleri metabolik enzimleri sayesinde gerçekleştirir⁴. Hücrelerde farklı tepkimeleri yürüten yüzlerce enzim bulunmasına karşın işlevleri açısından belli gruplar altında incelenebilirler:

Oksidoredüktazlar, moleküllerin indirgenme (redüksiyon) veya yükseltgenme (oksidasyon) işlemlerini yürütürler. Bilindiği gibi bu tepkimeler birbirinin tersidir ve oksidoredüktazlar tepkimeleri ortam koşullarına göre her iki yönde de yürütebilirler.

Transferazlar, bir molekülden diğerine bir grup atomun aktarılmasını sağlarlar. ATP ve şeker molekülleri arasındaki fosfat aktarımı, karbohidratların aminoaside dönüşmesinde amino grubunun aktarımı hep bu enzimler tarafından gerçekleştirilir.

Hidrolazlar, bir su molekülünün girişi ile bir bağın parçalanması ya da su molekülü çıkışı ile bir bağ kurulması işlemini yürütürler. Ester bağlarının hidrolizi bunlara örnek verilebilir.

İzomerazlar, bir molekülün izomerine dönüşmesini sağlarlar.

Liyazlar, su ve amonyum gibi küçük moleküllerin çift bağlı bölgelere eklenmesini veya buradan çıkartılmasını sağlayan enzimlerdir.

Ligazlar, -yukarıda DNA ligazlarda değinildiği gibi- küçük molekülleri birbirine bağlayarak büyük moleküller oluşturan enzimlerdir.

Robotları yeniden programlamak

Enzimlerin yapıları ve işlevleri hakkında biriken bilgiler, bugün artık araştırmacılara enzimlerin aminoasitlerini değiştirerek onlara yeni özellikler kazandırabilme yeteneği sağlamıştır. Burada, örnek

olarak polimeraz zincirleme tepkimesinde (PZT) kullanılan ısıya dayanıklı DNA polimerazlarda yapılan geliştirmelere değineceğiz.

PZT yüksek sıcaklıkta yapılan sıcaklık döngüleri ile gerçekleştirilir. Primerlerin bağlandığı sıcaklıklardan daha düşük sıcaklıklara düşülürse, primerler kendilerine özgül olmayan bölgelere bağlanabilirler. PZT'ye başlanırken tepkime karışımları oda sıcaklığında hazırlandığından bu sırada DNA'ya özgül olmadan bağlanan primerlerden, ilk ısınma sırasında, özgül olmayan ürünler oluşur. Bunu önlemek için DNA polimerazın düşük sıcaklıkta çalışmasını engellemek, yüksek sıcaklığa çıkıldıktan sonra çalışmaya başlamasını sağlamak gerekmektedir. PZT'de yaygın olarak kullanılan "Taq polimeraz" enziminden elde edilen bazı mutantların düşük sıcaklıklarda çalışmadığı, yüksek sıcaklıklarda işlevini koruduğu saptanmış, sıcakta başlama ("hot start") için bu enzimler kullanılmaya başlanmıştır. Bu enzim, mutantları rastgele tarayarak elde edilmiştir. Ancak enzimlerin yapıları ve her bölgedeki aminoasitlerin işlevleri anlaşıldıkça, enzimlerin bilinçli bir şekilde yeniden tasarımı da yapılabilmeye başlanmıştır. Tasarlanan bu değişiklikler yer hedefli mutagenез ("site directed mutagenesis") ile gerçekleştirilmiştir. Bu konuda en başarılı örneklerden birisi Taq polimerazın Phe667Tyr mutantıdır. Enzime dideoksinükleotidler, deoksinükleotidlerden ayırma yeteneği kazandırdığı anlaşılan bu aminoasidin değiştirilmesi ile enzimin dideoksinükleotidler kullanma yeteneği yaklaşık 1000 kat artırılmıştır. Bilindiği gibi dideoksinükleotidler DNA dizi incelemesi yapılırken zincir sonlandırma için kullanılmaktadır. Bu nedenle, bu yeni Taq polimeraz, dizi analizi tepkimelerinin önemli bir elemanı haline gelmiştir. Yüksek sıcaklığa dayanıklı *Methanopyrus kandleri*'nin topoizomerase V enziminin DNA'ya bağlanan bölgesi Taq polimeraz ve Pfu polimeraza eklendiğinde bu enzimlerin DNA yapımını daha iyi sürdürebildiği, fenol, kan, interkale edici boyalar gibi PZT inhibitörlerinden daha az etkilendiği saptanmıştır⁷.

Sonuç olarak enzimlerin yapısı ve işlevleri anlaşıldıkça onları yeniden tasarlamak ve yeni özellikler kazandırmak olanaklı hale gelecek, belki de yepyeni işlevsel enzimlerin tasarlanması ve üretilmesi gerçekleşecektir. Akıllı robotlar biyoteknolojiye her zamankinden fazla hizmet etmeyi sürdürecektir.

Kaynaklar

1. Gilbert W. The RNA world. Nature 1986; 319: 618.
2. Johnston W, Unrau P, Lawrence M, Glasner M, Bartel D. RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension. Science 2001; 292: 1319-25.
3. Garrett RH, Grisham CM. Biochemistry. 1999, 2nd ed. Saunders College Publishing. US.
4. <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/E/Enzymes.html>
5. Goodsell DS. The molecular perspective: DNA polymerase. Oncologist 2004; 9: 108-9.
6. Hubscher U, Maga G, Spadari S. Eukaryotic DNA polymerases. Ann Rev Biochem 2002; 71: 133.
7. Pavlov AR, Pavlova NV, Kozyavkin SA, Alexei I. Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications. Trends in Biotechnol 2004; 22: 253-60.
8. Hurwitz J. The discovery of RNA polymerase. J Biol Chem 2005; 280: 42477-85.
9. Reverse transcriptases. <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/enzymes/rt.html>
10. Restriction enzyme resource. http://www.promega.com/guides/re_guide/chapone/1_1.htm
11. Peters P. Restriction Enzymes Background Paper. <http://www.accessexcellence.org/AE/AEC/CC/restriction.html>
12. Bowen R. Restriction endonucleases and DNA modifying enzymes. <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/enzymes/index.html>
13. Stein DC, Gunn JS, Radlinska M, Piekarczyk A. Restriction and modification systems of *Neisseria gonorrhoeae*. Gene 1995; 157: 19.
14. Wilson GG, Murray NE. Restriction and modification systems. Ann Rev Genet 1991; 25: 585.

KNF3**SEPTIFAST - A MULTIPLEX REAL TIME PCR METHOD FOR THE DETECTION AND IDENTIFICATION OF BACTERIAL AND FUNGAL PATHOGENS IN THE BLOODSTREAM***Roche Diagnostics katkılıyla***Gorm LISBY, MD, PhD**

Department of Clinical Microbiology 445, Hvidovre Hospital, Kettegård Alle 30, DK-2650 Hvidovre, Denmark.

Worldwide, severe sepsis is increasingly a cause of death, and rapid, correct initial antimicrobial treatment reduces mortality. Although blood culture is considered to be the gold standard, the etiological agent(s) cannot always be found by this technology. A novel multiplex PCR test (*SeptiFast*), that can be performed in less than six hours and can identify a panel of 20 bacterial and fungal species directly from blood, was compared with blood culture in a multicenter trial in patients with suspected bacterial or fungal sepsis. Five hundred and fifty-eight paired samples of blood culture and *SeptiFast* from 359 patients were evaluated. Blood culture found 96 isolates and *SeptiFast* identified 186 microorganisms. Of the 96 blood culture isolates, 50 were also detected by *SeptiFast* and 22 blood culture isolates were identified as contaminant isolates. Eighteen of the remaining 24 blood culture clinical isolates were not detected by *SeptiFast* and six blood culture isolates were not included in the *SeptiFast* masterlist. *SeptiFast* detected 186 microorganisms, of which 12 were considered to be contaminants. Of the 174 clinical microorganisms identified by *SeptiFast*, 50 were also detected by blood culture. 67 of the remaining 124 *SeptiFast* positive and blood culture negative microorganisms were also identified in routine cultures from clinical relevant anatomical sites from the patient. Future clinical utility studies will reveal if *SeptiFast* can provide a rapid, significant add-on advantage to blood culture in the detection of blood stream pathogens.

KNF4

GENOMIC ANALYZER

Makro katkılarıyla

Dr.Rick TEARLE

Revolutionary improvements in sequencing technology and throughput now make possible experiments that until recently were just dreams. Illumina's Genome Analyzer, with a throughput of up to 4Gb in 5 days, allows the sequencing of genomes, transcriptomes and the epigenome in a matter of days. The technology is based on the formation of clonal clusters of molecules on a fixed surface, with up to 100 million clusters being formed. These clusters are then sequenced with a variation on the standard sequencing-by-synthesis. The massive parallelism allows for the high throughput of sequence data and also reduces the cost of sequencing by up to three orders of magnitude. If the first human genome took years to sequence and cost well over \$1Bn, a human genome can now be sequenced in months for less than \$300,000.

Almost any aspect of DNA or RNA biology can be addressed, not just genome sequencing. The transcriptome of an organism at a particular stage or in a particular environment can be mapped, gene expression analysed and compared, DNA and RNA modifications investigated, and the binding sequences of DNA or RNA binding sequenced delineated almost to the base, across a whole genome.

The implications for microbial analysis are enormous. A new species can be analysed completely in a matter of weeks. Genetic variation within and between species is amenable to dissection at the population level. Metagenomics is now possible.

However the availability of such vast amounts of data has pushed the problems of analysis into a new realm, and bioinformatics is now the new challenge and the new bottleneck.

The presentation will explain the the technology behind the Genome Analyzer and discuss the kinds of experiments that can be now be carried out.

KNF5

BİYOSENSÖRLER

Prof. Dr. Hüseyin Avni ÖKTEM

ODTÜ, Biyolojik Bilimler Bölümü, 06531 Ankara.

Biyosensörler biyolojik ajanlardan oluşan bir duyargacı bulunan ve bir çevirici yolu ile varolanı nitelik veya nicelik açısından belirleyebilen kimyasal tanıma cihazlarıdır. Biyosensörler isminden de anlaşılacağı gibi bir biyolojik ajan ve algılayıcıdan oluşmaktadır. Biyolojik ajan algılanması istenen maddeye çok özel bir bağlanma gösterirken, algılayıcı çevirme mekanizmasına bağlı olarak bağlanmayı nitel veya nicel açıdan anlaşılabilir bir değere çevirir.

Biyosensörler günümüzde biyomedikal, endüstriyel ve askeri uygulamalarda yer almaktadır. En geniş uygulama alanı, pazarlama potansiyeli sebebiyle kan şekeri ölçmekte kullanılan biyosensörlerdir. Potansiyeli olmasına rağmen biyosensörler henüz gıda güvenliği, çevre kirliliği örneklemeleri ve diğer klinik alanlarda yaygınlaşmamıştır.

Biyosensörler, dönüştürücülerin kullandığı temel prensipleri esas alarak rezonant, optik, termal, iyon hassas ve elektrokimyasal olmak üzere sınıflandırılabilir. Rezonant tip biyosensörlerde akustik dalga dönüştürücü antikor, aptamer bakteriyofaj gibi bioelementlerle birleştirilir. Hedef molekül bioelementle etkileştiği zaman, zardaki kütle değişiminde oluşan değişim rezonant frekansını değiştirir ve frekansdaki bu değişimin ölçülmesi ile bağlanan hedef molekül miktarı belirlenebilir. Optik biyosensörlerde, dönüştürücü tarafından çıktı olarak alınan ve ölçülen sinyal, ışıktır. Bu tip biyosensörler optik kırınım veya elektrokimyasal ışımaya dayanırlar. Optik biyosensörlerde bioelementin hedef moleküle bağlanması, kırınımında değişim oluşturmaktadır ve bu değişim ölçülerek hedef belirlenebilir. Termal biyosensörler, biyolojik reaksiyonların temel prensiplerinden biri olan ısı üretimi veya tüketimi temeline dayanırlar. Herhangi bir biyolojik reaksiyon oluşurken ısı üretir veya tüketir ve reaksiyonun olduğu ortamın sıcaklığını değiştirir. Termal biyosensörler, ortamdaki bu ısı değişimini ölçerek bioelement ile hedefin bağlanma miktarını saptar. Isı değişimi, molar entalpi ile doğrudan orantılı olduğu için bu tip biyosensörler çok hassastır. İyon hassas biyosensörler, yarı iletken FET (alan etkili transistör) yüzeyler kullanılarak üretilir. Bu tip biyosensörlerde, yüzeydeki bioelement ve hedef arasındaki etkileşimler elektrik potansiyelde bir değişim oluşturur ve bu değişim ölçülerek hedef belirlenebilir. Bunun yanında bu tip yüzeyler sadece hedef molekülün geçebileceği özel polimerler ile kaplanarak daha özgül hale getirilebilir. Elektrokimyasal biyosensörler ise genellikle DNA, DNA'ya bağlanan ilaçlar ve glukoz miktarının belirlenmesinde kullanılır. Bu tip biyosensörlerin prensipi, oluşan reaksiyon tarafından kullanılan ya da üretilen iyonların, oluşan ortamın elektriksel özelliklerini değiştirmesi esasına dayanır. Elektrokimyasal biyosensörler, ölçtükleri değere göre kondaktiyometri, amperometrik veya potansiyometrik olarak adlandırılırlar.

Bunların dışında biyosensörler, kullanılan bioelementlere göre de gruplanabilir. Biyosensörlerde algılayıcı bioelement olarak genellikle enzimler, antikorlar, DNA, RNA, aptamer, bazı dokular, bütün hücreler ve polisakaritler kullanılabilir.

Biyosensörler nitel, nicel veya yarı nicel olabilirler. Kullanım amaçlarına göre hassasiyet ve ölçme-değerlendirme limitleri değişebilir. Nitel biyosensörlere en güzel örnek gebelik testleridir.

Bu testler miktar belirtmez, sadece pozitif ya da negatif sonuç verir. Yarı nicel biyosensörlere verilebilecek en güzel örneklerden biri alkol testleridir. Bu tip testler kesin rakamlar yerine daha çok aralık belirtirler. Nicel biyosensörlerde ise glukoz biyosensörlerinde olduğu gibi hedefin miktarı belirlenmektedir.

Bu sunumda biyosensörlerin genel çalışma prensipleri ve uygulama alanları özetlenecektir.

Mini Konferans

MKF

İNSAN PAPİLLOMAVİRUS AŞILARINDA SON DURUM

Prof. Dr. A. Dürdal US

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

Tüm dünyada servikal kanserlerin her yıl yaklaşık 500.000 kadını etkilediği ve bunların %80'inin de gelişmekte olan ülkelerde yaşayan kadınlar olduğu bilinmektedir. 2005 yılında dünya çapında servikal kansere bağlı yaklaşık 260.000 ölüm olduğu ve bunların %100'ünün insan papilloma virusları (HPV) ile oluşturulduğu tahmin edilmektedir. Gelişmiş ülkelerde jinekolojik tarama programlarının iyi bir organizasyonla ve düzenli olarak yürütülmesi, prekanseröz lezyonların erken tanısı ve etkin tedavisini mümkün kılmakta ve bu durum da gelişmiş ülkelerde HPV'na bağlı servikal kanser insidansının daha düşük olmasını açıklamaktadır.

İnsan papilloma virusları (HPV), deri veya mukoz membranların bazal epiteliyal hücrelerini enfekte eden, çıplak, ikozahedral simetrik, çembersel çift iplikli DNA içeren viruslardır. Viral genom yedi erken (E1-E7) ve iki geç (L1, L2) protein kodlamaktadır. Yapısal olmayan erken proteinler, genomun replikasyon ve transkripsiyonundan (E1-E5) ya da konak hücrenin transformasyonundan (E6, E7) sorumludur. Geç proteinlerden olan L1 majör kapsid proteinleri, kapsid yapısının %80'ini oluşturmaktadır. L1 polipeptidleri, minör kapsid proteini olan L2 alt üniteleri olmaksızın, kendiliğinden bir araya gelerek virus benzeri partikül (virus-like particles=VLP) adı verilen yapıları meydana getirme özelliğine sahiptir. Bu yapılar, günümüzde lisans almış HPV aşılarının hazırlanmasında kullanılmakta ve enfeksiyona karşı koruyucu nötralizan antikor yapımını indükleyerek profilaktik etki oluşturmaktadır. Buna karşın virusun onkojenik proteinleri olan E6 ve E7'yi hedef alan terapötik aşı adayları, hücrel immün yanıtı indükleyerek HPV ile transforme hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlamaya yöneliktirler.

Yüzden fazla HPV genotipi arasında yüksek riskli tipler olarak kabul edilen 13'ü, servikal kanser ve diğer mukozal (anogenital, baş, boyun) kanserlerden sorumludur. Düşük riskli tipler ise, servikal dokuda genellikle benign lezyonlar ve gerek kadın gerekse erkeklerde genital siğiller (condyloma acuminata) oluşturmaktadır. Genital HPV enfeksiyonu primer olarak genital yüzeylerle temas sonucu bulaşır, ancak bulaş için cinsel temas gerekliliği yoktur. Enfeksiyon her yaşta görülebildiği gibi, özellikle kadınlarda iki dönemde pik yaptığı (<30 yaş ve 55-64 yaş) rapor edilmektedir. Serviksin HPV enfeksiyonları sıklıkla asemptomatik olup, enfeksiyonların %90'ından fazlası iki yıl içinde temizlenmektedir. Ancak oluşan immünitenin düzeyi ve süresi tam olarak bilinmemektedir. Doğal enfeksiyon sonucu kadınların yalnızca %50-60'ında serumda antikor varlığı saptanmaktadır.

Dünyanın birçok ülkesinde, yüksek ve düşük düzey skuamöz intraepiteliyal lezyonlar (sırasıyla, HSIL ve LSIL), servikal intraepiteliyal neoplazi (CIN) ve adenokarsinoma in situ (AIS) olgularında etken olan HPV genotiplerinin araştırıldığı çok sayıda çalışma yapılmıştır. Buna karşın bazı bölgeler (Orta Asya, Afrika ve Doğu Avrupa) için yeterli veri bulunmamaktadır. Yine de bu olgularda en sık rastlanılan HPV genotiplerinin tip 16 (%50-60) ve 18 (%10-15) olduğu; diğer yüksek riskli tiplerin ise (31,33,35,45,52,58, vb) bölgelere göre farklı prevalans gösterdiği belirtilmektedir. Dolayısıyla HPV tip 16/18 içeriğine sahip bir aşının dünyadaki servikal kanserlerin %70'inden fazlasını önleyebileceği öngörülebilir.

HPV enfeksiyonlarından korunmada, 2006 yılında birçok ülkede lisans alan dört değerli (kuad-rivalan) aşı (Gardasil; Merck) ile 2007 yılında Avustralya'da lisans alan iki değerli (bivalan) aşının (Cervarix; GlaxoSmithKline=GSK) son derece etkili olduğu, yapılan birçok plasebo kontrollü faz II ve faz III çalışmasında gösterilmiştir (Tablo I). Bu aşılar, rekombinant teknolojiyle üretilen içi boş protein kılıfları (VLP) kullanılarak hazırlanır (Şekil 1). VLP'ler viral DNA içermedikleri için enfeksi-yöz değillerdir, buna karşın son derece immünojenik özellik taşırlar. Aşının kas içi uygulamasından sonra VLP'ler hızla kan damarlarına ve lokal lenf düğümlerine yayılarak hem CD4⁺ T hücre hem de B hücre yanıtını indüklerler. Tipe özgül olarak oluşan antikorlar nötralizan özellik taşımakta ve konformasyonel olarak L1 epitopunu tanımaktadırlar. Persistan HPV enfeksiyonunun ve dolayısıyla da servikal lezyonların önlenmesi, ancak kuvvetli bir humoral immün yanıt ve immün bellek ile ger-çekleşir. Matematiksel model analizlerine göre, HPV tip 16 profilaktik aşısının üç doz uygulaması ile 16-23 yaş kadınların %99'unun hayatları boyunca saptanabilir düzeyde anti-HPV-16 antikorlarına sahip olacağı hesaplanmıştır. Aşı üreticilerinin kendi patentleriyle kullandığı adjuvan sistemlerinin, klasik alüminyum adjuvanına göre immün yanıtı daha yüksek düzeyde stimüle ettiği ifade edilmek-tedir. Örneğin Cervarix aşısında kullanılan AS04 adjuvanının hem hücresel hem de humoral immün yanıtı daha kuvvetli ve daha uzun süreli uyardığı ve tip 16/18'e karşı daha yüksek özgül bellek B hücre yanıtı oluşturduğu vurgulanmaktadır.

Tablo I. Günümüzde lisans almış HPV aşılarının özellikleri

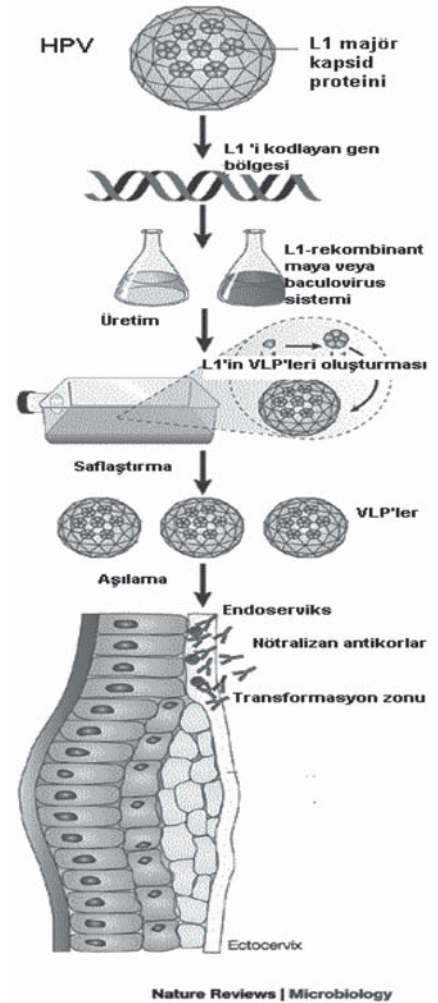
	<i>Kuadriyalan aşı</i>	<i>Bivalan aşı</i>
Üretici firma (ticari isim)	Merck (Gardasil)	GlaxoSmithKline (Cervarix)
VLP genotipleri	6,11,16,18	16,18
Substrat (ekspresyon sistemi)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Baculovirus
Adjuvan	Alüminyum hidroksifosfat sülfat (225 µg) (Merck alüminyum adjuvanı)	Alüminyum hidroksit (500 µg) + monofosforil lipid A (50 µg) (GSK AS04 adjuvanı)
Uygulama şekli	3 doz x 0.5 ml; kasiçi uygulama	3 doz x 0.5 ml; kasiçi uygulama
Uygulama süresi	0, 2.ay, 6.ay	0, 1.ay, 6. ay
Faz II çalışmalarının yapıldığı ülkeler	Brezilya (%34), Avrupa (%21), ABD (%45)	Brezilya (>50), Kuzey Amerika
Faz III çalışmalarının yapıldığı ülkeler	Kuzey Amerika (%25), Latin Amerika (%27), Avrupa (%44), Asya-Pasifik (%4)	Kuzey Amerika (%12), Latin Amerika (%34), Avrupa (%30), Asya-Pasifik (%25)
Adölesanlardaki güvenilirlik/etkinlik ile ilgili destekleme çalışmaları	9-15 yaş arası kız ve erkekler	10-14 yaş arası kızlar; 10-18 yaş arası erkekler
Halen devam eden veya yeni başlayacak klinik çalışmalar	25-45 yaş arası kadınlarda etkinlik, immünojenisite destekleme ve güvenilirlik çalışmaları; - Diğer aşilarla birlikte aynı anda uygulama çalışmaları; - HIV ile enfekte ve diğer immün yetmezlikli gruplarda güvenilirlik ve immünojenisite çalışmaları; - Erkeklerde etkinlik çalışmaları	>26 yaş kadınlarda etkinlik, immünojenisite destekleme ve güvenilirlik çalışmaları; - Diğer aşilarla birlikte aynı anda uygulama çalışmaları; - HIV ile enfekte kadınlar dahil Afrika toplumlarında güvenilirlik ve immünojenisite çalışmaları

Faz II ve III aşı çalışmaları en yoğun olarak Kuzey ve Latin Amerika ve Avrupa'da gerçekleştirilmiş; Afrika'da ise aşının etkinliği ve güvenilirliğinin araştırılması için çalışmalar henüz planlanmıştır. Yapılan çalışmalarda, her iki tip HPV aşısının da üçüncü dozundan bir ay sonra 15-26 yaş arasındaki kadınların yaklaşık %100'ünde aşı tiplerine karşı saptanabilir düzeylerde antikor oluştuğu belirlenmiştir. Aşı ile elde edilen antikor düzeyleri, doğal enfeksiyon sırasında oluşan antikor düzeylerinden 10-104 kat daha yüksektir. Aşılamadan sonra oluşan antikor düzeylerinin yaş ile ters orantılı olduğu izlenmektedir. VLP temelli aşılarda 15-23 yaş arasındaki kadınlarda yüksek immünojenisite gösterdiği ve çok iyi tolere edildiği saptanmıştır.

Aşının üçüncü dozunun tamamlanmasıyla en yüksek düzeye (pik noktasına) ulaşan antikor titreleri, aşılamadan 18 ay sonra yaklaşık 1log azalmakta, ilerleyen zamanlarda titrelerin düşmesine rağmen yine de doğal enfeksiyon sonucu oluşan antikor titrelerinden daha yüksek olmak kaydıyla beş yıl boyunca devam etmektedir. Ancak hastalığa karşı korumada etkili olan minimum koruyucu antikor düzeyinin tam olarak bilinmediği de akıldan çıkarılmamalıdır. Kuadriyalan aşı çalışmalarında, ilk aşılamadan beş yıl sonra uygulanan rapel dozunun antikor titrelerinde artışa yol açtığı gösterilmiştir. Günümüzde bildirilen en uzun takipli çalışmalar ancak beş yılı kapsamaktadır. Oysa antikor titrelerindeki kalıcılığın ve klinik korumanın net olarak belirlenmesi için daha uzun takipli çalışmalara gerek vardır ki, bugün için her iki aşının da uygulanmasından sonra 14 yıllık takip çalışmaları planlanmıştır.

Her iki tip aşı ile de yapılan çalışmalar, diğer HPV tiplerine karşı çapraz koruma sağlandığını göstermektedir. Bu durumun, aşı tipleri olan tip 16'nın tip 31 ile, tip 18'in ise tip 45 ile arasındaki yakın genetik ilişkiye bağlı olduğu ifade edilmektedir. Bivalan aşı ile yapılan uzun süre takipli faz II çalışmalarında, aşı etkinliğinin tip 45'e karşı %94.2, tip 31'e karşı ise %54.5 olduğu bildirilmiştir. Kuadriyalan aşı çalışmasında ise, önceden tüm tipler için seronegatif olan 10 kadın aşılanmış ve 10/10'unda tip 18'i, 8/10'unda tip 31'i ve 6/10'unda tip 45'i nötralize eden antikorların geliştiği saptanmıştır. Ancak çapraz korumanın klinik öneminin gösterilmesi için ileri çalışmalar devam etmektedir.

HPV aşısının diğer aşılara kombine kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalar, kuadriyalan HPV aşısı ile rekombinant hepatit B aşısının aynı ya da farklı zamanlarda uygulanmasının, her iki aşıya karşı antikor yanıtını değiştirmediklerini göstermiştir. Gerek kuadriyalan gerekse bivalan HPV aşılı ile adölesanlara uygulanan diğer aşılarda (difteri-tetanoz-boğmaca, meningokokal konjugat aşısı, vb) arasındaki etkileşimin araştırıldığı çalışmalar ise halen devam etmektedir. Ancak bu aşılarda HIV pozitif, ciddi malnütrisyonlu ve malaraya veya helmint enfeksiyonları olan bireylerde etkinliği henüz değerlendirilmemiştir.



Şekil 1. HPV-L1 virus benzeri partiküller (VLP) ile aşı hazırlanması ve uygulanması (<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v2/n4/thumbs/nrmicro867-f2.gif>)

Her iki aşıda, üç dozun tamamlandığı kadınlarda genotip 16 ve 18 ile oluşan persistan enfeksiyonlara karşı %90'ın üzerinde etkinlik göstermiştir (Tablo II). Bivalan aşının faz II çalışmalarında; aşılanan 481 kadından hiçbirisinde tip 16/18'e bağlı CIN-2 lezyonu gelişmezken, plasebo grubundaki 470 kadının beşinde tip 16/18'e bağlı CIN-2 lezyonu ortaya çıkmıştır (etkinlik %100). Kuadrivalan aşı protokolünün tamamlandığı 16-26 yaş arası kadınlarda da benzer sonuçlar elde edilmiş ve aşı CIN 2/3 veya AIS gelişiminden korumada %100 etkin bulunmuştur.

HPV aşıları profilaktik amaçlı olarak tasarlanmışlardır. Aşıda bulunan tipler ile daha önceden karşılaşmış kadınlara kuadrivalan aşının uygulaması sonucu elde edilen immünojenite, etkinlik ve güvenilirlik ile ilgili veriler, aşılamadan önce tip 16/18 ile enfekte olmuş olan kadınlarda CIN 2/3 veya AIS'e karşı aşının koruyucu olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte, aşılamadan önce aşıda bulunan dört tip ile de karşılaşmış kadın sayısının çok az olacağı düşünülürse, aşı tiplerinden sadece birisi ile karşılaşmış kadınların diğer tipler ile enfeksiyondan korunmasında aşidan yararlanabileceği ifade edilmekte ve bu nedenle de tarama yapılmasına gerek olmadığı ileri sürülmektedir. Aşılanacak kadınların seçilmesinde tarama yapılmasına gerek olmadığının belirtilmesine karşın, aşılanmış kadınların taranmasına devam edilmesi gerektiği de vurgulanmaktadır; zira bu kadınlar CIN lezyonları veya AIS nedeni olabilecek diğer HPV tipleriyle enfekte olma riskini taşımaktadırlar.

Tablo II. HPV aşıları ile yapılan randomize, plasebo kontrollü etkinlik çalışmaları için birer örnek

Üretici/Aşı	Uygulama zamanı (Ay)	Plasebo/Hasta sayısı	Yaş (yıl)	Çalışma süresi (Ay)	Homolog tiplerle oluşan persistan enfeksiyona karşı koruma (%)	Homolog tiplerle oluşan >ASCUS'a karşı koruma (%)	Herhangi bir HPV tipiyle oluşan >ASCUS'a karşı koruma
Merck/Kuadrivalan	0, 2, 6	275/277	16-23	35	89 (70-97)	100 (16-100)*	Bildirilmedi
GSK/Bivalan	0, 1, 6	383/393	15-25	48	94 (63-100)	93 (71-99)*	45% (17-63)

>ASCUS (Atypical squamous cells of unknown significance)'dan daha ileri tipteki lezyonlar; * %95 Confidence Interval.

HPV aşılarının yan etkileri değerlendirilecek olursa, enjeksiyon bölgesinde ağrı, eritem ve ödem oranlarının aşı uygulananlarda plasebo gruplarından daha yüksek olduğu görülmektedir. Ciddi yan etkiler yönünden ise aşı ve plasebo grupları arasında herhangi bir fark bulunmamıştır. Aşılananların çok az bir kısmı (%0.1) yan etkiler nedeniyle uygulamadan vaz geçmişlerdir. Bu konuda daha güvenilir verilerin elde edilebilmesi için üretici firmalar lisans sonrası takip planları hazırlamışlardır.

HPV aşılmasının primer hedef grubu, adolesans öncesi -cinsel deneyim geçirmeyen- kız çocuklarıdır. Buna karşın >26 yaş kadınlar ile erkeklerin aşılanmasının sağlayacağı potansiyel yararlar da araştırılmaktadır. Yine de diğer grupların aşılanması ile ilgili ayrıntılı maliyet-etkinlik çalışmalarına gereksinim vardır. CDC/ACIP (Centers for Disease Control and Prevention/Advisory Committee on Immunization Practices), kadınlar için aşılama yaşını 11-12 olarak vermekte, ancak aşının 9 yaşa kadar çekilebileceğini de ifade etmektedir. Daha önceden aşılanmamış kadınlar için ise, aşılanmanın 13-26 yaş arasında uygulanması önerilmektedir (Catch-up vaccination). Aşılama rutin

servikal kanser tarama programlarını etkilememeli ve aşılannmış kadınlar daha önceden önerildiği şekilde taramaya dahil edilmelidir.

HPV taramalarının sınırlı olduğu ya da hiç yapılamadığı veya tedaviye erişim olanaklarının olmadığı ülkelerde HPV aşılmasının en önemli yararı servikal kanserlerden ölüm oranını potansiyel olarak azaltması olacaktır. Düşük ya da orta gelirli ülkelerde yapılan çalışmalar HPV aşılması ile birlikte hayat boyu 1-3 kez tarama yapılmasının, aşının yüksek fiyatına rağmen, servikal kanserlerin önlenmesinde maliyet-etkin olduğunu düşündürmüştür. Ancak, lisans aldıktan sonra büyük umut ve heyecan oluşturan bu yeni aşların ne zaman ve nasıl uygulanacağı konularında ve aşı politikalarının düzenlenmesinde bazı ülkelerde hala netleşmeyen ve/veya çözülemeyen sorunlar mevcuttur. Bilindiği gibi bir aşının bir ülkedeki aşı protokollerine dahil edilmesi için en önemli belirleyicilerden birisi aşının fiyatıdır. Bugün için kuadrivalan aşının fiyatı doz başına 100 \$ (toplam 300 \$; ülkemizde 750-1000 YTL) olup, üretici firmalar ülkelerin ekonomik düzeylerine göre fiyatlarını düşürmeyi arzu ettiklerini ifade etmektedirler. Buna karşın, günümüzde HPV aşısını genel aşı programlarına dahil eden çok az sayıda ülke olduğu için aşı fiyatlarında bir düşüşün olmayacağı olasılığı yüksektir. Aşı politikalarını oluşturan resmi sağlık kurumları/yetkililerine yol göstermek amacıyla Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2007 yılında bir kılavuz hazırlamış ve yayınlamıştır.

Hastalığın toplumlara yüklediği sorunlar ile aşının güvenilirlik ve etkinliği konusundaki bilgiler, bugün için HPV aşılmasının sağlık programlarına entegre edilmesi konusunda karar vermek için yeterli değildir. Bir aşının, bir ülkenin aşılama programına alınabilmesi için maliyet-yarar analizlerinin (hastalığın o ülkedeki insidansı, mortalitesi, tedavi giderleri; aşının etkinliği, sağlayacağı korumanın gücü ve süresi, vb) iyi yapılması gerekmektedir. Ayrıca HPV aşılmasında, konunun psikososyal ve etik boyutu da göz ardı edilmemelidir. Zira bazı tutucu ve radikal dinci çevreler, “9-12 yaşındaki kız çocuklarının cinsel yolla bulaşan bir etkenin oluşturabileceği enfeksiyon/kansere karşı korunması için aşı yapılması”na sıcak bakmamakta; bu durumun “çocukların cinsel özgürlüğe kavuşması için verilen bir izin” olacağını savunmaktadırlar. Örneğin, ABD Teksas eyaletinde 2007 yılında zorunlu uygulama programına alınan HPV aşılması, gerek aileler gerekse medya tarafından ciddi tepkilerle karşılanmıştır. Ayrıca, aşının şimdiye dek pazarlanan en pahalı aşı olduğu ve üretici firma ile resmi makamlar arasında maddi çıkarlara dayalı ilişkiler sonucu bu zorunluluğun getirildiği kanısı da doğmuştur. Ülkemizde de benzer tepkiler gerek kamuoyu ve medyada gerekse bilimsel platformda tartışılmaktadır. Tüm bu konular göz önüne alındığında, ülkemizde HPV aşı uygulanmasının ulusal aşı programına dahil edilmesi ya da aşırı satın alabilme olanağı olanlar için isteğe bağlı olarak da olsa önerilen yaşlarda uygulanması ile ilgili kararlara varılabilmesi zaman alacak gibi görünmektedir.

Kaynaklar

1. Ault K, Reisinger K. Programmatic issues in the implementation of an HPV vaccination program to prevent cervical cancer. *Int J Infect Dis.* 2007; 11 (Suppl 2): S26-8.
2. Ault KA. Long-term efficacy of human papillomavirus vaccination. *Gynecol Oncol* 2007; 107 (Suppl 2): S27-30.
3. Breakthroughs in Bioscience. Viruses, cancer, warts and all: The HPV vaccine for cervical cancer. <http://opa.faseb.org/pdf/2008/HPV.pdf>
4. Brun JL. Human papillomavirus vaccines. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 2008; 37 (Suppl 1): S155-66.

5. Bu aşı dünyada tartışılıyor.
http://haber.turkmania.com/14626-Bu_asi_dunyada_tartisiliyor.htm
6. Cutts FT, Franceschi S, Goldie S, et al. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. Bulletin of the World Health Organization 2007; 85: 719-26.
7. Giannini SL, Hanon E, Moris P, et al. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. Vaccine 2006; 24: 5937-49.
8. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, et al.; HPV Vaccine Study group. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. Lancet 2006; 367: 1247-55.
9. Hildesheim A, Herrero R, Wacholder S, et al.; Costa Rican HPV Vaccine Trial Group. Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial. JAMA 2007; 298: 743-53.
10. HPV vaccine edict opponents.
<http://osi-speaks.blogspot.com/2007/02/persons-for-week-hpv-vaccine-edict.html>
11. İngiliz kızların cinsel ilişki yaşı 12'ye düştü! Okulda, rahim ağzı kanseri aşısı olacaklar. <http://haber.ihya.org/lobi/index.php?t2=haber&an=34452&kn=32>
12. Markowitz LE, Dunne EF, Saraiya M, et al.; Centers for Disease Control and Prevention (CDC); Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Quadrivalent human papillomavirus vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep 2007; 56 (RR-2): 1-24.
13. Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, et al.; HPV PATRICIA study group. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. Lancet 2007; 369: 2161-70.
14. Palicaros A, Vonau B. Human papilloma virus vaccine--more than a vaccine. Curr Opin Obstet Gynecol 2007; 19: 541-6.
15. Pedersen C, Petaja T, Strauss G, et al.; HPV Vaccine Adolescent Study Investigators Network. Immunization of early adolescent females with human papillomavirus type 16 and 18 L1 virus-like particle vaccine containing AS04 adjuvant. J Adolesc Health 2007; 40: 564-71.
16. Political Friendster. <http://www.politicalfriendster.com/images/5565.jpg>
17. Rahim ağzı kanseri için aşı hesabı.
<http://www.milliyet.com.tr/2007/04/05/yasam/yas01.html>
18. Rahim ağzı kanseri aşısı Türkiye'de. www.ntvmsnbc.com/news/404564.asp
19. Roden R, Wu TC. How will HPV vaccines affect cervical cancer? Nature Reviews Cancer 2006; 6: 753-63.
20. Ustaçelebi Ş. İnsan papillomavirus aşılması. 3.Ulusal Viroloji Kongresi. 9-13 Aralık 2007, Uludağ. Program ve Bildiri Özet Kitabı, s:125-7.
21. World Health Organization. Human papillomavirus and HPV vaccines: technical information for policy-makers and health professionals. 2007.
<http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF07/866.pdf>

Akşam Gösterimi

AG

BÜYÜK PATLAMADAN MOLEKÜLER MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ'NE SAÇILAN YILDIZ TOZLARI

Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ

Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

Sonsuzluğun Öyküsü

.....Hiç düşündünüz mü? Kanınızda oksijen taşıyan demir atomlarının hangi yıldızda oluştuğunu.... Hidrojenden demir yapabilir misiniz? Ya da oksijen? Hiç düşündünüz mü sizi oluşturan tüm atomların 13.7 milyar yıllık serüvenini? Yaşamınızda kaç kez başınızı kaldırıp baktınız, sizi oluşturan yıldızlara? Yıldızlar ki gördüğünüzden ve sandığınızdan çok daha kalabalık, kentlerin ışıklarından uzak, çini mürekkebi gibi karanlık bir gecede..... Yıldızlar ki bize aslında herşeyi anlatmakta..... Kaç kez şaşırıp kaldınız atomlardaki bilincin tüm canlıları ve sizi yarattığını öğrendiğinizde? ve kaç kez tanrıyla buluştunuz, safsatalardan, şekilsellikten uzak, evrenle yüreğiniz arasında bir yerde????

Yoksa hiç bunlara zamanınız olmadı mı? Öğretmen, sınav bir yanda, ekmek parası aslanın ağzında, verem, sıtma, açlık ve savaşlar, savaşlar, savaşlar; bitmek bilmeyen savaşlar... Evlendin mi peki? Kaç çocuk var şimdi? Hangi okulu kazandı? Oooo torunda gelmiş maaşallah... Onun ölümü de çok zamansız oldu... Bu sırtımdaki ağrılar da bir türlü geçmiyor... Yine yılbaşı gelmiş, Japonya, Avusturalya, Çin, Hindistan, İran, aaaa işte sıra bizde... 365 kere döndürmüş bizi dünya yine... Peki ya yıldızlar?..... Onlara hiç bakmadınız mı alıcı gözle? Onlar size sonsuzluğun öyküsünü anlatıyor aslında..... ve ben bu gece çevirmeniniz olacağım yıldızların altında; yıldızlarla sizin aranızda..... Bu gece ne verem, ne sıtma, ne savaş, ne de yılbaşı..... Bu gece, büyük patlama, yıldızlar, gök adaları, zaman, kara delik, enerjiye karşı kara enerji ve herşeyi geldik konuşmaya..... Şimdi yaslanın koltuklarınızın arkasına, bırakın götüreyim sizi sonsuzluğa.....





Uzmanıyla Tartışalım

MOLEKÜLER TIPLENDİRME YÖNTEMLERİNİN HASTANE ENFEKSİYONLARININ KONTROLÜNDEKİ YERİ

Prof. Dr. Rıza DURMAZ

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

Hastane enfeksiyonları dünyanın birçok yerindeki sağlık merkezlerinde morbidite ve mortalitede önemli oranda artışa ve ciddi oranlarda ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Yaklaşık üçtebirinin çapraz bulaşa bağlı olarak geliştiği hastane enfeksiyonlarında; hasta, sağlık personeli, yardımcı hizmetliler ve ziyaretçiler risk altındadır. Hastane çevresi, tıbbi alet ve gereçler, hastanın kendisi ve sağlık hizmeti sunun kişiler, başta dirençli bakteriler olmak üzere birçok nozokomiyal patojen için kaynak görevi üstlenmektedir. Buralardan bakteriler eller, hava veya ortak kullanılan malzemelerle hastadan hastaya yayılmaktadır. Patojenin erkenden saptanması ve çapraz bulaşın önlenmesi için hastane enfeksiyon kontrol ekibinin sürekli alarmda olması gerekir. Salgın tespit edildiğinde, hemen bir araştırma planlanmalı, hastaya ait veriler ve örnekler toplanmalı, ampirik kontrol tedbirleri başlatılmalıdır. Salgından etkilenen olguların zaman ve yere bağlı özellikleri, etkilenmemiş olanlarla karşılaştırılmalı, enfeksiyonun epidemiyolojisi hakkında neden-sonuç ilişkisine ait bir hipotez oluşturulmalıdır. Klinik ve epidemiyolojik verilerle desteklenen moleküler tiplendirme metotları kullanılarak, üretilen mikroorganizmanın salgınla ilişkisi belirlenmelidir. Salgınların değerlendirilmesinde, olgular arasındaki ilişkinin doğru biçimde ortaya konulması önemlidir. Yeterli epidemiyolojik veri varlığında, seçilecek en uygun tiplendirme yöntemiyle salgıya neden olan izolatların birbiriyle ilişkileri araştırılmalıdır. Elde edilen moleküler epidemiyolojik veriler kullanılarak, uygulanmakta olan enfeksiyon kontrol önlemleri ve tedavi protokollerinin etkinliği değerlendirilmelidir¹.

Hastane enfeksiyonlarının epidemiyolojik araştırmaları, tipik olarak belirli bir patojen tür ile ilişkili enfeksiyonun prevalansındaki artış, enfekte hastaların belirli yer ve zaman içinde kümeleşme göstermesi ya da ortak bir antimikrobiyal duyarlılık profiline sahip izolatların identifikasyonu ile başlatılır.

Hastane enfeksiyonlarında moleküler tiplendirme çalışmaları

başlıca şu amaçlar için yapılmaktadır:

Dirençli bakterilerin hastane ortamındaki durumunu belirlemek: Moleküler tiplendirme yöntemleriyle özellikle glikopeptidlere dirençli enterokoklar, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşları, florokinolona dirençli *Pseudomonas aeruginosa* ve *E.coli* suşları, karbapeneme dirençli *P.aeruginosa*, vankomisine dirençli enterokoklar ve çoğul ilaca dirençli *Acinetobacter baumannii* gibi patojenlerin neden olduğu hastane kaynaklı enfeksiyonlarda bakterilerin hastane ortamında yaygınlık dereceleri ve kalış süreleri araştırılabilir²⁻⁸.

Hastane salgınlarını değerlendirmek: Tiplendirme yöntemleriyle salgının özellikleri belirlenerek, kimin, nerede, ne zaman, ne ile ve nasıl etkilendiği, bulaş yolları, potansiyel kaynak ve vektörlerin tanımı yapılabilir. Birçok kişinin hasta ya da kolonize olduğu salgınlar, çoğunlukla yatak sayısının fazla olduğu klinikler, yoğun bakım ve yeni doğan ünitelerinde görülmektedir. Bu tip salgınlar kısa süre içinde çok oluşur. Sıklıkla aynı klinik içindeki hastaları etkiler. Böyle durumlarda enfeksiyonun kaynağını araştırmak önemlidir. Genelde ortak kaynaktan gelen salgınlar, tanı ve tedavi amacıyla kullanılan steril olmayan aletlerle (solunum yolu gereçleri, kateterler, endoskoplar...) ilişkilidir. Sağlık

personelinin elleriyle ve nadiren doğrudan temas yoluyla da yayılma olmaktadır. Sağlık personelinin elleri, lavabolar, hasta odaları gibi yerlerden tarama kültürleri yapılarak muhtemel kaynaklar tanımlanabilir. Benzer fenotipik karaktere sahip nozokomiyal patojenlerin izolasyonundaki artış araştırmacıları, izolatlar arasında aynı ve farklı olanların ayırımını yapabilecek etkin tiplendirme yöntemlerini kullanmaya yöneltir. Moleküler tiplendirme yöntemleriyle aynı klinikteki farklı hastaların izolatları veya birçok kliniği ilgilendiren salgın izolatları, hastane çevresi ve sağlık personelinin ellerinden üretilen izolatların DNA parmak izleriyle karşılaştırılarak salgının kaynağı saptanmaktadır. Moleküler tiplendirme yardımıyla daha etkin el yıkama, önlük giyme, temizlik ve dezenfeksiyon kuralları uygulanarak yeni enfeksiyonların önüne geçilebilir⁹⁻¹³. Tayvan'da bir üniversite hastanesindeki MRSA enfeksiyonlarının kaynağı ve kontrol önlemlerinin etkinliğini denetlemek amacıyla, sağlık personeli ve hastalardan üretilen MRSA suşlarının “pulsed-field gel electrophoresis” (PFGE) ile tiplendirmesi yapılmış, iki predominant genotip saptanmış, taşıyıcıların topikal mupirosin ile tedavi edilmesiyle, nozokomiyal MRSA enfeksiyonlarında yarıdan daha fazla azalma kaydedilmiştir¹⁴. Bir kulak burun boğaz servisinde 10 gün içinde ortaya çıkan ve yedi kişiyi etkileyen penisiline dirençli *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) salgını, PFGE yöntemiyle doğrulanmış ve uygulanan etkili kontrol önlemleriyle salgın kontrol altına alınabilmiştir¹⁵.

Patojen-normal flora ayırımı yapmak: Hastane kaynaklı enfeksiyonlardan üretilen etkenlerin çoğu, aynı zamanda hastane çevresinde yaygın olarak bulunan kommensal organizmalar olabileceğinden, moleküler tiplendirme çalışmalarıyla hastadan elde edilen izolatın enfeksiyona neden olan patojenik bir suş mu yoksa enfeksiyon kaynağı olmayan kommensal bir kontaminant mı olduğu belirlenebilmektedir. Örneğin; serebrospinal şanti olan ağır immün yetmezlikli bir hastanın kan kültürlerinden arka arkaya izole edilen *Staphylococcus epidermidis* suşlarının hepsi aynı genetik tipte bulunursa, gerçek bakteriyemi olma olasılığı yüksektir¹⁶.

Endojen-eksojen kaynaklı enfeksiyonların ayırımı yapmak: Moleküler tiplendirme yöntemleriyle bir hastadaki enfeksiyonun endojen veya eksojen kaynaklı olup olmadığı hakkında bilgi alınabilmektedir¹¹. Sepsis veya menenjitli hastalardan üretilen mikroorganizmalar ile hastanın deri ve mukozalarında bulunan bakterilerin tiplendirilmesi yapılarak, enfeksiyonun endojen kaynaklı olup olmadığı hakkında bilgi edinilebilmektedir. Kanserli hastaların kan kültürlerinden üretilen koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) ile hastaların burun, boğaz, barsak ve derisinde kolonize olan KNS izolatları arasındaki ilişkiyi saptamak üzere yapılan moleküler tiplendirme çalışmalarında, KNS'lara bağlı tekrarlayan bakteriyemilerin mukozalardaki bakterilerin translokasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir¹⁷.

Re-enfeksiyon veya re-aktivasyon ayırımı yapmak: Moleküler tiplendirme yöntemleriyle tekrarlayan hastane enfeksiyonlarının daha önce geçirilmiş bir enfeksiyonun yeniden alevlenmesiyle mi (re-aktivasyon), yoksa aynı etkenle konağın yeniden enfekte olmasıyla (re-enfeksiyon) mı oluştuğu ortaya konulabilir. Bunun sonucu olarak uygulanan tedavi protokolü ve enfeksiyon kontrol yöntemlerinin etkinliği değerlendirilebilir. Aynı etkenle tekrarlayan enfeksiyonlar o hastanedeki korunma ve kontrol önlemlerinin yetersizliğini, re-aktivasyonlar ise tedavi protokollerinin yetersizliğini göstermektedir¹.

Hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonların ayırımı yapmak: Moleküler tiplendirme yöntemlerinin yardımıyla hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonların ayırımı yapılabilmektedir. Minnesota ve North Dakota'dan dört çocuğun ölümüne neden olan MRSA suşlarının tiplendirmelerinde, suşların birbirleriyle ilişkili, ancak hastanede saptanan nozokomiyal izolatlardan farklı oldukları gösterilmiştir¹⁸.

Moleküler Tiplendirme Yöntemleri

Plazmid analiz yöntemi ve kromozomal DNA üzerinde yapılan tiplendirme metotları olmak üzere iki ana başlık altında toplanmaktadır. Plazmid analizi, moleküler tiplendirme yöntemlerinin ilk jenerasyonudur. Ayrım gücü ve tiplendirebilirlik özelliği bakteri türlerine bağlı olarak değişmektedir. Plazmidler sonradan kazanılabilen ya da kaybedilebilen hareketli ekstrakromozomal DNA molekülleri olduğundan, epidemiyolojik olarak ilişkili izolatların farklı plazmid profili göstermeleri beklenen bir durumdur. Özellikle nozokomiyal patojen olan bakterilerin çoğunun tiplendirilmesinde en iyi yöntemler kromozomal DNA polimorfizmine dayalı olanlardır. Ribotiplendirme, *pulsed field gel electrophoresis (PFGE)*, *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)*, *repetitive extragenic palindromic element-PCR (rep-PCR)*, *random amplified polymorphic DNA (RAPD)*, *amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)*, *amplified fragment length polymorphism (AFLP)* ve *multilocus sequence typing (MLST)* yaygın olarak kullanılan kromozomal DNA bazlı tiplendirme yöntemleridir^{1,9,11}.

Moleküler tiplendirme yöntemleri çoğunlukla pahalı yöntemlerdir. Kullanmaya başlamadan önce, performans ve uygunluk kriterleri açısından gözden geçirilmelidirler. Çok sayıda yöntem geliştirilmesine rağmen, bugün itibariyle; tekrarlanabilirlik, ayırt edicilik, kolayca uygulanabilirlik, ekonomik ve karşılaştırılabilir sonuçlar verme bakımından mükemmel olan bir yöntem henüz bulunmamaktadır^{16,19}. Yöntemlerden hangisinin kullanılacağına karar vermeden önce, mevcut durumun, tiplendirme çalışmalarını yapmaya gerçekten değer olup olmadığı büyük bir titizlikle analiz edilmelidir. Ayrıca, her koşul için kullanılabilecek ideal ve evrensel bir yöntem olmadığından, seçilecek tiplendirme yönteminin amaca uygunluğu gözden geçirilmelidir. Yöntemlerin etkinliğini değerlendirmede ön koşul, çalışılacak bakteri grubunun uygun ve iyi tanımlanmış olmasıdır. Çalışılacak mikroorganizmaların kapsamı; çalışmanın lokal, bölgesel ya da evrensel olup olmadığı ve uzun süreli sürveyansa ihtiyaç olup olmadığı gibi epidemiyolojik içeriği iyi tanımlanmalıdır.

Moleküler tiplendirme sonucunda hastane enfeksiyon kontrol programının uygulanabilmesi için laboratuvar, klinik ve hemşirelik başta olmak üzere birçok disiplinin işbirliği halinde çalışmasına gerek vardır. Oluşturulan bu ekip koordineli bir biçimde çalışmalı, sürekli geri bildirimler almalı, uygulanmakta olan hijyen koşullarını değerlendirmeli ve eğitim programları düzenlemelidir. Laboratuvar, epidemiyolojik sürveyans için erken uyarı sistemi olarak iş görebilir. Laboratuvar, salgına neden olan etkeni tanımlamalı, hastane personeli ve çevreden tarama kültürleri yaparak arka arkaya izole edilen benzer izolatların aynı suş olup olmadığını incelemeli ve enfeksiyon kontrol komitesini yaygın bir patojen içindeki gruplanmadan haberdar etmelidir. Haftalık toplantılarla durum değerlendirmesi yapılarak, toplum, sağlık personeli ve hastaların eğitimi, fiziksel bariyer, daha etkin antisepsi ve dezenfeksiyon uygulanması için gerekli önlemlerin alınmasına katkıda bulunmalıdır. Bilgilerin enfeksiyon kontrol pratiğinde etkin kullanılması sağlanmalıdır. Hastane enfeksiyonu kontrol önlemlerinin başarısı, oluşturulan bu ekibin ortak kararlar alması ve iyi iletişim kurabilmelerine bağlıdır.

Kaynaklar

1. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clin Microbiol Rev 2006; 19: 512-30.
2. Gubbay JB, Gosbell IB, Barbagiannakos T, Vickery AM, Mercer JL, Watson M. Clinical features, epidemiology, antimicrobial resistance, and exotoxin genes (including that of Pantone-Valentine leukocidin) of gentamicin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (GS-MRSA) isolated at a paediatric teaching hospital in New South Wales, Australia. Pathology 2008; 40: 64-71.

3. Carvalho AP, Albano RM, de Oliveira DN, Cidade DA, Teixeira LM, Marques Ede A. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. *Microb Drug Resist* 2006; 12: 103-10.
4. Stampone L, Del Grosso M, Boccia D, Pantosti A. Clonal spread of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain among bloodstream-infecting isolates in Italy. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1575-80.
5. Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, et al. Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of nosocomial infection or colonization: implications for control. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 37-45.
6. Stephens C, Francis SJ, Abell V, DiPersio JR, Wells P. Emergence of resistant *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients within an acute care teaching hospital and a long-term acute care hospital. *Am J Infect Control* 2007; 35: 212-5.
7. Deplano A, Denis O, Nonhoff C, et al. Outbreak of hospital-adapted clonal complex-17 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain in a haematology unit: role of rapid typing for early control. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 849-54.
8. Carter RJ, Sorenson G, Heffernan R, et al. Failure to control an outbreak of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a long-term-care facility: emergence and ongoing transmission of a fluoroquinolone-resistant strain. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26: 248-55.
9. Foxman B, Riley L. Molecular epidemiology: Focus on infection. *Am J Epidemiol* 2001; 153: 1135-41.
10. Ayan M, Durmaz R, Aktas E, Durmaz B. Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital-acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. *J Hosp Infect* 2003; 54: 39-45.
11. Blanc DS. The use of molecular typing for epidemiological surveillance and investigation of endemic nosocomial infections. *Infect Genet Evol* 2004; 4: 193-7.
12. Tansel O, Kuloglu F, Mutlu B, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a new University hospital due to a strain transferred with an infected patient from another city six months previously. *New Microbiol*. 2003; 26:175-80.
13. Guducuoglu H, Durmaz R, Yaman G, Cizmeci Z, Berktaş M, Durmaz B. Spread of a single clone *Acinetobacter baumannii* strain in an intensive care unit of a teaching hospital in Turkey. *New Microbiol* 2005; 28: 337-43.
14. Wang JT, Lin SF, Chiu HL, et al. Molecular epidemiology and control of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a teaching hospital. *J Formos Med Assoc* 2004; 103: 32-6.
15. Subramanian D, Sandoe JA, Keer V, Wilcox MH. Rapid spread of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* among high-risk hospital inpatients and the role of molecular typing in outbreak confirmation. *J Hosp Infect* 2003; 54: 99-103.
16. Pfaller MA, Herwaldt LA. The clinical microbiology laboratory and infection control: Emerging pathogens, antimicrobial resistance, and new technology. *CID* 1997; 25: 858-70.
17. Costa SF, Miceli MH, Anaissie EJ. Mucosa or skin as source of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia? *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 278-86.
18. CDC. Four pediatric death from community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*-Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *MMWR Morb Wkly Rep* 1999; 48: 707-10.
19. Pfaller MA. Molecular approaches to diagnosis and managing infectious diseases: Practicality and costs. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 312-8.

MOLEKÜLER TİPLENDİRME YÖNTEMLERİNİN HASTANE ENFEKSİYONLARININ KONTROLÜNDEKİ YERİ: GÜNCEL BİLGİLER IŞIĞINDA GENEL BİR BAKIŞ

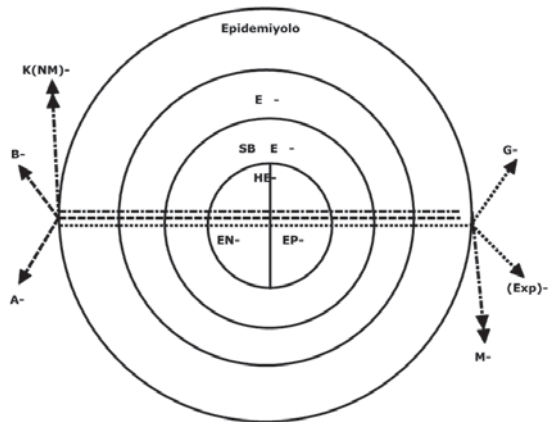
Y. Doç. Dr. İ. Çağatay ACUNER

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kurupelit, Samsun.

Epidemiyoloji, “insan popülasyonlarında, yaralanma ve hastalıkların dağılımının (‘distributions’) ve belirleyicilerinin (‘determinants’) araştırılmasıdır” biçiminde tanımlanabilir¹. Enfeksiyon hastalıkları epidemiyolojisi ve hastane epidemiyolojisinin bir alt-bölümü olarak hastane (enfeksiyonlarının) epidemiyolojisi, bu tanımın ilgili alanlardaki alt disiplinleridir² (Şekil.1.) Enfeksiyon hastalıklarının moleküler epidemiyolojisi ise, “moleküler biyolojik yöntemler kullanılarak, enfeksiyon hastalıklarının dağılımının ve belirleyicilerinin araştırılmasıdır” biçiminde tanımlanabilir¹. Günümüzde, klinik tıp, evrimsel biyoloji, ekoloji, popülasyon genetiği, matematik ve biyoinformatik gibi birçok disiplinin, moleküler epidemiyoloji çalışma alanının multi-disipliner (veya trans-disipliner) yapısına katkısı olduğu bilinmektedir³⁻¹⁰. Giderek daha fazla sayıdaki mikrobiyal genomların tam dizilerinin ortaya çıkarılması (tamamlanmış n=679, sürmekte olan n=972, Nisan 2008, [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi)) ile oluşan genomik devrim öylesine etkili olmuştur ki, biyokimya, ekoloji, biyoinformatik, popülasyon biyolojisi, epidemiyoloji ve tıbbi mikrobiyoloji arasındaki sınırlar belirsizleşmiştir¹¹. Moleküler epidemiyoloji, filom/metagenom düzeyinden, fenotipik önemi olan tek lokustaki nükleotid dizisi fragmanlarına dek, genetik determinantları kullanarak, mikroorganizmaların farklı operasyonel taksonomik birimleri arasındaki/içindeki (örn. cinsler, türler, tür-altı varyantlar veya tipler), popülasyonlar arası ve -içi (sub-popülasyonlar), ağaçsı (vertikal) veya ağsı (horizontal/lateral ilişkileri de içeren) yapıdaki dinamiklerini, ekolojik nişlerdeki veya patojen-konak ilişkilerindeki ağsı dinamiklerin (kolonizasyon-taşıyıcılıktan epidemilere dek) yapısıyla ilişkilendirerek inceler¹²⁻²¹. Böylelikle, filogenetik analizden evrimsel biyolojiye, popülasyon genetiğinden biyoinformatiğe dek bir çok disiplinden yararlanarak, makro- ve mikro- -evrim ve -epidemi dinamiklerini açıklar^{4,6,22} (Tablo; A1). Bu özellikleriyle, moleküler epidemiyoloji, hastalıkların etyolojisine ilişkin çalışmalara ayrı bir boyut katar ve klasik epidemiyolojinin sağlayamadığı bilişiyi sağlar⁶.

Şekil 1. Epidemiyoloji alanının içinde moleküler epidemiyolojinin yeri.

EH-E; enfeksiyon hastalıklarının epidemiyolojisi, SBİ; sağlık bakımı ile ilişkili, HE-E; hastane enfeksiyonlarının epidemiyolojisi, EN-HE; endemik hastane enfeksiyonları, EP-HE; epidemik hastane enfeksiyonları, G-E; gözlemsel epidemiyoloji, İ(Exp)-E; intervansiyonel (eksperimental) epidemiyoloji, B-E; betimleyici epidemiyoloji, A-E; analitik epidemiyoloji, K(NM)-E; konvansiyonel (non-moleküler) epidemiyoloji, M-E; moleküler epidemiyoloji.



Tablo: Özel Açıklamalar

A1	Makro-evrim dinamikleri, topluluk ekolojisi ('community ecology') kuramı ile açıklanabilir; "sistem: metatopluluk, subsistem: lokal topluluk, nötral-evrimleşme sistem birimi: bireysel organizma, biyoçeşitlilik birimi: tür"dür. Mikro-evrim dinamikleri, popülasyon genetiği ve moleküler evrim kuramları (nötralist, nötrale-yakın, seleksiyonist, 'unified', vd.) ile açıklanabilir; "sistem: popülasyon, subsistem: 'deme', nötral-evrimleşme sistem birimi: bireysel (tek) gen, biyoçeşitlilik birimi: alel"dür ^{23,24} . Makro-epidemik dinamikler, ayrı ekolojik nişlere adapte olmuş ekotipleri (tür tanımı olarak önerilmiştir ²⁵⁻²⁷) temsil eden klonal-komplekslerin, klonal-kompleks-İçi (serbestçe rekombine olan panmiksik popülasyonlarda dekatlar, daha çok mutasyonla moleküler-evrimleşen klonal popülasyonlarda bin yıllar), ilişkili klonal-kompleksler-arası (yüz binlerce yıl veya milyonlarca yıl) veya ilişkisiz klonal-kompleksler-arası (milyonlarca veya yüz milyonlarca yıl) makro-varyasyon dinamiklerinden oluşur. Mikro-epidemik dinamikler ise, belirli bir klonal-kompleks-İçi klonların (haftalar veya dekatlar) mikro-varyasyon dinamiklerinden oluşur ^{11, 28-31} .
A2	Gözlemsel betimleyici ('descriptive') epidemiyojik çalışmalar , birincil (örn. hasta kayıtları) veya ikincil (örn. enfeksiyon kontrol izlemi) kaynaklardan elde edilen verilerden elverişli olanlarını kullanarak, çizgisel-listeleme (tablo) ve epidemik eğri (grafik) oluşturulması gibi yöntemlerle analiz eder ve bunun sonucunda: a) bir enfeksiyon hastalığı olayının olgu tanımını yapar, b) enfeksiyon hastalığını edinmiş popülasyonun karakteristiklerinin; kişi, yer ve zaman özelliklerine dayanarak belirlenmesini sağlar, c) enfeksiyonla ilişkili risk faktörleri hakkında önemli ipuçları sağlayabilir, d) enfeksiyonun çalışılan popülasyondaki yaygınlığı ve oluşumu hakkında hipotezler üretilmesinde kullanılabilir.
A3	Gözlemsel analitik (niceliksel; 'quantitative') epidemiyojik çalışmalar , olgu-kontrol, kohort veya 'cross-sectional' (örn. nokta-prevalans, period-prevalans, seroprevalans) çalışma tasarımlarından elde edilen verileri, maruziyet ('exposure') etkisinin ölçümleri ('measures of effect') veya hastalık sıklığının ölçümleri gibi istatistiksel yöntemlerle analiz ederek; a) betimleyici çalışmalardan üretilen hipotezleri test etmek, b) bir popülasyondaki enfeksiyonun nedenini ve etkilerini ortaya koymak, c) belirli bir popülasyonun neden öncelikle belirli bir enfeksiyonu edindiğini saptamak için kullanılabilir ² .
A4	Bu çalışmanın sonucunda, hastane enfeksiyonu eğitim ve önleme programlarında yararlanılabilecek, dünya genelinde internet üzerinden erişime açık ve çeşitli parametrelerin kombinasyonu ile üzerinde sorgulama yapılabilen, bir nozokomiyal salgın veritabanı oluşturulmuştur. (Outbreak Worldwide Database , 2003. http://www.outbreak-database.com/)
A5	Aşırı-saçılma ('overdispersion'): Veri setinde, basit bir istatistik modelden beklenene kıyasla daha fazla değişkenlik olmasıdır.
A6	Otokorelasyon ('autocorrelation'): Birbirinden bağımsızmış gibi görünen gözlemler arasında, gözlemler arasındaki zaman ayırımının fonksiyonu olarak varolan bir ilişkinin gücüdür. Gözlem sinyallerinin kendi aralarındaki çapraz-korelasyondur.
A7	Bulaşıcı bir hastalığın, bir popülasyonda, indeks olgu/lar/dan (primer olgu/lar) sonra, sekonder, tersiyer ve diğer jenerasyon olgulara doğru, insandan insana yayılma potansiyeline " temel üreme (çoğalma) hızı " ('basic reproductive rate', R_0) denir. İnsandan insana yayılan hastalıklarda, ardışık -bulaş- jenerasyonlar/ı arasındaki -bir önceki jenerasyondaki olgu/lar/daki semptomatik dönemin başlangıcından, bir sonraki jenerasyondaki olgu/lar/daki semptomatik dönemin başlangıcına dek geçen- zaman perioduna, " seri aralık " ('serial interval', jenerasyon zamanı; 'generation time') denir. $R_0 > 1$ ise epidemi olacağının, $R_0 = 1$ ise hastalığın endemik kalacağının, $R_0 < 1$ ise popülasyondaki hastalığın sonlanacağının göstergesidir. $R_0 = \beta \cdot \kappa \cdot D$ formülünde: β (p); temas başına transmisyon riskidir (atak hızı), κ (c); popülasyondaki hastalığı olmayan bir kişinin zaman birimi başına bu türden ortalama temas sayısıdır . D (d); aynı zaman birimi başına, enfekte bir kişinin enfektivite süresidir . $R = R_0 \cdot x = p \cdot c \cdot d \cdot (1 - h \cdot f)$ formülü, "efektif üreme hızını" verir: x; popülasyonun duyarlı fraksiyonunu, h; aşı etkinliğini, f; aşılanmış fraksiyonu gösterir. Duyarlı konak başına enfeksiyon hızı; $I = c \cdot P \cdot p$ formülüyle hesaplanır; P; kaynağın enfeksiyöz olması olasılığını (örn. enfeksiyöz kaynakların prevalansı) gösterir ⁴³⁻⁴⁵ .
A8	Infectivity = P (Transmission Exposure), Pathogenicity = P (Disease Transmission), Virulence = P (Complication Disease) ^{53,54}
A9	Enfeksiyon hastalığının oluşumunda etkili olan faktörlerin ilişkisini gösteren, enfeksiyon hastalığının kavramsal model denklemi: $I_p = (D \times S \times T \times V) / H_d$. Bu formülde: I_p ; enfeksiyon hastalığının olasılığı, D; konağa transmisyonu yapılan mikroorganizma dozunu (sayısını) (enfeksiyöz dozun altında, eşit veya üstünde olabilir), S; etkenle temas eden konağın bulaş-alıcı yeri sayısını (giriş-yeri sayısı), T; temasın süresini (tutunma ve çoğalma için yeterlidir veya değildir), V; etkenin virulansını, H_d ; konağın, enfeksiyonu önlemeye çalışan savunma yanıtlarının birleşik kuvvetini gösterir.
A10	Buna göre uygulamada şunlara dikkat edilmelidir: enfeksiyon kontrolü amaçlı intervansiyon stratejileri; c, P, p, x ve/veya d'yi hedef alabilir ve uzun seri aralıklar, intervansiyon için zaman kazandırır ⁵³ .

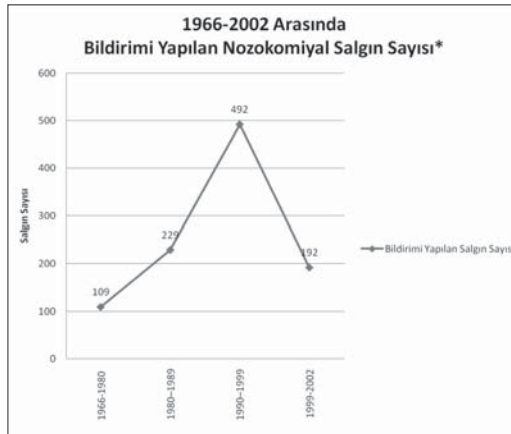
Bilim felsefecisi Imre Lakatos'un sınıflamasına göre, bir bilim alanında aynı anda varlığını sürdüren birbirine bağlı kuramlar, bir araştırma programları bütünü oluşturur ve bu bütün üç öğeden oluşur; "sert çekirdek" ('hard core'), "pozitif buluş tekniği" ('positive heuristic') ve "koruyucu kuşak" ('protective belt'). Bu öğelerden birisi olan "sert çekirdek", bilim adamları topluluğunun bağlı olduğu geleneklerce belirlenmiş ve birbirine bağlı kuramların hepsinde ortak olan düşüncedir³².

Hastane epidemiyolojisi bilim alanında, günümüzde varlığını sürdüren araştırma programlarının "sert çekirdeğine" göre baskın olan kanı şudur: Olası bir salgını araştırırken, klinik veya epidemiyolojik kanıtlara dayalı bir hipotez oluşturan hastane epidemiyoloğu veya enfeksiyon kontrol hekimi, hastane enfeksiyonlarına yol açan etkenlerin, tür-altı ('subspecies') düzeyde (sub)tiplendirme analizinde kullanılan moleküler epidemiyolojik yöntemlerle elde edilen verilerini, hipotezi kabul etmekte veya reddetmekte kullanabilir. Ancak, moleküler epidemiyolojik yöntemlerle elde edilen veriler, gerekli olmakla birlikte yeterli değildir. Zira bu veriler, hastane enfeksiyonlarının izleminden elde edilen klinik epidemiyolojik verilerin betimleyici (Tablo; A2) ve olanaklı ise analitik (Tablo; A3) epidemiyolojik yöntemlerle analiziyle birlikte değerlendirilerek yorumlanmalıdır ve ancak bu istatistiksel yöntemlerden elde edilen sonuçlarla destekleniyorsa anlamlı kabul edilebilir³³⁻³⁷.

"Modern Enfeksiyon Hastalıkları Epidemiyolojisi" kitabının yazarı Johan Giesecke, moleküler epidemiyolojik yöntemlerle yapılan genotipik subtiplendirmenin yararının sınırlarına ilişkin şu yorumu yapmıştır: "Bu tür genetik yöntemler, yandaşlarınca, sıklıkla, enfeksiyon hastalıkları epidemiyolojisi için tümüyle yeni ve devrimci araçlar olarak betimlenir, ancak ben, bunlar hakkında, farklı patojenlerin subtiplendirilmesinde uzun bir zincir oluşturan yöntemlerin yalnızca yeni bir halkası olarak düşünme eğilimindeyim. Gerçek yaşamdaki epidemiyolojiye uygulanabilirliklerine ilişkin birçok şey, en önemlisi, farklı durumlarda ve farklı türlerdeki doğal mutasyon hızı ölçüleri, aydınlatılmayı beklemektedir"³⁸. Moleküler epidemiyolojik yöntemlerle yapılan genotipik subtiplendirmenin yararının sınırlı olduğunu düşünenlerin asıl çekincesi, Giesecke'nin yorumunda belirginleşmektedir: Mikrobiyal patojenlerin genotipik ve fenotipik evrim dinamiklerinin ve daha geniş anlamda konak-patojen ko-evolüsyonu ilişkisinin, henüz yeterince iyi bilinmediği ve özellikle de bu türden evrimsel dinamiklerin, patojenlerin yol açtıkları enfeksiyonların epidemik dinamikleriyle ilişkisinin yeterince güvenilir yöntemlerle ortaya konamadığı düşünülmektedir. Ancak, yaygın olarak uygulanan "gelecekte" istatistik yöntemlere güvenilmesi yönündeki baskın düşüncenin de yanıltıcı olabileceğine ilişkin uyarıcı nitelikte görüşler vardır³⁹. Bir örnek vermek gerekirse: "Hastane epidemiyolojisi, kronik hastalıkların epidemiyolojisi ile kıyaslandığında halen ergenliğindedir ve niteliğin ölçümüne dayalı epidemiyoloji ise henüz gençtir. ...Epidemiyoloji çalışmaları, hastane epidemiyolojisi ve kalite güvencesi adına daha fazla anlamsızlık üretilmesini önlemek için gereklidir. ...Sonuçta, epidemiyoloji, yalnızca, nicelikselleştirilmiş sağduyudur"⁴⁰. "Salgınlarla uğraşırken, istatistiksel anlamlılık en az önemli olan şeydir. Potansiyel bir epidemiyale karşılaştığımızda, halen, eski kurala başvururuz: İki, rastlantıdır ve üç ise epidemidir. Elbette bu, olayların ciddiyetine göre ayarlanmalıdır. Beklenmedik tek bir fatalite, birçok daha az ciddi olayla aynı araştırmayı başlatmalıdır. Ancak, üç olayın, istatistiksel anlamlılığa ulaşılacak bir kontrast oluşturmaları pek olası değildir. ...Öyleyse, epidemiyologlar, herhangi bir istatistiksel *p* değerinden çok, gözlemlenen olayların biyolojik anlamı, etkinin büyüklüğü ve potansiyel gelecek olaylarla ilgilenmelidirler"⁴⁰.

Bir sistematik literatür analizinde (Tablo; A4), 1966-2002 yılları arasında yayınlanmış 1022 nozokomiyal salgın bildiriminde, betimleyici, analitik veya genotipik epidemiyolojik yöntemlerin, hangi sıklıkla kullanıldığı incelenmiştir (Şekil 2 ve 3). Buna göre, ilk döneme kıyasla, son üç dekatta, kohort

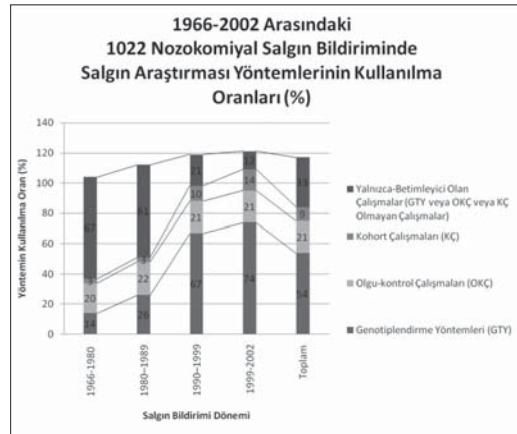
çalışmaları ve genotipik yöntemlerin kullanımı giderek artarken, olgu-kontrol çalışmaları oranı değişmemiş, yalnızca-betimleyici olan çalışmalar ise azalmıştır⁴¹.



Şekil 2. Salgın Araştırması Sayısı

(41 no'lu kaynağın orijinal tablo verileri, grafiğe dönüştürülerek uyarlanmıştır)

*Sistematik analize katılma ölçütlerine uyan yayınlar; yalnızca nozokomiyal salgın olma ölçütü, en sık patojenlerden olma ölçütü, vd. ölçütler.



Şekil 2. Salgın Araştırması Yöntemlerinin Kullanılma Oranları (%)

(41 no'lu kaynağın orijinal tablo verileri, grafiğe dönüştürülerek uyarlanmıştır; oran toplamaları %100'ü geçebilir, zira bazı yayınlarda yöntemler birlikte kullanılmıştır.)

Yine bu bakımdan dikkat çekici olarak, Cooper ve Lipsitch⁴² yaptıkları bir çalışmada, hastane enfeksiyonlarının izleminden elde edilen klinik epidemiyolojik verilerin istatistiksel özellikleri ve bunların analizinde kullanılan “geleneksel” istatistik yöntemler hakkında, gözden kaçmaması gereken şu yorumu yapmışlardır: “Aktarılabılır nozokomiyal enfeksiyonların etkeni olabilen patojenlerin sürveyans verileri, genellikle, az sayıdaki enfekte olgulardan oluşan kısa-zaman-serileri biçimindedir. Bu veriler, sıklıkla, “aşırı-saçılma” ve “otokorelasyon” sergiler (Tablo; A5 ve A6). Bugüne dek, neredeyse tüm analiz yöntemleri, hastane enfeksiyonlarına yol açan organizmaların aktarılabılır doğasını gözardı etmiş ve yalnızca birbirinden bağımsız olgular veya sonuçlar için uygun olan metotları kullanmıştır. Oysa hastadan hastaya bulaşın önemli olduğu durumlarda, bu tür analizlere dayalı çıkarımlar güvenilir kabul edilemez”⁴². Bu düşünce, hastane epidemiyolojisi alanında, neredeyse yeni bir araştırma programları bütününün “sert çekirdeğini” oluşturabilecek denli güçlü görünmektedir. Cooper ve Lipsitch⁴², önerdikleri yöntemin, “geleneksel” istatistik yöntemlere kıyasla biyolojik olarak daha anlamlı ve temel epidemiyolojik parametrelerin kestirimine izin veren bir yaklaşım olduğunu ileri sürmüşlerdir. Hastane ortamındaki bileşenler arasında oluşan etkileşimlere (‘interactions’), döngülere (‘cycles’, ‘rings’) veya ağlara (‘nets’) bağlı hastane enfeksiyonu epidemiyolojisi dinamiği, matematiksel modellerle incelenmeyi gerektirecek denli karmaşıktır^{43,46} (Şekil 4).

Enfeksiyonlarda, epidemiyolojik parametrelerin kestirimi önemlidir (Tablo; A7, A8, A9, A10); zira enfeksiyon hastalıklarının epidemiyolojik dinamikleri, en azından bir ölçüde, evrim dinamiklerinin mikrobiyal patojen popülasyonu üzerinde nasıl etki edeceğini belirlemektedir^{47,48}. Buna karşılık, evrim dinamiklerinin sonucu olarak patojende ortaya çıkan değişiklikler de, epidemiyolojik dinamiklerin doğasını etkilemektedir⁴⁸. Evrim ve epidemiyoloji dinamikleri arasındaki karşılıklı geri-beslemelerin anlaşılması ve çeşitli dışsal faktörlerin (örn. çevresel değişikliklerin) bu süreci nasıl etkileyebileceğinin test edilebilmesi, enfeksiyon hastalıklarının evrimsel epidemiyolojisinin ana amaçlarındanıdır^{4,48}.



Şekil 4. Hastane ortamındaki bileşenler arasında oluşan etkileşimlerin/döngülerin/ağların figüratif temsili.

Hastane enfeksiyonu epidemiyolojisi dinamiği, “hiperkompleks” bir ortam kabul edilen hastane ortamındaki bileşenler arasındaki dinamiklerden (basamakların ‘logico-temporal’ sıralaması sayılarla belirtilmiştir) oluşur. Bu bileşenler ve dinamiklerden bazıları şunlardır: a) çevre-ortam bileşenleri (servisler/diğer birimler, örn. girişimsel birimler/hasta odaları/canlı-cansız diğer çevre; “çemberler”), b) mikrobiyal bileşenler (‘specialist’ veya ‘generalist’ mikrobiyal patojen; MP, “oval”, [1]), (bulaş yolu/giriş yeri/enfeksiyöz dozu; “üçgen”, [2]), (tutunma-tropizm/ kolonizasyon/invazyon-yayılma/kompartmanlar; “elmas”, [3]), (genetik varyasyon mekanizmaları/hipermutatorluk/mobil genetik elemanlar-LGT,HGT/modülerite/seleksiyon;

“sekizgen”, [5,8]), (mikrobiyal topluluk etkileşimleri; dolaşımdaki birden fazla farklı mikrobiyal patojen, mikrobiyal flora, biyofilmler, sinyal sistemleri; “güneş”, [1,9]), (enfektivite, patojenite ve virulans -ve antibiyotik direncinde- değişimler -genellikle artış yönünde-; “dörtlü ok”, [6,10]), c) konak bileşenleri (risk altındaki -duyarlı, kolonize veya enfekte- konaklar -hasta/refakatçi/sağlık çalışanı-; “çarklar”, [0]), (konak immun yanıtı/statüsü ve risk faktörleri; K, “kare”, [0,4]), d) intervensiyonel (diagnostik, terapötik, kontrol veya önleme amaçlı) bileşenler (antibiyotik tüketimi/baskısı; DDD/MIC/MPC/PK-PD; tıbbi girişimler ve ekipmanlar; el yıkama, izolasyon, aktif izlem-eradikasyon, antibiyotik tüketiminde heterojenitenin sağlanması; “şimşek”, [7]). Giriş yeri, invazyon-yayılma yolları, kompartmanlar; mikrobiyal özelliklere bağlı olmakla birlikte konak bileşenleri içinde de sayılabilir.

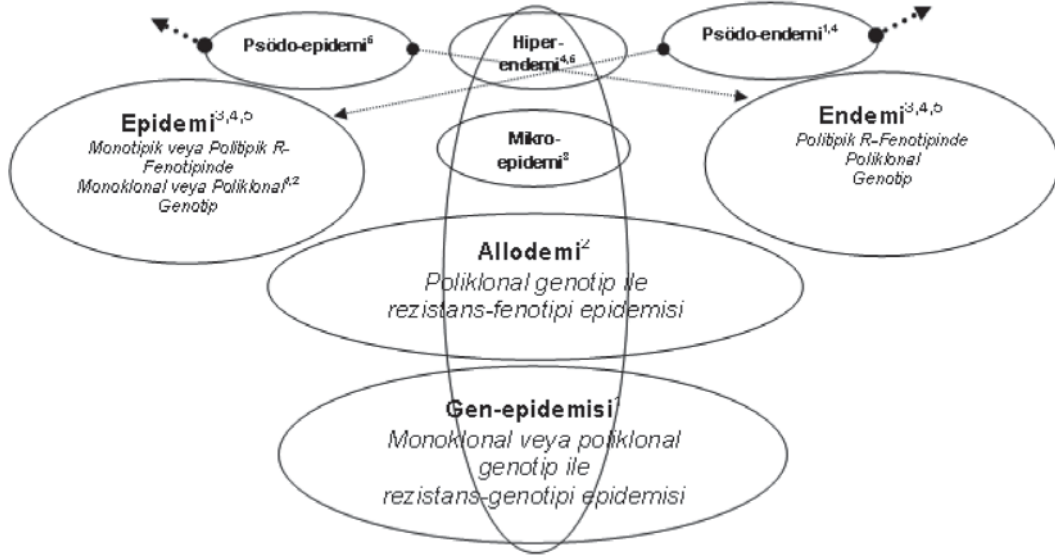
Baquero⁴⁹⁻⁵¹, herhangi bir operasyonel taksonomik birimdeki (‘operational taxonomic unit’) mikrobiyal patojenin (veya fenotipik ya da genotipik modüler birimin), popülasyon dinamiğinin doğal akışı boyunca, endemik dönemlerine kıyasla, subtakson zenginliğinin (‘richness’) azaldığı, belirli bir subtaksonun sayısal yoğunluğunun (‘abundance’) arttığını, yani biyoçeşitlilik ölçülerinde (‘biodiversity measures’) belirli yönde değişiklik olduğu periodlar olan epidemik episodlarının, o patojenin (veya modüler birimin) evrimsel dinamiğinin döngüsel (‘divergence’ ve ‘convergence’; ‘evolutionary breathing’) bir parçası olduğunu ileri sürmüştür. Bu tür bir evrimsel dinamiğin, hastane ortamı gibi “hiperkompleks” bir çevrede, fraktal bir biçim sergilediği ve ‘non-Darwinian’ evrim niteliğinde olduğunu ileri sürmüştür⁵⁰. ‘Non-Darwinian’ hipotezde evrim; organizmal, sub-organizmal, supra-organizmal düzeylerde, rastlantısal etkileşimler (‘random interactions’), sürüklenme (‘drift’), darboğazlar (‘bottlenecks’) ve katastrofik olaylar (‘catastrophic events’) tarafından yönlendirilen ani değişim patlamaları (‘spurts of change’) ile oluşur^{49,52}. Bu hipotezde sözü edilen sub-organizmal veya supra-organizmal düzeydeki replike olabilen varlıklar

(‘replicating entities’), bireysel organizmaların ötesinde; moleküller, kısa genetik diziler, genler, operonlar, plazmidler, klonlar, türler, üst düzey taksonlar ve topluluklardır (‘community’) -ki ‘ultra-Darwinian’ evrim hipotezinde, organizmal düzey de dahil, bu varlıklar, seçim birimleri (‘units of selection’) veya seçim düzeyleri (‘levels of selection’) olarak karşılık bulur⁴⁹. Bu hipotez, çeşitliliğin (‘diversity’) genetik varyasyonla sürdürüldüğü popülasyonların içinde, bir organizmanın, zindeliği (‘fitness’) en yüksek varyantının, değişen biyotik ve abiyotik çevre koşulları altındaki doğal seçilimi (‘natural selection’) süreci olan ‘Darwinian’ evrimi, yani pozitif (yönlü; ‘directional’, adaptif; avantajlı değişimin seçildiği) çevresel seleksiyonu da içerir. Ancak bu hipoteze göre, bir varyantın veya konfigürasyonun fiksasyonu sıklıkla ‘Darwinian’ evrim sürecinden bağımsızdır⁴⁹. Baquero, trans-hiyerarşik modüler parçacıkları; operatif (örn. rezistans veya patojenisite determinantları, vd.), translokatif (örn. insersiyon sekansları, tekrarlayıcı sekanslar, rekombinazlar, vd.) ve dispersif (örn. plazmidler, fajlar, gen kasetleri, integronlar, transpozonlar, klonlar, vd.) olarak üç kategoride sınıflandırmıştır. Herhangi bir lokal ortamda, bu parçacıkların değişik birleşimlerinden ortaya çıkan bir veya daha fazla bileşim veya patern, seleksiyon baskısı ile zenginleşir. Kazanan paternlerin başarısı, başarıyla etkileşen parçacıklardan oluşan bir “modüler birimler havuzu”nun zenginleşmesini sağlar⁴⁹.

Moleküler epidemiyolojik yöntemlerin geliştirilmesi, seçilmesi, uygulanması ve yorumlanması, evrimsel dinamiklerin dikkate alınmasının önemli olduğunu kavrayarak, daha önce bu konuyu, moleküler evrim kuramları ve modellerinden, moleküler saat kavramına ve filogenetik ağaç oluşturulması ve test edilmesine dek derinlemesine inceleyerek, ilgili Türk bilim topluluğu ile paylaşmış olan Türk araştırmacılar da vardır^{55,56}.

Patojenlerin epidemiyolojik ve evrimsel dinamiklerini ilişkilendiren moleküler biyolojik çalışmalar, heyecan verici buluşlarla yeni ortaya çıkmaya başlamıştır⁵⁷. Öyle ki bu gelişmeler, bakterilerde tür tanımının yapılmasında yeni düzenlemelere yol açmıştır⁵⁸. Bunun da ötesinde, bu gelişmelere dayalı olarak, bazı yazarlarca, mikrobiyal patojenlerin epidemiyolojik ve evrimsel dinamiklerinin, örneğin antibiyotik direnci gelişiminin kestiriminin yapılabileceği (‘prediction’) savı ileri sürülmüştür^{59,60}. Mikrobiyal filogenetik yapının ağaçsı değil ağsı biçimde olduğunun gösterilmesiyle, ortak nişi paylaşmayan taksonlar arasında antibiyotik direnç genlerinin horizontal aktarımı yoluyla, hızla ve yalnızca birkaç aktarım basamağı ile, direnç geni kazanımının olabileceği gösterilmiştir¹³. İlk kez, bakterilerde mutasyon (ve böylece bu mekanizmaya bağlı direnç) gelişiminin kontrol edilebileceği ileri sürülmüştür⁶¹. Yanı sıra, mikrobiyal patojenlerin, fenomik, genomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik (özetle sistemomik), mobilomik/fluksomik, patogenomik, rezistomik, pangenomik, metagenomik, filomik ve mikrobiomik yöntemlerle tanımlanacak kapsamlı profillerinin, enfeksiyon hastalıklarının yönetimi ve sürveyansında kullanılması yararlı olabileceği ileri sürülmüştür^{62,63}.

Kuramsal perspektifler ve bulgularla paralel doğrultuda, moleküler epidemiyolojik çalışmalar sonucunda elde edilen bilgilere dayalı olarak, hastane enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde, daha önce diğer yöntemlerle fark edilememiş dinamikler saptanmış ve çoğunluğu “evrimsel-epidemiyolojik” nitelikte olan kavramlar ortaya çıkmıştır. Uygulamada, hastane enfeksiyonlarının araştırılması, kontrolü ve önlenmesi bakımından önemli olan bu kavramlardan bazıları şunlardır: klonal popülasyon, non-klonal popülasyon (panmiksik popülasyon), gen-epidemi ve modülerite, allodemi, mikro-epidemi ve psödo-endemi^{49,51,64-76} (Şekil 5). Bu çerçevede, hiper-endemi kavramı da tartışılarak sorulanmaya değer görülebilir⁷⁷.



Şekil 5. Moleküler epidemiyolojik yöntemlerle saptanabilen epidemiyolojik dinamikler

1. Gen epidemisine bağlı olgular, aslında sub-organizmal modüler birimlerle oluşan bir epidemi iken, endemi sanılabilir (psödo-endemi). 2. Allodemi olguları, poliklonal genotipte monotipik rezistans fenotipi seleksiyonu ile (gen epidemisini içerebilir, ancak, bundan farklı olarak, farklı direnç mekanizmaları da aynı fenotipi sergileyerek seçilebilir) oluşan bir epidemi iken, endemi sanılabilir

(psödo-endemi). 3. Mikro-epidemi olguları, yüksek-riskli servislerde, aynı kökenlerle ve çapraz-bulaşlarla oluşan birkaç olguluk kümelerdir, ancak, endemik sanılan olguların üçte birini oluşturur; endemi sanılır (psödo-endemi), aslında epidemidir. 4. Hiperendemik durumlardaki olgular, gerçekte psödo-endemi olabilir, yani; süreklilik kazanmış epidemik döngü -nozokomiyal sürveyans kıyaslamasında ('benchmarking') yüksek oranlı endemi (?) - olabilir. 5. Psödo-epidemi.

Hastane enfeksiyonu oranları, günümüzde hastane sağlık hizmetlerinde bir kalite indikatörü olarak kullanılmaktadır. Hastane enfeksiyonlarının epidemik olanlarının %70'nin, endemik olanlarının %20-32'sinin, yoğun izlem ve enfeksiyon kontrolü programları ile önlenebileceği gösterilmiştir. Hastane enfeksiyonlarının %8-10 oranında epidemik (epidemilerin %10'u psödo-epidemik), geri kalanının hiper-endemik veya endemik olduğu bildirilmektedir. "Endemik" enfeksiyonların üçte birinin ise, yüksek riskli servislerde, hastalar arasındaki çapraz-bulaş ile oluştuğu bildirilmiştir. Hastane enfeksiyonlarının, dirençli bakterilerin ortaya çıkması ve yayılması nedeniyle yerel önemine ek olarak küresel önemi de vardır. Dünyanın herhangi bir yerindeki bir hastanede ortaya çıkan hastane enfeksiyonu etkeni dirençli bir bakteri klonunun, global yayılıma yol açabildiği gösterilmiştir⁷⁸. Bu türden global yayılımın epidemiyolojik ve ekonomik etkisi, günümüzde halen tam olarak ölçülememektedir. Bu nedenlerle, hastanelerde ve yanı sıra ulusal ve uluslararası düzlemde, yapılandırılmış, karşılaştırılabilir ve karşılıklı veri değişimine uygun enfeksiyon kontrolü ve epidemiyolojisi programlarına (örn. WHONET, ESGNI, EARSS, mlst.net, seqnet, HARMONY; harmony-microbe.net, vd.) gereksinim duyulmaktadır.

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanan moleküler tiplendirme teknikleri ile: a) kolonize ve enfekte hastalar arasındaki ilişki, b) kontaminasyon ile enfeksiyonun ayırt edilmesi, c) hospitalize hastalar arasındaki bulaşın gösterilmesi, d) re-enfeksiyon ile relapsın ayırt edilmesi, e) antimikrobiyal ilaçlara dirençli kökenlerin aynı hastanede veya değişik hastaneler arasında zaman içindeki yayılımı, f) kısa dönemli olarak hastane epidemilerinin saptanması, g) uzun dönemli olarak, lokal, ulusal ve global düzlemde, nozokomiyal enfeksiyonların ve mikrobiyal patojenlerin evrimsel-epidemiyolojik

dinamiklerinin izlenmesi, h) kısa ve uzun dönemli olarak, lokal, ulusal ve global düzlemde anti-biyotik direncinin, antibiyotik direnç mekanizmalarının, diğer virülans ve patojenite özelliklerinin değişme ve evrimleşme dinamiklerinin izlenmesi sağlanmaktadır^{4-9,74,79-81}.

Hastane enfeksiyonlarının kontrolü için mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından uygulanan moleküler tiplendirme testlerinin maliyeti, hastaya yüklenmeyip, hastanenin rutin genel gider kalemleri kapsamında karşılanmalıdır⁸². Moleküler tiplendirme tekniklerinin rutin olarak doğru kullanımını da içeren enfeksiyon kontrol programlarının tıbbi ve ekonomik getirisi olduğu gösterilmiştir⁸³. Moleküler epidemiyolojik yöntemlerin, endemik olduğu sanılan, aslında mikro-epidemik olan durumların ortaya konulması için de kullanılabileceği bildirilmiştir⁸⁴.

Struelens⁷ ve van Belkum⁸, moleküler epidemiyolojik tiplendirme tekniklerini, genel olarak “karşılaştırmalı”-tiplendirme sistemleri (‘comparative-typing systems’) ve “kütüphane”-tiplendirme teknikleri (‘arşivleme’, ‘kataloglama’, ‘library-typing systems’) kategorilerinde sınıflandırmışlardır. Struelens, moleküler epidemiyolojik tiplendirme uygulamasına gereksinim yaratan durumları, üç kategoride sınıflandırmıştır; salgın araştırmaları, bölgesel izlem ve global izlem çalışmaları. Bu sınıflandırmaya uygun olarak, zaman boyutunda kısa sürede hızlı değişim sergileyen moleküler belirleyici/belirteçlerle (‘molecular determinant’ veya ‘molecular marker’) tasarlanmış tekniklerin, salgın araştırmasında kullanılmaya uygun olduğu düşünülerek, bu tür tekniklerin ayırt edici gücünün (‘discriminatory power’) 0.95 veya üzerinde olması bir ölçüt olarak önerilmiştir⁷⁹. Kütüphane-tiplendirme sistemleri ise, zaman boyutunda kısa veya uzun dönemli değişim gösteren eğilimleri, sırasıyla hızlı veya yavaş değişim gösteren moleküler belirteçlerle retrospektif (kültür koleksiyonları ile veya elde edilen verilerin ata kökenlere yönelik ‘coalescent’ ya da ‘split-decomposition’ analizleri ile) veya prospektif olarak saptayabilen ve bunu laboratuvar-ıçi ve laboratuvarlar-arası tekrarlanabilirliği (‘reproducibility’) yüksek, standardize edilmiş yorumlama ve nomenklatüre dayalı taşınabilir/iletilebilir/erişilebilir bir veritabanı oluşturulmasıyla sağlayabilen teknikler olmalıdır^{7,8,28,85-94}. Moleküler epidemiyolojik tiplendirme yöntemlerinin daha ayrıntılı olarak sınıflandırılması, performans ölçütleri ve yorumlama ölçütleri ile ilgili kılavuzlar güncellenerek yayınlanmıştır^{37,79,81,95-98}.

ESGEM’in, çeşitli ülkelerden 154 laboratuvarla (Türkiye’den katılan laboratuvar sayısı, $n=7$) yaptığı bir anket çalışmasında, laboratuvarların %73’ünün en az bir moleküler epidemiyolojik tiplendirme yöntemi/ni(ne) kullandığı/(erişimi olduğu); %78’nin bu yöntemleri, salgın araştırması (%30), genel enfeksiyon sürveyansı (%26) ve hastalık epidemisi, patojenitesi ve virülansını gösteren moleküler determinantları saptamak (%21) için kullandıkları belirlenmiştir. Kalite kontrolü (%7), ulusal-referans-görevleri (%13) ve araştırma (%3) için kullanım daha azdır⁹⁹. En sık kullanılan üç yöntem, (yaklaşık oranlarla) PFGE (%32), DNA dizi analizi (MLST, vd.) (%22) ve RAPD/rep-PCR (%16) olarak belirlenmiştir⁹⁹. Referans laboratuvarlarında, ribotiplendirme (%10) ve MLVA (%9), diğer laboratuvarlara kıyasla iki kez daha sık kullanılmaktadır. Laboratuvarların yalnızca %19’unun, sahip oldukları bir yazılımla, standardize veri analizi, yorumlaması ve saklaması yapabildiği bildirilmiştir⁹⁹. Moleküler epidemiyolojik tiplendirme için kurum başına kullanılan ortalama yıllık bütçe 44 bin Euro’dur. Çalışılan izolat başına ortalama harcama, 56 (7-200) Euro’dur. Katılımcılarca, birçok tür için kullanılabilecek tek tiplendirme yöntemi beklentisinin olduğu ve daha hızlı ve yüksek-çıkı-tı-sayı-yöntemlerin klinik uygulama üzerindeki etkiyi artıracığı düşüncesi belirtilmiştir. En sık tiplendirilen etkenlerin, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* olduğu saptanmıştır. Şu anki tiplendirme sıklığı, ayda ortalama yaklaşık 18 (9-24) bakteridir ve %20 daha fazla tiplendirme yapma gereksinimi olduğu belirtilmiştir. Referans laboratuvarları, diğer laboratu-

varlara kıyasla, 1.5-2 kat daha fazla tiplendirme yapmaktadır. Daha uygun maliyet koşulları altında, katılımcıların %30'u, gerçek-zamanlı izlem uygulamasına geçmek isteyeceklerini ve tiplendirmede daha fazla çeşitliliği tercih edeceklerini, %20'si ise küçük ölçekli salgınlarda da tiplendirme yapacaklarını belirtmişlerdir⁹⁹.

Yaygın kullanılan yöntemlerden, PFGE (restriksiyon işlemi tüm genomu hedef alır, ancak tüm genomun restriksiyonundan elde edilen fragmanların tamamı jelde ayıramaz), kısa dönemli hızlı değişimlerin incelenmesi temelinde yapılan epidemik ilişkililik ('relatedness', aslında ilişkisizlik çünkü özdeş paternler 'indistinguishable' 'ayırt edilemiyor' olarak bildirilir) analizlerinde gücü en yüksek olan ve "altın standart" olarak kabul edilen yöntemdir. Yalnızca, *Staphylococcus aureus* için, HARMONY protokolü ile standardize edilmiştir (bu patojen için "kütüphane"-tiplendirme tekniği olarak kullanılabilir)⁸⁶. Yaygın kullanılan "kütüphane"-tiplendirme tekniklerinden, çok-lokuslu dizi analizi (MLST) veya tek-lokuslu dizi analizi (SLST) ('spa-typing') tekniklerinde, alel, dizi-tipi, tek- veya çift-lokus varyantları (MLST için; SLV, DLV), klonlar, ata/kurucu-klon ve klonal-kompleksler biçiminde tiplendirme ve kümelenendirme yapılır. Elde edilen tiplendirme verilerinden yararlanılarak, sırasıyla eBURST veya BURP algoritmalarıyla (ilgili veritabanı sitelerine internet üzerinden erişimle kullanılabilen yazılım yardımı ile uygulanabilir) UPGMA ve klasik hiyerarşik-kümelenendirme gibi yöntemlerden farklı algoritmalarla, popülasyon haritalaması ('mapping') yapılır; aynı verilerle istenirse UPGMA gibi bir yöntemle dendrogram da oluşturulabilir^{90,91,93}. MLST yönteminde, iki izolat arasındaki karşılaştırmada, bir lokusta, ≥ 1 nükleotid farkı, farklı alel varlığı (SLV) olarak kabul edilmektedir. Ancak, >1 nükleotid varlığı, birden fazla ayrı genetik olgunun birikmesi ile de oluşmuş olabilir; eBURST algoritmasına göre yapılan haritalamadaki genetik uzaklık ölçümünde, bu durum dikkate alınmamaktadır. MLST dizi analizi verileri üzerinde uygulanacak ve genetik olgu sayısı ve türünün (rekombinasyon, mutasyon) saptanması için kullanılacak bir algoritma yoluyla ve ardından genetik uzaklıkların belirlenmesi sonucunda oluşturulacak kümelenendirme ile, PFGE'nin ayırt edici gücü ile karşılaştırılabilir düzeyde uyumlu sonuçlar alınabileceği düşünülmüştür (Acuner İÇ, yayınlanmamış veri). Dizi analizi yapılan (6-7) lokusun dizilerinin, kümelenendirme veya filogenetik incelemeleri yapıldığında, tek gen bölgesi kullanılarak ayrı ayrı oluşturulan filogenetik ağaçların MLST ile uyumsuz olduğu, birleştirilmiş ('concatenated') diziler kullanılarak oluşturulan filogenetik ağacın ise MLST ile uyumlu olduğu saptanmıştır^{87,100}. MLST yöntemi ilk geliştirildiğinde, araştırmacıların bu yöntemle filogenetik ilişkinin gösterilebileceğine ilişkin bir savları bulunmamaktaydı. Ancak, veri birikimiyle gelişen veritabanı kullanılarak yapılan sonraki karşılaştırmalı filogenetik araştırmalarla, bazı patojenlerin evrimleşmesinde klonal komplekslerin yeri o kadar belirginleşmiştir ki, *Neisseria meningitidis* gibi panmiksik bir popülasyonda bile virülans özellikleri ile uyumluluk bulunmuş ve özellikle klonal popülasyon yapısına sahip olan *S.aureus*'da ise, klonal komplekslerin tür olarak tanımlanması önerilmiştir^{11,100,101}.

Bakterilerin epidemiyolojik dinamiklerinde ve evrimlerinde etkili olan birçok evrimsel güç ve varyasyon mekanizması vardır¹⁰²⁻¹¹⁶. Bakteriye genom, çekirdek ('core') ve aksesuar (türe ve kökene göre genomun %10-40'ını oluşturabilir; mobil genetik elemanlarla değişkendir ve genom plastisitesini sağlar) genom olarak iki sınıfa ayrılabilir. Genom, kodlayan ('coding'; örn. MLST'de kullanılan 'housekeeping' genleri; esansiyel metabolik süreçleri kodlayan genler), kodlamayan ('non-coding'; yapısal, metabolik veya regülatör/informasyonel kodlayıcı dizileri içermeyen diziler; örn. bazı tekrarlayıcı diziler) bölgeler olarak da ikiye ayrılabilir. Moleküler epidemiyolojik tiplendirme yöntemlerinde kullanılan moleküler belirteçlerin bilinçli olarak seçilebilmesi için, evrimleşmesinin nasıl olduğunun, yani; nükleik asit dizisi-temelli (DNA nükleotid değişimi-temelli) üç ana modelden türetilen 56 ayrı

moleküler evrim modelinden hangisiyle uyumlu olarak varyasyon üretimi olduğunun (eğer protein kodlayan belirteç-temelli ise ve tercih edilirse, amino asit-değişimi-temelli 5 ana modelden hangisine uyumlu olarak evrimleştiğinin) saptanması, üretilen varyasyonun seleksiyonunun ne türde olduğunun (nötral, 'neutral' veya nötrale-yakın, 'nearly-neutral' veya yönlü, 'directional' veya saflaştırıcı, 'purifying'; Kimura'nın nötral kuramından türetilen nötrale-yakın hipoteze göre, zindelik -'fitness'- üzerindeki etkisine göre, mutasyonların çok az bir oranı avantajlı, kalan kısmı ise, yaklaşık birbirine eşit oranlarda olmak üzere, zararlı, nötral veya nötrale-yakın -hafifçe zararlıdır -'slightly deleterious'-) ve bu evrimleşme süreçlerinin sonucunda genomun farklı yerlerinde farklı hızlarda oluşabilen "moleküler saatin" hızının belirlenmesi gereklidir^{20,103,117-120}. Bunun başarılabilmesi için, birçok basamaktan oluşan kapsamlı bir uygulamalı ve kuramsal çalışmanın yapılması gereklidir¹²¹⁻¹²³.

John Maynard Smith, bir alelin moleküler evrimi sırasında, bağlantı-dengesizliğinin kaybolması ve evrimsel (filogenetik) sinyalin tamamen silinmesi (non-klonal popülasyonlardaki gibi) için, rekombinasyonun mutasyona kıyasla en az 20 kat fazla olması gerektiğini tahmin etmiştir ve sonraki çalışmalarda bu oran giderek gerçeğe yakınlaşarak daha düşük bir oran olarak saptanmıştır. Bu nedenle, bakterilerde genellikle, klonal (bağlantı dengesi olan) -birbirinden bağımsız evrimleşen- popülasyonlar gözlenir ve non-klonal popülasyonların görülebilmesi için rekombinasyon sıklığının oldukça fazla olması gereklidir. Örneğin, bazı bakterilerde saptanan bu oranlar yaklaşık olarak şöyledir: *Staphylococcus aureus*; 1/15 (klonal), *Neisseria meningitidis*; 5/1, *Streptococcus pneumoniae*; 9/1^{28,68,90,122}. Ancak, bu oranların saptandığı çalışmalarda yöntemsel sorunlar vardır; yeniden-düzenlenme ('re-arrangement', intrajenik-rekombinasyon) veya homolog veya non-homolog rekombinasyonun saptanması gerçek anlamda HGT'nin saptanması demek değildir. Zira rekombinasyon varlığının araştırılması, yalnızca alıcı tüm-genomu veya genom bölgeleri üzerinde yapılırken, gerçek anlamda HGT varlığının araştırılması alıcı ve vericinin tüm-genomlarının karşılaştırılması ile yapılmalıdır. Ayrıca, bu yöntemler, mikrobiyal filogenetik yapının ağaçsı olduğu varsayımına dayalı iken, aslında filogenetik yapı ağsı niteliktedir ve bu yapıya uygun yöntemler kullanılmalıdır^{28,122-127}.

Dizi-temelli yöntemlerde, moleküler belirteç olarak kullanılacak dizinin, ne tür bir evrimleşme gösterdiğinin pratik olarak saptanması için sinonim olan ve olmayan mutasyon oranına bakılır; oran bire eşitse nötral evrim, >1 ise yönlü seleksiyon, <1 ise saflaştırıcı seleksiyon söz konusudur. Hızlı değişimleri göstermesi beklenen belirteçler, pürifiye edici seleksiyonla evrimleşen dizilerden veya yönlü seleksiyonla evrimleşen dizilerden seçilebilir; moleküler saat bakımından uzun süreli/yavaş değişimleri göstermesi istenen belirteçler ise nötral veya nötrale yakın evrimleşen dizilerden seçilebilir. Ancak MLST'de belirteç olarak kullanılan esansiyel metabolik genlerin, nötral veya nötrale-yakın evrimleştiği sanılırken, pürifiye edici seleksiyon altında oldukları anlaşılmıştır^{87,128}. Dizi-temelli yöntemlerin de bazı yetersizlikleri vardır^{57,129}. Moleküler saat olarak hızlı değişen ve dizi-temelli bir moleküler belirteç bulunmasında, yeni bir yöntem de önerilmiştir¹³⁰. Moleküler belirteçlerin doğru seçilerek uygulanmasıyla ve yorumlanmasıyla, mikrobiyal patojenlerin evrimsel-epidemiolojik dinamikleri ile ilgili çok değerli bilgiler elde edilebilmiştir. Örneğin, beta-laktam antibiyotiklere direnç genlerini ve *mecA*'nın ekspresyonunu regüle eden genleri taşıyan ve böylece MRSA kökenlerinin ortaya çıkmasına yol açan *SCCmec* elementlerinin, *Staphylococcus aureus*'un global biyocoğrafyanın farklı bölgelerindeki moleküler evrimi sırasında, birbirinden farklı klonlarca, en az 20 kez kazanıldığı saptanmıştır¹³⁰. Ayrıca ilerleyen çalışmalarla, başlangıçta toplumdaki edinilmiş MRSA için sabit birer belirteç olduğu sanılan *SCCmec* IV ve V tipleri ile PVL'nin, aslında hastane kökenli başka klonlarda da görülebildiği anlaşılmıştır¹³⁰.

PFGE ve MLST gibi yaygın olarak kullanılan yöntemler sorunsuz değildir. Goering⁹⁷, PFGE yorumunda biyolojik temelde kullanılması gereken Tenover ölçütlerini 1998'de kuramsal olarak modifiye ederek, tek genetik olguyla (GE) oluşabilecek bant farkının (BF), farklı olası genetik varyasyon mekanizmalarına göre 0 ile 4 arasında değişebileceğini göstermiştir. Bu durumda, daha önce epidemik ilişkiye karar vermek için kullanılması önerilmiş olan ölçütlerde değişiklikler olmuştur; 0GE; (0)0 (ayrıt edilemiyor=ilişkili) 1GE; (2-3) 0-4 BF (yakın ilişkili), 2GE; (4-6)0-8 BF (olası ilişkili), 3GE; (≥ 7)0-12 BF (ilişkiz). Aslında uygulamada, PFGE yönteminin yaygın yorumlama yöntemi olarak, doğrudan doğruya Tenover ölçütleri değil, yazılımlar aracılığıyla ve çeşitli benzerlik indeksleriyle elde edilen verilerle oluşturulan benzerlik matrisleri ve buna dayalı UPGMA dendrogramları ve karar eşikleri (benzerlik-düzeyi-kesim-değeri) kullanılmaktadır⁹⁸. Literatürde biriken verilerle birlikte güncel durumu değerlendiren ESGEM, yeni bir kılavuz yayınlayarak bu karmaşıklığın giderilmesi için, 1-4 band farklılığının aynı tipin alt-tipleri olarak, ≥ 5 band farklılığının ise ayrı tipler olarak yorumlanmasını önermiştir. Yeni ESGEM kılavuzunda, yorumlamada, eğer diğer epidemiyolojik verilerle destekleniyorsa ≥ 5 band farkının da "benzerlik kümeleri" olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir⁸¹. Oysa başka bir çalışmada, belirli bir algoritma kullanılarak, modifiye Tenover ölçütlerinin doğrudan uygulanabileceği ve hatta -en azından 1GE düzeyinde- genetik olgu mekanizmalarının da ayrıt edilebileceği gösterilmiştir¹³³. Ayrıca, UPGMA ve benzeri diğer yöntemlerle oluşturulan dendrogramlarda, aynı benzerlik-düzeyi-kesim-değeri altında kaldıkları için ilişkili olarak birlikte kümelendirilen izolatların arasındaki band (PFGE için) veya lokus varyasyonu (MLST için) sayılarının (eBURST algoritmasında, bundan farklı olarak, en fazla sayıda SLV'si ve DLV'si olan lehine sırasıyla tercih yapılarak kümelendirilir; bir izolat başka bir kümedeki bir izolata daha yakın olsa bile birden fazla kümeye atanamaz) eşit olmayabildiği ('triangle inequality') ve böylece, olası farklı dendrogram hipotezlerinin elenemediği (saklı öyküler; 'hidden histories') (dendrogram hipotezinin gücünün test edilmesi için, 'bootstrapping' veya 'jackknifing' gibi, istatistik analizler kullanılır) anlaşılmıştır^{12,131,132}. Bu sorunun çözümünde, çok-boyutlu-ölçeklendirme ('multi-dimensional scaling') yönteminin kullanılabilceği gösterilmiştir^{130,131}. Ayrıca, yeni bir "dendrogram" yöntemi önerilmiştir^{132,133}.

Literatürde, güncel olarak, dizi analizi temelli olan tek- veya çok-lokuslu yöntemlerle, diğer yöntemlerin karşılaştırmalı performansını değerlendiren yayınlar yer almaktadır²⁹⁻³¹. Bu çalışmalarda, kullanılan izolat koleksiyonunun özelliklerinin önemli olduğu anlaşılmıştır. Kısa dönemli lokal nozokomiyal salgın izolatları (az çeşitlilik-daha fazla ilişkililik gösteren) ile yapılan çalışmalarla, uzun dönemli ve farklı coğrafyaların izolatlarını içeren (daha fazla çeşitlilik-daha az ilişkililik gösteren) koleksiyonlarla yapılan çalışmalarda, aynı yöntemlerin performansları ve sonuçlarının uyumlulukları farklılıklar göstermiştir. Bir kural olarak, ayırt edici gücü yüksek olan yöntemler kendi aralarında, ayırt edici gücü düşük olan yöntemler ise kendi aralarında daha yüksek uyum göstermektedir³⁰. Eğer çalışma çeşitliliği fazla olan bir koleksiyonla yapılıyorsa, ayırt edici gücü çok farklı olan yöntemler arasında bile iyi korelasyon saptanabileceği ileri sürülmüştür³⁰. Ucuz, hızlı ve multipleks-PCR-temelli bir teknik olarak MLVA yöntemi, PFGE ile yüksek oranda uyumlu bulunurken, dizi analizi temelli *spa*-tiplendirmesi (SLST) ve MLST kendi aralarında daha uyumlu bulunmuştur³⁰. Genel olarak, *spa*-tiplendirmesi, MLST ile PFGE arasında bir ayırt edici güç sergilemektedir ve bu nedenle, hem lokal nozokomiyal salgınlar için uygundur ve hem de MLST tiplendirmesi için uygun temsilci izolatların seçilmesinde kullanılabileceği belirtilmiştir^{29,30}. MLST klonal-kompleksleri ile, %65 benzerlik-düzeyi kesim değerine göre kümelendirilen PFGE tipleri sonuçları arasında çok iyi uyum saptandığı ve bunun yeni bir tiplendirme nomenklatürü tasarımı için temel oluşturabileceği bildirilmiştir²⁹. IUMS

S.aureus tiplendirme altkomitesi tarafından, uluslararası nomenklatür olarak, klonların karakterize edilmesinde, “MLST sekans tipi-fenotip-SCC*mec* tipi” ile adlandırma yapılması kabul edilmiştir²⁹.

Yukarıda, moleküler epidemiyolojik tiplendirme yöntemlerinin, hastane enfeksiyonlarının kontrolündeki yerinin belirlenebilmesi için, alanın- veya “sanatın”-güncel-durumuna (‘state-of-the-art’) yönelik “anahtar” kavramlara ve terimlere -kısa- değinilerde bulunulmaya çalışılmıştır. Sonuç olarak denilebilir ki, gerek kuramsal ve gerekse uygulamadaki yöntemsel bilgilerin giderek genişleyen ve derinleşen güncel düzeyiyle, hastane enfeksiyonlarının kontrolünde, moleküler epidemiyolojik tiplendirme yöntemlerinin yeri de bu gelişmelere paralel olarak artmaktadır.

Kaynaklar

1. Riley LW (ed). Principles and approaches, pp: 1-28. Molecular Epidemiology of Infectious Diseases: Principles and Practices. 2004, ASM Press, Washington DC.
2. Archibald LK, Hierholzer WJ. Principles of infectious diseases epidemiology, pp: 3-17. In: Mayhall CG (ed), Hospital Epidemiology and Infection Control. 2004, LWW, Philadelphia.
3. Mathema B, Kreiswirth BN. 2004. “Variable-Number Tandem Repeats” kullanılarak bakteri genotiplendirmesi. p: 223-33. In: Persing DH, et al (eds), Moleküler Mikrobiyoloji: Tanı Prensipleri ve Uygulamalar (Çeviri). 2006, Palme Yayıncılık, Ankara.
4. van Belkum A, Struelens M, de Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 547-60.
5. Martinez JL, Baquero F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 647-79.
6. Thompson RCA (ed). Molecular epidemiology: applications to problems of infectious disease, p: 1-4. In: Molecular Epidemiology of Infectious Diseases. 2000, Arnold, London.
7. Struelens MJ, De Gheldre Y, Deplano A. Comparative and library epidemiological typing systems: outbreak investigations versus surveillance systems. Infect Control Hosp Epidemiol 1998; 19:565-9.
8. van Belkum A. High-throughput epidemiologic typing in clinical microbiology. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 86-100.
9. Pérez-Losada M, Porter ML, Tazi L, Crandall KA. New methods for inferring population dynamics from microbial sequences. Infect Genet Evol 2007; 7: 24-43.
10. Koizumi H. Trans-disciplinarity. Neuroendocrinol Letters 2001; 22: 219-21.
11. Turner KME, Feil EJ. The secret life of the multilocus sequence type. Int J Antimicrob Agents 2007; 29: 129-35.
12. Hall BG, Barlow M. Phylogenetic analysis as a tool in molecular epidemiology of infectious diseases. Ann Epidemiol 2006; 16: 157-69.
13. Kunin V, Goldovsky L, Darzentas N, Ouzounis CA. The net of life: reconstructing the microbial phylogenetic network. Genome Res 2005; 15: 954-9.
14. Doolittle WF, Bapteste E. Pattern pluralism and the Tree of Life hypothesis. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 2043-9.
15. Keeling MJ, Eames KT. Networks and epidemic models. J R Soc Interface 2005; 2: 295-307.
16. May RM, Anderson RM. Parasite-host coevolution. Parasitology 1990; 100: S89-S101.
17. Anderson RM. Evolutionary pressures in the spread and persistence of infectious agents in vertebrate populations. Parasitology 1995; 111: S15-S31.
18. May RM. Network structure and the biology of populations. Trends Ecol Evol 2006; 21: 394-9.
19. Crandall KA, Posada D. Phylogenetic approaches to molecular epidemiology, pp: 25-40. In: Leitner T (ed) The Molecular Epidemiology of Human Viruses. 2002, Kluwer AP, Massachusetts.
20. Liò P, Goldman N. Models of molecular evolution and phylogeny. Genome Res 1998; 8: 1233-44.
21. Avise JC (ed). Why employ molecular genetic markers? pp: 5-20. In: Molecular Markers, Natural History, and Evolution. 2004 Sinauer, Massachusetts.
22. Tibayrenc M. Bridging the gap between molecular epidemiologists and evolutionists. Trends Microbiol 2005; 13: 575-80.
23. Alonso D, Etienne RS, McKane AJ. The merits of neutral theory. Trends Ecol Evol 2006; 21: 451-7.
24. Page KM, Nowak MA. Unifying evolutionary dynamics. J Theor Biol 2002; 219: 93-8.
25. Cohan FM. Bacterial species and speciation. Syst Biol 2001; 50: 513-24.
26. Cohan FM. What are bacterial species? Annu Rev Microbiol 2002; 56: 457-87.
27. Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, et al. Opinion: re-evaluating prokaryotic species. Nat Rev Microbiol 2005; 3: 733-9.

28. Feil EJ. Small change: keeping pace with microevolution. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 483-95.
29. Cookson BD, Robinson DA, Monk AB, et al. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1830-7.
30. Malachowa N, Sabat A, Gniadkowski M, et al. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, spa typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3095-100.
31. Koren L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. Spa typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macro-variation. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 792-89.
32. Lakatos I. Yanışılama ve bilimsel araştırma programlarının metodolojisi, s:111-242. Lakatos I, Musgrave A. (ed) Çeviri: Bilginin Gelişimi ve Bilginin Gelişimi ile İlgili Teorilerin Eleştirisi. 1992, Paradigma, İstanbul.
33. Barrett TJ, Ribot E, Swaminathan B. 2004. Epidemiyoloji için moleküler alt tiplendirme: paternlerin karşılaştırılmasında karşılaşılan sorunlar ve verilerin yorumu, s: 259-66. Persing DH, et al (eds), Çeviri: Moleküler Mikrobiyoloji: Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. 2006, Palme Yayıncılık, Ankara.
34. Stratton CW, Greene JN. Role of the microbiology laboratory in hospital epidemiology and infection control, pp: 1809-25. In: Mayhall CG (ed), *Hospital Epidemiology and Infection Control*. 2004, LWW, Philadelphia.
35. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 512-530.
36. Zaidi N., Konstantinou K., Zervos M. 2003. The role of molecular biology and nucleic acid technology in the study of human infection and epidemiology. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127:1098-105.
37. Goering RV. Pulsed-Field Gel Electrophoresis, pp: 185-96. In: Persing DH, et al (eds), Çeviri: Moleküler Mikrobiyoloji: Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. 2006, Palme Yayıncılık, Ankara.
38. Giesecke J (ed). Measuring infectivity, pp: 160-75. In: *Modern Infectious Disease Epidemiology*. 2002, Arnold, London.
39. Harbarth S. Epidemiologic methods for the prevention of nosocomial infections. *Int J Hyg Environ Health* 2000; 203: 153-7.
40. Freeman J, Tokars J. Modern quantitative epidemiology in the hospital, p: 19-48. In: Mayhall CG (ed), *Hospital Epidemiology and Infection Control*. 2004, LWW, Philadelphia.
41. Gastmeier P, Stamm-Balderjahn S, Hansen S, et al. How outbreaks can contribute to prevention of nosocomial infection: analysis of 1,022 outbreaks. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26: 357-61.
42. Cooper B, Lipsitch M. The analysis of hospital infection data using hidden Markov models. *Biostatistics* 2004; 5: 223-37.
43. Giesecke J (ed). Mathematical models for epidemics, pp:119-32. In: *Modern Infectious Disease Epidemiology*. 2002, Arnold, London.
44. Roberts MG. The pluses and minuses of R_0 , *J R Soc Interface* 2007; 4(16): 949-61.
45. Heffernan JM, Smith RJ, Wahl LM. Perspectives on the basic reproductive ratio. *J R Soc Interface* 2005; 2(4): 281-93.
46. Levin BR. How can we predict the ecologic impact of an antimicrobial: the opinions of a population and evolutionary biologist. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7(Suppl 5): 24-28.
47. Grenfell BT, Pybus OG, Gog JR, et al. Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. *Science* 2004; 303: 327-32.
48. Day T, Gandon S. Applying population-genetic models in theoretical evolutionary epidemiology. *Ecol Lett.* 2007; 10: 876-88.
49. Baquero F. From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 510-8.
50. Baquero F. Epidemiology and evolution. ESCMID Award of Excellence Lecture. 15th ECCMID, 2005, Copenhagen.
51. Baquero F. Modularization and evolvability in antibiotic resistance, pp: 233-47. In: Baquero F, Nombela C, Cassell GH, Gutierrez-Fuentez JA (eds), *Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens*. 2008, ASM Press, Washington DC.
52. King JL, Jukes TH. Non-Darwinian evolution. *Science* 1969; 164: 788-98.
53. Aragon T. Essential field epidemiology: a quick reference guide. 2005; <http://www.idready.org>
54. Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun* 1999; 67: 3703-13.
55. Abacıoğlu H. Filogenetik analiz, s: 43-54. Ağaçfıdan A, Badur S, Türkoğlu S (ed) *İnfeksiyon Hastalıklarının Laboratuvar Tanısında Moleküler Yöntemler*. 2002, TMC Yayınları, Yayın No: 42, İstanbul.
56. Abacıoğlu H. Filogenetik analiz, s: 15-25. 4. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre Kitabı. 2006, Ankara.
57. Crandall KA, Losada MP. Epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens, pp: 21-30. In: Baquero F, Nombela C, Cassell GH, Gutierrez-Fuentez JA (eds), *Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens*. 2008, ASM Press, Washington DC.

58. Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002; 52 (Pt 3): 1043-7.
59. Hall BG. Predicting the evolution of antibiotic resistance genes. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 430-5.
60. Martínez JL, Baquero F, Andersson DI. Predicting antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2008; 5: 958-65.
61. Cirz RT, Romesberg FE. Controlling mutation: intervening in evolution as a therapeutic strategy. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2007; 42: 341-54.
62. Sintchenko V, Iredell JR, Gilbert GL. Pathogen profiling for disease management and surveillance. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 464-70.
63. Fraser-Liggett CM. Insights on biology and evolution from microbial genome sequencing. *Genome Res* 2005; 15: 1603-10.
64. Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4384-8.
65. Spratt BG, Maiden MC. Bacterial population genetics, evolution and epidemiology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999; 354: 701-10.
66. Smith JM, Feil EJ, Smith NH. Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria. *Bioessays* 2000; 22: 1115-22.
67. Dijkshoorn L, Ursing BM, Ursing JB. Strain, clone and species: comments on three basic concepts of bacteriology. *J Med Microbiol* 2000; 49:397-401.
68. Spratt BG, Hanage WP, Feil EJ. The relative contributions of recombination and point mutation to the diversification of bacterial clones. *Curr Opin Microbiol* 2001; 4: 602-6.
69. Spratt BG. Exploring the concept of clonality in bacteria. *Methods Mol Biol* 2004; 266: 323-52.
70. Hanage WP, Fraser C, Spratt BG. Sequences, sequence clusters and bacterial species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361: 1917-27.
71. Hanage WP, Spratt BG, Turner KM, Fraser C. Modelling bacterial speciation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361: 2039-44.
72. Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis* 2003; 36 (Suppl 1): S11-23.
73. Baquero F, Coque TM, Cantón R. Allodemics. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 591-2.
74. Struelens M. Molecular typing: a key tool for the surveillance and control of nosocomial infection. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15: 383-5.
75. Fraser C, Hanage WP, Spratt BG. Neutral microepidemic evolution of bacterial pathogens. *PNAS USA* 2005; 102: 1968-73.
76. Acuner IC Investigation of an outbreak at hospital settings. 1st ICCAID, 2006, Bishkek. http://www.iccaid.org/2006/files/presentations/C_ACUNER3.pdf
77. Pan A, Carnevale G, Catenazzi P, et al. Trends in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bloodstream infections: effect of the MRSA "search and isolate" strategy in a hospital in Italy with hyperendemic MRSA. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26: 127-33.
78. Witte W. International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens. *Infect Genet Evol* 2004; 4: 187-91.
79. Struelens MJ Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect* 1996; 2: 2-11.
80. Tibayrenc M, Ayala FJ. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of pathogenic microorganisms: analysis and interpretation of data, pp: 21-9. In: Thompson RCA (ed), *Molecular Epidemiology of Infectious Diseases*. 2000, Arnold, London.
81. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(Suppl 3): 1-46.
82. Scheckler WE, et al. Requirements for infrastructure and essential activities of infection control and epidemiology in hospitals: a consensus panel report. Society of Healthcare Epidemiology of America Position Paper. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998; 19: 114-24.
83. Hacek DM, et al. Medical and economic benefit of a comprehensive infection control program that includes routine determination of microbial clonality. *Am J Clin Pathol* 1999; 111: 647-54.
84. Blanc DS. The use of molecular typing for epidemiological surveillance and investigation of endemic nosocomial infections. *Infect Genet Evol* 2004; 4: 193-7.
85. Enright MC, Spratt BG. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* 1999; 7: 482-7.
86. Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, et al. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1574-85.
87. Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, et al. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J Bacteriol* 2003; 185: 3307-16.

88. Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol* 2003; 11: 479-87.
89. Cooper JE, Feil EJ. Multilocus sequence typing- what is resolved? *Trends Microbiol* 2004; 12: 373-7.
90. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, et al. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* 2004; 186: 1518-30.
91. Spratt BG, Hanage WP, Li B, Aanensen DM, Feil EJ. Displaying the relatedness among isolates of bacterial species - the eBURST approach. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 241: 129-34.
92. Aanensen DM, Spratt BG. The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 728-33.
93. Mellmann A, Weniger T, Berssenbrügge C, et al. Based Upon Repeat Pattern (BURP): an algorithm to characterize the long-term evolution of *Staphylococcus aureus* populations based on spa polymorphisms. *BMC Microbiol* 2007; 7: 98.
94. Strommenger B, Braulke C, Heuck D, et al. Spa typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 574-81.
95. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-9.
96. Tenover FC, Arbeit RD, 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.
97. Goering RV. The molecular epidemiology of nosocomial infection: an overview of principles, application, and interpretation. In: Specter S, Bendinell M, Friedman H (ed), *Rapid Detection of Infectious Agents*. 1998, Springer, US.
98. Soll DR, Pujol C, Lockhart SR. Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms, pp: 129-51. In: Murray P, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (ed), *Manual of Clinical Microbiology*. 2007, ASM Press, Washington DC.
99. Maquelin K, Cookson B, Tassios P, van Belkum A; for the European Society for Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM). Current trends in the epidemiological typing of clinically relevant microbes in Europe. *J Microbiol Methods* 2007; 69: 222-6.
100. Feil EJ, Holmes EC, Bessen DE, et al. Recombination within natural populations of pathogenic bacteria: short-term empirical estimates and long-term phylogenetic consequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 182-7.
101. Feil EJ, Enright MC. Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2004; 7: 308-13.
102. Ochman H, Elwyn S, Moran NA. Calibrating bacterial evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12638-43.
103. Tenaillon O, Toupanance B, Le Nagard H, et al. Mutators, population size, adaptive landscape and the adaptation of asexual populations of bacteria. *Genetics* 1999; 152: 485-93.
104. Arber W. Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiol Rev* 2000; 24: 1-7.
105. Dobrindt U, Hacker J. Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2001; 4: 550-7.
106. Arber W. Biological evolution: lessons to be learned for microbial population biology and genetics. *Res Microbiol* 2004; 155: 297-300.
107. Gomez MJ, Ildefonso C, Valencia A. Gene order in prokaryotes: conservation and implications, pp: 209-37. In: Vicente M, Tamames J, Valencia A, Mingorance J (ed), *Molecules in Time and Space*. Bacterial Shape, Division and Phylogeny. 2004, Kluwer/Plenum, New York.
108. Simonson AB, Servin JA, Skophammer RG, et al. Decoding the genomic tree of life. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102 (Suppl 1): 6608-13.
109. Ogunseitan O. Theoretical mechanisms of speciation, pp: 12-7. In: Ogunseitan O (ed), *Microbial Diversity*. 2005, Blackwell, Oxford.
110. Kussell E, Leibler S. Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments. *Science* 2005; 309: 2075-8.
111. Kussell E, Kishony R, Balaban NQ, Leibler S. Bacterial persistence: a model of survival in changing environments. *Genetics* 2005; 169: 1807-14.
112. Hughes AL. Evidence for abundant slightly deleterious polymorphisms in bacterial populations. *Genetics* 2005; 169: 533-8.
113. Konstantinidis KT, Ramette A, Tiedje JM. The bacterial species definition in the genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361: 1929-40.
114. Parter M, Kashtan N, Alon U. Environmental variability and modularity of bacterial metabolic networks. *BMC Evol Biol* 2007; 7:169.

115. Baquero F, Nombela C, Cassell GH, Gutierrez-Fuentez JA (eds). Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens. 2008, ASM Press, Washington DC.
116. Bromham L, Penny D. The modern molecular clock. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 216-24.
117. Sullivan J, Joyce P. Model selection in phylogenetics. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 2005; 36: 445-66.
118. Posada D. ModelTest Server: a web-based tool for the statistical selection of methods of nucleotide substitution online. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: W700-3.
119. Pybus OG. Model selection and the molecular clock. *PLoS Biology* 2006; 4: e151.
120. Pérez-Losada M, Viscidi RP, Demma JC, Zenilman J, Crandall KA. Population genetics of *Neisseria gonorrhoeae* in a high-prevalence community using a hypervariable outer membrane porB and 13 slowly evolving housekeeping genes. *Mol Biol Evol* 2005; 22:1887-902.
121. Perez-Losada M, Browne EB, Madsen A, Wirth T, Viscidi RP, Crandall KA. Population genetics of microbial pathogens estimated from multilocus sequence typing (MLST) data. *Infect Genet Evol* 2006; 6:97-112.
122. Cooper JE, Feil EJ. The phylogeny of *Staphylococcus aureus* - which genes make the best intra-species markers? *Microbiology* 2006; 152(Pt 5):1297-305.
123. Stumpf MP, McVean GA. Estimating recombination rates from population-genetic data. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 959-68.
124. Moret BM, Nakhleh L, Warnow T, et al. Phylogenetic networks: modeling, reconstructibility, and accuracy. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform* 2004; 1:13-23.
125. Makarenkov V, Kevorkov D, Legendre P. Phylogenetic network construction approaches, pp: 61-98. In: Arora DK, Berka RM, Singh GB (eds), *Applied Mycology and Biotechnology: Bioinformatics*. Vol.6, 2006, Elsevier.
126. Thompson SL. A simple procedure for joint estimation of the long-term rates of sexuality and mutation in predominantly clonal populations, for use with dominant molecular markers. *Molecular Ecology Notes* 2007; 7: 567-9.
127. Kuhn G, Francioli P, Blanc DS. Evidence for clonal evolution among highly polymorphic genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2006; 188:169-78.
128. Rocha EP, Smith JM, Hurst LD, et al. Comparisons of dN/dS are time dependent for closely related bacterial genomes. *J Theor Biol* 2006; 239: 226-35.
129. Zheng Y, Roberts RJ, Kasif S. Identification of genes with fast-evolving regions in microbial genomes. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 6347-37.
130. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, et al. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 222-35.
131. Vauterin P. 2006. Representations of strain similarities in molecular microbial typing. 16th ECCMID, 2006, Nice. http://www.aphl.org/conferences/2006_conferences/pulsenet_update_meeting_2006/Documents/Proceedings/36_Vauterin.pdf
132. Acuner IC 2006. Theoretical framework on the uses of standardised antibiotic phenotype and pattern indexes. 16th ECCMID, 2006, Nice. *Clin Microbiol Infect* 12 (s4) P1278.
133. Acuner IC, Eroglu C. Rethinking the applicability of Tenover criteria: a model algorithm and a new dendrogram approach for the direct and wider application. 17th ECCMID, 2007, Munich. *Clin Microbiol Infect* 13(s1) P1854.





Paneller

PNL 1

MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN MAYA MANTARLARININ TAKSONOMİSİNE GETİRDİKLERİ

Doç. Dr. Ayşe KALKANCI

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Maya mantarlarının taksonomisine ait kurallar, uluslararası botanik isimlendirme kodları (International Code of Botanical Nomenclature-ICBN) tarafından düzenlenmektedir. Bu kodlar yapılan toplantılarda, yapıldığı şehrin adı altındaki metinlerde toplanmaktadır. Bu metinlerin sonuncusu, 2000 yılında, St. Louis, Missouri'de yapılan 'Sixteenth International Botanical Congress, International Code of Botanical Nomenclature (Saint Louis Code)' toplantısından sonra yayımlanmıştır. Bu toplantılarda, maya taksonomisinde yapılacak herhangi bir değişiklik için bazı ilkeler belirlenmiştir. Örneğin, bir mantarın yeni bir teleomorfik şekli tanımlandığında, isimlendirme için 'gen. nov., sp. nov., var. nov.' gibi kısaltmalar, anamorf şekil için 'anam. nov.' gibi bir kısaltma kullanılmalıdır. 1935'den beri tanımlanan türler Latince isimlendirilmektedir. 1960'ların sonuna kadar bir türün isimlendirilmesi için sadece fenotipik özelliklerinden yararlanılmaktaydı. Nükleik asitlerin ölçülmesine ait yöntemlerin geliştirilmesi ile, türler arasındaki genetik benzerliğin gösterilmesi mümkün olmuştur. DNA temelli çalışmalar çok gelişmiş moleküler yöntemlerin kullanılmasını gerektirmektedir. Daha çok DNA dizi analizi yöntemi kullanılmakta, ancak DNA hibridizasyonu ile değerli bilgiler elde edildiği unutulmamalıdır.

Moleküler yöntemlerin maya taksonomisine çok önemli katkıları olmuştur. En önemlisi, tanımlamada kullanılan, glukoz fermentasyonu, nitrat asimilasyonu, yalancı veya gerçek hif oluşturma gibi, morfolojik ve fizyolojik özelliklerin çoğunun taksona özgül olduğu, ancak filogenetik olarak önemli olmadığı anlaşılmıştır.

Mayalarda bulunan hücresel DNA, $6.5-14 \times 10^9$ dalton büyüklükte, başka bir deyişle *Escherichia coli* hücresel DNA'sının 2-5 katı büyüklüğündedir. *Saccharomyces cerevisiae* toplam DNA'sının %5-20'si mitokondri kaynaklıdır. Maya hücresel DNA'sının ayrılması için önce sert ve kalın hücre duvarının mekanik olarak parçalanması veya kimyasal olarak yıkılması gereklidir. Mekanik yöntemler hızlıdır, fakat DNA kaybı görülebilir. Kimyasal yöntemler hücrenin tuz içeren tamponlar içinde otolizi temeline dayanır. DNA elde edildikten sonra, içerdiği guanin-sitozin (G+C) miktarı hesaplanmalıdır. Askomisetlerde çekirdekteki G+C içeriği %27-50 iken, bazidiyomisetlerde yaklaşık olarak %50-70'dir. Bazı mayalar birbirine çok yakın G+C içeriğine sahip olabilirler. Ancak temel olarak, G+C içeriği en az %1 farklı olan iki maya, iki farklı tür olarak sınıflandırılmalıdır.

Ribozomal RNA (rRNA) ve ribozomal DNA (rDNA), birçok mikroorganizmanın yakın veya uzak ilişkide olduğu diğer mikroorganizmaları göstermek için, son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ribozomlar bütün hücresel organizmalarda bulunurlar. Bu nedenle, rRNA/rDNA bütün organizmalar ile paylaşılmış bir moleküler geçmişi gösterir. Bazı rRNA/rDNA dizileri evrimsel ilişkileri anlamamızda ve filogenetik sınıflandırmalar yapılmasında kullanılabilirler.

Ökaryotik hücredeki rRNA, farklı büyüklüklerde parçalar içerir. Geniş (25S-28S), küçük (18S) ve 5.8S rRNA'yı kodlayan genler, 100-200 kopya kadar tekrar bölgeleri içerir. Maya sistematüğinde rRNA karşılaştırmasını ilk yapan araştırmacılar Bicknell ve Douglas (1970)'dir. Bu iki araştırmacı, türlere ait 25S rRNA farklılıklarını göstermişlerdir. Bu tarihten sonra yapılan çalışmalar ile çok

sayıda maya türüne ait rRNA incelenmiştir. Ribozomal DNA farklılıkları ise 'restriction fragment length polymorphisms' (RFLPs) yöntemi ile incelenebilir. RFLP sonuçları, farklı türlerin veya aynı tür içindeki farklı kökenlerin gösterilmesinde kullanılabilir. *Candida* cinsi içindeki evrimsel ilişkiler, ilk defa Magee tarafından (1987), *Cryptococcus* cinsi içinde olanlar ise Vilgalys ve Hester tarafından (1990) bildirilmiştir.

Küçük olması nedeniyle 5S rRNA dizisi kolaylıkla saptanabilmekte ve filogenetik ilişkilerin gösterilmesinde kullanılmaktadır. Yaklaşık 160 nükleotid içeren 5.8S rRNA ise, bazı değişmiş nükleotidler içermektedir. 5.8S rRNA geni 'inter transgenic spacer' (ITS) bölgeleri arasında yerleşmiştir. Bu nedenle daha çok rDNA'nın ITS bölgelerine ait DNA dizileri, moleküler tanımlama ve genotipleme çalışmalarında hedef olarak kullanılmaktadır.

Geniş alt ünitenin 5' ucu çok değişken olduğu için, birbiri ile yakın ilişkili türlerin ayırımında rRNA/rDNA geniş alt ünite dizileri kullanılabilir. Bazı istisnalar hariç, D2 bölgesi birçok askomiçet ve basidiyomiçet mayanın tanımlanmasında yeterli olur. Son yıllarda en çok 600 nükleotid içeren, D1/D2 bölgesi hedeflenmektedir. Birçok laboratuvarında otomatik DNA dizileme cihazları kullanılarak cins ve tür tanımı yapılmaktadır.

Moleküler yöntemler kullanılmaya başlandıktan sonra yeni maya cins ve türleri tanımlanmış, daha önce tanımlanmış mayaların cins ve tür tanımları değiştirilmiş veya yeni anamorf/teleomorf şekiller gösterilmiştir. Tam olarak maya olduğu söylenemese de, taksonomik olarak değiştirilmiş mantarlara en belirgin örnek, *Pneumocystis* olarak verilebilir. İlk değişiklik, bir protozoon olarak tanımlanan mikroorganizmanın, aslında bir mantar olduğunun anlaşılması ile gerçekleşir. Daha sonra, insanlarda pnömoni etkeni olduğu gösterilen ve *Pneumocystis carinii* olarak tür tanımı yapılan mantar, 1999 yılında Frenkel tarafından *Pneumocystis jirovecii* olarak tekrar sınıflandırılmıştır.

Candida cinsi içinde çok sayıda yeni tür tanımlanmaktadır. Örneğin, *Candida alocasiicola* sp. nov., *Candida hainanensis* sp. nov., *Candida heveicola* sp. nov. ve *Candida musiphila* sp. nov., 2008 yılında bitki patojeni olarak tanımlanmış yeni anamorfik, askomiçet mayalardır. Tayland'dan yapılan bildirilerde, 2004 yılında *Candida krabiensis* sp. nov., *Candida sithepensis* sp. nov., ve *Pichia siamensis* sp. nov., 2007 yılında ise *Candida thailandica* sp. nov. ve *Candida lignicola* sp. nov. türleri tanımlanmıştır. Bu örnekler çoğaltılabilir.

Cins adı değişen mayalara da örnekler verilebilir. *Yarrowia lipolytica* olarak tanımlanan 38 mayanın tekrar isimlendirilmesi sonucunda, üç yeni *Candida* türü; *Candida oslonensis* sp. nov., *Candida alimentaria* sp. nov. ve *Candida hollandica* sp. nov. tanımlanmıştır.

Trichosporon taksonomisi son yıllarda bütünüyle değişmiştir. Sugita ve Nakase tarafından 19 tür olarak sınıflandırılan *Trichosporon* cinsine ait tür sayısı, D1/D2 bölgesi DNA dizileme sonuçlarına göre üç grupta 23 türe çıkarılmıştır.

Kaynaklar

1. Biswas SK, Wang L, Yokoyama K, Nishimura K. Molecular phylogenetics of the genus *Trichosporon* inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene sequences. J Clin Microbiol 2005; 43: 5171-8.
2. Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. Biol Rev 1998; 73: 203-66.
3. Greuter W, Barrie FR, Burdet HM, et al (eds). International Code of Botanical Nomenclature (Tokyo Code), 1994. Adopted by the Fifteenth International Botanical Congress, Yokohama, August–September 1993. Regnum Veg, 131: 1-389.

4. Greuter W, McNeill J, Barrie FR, et al (eds). International Code of Botanical Nomenclature (Saint Louis Code), 2000. Adopted by the Sixteenth International Botanical Congress, St. Louis, Missouri, July–August 1999. Regnum Veg, 138: 1-474.
5. Jindamorakot S, Limtong S, Yongmanitchai W, et al. Two new anamorphic yeasts, *Candida thailandica* sp. nov. and *Candida lignicola* sp. nov., isolated from insect frass in Thailand. FEMS Yeast Res 2007; 7:1409-14.
6. Knutsen AK, Robert V, Poot GA, et al. Polyphasic re-examination of *Yarrowia lipolytica* strains and the description of three novel *Candida* species: *Candida oslonensis* sp. nov., *Candida alimentaria* sp. nov. and *Candida hollandica* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2007; 57: 2426-35.
7. Limtong S, Srisuk N, Yongmanitchai W, et al. Three new thermotolerant methylotrophic yeasts, *Candida krabiensis* sp. nov., *Candida sithepensis* sp. nov., and *Pichia siamensis* sp. nov., isolated in Thailand. J Gen Appl Microbiol 2004; 50: 119-27.
8. Redhead SA, Cushion MT, Frenkel JK, Stringer JR. *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: Nomenclature and typifications. J Eukaryot Microbiol 2006; 53: 2-11.
9. Sugita T, Nakase T. Molecular phylogenetic study of the basidiomycetous anamorphic yeast genus *Trichosporon* and related taxa based on small subunit ribosomal DNA sequences. Mycoscience 1998; 39: 7-13.
10. Sugita T, Nishikawa A, Shinoda T. Reclassification of *Trichosporon cutaneum* by DNA relatedness, by the spectrophotometric method and the chemoluminometric method. J Gen Appl Microbiol 1994; 40: 397-408.
11. Wang SA, Jia JH, Bai FY. *Candida alocasiicola* sp. nov., *Candida hainanensis* sp. nov., *Candida heveicola* sp. nov. and *Candida musiphila* sp. nov., novel anamorphic, ascomycetous yeast species isolated from plants. Antonie van Leeuwenhoek 2008; 93 (Epub of print).

MANTARLARIN GENOTİPLENDİRME ÇALIŞMALARINDA GÜNCEL DURUM

Prof. Dr. A. Nedret KOÇ

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

Mantarların tanımlanmış en az 100.000 türü vardır. Bu sayıya her yıl yaklaşık 1.000-1.500 türün daha katıldığı düşünülmektedir. Bununla birlikte henüz keşfedilmemiş olanların sayısının ise, 1 milyon ile 10 milyon arasında olduğu tahmin edilmektedir¹.

Mantarların tanımlamaları; morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal karakteristiklerin kombinasyonuna dayanmaktadır. Mantarlar benzer biyokimyasal morfolojik ve fizyolojik profile sahip organizmalar olduklarından dolayı karışıklıklar olması olasıdır. Bundan dolayı isimlendirme, taksomi ve epidemiyolojik çalışmalarda genotiplendirme, fenotipik yöntemlerin yerini almıştır. Genotipik yöntemlerin kullanıldığı sahalar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- I. Taksonomik / Filogenetik çalışmalar
- II. Epidemiyolojik çalışmalar
 - a) Salgın araştırmalarında; salgının kaynağı ve yayılma yollarının belirlenmesi
 - b) Re-aktivasyon ve yeni bulaşların belirlenmesi
 - c) Hastane enfeksiyonlarının belirlenmesi
 - d) Kolonizasyon ve enfeksiyonun belirlenmesi
 - e) Antibiyotik direnci ve yayılımının belirlenmesi

III. Tanımlamalar

Genotiplendirme, türler arasındaki farklılığın genomik yapı ve genetik dizilim ile gösterilmesidir. Bu amaçla kullanılan çeşitli yöntemler vardır ve dolayısıyla bu yöntemlerin seçilmesinde; a) tiplendirilebilirlik, b) ayırım gücü, c) tekrarlanabilirlik, d) stabilite, e) kullanım kolaylığı, ucuzluğu, çalışma süre ve sonuçların kolayca yorumlanabilmesi gibi konulara dikkat edilmelidir. Bunun için genotiplendirmede moleküler yöntemlerden bir veya birden fazlası beraber kullanılır. Bu yöntemlerden birinin uygulanması yönünde verilecek karar; yukardaki kriterleri taşımasına bağlı olduğu kadar, laboratuvarların koşullarına, personel sayısı ve deneyimine, çalışılacak suşların sayısı ve çeşidine göre de değişebilir. Genotiplendirmede kullanılan yöntemler hiçbirini diğerine olan gereksinimi ortadan kaldıran yöntemler olarak algılanmamalı, diğerini desteklemek amacıyla kullanılmalıdır².

Genotiplendirmede kullanılan yöntemler şunlardır³:

1. Genomik DNA'nın kompozisyon farklılığına dayanan yöntemler:
 - a. PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis): Karyotiplendirme ve RFLP (Restriction fragment length polymorphism)
 - b. SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism): CE-FLA (capillary electrophoresis (CE)-Fragment Length Polymorphism, denaturing conditions) ve CE-SSCP (capillary electrophoresis (CE)-Single-Stranded Conformation Polymorphism, native conditions)
2. Amplifikasyona dayalı yöntemler: RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), AFLP (amplified fragment length polymorphism), microsatellite PCR (interrepeat PCR, IR-PCR), rep-PCR

(repetitive-sequence-based PCR), MLST (multi-locus sequence typing), Microchip teknolojisi (Microarray analysis).

3. Birden fazla yöntemin bir arada kullanıldığı yöntemler: RFLP-PCR (restriction digestion-mediated PCR) ve SSCP-PCR (single-stranded conformational polymorphism ve PCR).

RFLP'e dayalı genotiplendirme yöntemleri altın standart olarak kabul edilir. Bu yöntemde, besiyerinde üretilen mikroorganizmalar düşük erime ısısında agaroz karıştırılır; hücreler deterjan veya enzim ile parçalayarak DNA izolasyonları yapılır ve bu DNA kalıpları restriksiyon enzimi ile kesilerek elektroforez ile 10-800 kilobazlık DNA segmentleri net olarak ayırt edilebilir. Bu bant profilleri, bilgisayar programları yardımıyla değerlendirilerek suşların birbirleriyle olan ilişkileri ortaya konulur.

O'Reilly ve arkadaşlarının⁴, *Sporothrix schenckii* suşlarının fenotipik ve PFGE yöntemi ile BioNumerics software sistemi kullanarak enfeksiyon etkeni ve çevre izolatu suşları arasındaki farklılığı belirledikleri çalışmalarında, PFGE yönteminin farklılığı belirlemede en faydalı yöntem olduğunu bildirmektedirler. Genotipik olarak *S.schenckii* suşları, *Ophiostoma* spp. suşlarından ayrılmıştır. *S.schenckii* suşlarının genomik olarak stabil olduğu ve uzun yıllar aynı genomik paterni gösterdiği bildirilmektedir. Sporotirikoz sıklığının artışında en önemli nedenin, çevre izolatlarına maruz kalma olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmada genotipik yöntemlerin, mantarların doğru tanımlanmasını ve enfeksiyon sıklığının ve kaynağının saptanmasını sağlayarak, korunma için yol gösterici olduğu ifade edilmektedir⁴. Bu yöntemler, taksonomik ve filogenetik çalışmalarda, suşların başka cins adı altında isimlendirilmesine olanak vermekle birlikte, aynı zamanda farklı isimlendirilen suşlar aynı genotipik özellikleri gösterebilmektedir. Ayrıca suşlar arası genotipik farklılıklar antifungal duyarlılığı da etkileyebilmektedir.

C.albicans genotip A, B, C, D ile tip I *C.stellatoidea* ve *C.dubliniensis* arasındaki fenotipik ve genotipik ilişkinin karşılaştırıldığı bir çalışmada; agaroz jel elektroforezi ile RFLPs yönteminin *C.albicans* genotipleri A-D, tip I *C.stellatoidea* ve *C.dubliniensis* arasındaki farklılığı ayırabildiği gösterilmiştir. Ayrıca, *C.albicans* genotip D suşunun *C.dubliniensis* suşuna; *C.albicans* genotip B suşunun ise tip I *C.stellatoidea* suşuna benzer olduğunu bildirilmiştir. Suşların genotipleri ile antifungal hassasiyetlerinin karşılaştırmalarında; *C.dubliniensis* suşlarının *C.albicans* genotiplerine (genotip A, B, C) göre flukonazole daha hassas, ancak flusitozine karşı daha az hassas olduğu belirtilmektedir. *Candida* grupları ve antifungal duyarlılık arasında korelasyon olduğu bildirilmektedir⁵. Farklı bir çalışmada, Shin ve arkadaşları⁶, kateterle ilişkili *C.albicans* suşlarının hastane enfeksiyon etkeni olup olmadığını belirlemek için 'Southern hybridization' ile PFGE, EK (electrophoretic karyotyping) ve REAG (restriction endonuclease analysis of genomic DNA) yöntemlerini kullanmışlardır. Bunlardan EK ve REAG yöntemlerinin farklılıkları belirlemede benzer olduğu belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda, suşlar arası farklılığı belirlemede RFLP analizinin yetersiz olduğu, buna rağmen EK ile farklılığın yüksek oranda belirlenebilmesi nedeniyle daha fazla kullanıldığı bildirilmektedir^{7,8}.

Zinger ve arkadaşları⁹ CE-SSCP ve CE-FLA yöntemlerini mantarların genomik farklılığını belirlemede kullanmışlar ve her iki yöntemin de basit ve tekrarlanabilir olduğunu bildirmişlerdir.

Otomatik genotiplendirmenin diğer mikroorganizmalar kadar mantarlarda da kullanıldığı bildirilmektedir. Özellikle problemlere dayalı otomatik "fingerprinting" sistemlerinin (örn. RiboPrinter microbial characterization), uygun problemler geliştirildiğinde besin, çevre ve tıbbi mikoloji alanlarında kullanılabilir olduğu ileri sürülmektedir¹⁰.

RFLP'e dayalı genotiplendirmenin teknik olarak zor, pahalı, zaman alıcı ve sonuçların laboratuvarlar arası uyumunun sorunlu olması gibi nedenlerden dolayı, PCR temelli genotiplendirme yöntemleri hızlı, kolay ve nispeten daha ucuz olduğundan tercih edilmektedir¹¹⁻¹⁴. Ayrıca PCR öncesi

mantar DNA'sının ekstraksiyonunda kullanılan yöntemler standardize ve otomatize edilmeye çalışılmaktadır. Bunlardan en önemlisi, hem maya hem de küfler için kolay ve kısa sürede (yaklaşık 15 dakika) kullanılabilmesi açısından Whatman's FTA filtre kartları ile yapılan çalışmalardır¹⁵. PCR temelli genotiplendirme yöntemlerinden biri olan floresana dayalı RAPD (random amplified polymorphic DNA) yöntemi, *Beauveria bassiana* izolatları arasındaki farklılığı yüksek düzeyde belirleyebilmektedir¹¹. Tekrarlayan vulvovajinal kandidozlu hastalardan izole edilen *Candida* suşlarının genotipik farklılıkları ve bu farkın duyarlılıkla ilgisini araştırılan bir çalışmada, RAPD-PCR yönteminin suşlar arası antifungal direnç ve çapraz dirençte farklılığı belirlemede yeterli olduğu bildirilmektedir¹². Benzer bir çalışmada RAPD-PCR yöntemi ile *C.parapsilosis* suşlarının genotipik farklılıkları saptanabilmiş ve ayrıca fenotipik olarak *C.parapsilosis* olarak tanımlanan bir suşun *C.metapsilosis* suşu olduğu saptanmıştır¹³. Farklı bir çalışmada ise, RAPD yönteminin, toksijenik ve toksijenik olmayan *Aspergillus flavus* suşları arasındaki farklılığı belirlemede yetersiz kaldığı rapor edilmiştir¹⁴.

Daha önceleri bakterilerin genotiplendirmesi için kullanılan rep-PCR (repetitive-sequence-based PCR) yöntemi, son zamanlarda da mantarların genotiplendirmesi amacıyla geliştirilmiş hızlı (<24saat) ve kolay uygulanabilir otomatize ticari bir sistemdir¹⁶.

Wise ve arkadaşlarının¹⁷ 'DiversiLab' sistemi kullanarak rep-PCR yöntemiyle *Candida* türlerini genotiplendirdiği çalışmada; biyokimyasal ve fenotipik tanımlamaya göre %80 uyum, ITS1-5.8S-ITS2 (internal transcribed spacer region) bölgeleri ile yapılan DNA dizi analizine göre ise %95 uyum belirlenmiştir. Bu sistemin kolay, ucuz, kısa sürede sonuç verebilen ve yüksek tekrarlanabilirliğe sahip olmasından dolayı epidemiyolojik çalışmalarda cins/tür düzeyi tanımlamalarda, genotiplendirmelerde ve türlerin ayrımında kullanılabileceği bildirilmektedir. Benzer olarak *Fusarium*, *Aspergillus*, dimorfikler (*Coccidioides* spp., *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*) ve dermatofit (*Trichophyton mentagrophytes*, *T.rubrum*, *T.tonsurans*, *Microsporum canis*) suşlarının tanımlama, moleküler tiplendirme, epidemiyolojik ve sürveyans çalışmalarında kolayca kullanılabilecek etkin bir yöntem olduğunu ileri sürülmektedir¹⁸⁻²¹.

Chen ve arkadaşları²², hastane kaynaklı *C.albicans* suşlarının genetik profilini PFGE'e dayalı üç genotiplendirme (PFGE karyotyping, PFGE of SfiI ve BssHII restriction fragments) yöntemi ve rep-PCR ile araştırmış ve tüm yöntemlerin aynı hastadan izole edilen suşların klonal ilişkisini belirleyebildiğini bildirmiştir. En yüksek ayırım gücü PFGE-SfiI (35 genotip) ve rep-PCR (31 genotip) yöntemlerinde, en düşük ayırım gücü ise PFGE karyotiplendirme (19 genotip) yönteminde tespit edilmiştir. Bu araştırmacılar, her bir izolatin genotipinin hastaya özgül olduğunu ve izolatin kaynağı, coğrafi orijini ve antifungal direnci ile ilişkili olmadığını ileri sürmüşlerdir²².

PCR'a dayalı yöntemlerin en önemli dezavantajları, laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliklerinin düşük olmasıdır. Bunu önlemek için çalışmaların standardizasyonunda farklı moleküler yöntemler kullanılmaktadır.

MLST (multilocus sequence typing) yöntemi, bir grubun iki bağımsız grup ile karşılaştırıldığında, nükleotid dizideki farklılıkların gösterilebildiği bir yöntemdir²³⁻²⁶. Belirlenen allelik profiller, MLST veri bankasındaki (<http://www.mlst.net>) bilinen allellerle karşılaştırılarak, saptanan profilin diğer ülkelerdeki yaygınlık derecesi konusunda bilgi edinmek olasıdır. Sonuçların elektronik ortama aktarılması, kolayca saklanabilmesi ve tiplendirilen herhangi suşun sonucunun daha önceden var olanlarla kıyaslanabilmesi, multilokus enzim elektroforez (MLEE) sisteminden üstünlük sağlar²³⁻²⁷. MLST yönteminin, EK, PFGE, AP-PCR, SNPs ve hibridasyon yöntemlerine göre hızlı, uygulaması kolay, tekrarlanabilirliği benzer ve ayırım gücü yüksek olması gibi nedenlerle daha avantajlı olduğu bildirilmektedir²³⁻²⁷. Lasker²⁷, *Penicillium marneffe* suşlarının epidemiyolojik araştırmasında, MLST yönteminin ayırım gücünün ve laboratuvarlar

arası tekrarlama gücünün yüksek olduğunu bildirmektedir. Farklı bir çalışmada, HIV ile enfekte hastalardan izole edilen *C. glabrata* suşlarının genotipinin belirlenmesinde, kolonizasyon ve enfeksiyon etkenlerinin ayrılmasında ve antifungal duyarlılıktaki etkinliğin saptanmasında MLST ve PFGE yöntemlerinin benzer olduğu, ancak MLST yönteminin PFGE'e göre suşlar arası farkı daha az belirleyebildiği ifade edilmiştir²⁸. Bunun yanında her iki yöntemde suşların genotipi ile HIV enfeksiyonunun durumu, kaynak ve ilaç duyarlılığından bağımsız olduğu rapor edilmektedir²⁸. Bazı çalışmalar, MLST analizi ile nükleotid varyasyonlarının düşük düzeyde belirlediğinden sınırlı bilgi verebildiğini ve bundan dolayı "polymorphic microsatellite marker"ları (PMMs) tiplendirmek için kullanılabileceğini bildirmektedir. Mikrosatellit lokusların analizinin avantajı, genomda dizi varyasyonları en düşük derecede olan mikroorganizmalar arasındaki farklılığı hızlı olarak belirleyebilmesidir. Lasler ve arkadaşları²⁹, hastane enfeksiyonu etkeni olan *C. parapsilosis* izolatları arasındaki genetik farklılığı, genomik zincirden elde edilen polimorfik mikrosatellit lokuslar kullanarak belirledikleri çalışmalarında, mikrosatellit analizinin fırsatçı patojen mayaların moleküler epidemiyolojik analizinde önemli bir ek bir yöntem olabileceğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, genotip belirlenmesi için mikrosatellit ve hibridizasyon profil analizi yöntemleri karşılaştırıldığında benzer oldukları, ayırıcı ve tekrarlanabilirlik özelliklerinin yüksek olduğu gösterilmiştir²⁹.

MLST yönteminde seçilmiş gen dizileri kullanılırken, MLP (microsatellite length polymorphism) yöntemi, kısa DNA parçaları tekrarının uzamasına dayanmaktadır. *C. albicans* izolatlarının genotiplerinin araştırıldığı bir çalışmada, MLP yöntemi MLST yöntemine göre daha hızlı ve ucuz olmasına rağmen özgüllüğü %83, duyarlılığı ise % 73 olarak belirlenmiştir³⁰.

Mikrosatellit analizi, ayrıca suşların kaynaklarının belirlenmesinde de güvenilir şekilde kullanılabilir³¹. Bu yöntemle genital *C. albicans* enfeksiyonlarının kaynağının araştırıldığı bir çalışmada, sonuçların otomatik GeneScan software ile analiz edilmesiyle, kadınlarda kaynağın rektal bölge olduğu (%80) ve eşlerinin suşları ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır³¹. Bu yöntemler, suşların antifungal hassasiyetindeki değişiklikleri belirlemede de kullanılmaktadır. Metzgar ve arkadaşları³², RAPD-DNA ile mikrosatellit analiz yöntemleri kullanarak, farklı aralıklarda (günlük ve haftalık 6 ay boyunca) flukonazol alan HIV pozitif hastalardan izole edilen *Candida* spp. suşları arasındaki duyarlılık değişimlerini ve genetik farklılıkları araştırmışlardır. Bu çalışmada, mikrosatellit analizi ile elde edilen verilerin oldukça uyumlu olduğu saptanmış ve günlük antifungal kullanımı olan hastaların suşlarında istatistiksel olarak anlamlı çok küçük genetik farklılıklar belirlenmiştir³².

DNA mikroarray (=microchip, DNA chip, DNA array) yöntemi, gen ekspresyonu profillerinde veya genotiplendirme çalışmalarında geniş genom skalası oluşturması açısından avantajlı bir yöntemdir. Bu alandaki hızlı teknolojik gelişmeler, enfeksiyon hastalıklarında tanı, tedavi ve korunma konularına etkili bir yaklaşım getirmektedir³³⁻³⁸. Mikroarray teknolojisi, son zamanlarda mantarların klinik örneklerde tanımlanması ve genotiplendirmesinde kullanılabilen kolay, hızlı ve duyarlı bir yöntem olarak bildirilmektedir^{33,34}. Bu yöntemin geliştirilen otomatize formatı ile [Affymetrix GeneChip® Mapping 500 K Array (diğer adıyla, SNP Microarray and Pooling; SNP-MaP)], iki grup arasındaki allel farklılığı etkili ve güvenilir olarak saptanabilmektedir³⁵. Ronald ve arkadaşları³⁶, *Saccharomyces cerevisiae* suşlarında oligonükleotid mikroarray yöntemini kullanarak yüksek oranda genotiplendirme yapılabildiğini ileri sürmektedirler. Bu yöntem ayrıca, salgınları belirlemede ve filogenetik farklılıkları saptamada da kullanılmaktadır. O'Donnell ve arkadaşları³⁷, *Fusarium keratiti* salgınından izole edilen suşların genotipini mikroarray yöntemi ile belirlemişler, bunların kontak lenslerle ilişkisini göstermişler; çevresel izolatlardan bir çoğunun kaynak olabileceğini zira filogenetik farklılığın yüksek olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Mikrosferlerin renk koduna göre tek bir reaksiyonla yüzlerce mikroorganizmanın tanımlanabildiği Luminex MAP teknolojisi ise moleküler akım sitometrisi temeline dayanmakta ve mantarların genotiplendirmesinde kullanılabileceği ileri sürülmektedir³⁸. Bovers ve arkadaşları³⁹, *Cryptococcus neoformans* ve *Cryptococcus gattii* izolatlarını, AFLP (amplified fragment length polymorphism) ve Luminex “suspension array” yöntemleriyle genotiplendirdiklerini rapor etmektedirler. Suşların genetik varyasyonlarını ve alttiplerini belirlemede moleküler yöntemlerden birkaçının bir arada kullanıldığı bildirilmektedir. RFLP-PCR (restriction digestion-mediated PCR) yönteminin mantara ve konağa göre değişebilen fenotipik varyasyonlar gösteren *T. tonsurans* suşlarının genotipik varyasyonlarını ve alttiplerini belirlemede kullanılabileceği ileri sürülmektedir⁴⁰.

Sonuç olarak, mikroarray teknolojisi ve rep-PCR gibi genotipik yöntemler çeşitli avantajlar sağlmasına rağmen, bütün mantarları kapsayacak standardize edilmiş tek bir yöntem henüz mevcut değildir. Bu nedenle birden fazla yöntemin birlikte kullanılmasıyla, yöntemlerin birbirlerinin eksik olan yönünü tamamlaması sağlanmalı, ayırım gücü ve tekrarlanabilirlik gibi teknik özellikleri artırılmalıdır. Elde edilen sonuçlar mutlaka bilgisayar programları ile depolanmalı ve standart prosedürler oluşturulmalıdır.

Kaynaklar

1. Warnock DW. Taxonomy and classification of fungi, pp: 1721-7. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Manual of Clinical Microbiology. Vol 2. 2007, 9th ed. ASM Press Washinton, DC.
2. Patel R. Molecular laboratory diagnosis of infection, p. 711. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Manual of Clinical Microbiology. Vol 2. 2007, 9th ed. ASM Press Washinton, DC.
3. Swaminathan B, Ghassan MM. Molecular typing methods, pp: 51-87. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds), Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications. 1993. ASM Press Washinton, DC.
4. O'Reilly LC, Altman SA. Macrorestriction analysis of clinical and environmental isolates of *Sporothrix schenckii*. J Clin Microbiol 2006; 44:2547-52.
5. McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. J Clin Microbiol 1999; 37: 417-21.
6. Shin JH, Park MR, Song JW, et al. Microevolution of *Candida albicans* strains during catheter-related candidemia. J Clin Microbiol 2004; 42: 4025-31.
7. Lehmann PF, Lin D, Lasker BA. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. J Clin Microbiol 1992; 30:3249-54.
8. De Bernardis F, Mondello F, Millan RS, Ponton J, Cassone A. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol 1999; 37:3481-6.
9. Zinger L, Gury J, Alibeu O, et al. CE-SSCP and CE-FLA, simple and high-throughput alternatives for fungal diversity studies. J Microbiol Methods 2008; 72:42-53.
10. Arvik T, Henick-Kling T, Gafner J. Automated genotyping of *Saccharomyces cerevisiae* using the RiboPrinter. Int J Food Microbiol 2005; 25: 104: 35-41.
11. Berretta MF, Lecuona RE, Zandomeni RO, Grau O. Genotyping isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with fluorescent labels. J Invertebrate Pathol 1998; 71:145-50.
12. Chong PP, Abdul Hadi SR, Lee YL, et al. Genotyping and drug resistance profile of *Candida* spp. in recurrent and one-off vaginitis, and high association of non-albicans species with non-pregnant status. Infect Genet Evol 2007; 7:449-56.
13. Kocsube S, Toth M, Vagvölgyi C, et al. Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis* sensu lato in Hungary. J Medical Microbiol 2007; 56: 190-5.
14. Lourenço A, Durigon EL, Zanotto P, Madeira JEGC, Almeida APD, Correa B. Genetic diversity of environmental *Aspergillus flavus* strains in the state of São Paulo, Brazil by random amplified polymorphic DNA. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102: 687-92.
15. Healy M, Huang J, Bittner T, et al. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. J Clin Microbiol 2005; 43: 199-207.
16. Borman AM, Linton CJ, Miles SJ, Johnson EM. Molecular identification of pathogenic fungi. J Antimicrob Chemother 2008; 61(Suppl 1): i7-i12.

17. Wise MG, Healy M, Reece K, et al. Species identification and strain differentiation of clinical *Candida* isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence-based PCR. *J Med Microbiol* 2007; 56:778-87.
18. Healy M., Reece K, Walton D, et al. Use of the DiversiLab System for species and strain differentiation of *Fusarium* species isolates. *J Clin Microbiol* 2005; 43:5278-80.
19. Healy M, Reece K, Walton D, et al. Identification to the species level and differentiation between strains of *Aspergillus* clinical isolates by automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42:4016-24.
20. Pounder JI, Williams S, Hansen D, Healy M, Reece K, Woods GL. Repetitive-sequence-PCR-based DNA fingerprinting using the DiversiLab system for identification of commonly encountered dermatophytes. *J Clin Microbiol* 2005; 43:2141-7.
21. Pounder JI, Hansen D, Woods GL. Identification of *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Coccidioides* species by repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 2006; 44:2977-82.
22. Chen T. DNA microarrays an armory for combating infectious diseases in the new century. *Infect Disord Drug Targets* 2006; 6:263-79.
23. Taylor JW, Fisher MC. Fungal multilocus sequence typing-it's not just for bacteria *Curr Opin Microbiol* 2003; 6: 351-6.
24. Aanensen DM, Spratt BG. The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: W728-33.
25. Chen KW, Chen YC, lo HJ, et al. Multilocus sequence typing for analyses of clonality of *Candida albicans* strains in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2172-8.
26. Bournoux M-E, Morand S, d'Enfert C. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1290-7.
27. Lasker BA. Nucleotide Sequence-based analysis for determining the molecular epidemiology of *Penicillium marneffeii*. *J Clin Microbiol* 2006; 44:3145-53.
28. Lin CY, Chen YC, Lo HJ, Chen KW, Li SY. Assessment of *Candida glabrata* strain relatedness by pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2007; 45:2452-9.
29. Lasker BA, Butler G, Lott TJ. Molecular genotyping of *Candida parapsilosis* Group I clinical isolates by analysis of polymorphic microsatellite markers. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 750-9.
30. Garcia-Hermoso D, Cabaret O, Lecellier G, et al. Comparison of microsatellite length polymorphism and multilocus sequence typing for DNA-based typing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2007; 45:3958-63.
31. Shi WM, Mei XY, Gao F, et al. Analysis of genital *Candida albicans* infection by rapid microsatellite markers genotyping. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120:975-80.
32. Metzgar D, Belkum AV, Field D, Haubrich R, Wills C. Random amplification of polymorphic DNA and microsatellite genotyping of pre- and post-treatment isolates of *Candida* spp. from human immunodeficiency virus-infected patients on different fluconazole regimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2308-13.
33. Chen KW, Lo HJ, Lin YH, Li SY. Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. *J Medical Microbiol* 2005; 54: 249-58.
34. Leinberger DM, Schumacher UI, Autenrieth IB, Bachmann TT. Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4943-53.
35. Docherty SJ, Butcher LM, Schalkwyk LC, Plomin R. Applicability of DNA pools on 500 K SNP microarrays for cost-effective initial screens in genomewide association studies. *BMC Genomics* 2007; 8:214.
36. Ronald J, Akey JM, Whittle J, Smith EN, Yvert G, Kruglyak L. Simultaneous genotyping, gene-expression measurement, and detection of allele-specific expression with oligonucleotide arrays. *Genome Res* 2005; 15: 284-91.
37. O'Donnell K, Sarver BAJ, Brandt M, et al. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic *Fusaria*, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *J Clin Microbiol* 2007; 45:2235-48.
38. Page BT, Shields CE, Merz WG, Kurtzman CP. Rapid identification of ascomycetous yeasts from clinical specimens by a molecular method based on flow cytometry and comparison with identifications from phenotypic assays. *J Clin Microbiol* 2006; 44:3167-71.
39. Bovers M, Diaz MR, Hagen F, et al. Identification of genotypically diverse *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates by Luminex xMAP technology. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1874-83.
40. Gaedigk A, Gaedigk R, Abdel-Rahman SM. Genetic heterogeneity in the rRNA gene locus of *Trichophyton tonsurans*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5478-87.

FUNGAL VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN MOLEKÜLER TEMELLERİ

Prof. Dr. Mine YÜCESOY

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

Fungal enfeksiyonların patogeneğinde, konak ile ilgili faktörlerin yanı sıra fungusa ait birçok faktör de rol oynamaktadır. Burada enfeksiyon etkeni olarak en sık rastladığımız mantar türleri olan *Candida*, *Cryptococcus* ve *Aspergillus* türlerine ait virülans faktörlerinin moleküler temelleri üzerinde durulacaktır.

Candida Türleri

Candida türlerine ait virülans faktörleri; aderans, biyofilm üretimi, hücre yüzey hidrofobisitesi, enzimler, fenotipik değişim ve antijenik çeşitlilik, moleküler benzeme, hücre duvarı yapısı ve çeşitli sideroforları kullanabilme yeteneği olarak sayılabilir.

Candida türleri için enfeksiyonun ilk basamağını oluşturan adezyon ile kolonizasyon ve invazyon arasında ciddi bir ilişki saptanmıştır¹. *C. albicans* hücrelerinin non-*albicans* *Candida* türlerine göre konak hücrelerine daha fazla adere olma özelliği gösterdiği bildirilmiştir. *Candida albicans* için MP66, MP-lektin, MP-hem, hücre duvar proteinleri, antijen 6, mnt16, ala1p, kompleman reseptörleri, MP58 gibi adezinler ve ligandları belirtilmiştir². *C.albicans*'da adezyon moleküllerinin ALS gen ailesi tarafından kodlanan proteinler olduğu rapor edilmiştir³.

Biyofilmler, hastalıklar için önemli bir kaynak oluşturmakta olup, yapılan çalışmalarda *C.albicans*'ın en yoğun biyofilm oluşturduğu, *C.parapsilosis*, *C.glabrata* ve *C.kefyr* türlerinin de biyofilm oluşturmalarına karşın, *C.albicans*'dan daha az ürettikleri bildirilmiştir². *C.albicans*'da biyofilm oluşumu, planktonik hücreler bir yüzeye adere olduğu zaman muhtemelen hücre duvarında lokalize adezyon molekülleri aracılığı ile başlatılır³. Garcia-Sanchez ve arkadaşlarının³ *C.albicans* biyofilmleri üzerinde yaptığı bir çalışmada, biyofilm ve planktonik hücreler arasında 325 genin farklı ekprese edildiği, bu gruptan 214'ünün biyofilmlerde fazla, 111'inin ise az ekprese edildiği saptanmıştır. Bunun yanında protein sentezi ile ilgili genlerden 34'ünün daha fazla ekprese edildiği görülerek, biyofilmlerde ribozom üretiminin ve protein translasyonunun artmış olduğu düşünülmüştür. Yine aminoasit ve nükleotid metabolizması ile ilişkili olarak aromatik veya sülfür içeren aminoasit sentezi ile ilgili genlerin ve lipid metabolizması ile ilişkili olarak da mitokondriyal fosfolipidler, sfingolipidler ve ergosterol gibi membranla ilişkili lipid biyosentezi ile ilgili genlerin fazla ekprese edildiği belirlenmiştir. Aminoasit biyosentezi genlerinin fazla ekspresyonu ile paralel olarak, aminoasit metabolizmasının bir regülatörü olan Gcn4p'nin *C.albicans*'da biyofilm üretimi için gerekli olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada tüm biyofilm popülasyonlarında önemli oranda fazla ekprese edildiği izlenen *ALS1* yanında, adezin benzeri kangalları ve sekresyon sinyalleri olan proteinleri kodlayan *IPF10161*, *IPF 20008* gibi birçok yeni genin de anlamlı oranda fazla ekprese edildiği saptanmıştır³. *C.glabrata* mutant suşları ile yapılan bir çalışmada ise *RIF1*, *SIR4*, *EPA6* ve *YAK1*'in biyofilm oluşumunda rol alan genler olduğu saptanmıştır⁴. *EPA6*'nın kodladığı Epa6p'nin bu *Candida* türünde biyofilm oluşumu için gerekli olan bir adezin olduğu tanımlanmıştır. Aynı çalışmada iki adezin geni olan *EPA6* ve yakın paraloğu *EPA7*'nin ekspresyonu için Yak1p kinazın gerekli olduğu gösterilmiştir⁴.

Candida türlerinin patogeneğinde rolü olan enzim grupları, salgısal aspartik proteinazlar (SAP) ve fosfolipazlardır⁵. SAP'ların *C.albicans* dışında *C.dubliniensis*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* ve *C.lusitaniae* tarafından da salgılandığı bildirilmiştir⁵⁻⁸. *C.albicans*'da aspartik proteinazlar, 10 üyeden oluşan SAP gen ailesi tarafından kodlanmakta ve mukozal ve sistemik enfeksiyonlar için farklı genler gerekmektedir. Şöyle ki; yüzeysel, mukozal ve kutanöz enfeksiyonlarda SAP 1-3'ün patojenik bir rolü olmasına karşın sistemik enfeksiyonlar için SAP 4-6 kritik bir öneme sahiptir^{7,9}. Hücre duvarı ve sitoplazmik membranda düzgün olarak dağılmış olan SAP 1-3'ün hem maya hem de hif hücrelerinde, SAP 4-6 antijenlerinin ise sadece hif hücrelerinde bulunduğu ve invazyon esnasında hiflerin uçlarında lokalize olduğu saptanmıştır^{5,9}. SAP 1-3'ün yüzeysel enfeksiyonlarda doku hasarında direk rolü varken, SAP 4-6'nın daha derin dokulara penetrasyonda ve hücre sel savunma ile savaşında önemli olduğu vurgulanmıştır⁹. Bir SAP genine göre benzer ancak görevleri farklı birçok SAP geninin kolonizasyon ve enfeksiyonda sinerjik etki gösterdiği ileri sürülmüştür⁷. *C.tropicalis*'de ise SAP'ları kodlayan dört gen (SAPT1-4) klonlanmıştır⁸. Konak proteinlerinin, yüzeysel proteinlerinin, laminin, fibronektin, kollajen, keratin ve müsin gibi ekstraselüler matriks proteinlerinin, immünoglobulinlerin (özellikle IgA), lökosit proteinlerinin, sitokinlerin, defensinlerin, alfa-makroglobulin ve komplemanın SAP'lar için temel hedefler olduğu bildirilmiştir⁵. Bu enzimler konak proteinlerini parçalayarak hücreler için azot elde etmekte, bunun yanında da konak doku adezyonuna ve invazyonuna yol açmakta, konağın hücre ve moleküllerini parçalayarak antimikrobiyal saldırıya karşı fungusu korumakta ve direnç göstermektedir. Aynı zamanda koagülasyon faktör, protrombin ve kallikrein-kinin sistemi proteinlerini de hedef alarak pıhtılaşma kaskadını aktive ettiği, vasküler permeabilityi artırdığı ve inflamatuvar yanıtın aktive edilmesi ve korunmasında da rol oynadığı bildirilmiştir^{5,7}.

Fosfolipazlar, gliserofosfolipidlerdeki bir veya daha fazla ester bağlarını parçalayarak konak hücrelere penetrasyonda rol oynamakta ve konağın sinyal transdüksiyonuna etki etmektedirler^{5,10}. Fosfolipazların farklı alt grupları bulunduğu; bunların da fosfolipaz A, fosfolipaz B, lizofosfolipaz, lizofosfolipaz-transaçılaz, fosfolipaz C ve fosfolipaz D olduğu bildirilmiştir⁵. Yapılan çalışmalarda *C.albicans* yanında daha düşük düzeylerde *C.tropicalis*, *C.glabrata* ve *C.parapsilosis* türlerinin de fosfolipaz salgıladığı saptanmıştır¹⁰. Kunze ve arkadaşlarının¹¹ çalışmasında *C.albicans*'da korunmuş fosfolipaz motifleri bulunan en az üç gen (CaPLC1, CaPLC2, CaPLC3) bulunduğu, bunlardan CaPLC1'nin virülans için şart olduğu, ancak diğer iki genin hücre sel işlevlerde görevi olduğu halde patojenitede belirgin bir görev yapmadığı saptanmıştır.

Son yıllarda in vivo ekspresyon teknolojilerinin (IVET) kullanılmasıyla, enfeksiyonlar sırasında *C.albicans* tarafından hücre metabolizması, enerji üretimi, strese yanıt ve hücre duvarı yapısı ile ilgili genlerin yanında adezinler, proteazlar ve fosfolipazları kodlayan virülans ile ilişkili genlerin de eksprese edildiği saptanmıştır. Özellikle invazif kandidoz tablolarının patogeneğinde, çoklu gen sınıflarının eşgüdömlü ekspresyonunun gerekli olduğu ve bu ekspresyonun patogeneiz için gereken virülans faktörlerinin indüksiyonuna neden olduğu ileri sürülmüştür¹².

Candida türlerinin bir diğer önemli virülans faktörü de fenotipik değişimdir. Bu değişim sonucunda orijinal, düz, yıldız, yüzük ya da şapka şeklinde veya buruşuk gibi farklı koloni fenotipleri ortaya çıkabildiği gibi varyant koloni morfolojileri de izlenebilmektedir. Bunun en tipik örneği *C.albicans* WO-1 suşunun beyaz-opak değişimidir. Opak hücrelerin deriye kolonize olma yetenekleri ve çiftleşme özellikleri beyazlara göre daha fazla iken, sistemik hayvan modellerinde daha az virülans olarak belirlendiği bildirilmiştir¹³. Bunun yanında fungusun, maya-hif dönüşümünün de virülansı

etkilediği bilinmektedir. Şöyle ki; yalancı hif ve hif yapıları doku invazyonunda önemli rol oynarken, mayalar mukozal yüzeylere tutunur ve epitele invaze olur. Mayadan hife morfojenik değişimin, birçok transkripsiyon faktörünün regülasyonu için çoklu paralel sinyal yolağı ile kontrol edildiği saptanmış ve PLD1'in in vitro koşullarda morfogenezi regüle eden yolaklardan en az birinde görev yaptığı sonucuna varılmıştır¹⁴. Yapılan çalışmalarda *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* ve *C.lusitaniae* türlerinde bu değişimin izlendiği bildirilmiştir^{15,16}. *Candida* türlerinde rastlanan bu değişimin birçok özelliği etkilediği saptanmış olup, etkilenen bu özellikler, antijenik özellik, epitel hücrelerine adezyon, hif oluşumu, nötrofil ve oksidanlara duyarlılık, proteinaz üretimi ve ilaç duyarlılığı şeklinde sıralanabilir¹⁷.

C.albicans diploid olup, tek bir "mating type locus" (*MTL*) içermektedir. Doğal suşların %97'sinin *MTL* heterozigot (*a/a*), %3'ünün ise *MTL* homozigot (*a/a* veya *α/α*) olduğu saptanmıştır¹⁸. *C.albicans* suşlarının çoğunluğunda *MTL*'nin beyaz-opak değişimini kontrol ettiği rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda *C.albicans*'lardan sadece *MTL* homozigot olanların beyaz-opak değişimi geçirdiği, *MTL* heterozigot (*MTLa1*'i bir kromozomda, *MTLa1* ve *MTLa2*'yi homologunda taşıyanlar) olanların ise bu değişimi geçiremediği, ancak homozigot hale gelirlerse değişim geçirebildiği saptanmış ve *C.albicans* klinik izolatlarının beyaz-opak değişim özelliği ile *MTL* lokusunun konfigürasyonu arasında önemli bir korelasyon gösterdiği sonucuna varılmıştır^{18,19}. Bunun yanında bir başka çalışmada, *MTL* lokusundaki heterozigotluğun (*a/a*) beyaz-opak değişimi ve çiftleşme işleminde yer alan genleri bastırmakla kalmadığı, aynı zamanda çiftleşme sistemini doğada koruyan *a/a* genotipine kompetitif bir avantaj sağlayarak virülansı da etkilediği belirlenmiştir. Şöyle ki; *a/a* genotipinin daha stabil olduğu ve bu genotipteki suşların daha virülan olduğu görülmüştür²⁰. Srikantha ve arkadaşları²¹ *C.albicans* üzerinde yaptıkları bir çalışmada, *TOS9* adlı "master switch gene" gibi görev yapan ve sadece opak hücrelerde eksprese olan, *Tos9p* gen ürününün nükleusta lokalize olduğu bir gen belirlemişler ve bunun *C.albicans*'da beyaz-opak değişimini kromatin dönemindeki değişikliğe yol açarak regüle ettiğini saptamışlardır.

Birçok *C.glabrata* suşu spontan olarak kor fenotipler arasında ("core switching") ve düzgün olmayan buruşuk fenotipe ("irregular wrinkle switching") değişim göstermektedir. Yapılan bir araştırmada, bu türdeki değişimin *S.cerevisiae*'de bakır detoksifikasyonu ve strese yanıtla ilgili bir grup geni regüle ettiği saptanmış ve bu değişim ile fazla regüle edilen genlerin bazı olgular da kolonizasyon ve virülansla önemli rol oynayabileceği bildirilmiştir²². Bir başka araştırmada *C.lusitaniae*'nin *C.glabrata*'ya benzer şekilde fenotipik değişime uğradığı; yüksek amfoterisin B direncinin beyaz koloni tipi, yalancı hif oluşumunun ise koyu kahverengi koloni tipi ile ilişkili olduğu saptanmış olup, fenotipik değişimin *C.lusitaniae* için selektif bir avantaj sağladığı sonucuna varılmıştır²³.

Jin ve arkadaşlarının²⁴ yaptığı bir araştırmada, ilk kez *C.albicans* biyofilmlerinde de fenotipik değişim izlendiği ve bunun sıklığının %1 oranında olduğu belirlenmiş; biyofilmlerde izlenen beş farklı fenotipin karbonhidrat asimilasyonu, adezyon, biyofilm oluşumu, filamentasyon ve üreme hızı açısından farklı profiller gösterdiği izlenmiştir.

Yapılan çalışmalar sonunda *Candida* türlerindeki virülans faktörlerini kodladığı belirlenen genler Tablo I'de özetlenmiştir¹³. Bunların dışında *Candida* türlerinin virülans faktörleri arasında moleküler benzeme (timus, over, monosit antijenleri, CD11b/CD18, ışı şok proteini 90 ve 70), hücre duvarı yapısı (mannan ve mannoproteinler) ve hem *Candida* türlerinin hem de *Enterobacteriaceae* ailesinin sideroforlarından demiri kullanabilmeleri sayılabilir²⁵.

Tablo I. *Candida* türlerinde virülans ile ilişkili genler¹³

Fonksiyon	<i>C.albicans</i>	Non- <i>albicans</i>
Adezyon	ALS1 ALSS (ALA1) HWP1 INT1 MNT1 PMT1 PMT6	ALS (<i>C.tropicalis</i> , <i>C.dubliniensis</i>) EPA1 (<i>C.glabrata</i>)
Proteinaz ve fosfolipaz	SAP1-10 CaPLB1 CaPLB2 CaPLC CaPLD	SAP1-4 (<i>C.tropicalis</i>) SAP1-7 (<i>C.dubliniensis</i>) PLB
Hif oluşumu	CPH1 EFG1 INT1 TUP1	CLS12 (<i>C.lusitaniae</i>) CPH1 (<i>C.glabrata</i>)
Fenotipik değişim	SAP1 SAP3 WH11	
Çevreye uyum	PHR1 PHR2	PHR1 PHR2 EPD1 EPD2

Cryptococcus neoformans

C.neoformans'ın en önemli virülans faktörü kapsülü olup, onun dışındaki virülans faktörleri; fenol oksidaz aktivitesi, melanin sentezi, varyete farklılıkları, mannitol yapımı, salınan enzimler, adenin biyosentezi, demir kullanımı, miristol-koenzim A (protein N-miristol transferaz aktivitesi), çiftleşme tipi, 37°C'de üreyebilme, makrofajlarda hücre içi üreyebilme ve sinyal transdüksiyonu şeklinde sıranabilir²⁶⁻³⁰. *C.neoformans*'ın virülansında önemli bir rol oynayan kapsül, alternatif kompleman yolunun bir tetikleyicisidir. Kapsüle ve özellikle kapsülün primer komponenti olan glukuronoksilomannana bağlı diğer immün baskılayıcı etkiler; TNFα, IL-1 ve IL-6 gibi proinflatuvar sitokin salınımının inhibisyonu, IL-10 üretiminin artırılması, lökosit birikiminin inhibisyonu, antijen sunumunun ve lenfoproliferasyonun inhibisyonu, baskılayıcı T hücrelerin ve baskılayıcı faktörlerin indüklenmesi, gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtı ve Th1 yanıtının baskılanması, monositlerde MHC sınıf II ve B7 ekspresyonunun azaltılması, nötrofil ve makrofajların öldürme aktivitesinin azaltılması, nötrofillerin kemotaktik aktivitelerinin baskılanması, dendritik hücre aktivasyonunun ve olgunlaşmasının inhibisyonu, T hücre apoptozunun indüksiyonu ve antikor oluşumunun azaltılması şeklinde sıralanmıştır^{27,31-33}. Bu fungusta en az dört kapsül geni (*CAP64*, *CAP60*, *CAP59*, *CAP10*) tanımlanmıştır³⁰. Hu ve arkadaşlarının³⁴ çalışma sonuçları, kapsüller polisakkarit gibi virülans faktörlerinin hücre yüzeyine dağılımında protein kinaz A (PKA)'nın bir rolü olduğunu desteklemekte ve PKA tarafından regüle edilen bir gen olan *OVA1*'in kapsül kalınlığı ve melanin yapımında etkili olduğunu göstermektedir. Yapılan bir başka araştırmada, *C.neoformans*'ın kapsül biyosentezi, normal hücre duvarı yapısı ve 37°C'de üreyebilmesi için gerekli olan UDP-glukoz dehidrogenazı kodlayan bir gen tanımlanmıştır³⁵.

In vivo şartlarda üretilen melanin, reaktif oksijen ara ürünlerinin yok edicisi olup, bu şekilde fungus oksidatif hasardan korunur. Melaninin virülans faktörü olarak rol oynamasındaki bir mekanizma, mikroorganizmayı lökosit atağına karşı relatif olarak dirençli kılması; diğer mekanizma ise yüksek miktarda melanin üreten *C.neoformans* suşlarının diğerlerine göre T hücre proliferasyonunu ve TNF α üretimini azaltmasıdır^{27,28}. Yine melaninin antimikrobiyal ilaçlara karşı korunmada rol oynadığı saptanmıştır^{26,28,31}. Fenol oksidaz, fagozomal demiri Fe (III)'e oksitleyerek, *C.neoformans*'ın alveolar makrofajlarca öldürülmesine karşı koyar ve antimikrobiyal hidroksil radikallerinin oluşumunu azaltır^{26,28}. Bu enzimi kodlayan *CNLAC1* ve *CNLAC2* olmak üzere iki gen bulunduğu belirlenmiştir³⁶. Zhu ve arkadaşlarının³⁷ çalışmasında, bu fungusta tanımlanan klor kanal geninin (*CLC-A*) iki önemli virülans faktörü olan kapsül ve fenol oksidaz ekspresyonunda rolü olduğu saptanmıştır.

C.neoformans serotip A (*var. grubii*)'nın en patojen olduğu, serotip D (*var. neoformans*)'nin ise en az virülan olduğu bildirilmiş olup, bu durum serotip A'da Hog1 yolağının virülanstaki rolüne bağlanmıştır³⁸. Bir başka çalışmada ise *C.neoformans* 'da iki komponentli bir sistem (Toc) tanımlanmış ve bu sistemin HOG yolağını Pb2-Hog1 MAPK kaskadı üzerinden kontrol ettiği ve bunun da, fungusta strese yanıt, antifungal duyarlılık, virülans faktörleri ve üremeyi regüle ettiği saptanmıştır³⁹.

C.neoformans'ın in vitro koşullarda DNAz ve kollajen, elastin, fibrinojen, immünoglobulinler gibi insan proteinlerini ve kazeini parçalayan proteaz enzimleri salgıladığı saptanmıştır²⁷. *C.neoformans* proteazlarının konak doku invazyonuna neden olarak virülansta rol oynayabileceği belirtilmiştir²⁶. *C.neoformans*'ın fosfolipaz aktivitesinin de olduğu; fosfolipaz B, lizofosfolipaz ve lizofosfolipaz-transaçilaz ürettiği ve bunların virülans ile ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır^{10,27,30}. Üreaz enziminin de bir virülans faktörü gibi kabul edilebileceği, üreaz negatif mutantların patojenitesinde azalma meydana geldiği bildirilmiştir^{26,30}. Bunların yanında glukozilseramid sentetazın kriptokoksik patojenitede anahtar bir virülans faktörü olduğu, glikozilseramidin fungusun akciğerde ve özellikle alkalen pH'sı olan alveollerde üremesi ve kolonizasyonunda hayati öneme sahip olduğu belirtilmiştir⁴⁰. Virülans ile ilgili yapılan bir araştırmada, *C.neoformans* membranlarının sal benzeri kangallar içerdiği ve bunların hücre yüzeyinde fosfolipaz B1 ve Cu/Zn süperoksit dismutaz (SOD)'ın birikmesi için kullanıldığı saptanmıştır⁴¹.

C.neoformans'ın mannitol üretilip salgıladığı ve BOS'daki yüksek D-mannitol konsantrasyonlarının beyin ödemine yol açtığı ileri sürülmüştür^{27,32}. Bunun yanında mannitolün hidroksil radikallerini yok eden bir çöpçü olduğu ve bu şekilde fungusu oksidatif hasardan koruduğu bilinmektedir.

C.neoformans'da virülans ve morfogenez regüle eden cAMP-PKA, MAP-kinaz ve kalsinörin ile regüle edilen yolak olmak üzere üç sinyal transdüksiyon yolağı saptanmıştır³⁰. Bu mantar için, virülans ile ilişkili faktörler ile cAMP-bağımlı sinyalleşmenin direk ilişkili olduğu belirlenmiştir⁴². Jung ve arkadaşları⁴³ araştırmalarında, *C.neoformans* 'da demire yanıtı kontrol eden majör transkripsiyon regülatörü kodlayan bir gen belirlemiş ve bu genin demir transportu yanında homeostaz fonksiyonlarına, kalsiyum ve cAMP sinyallerine, hücre duvar bütünlüğüne etkili olduğu, ayrıca kapsül, melanin, konak ısısında üreme gibi bilinen virülans faktörleri ekspresyonunu da kontrol ettiğini saptamıştır.

Aspergillus Türleri

Başta *A.fumigatus* olmak üzere *Aspergillus* türlerinin virülans faktörleri 37°C'de üreyebilme, spor boyutlarının 2-3 μ m kadar küçük olması, konidyaların hidrofobik protein tabakası, hücre duvar pigmentleri, konidyaların pigment faktörü olan dihidroksinaftilen-melanin (DHNM), komplemanı inhibe edici faktör, nükleaz, elastaz, fosfataz, fosfolipaz, peptidaz ve proteazlar gibi ekstraselüler enzimler, *fos-1*, antioksidan direnç faktörleri, konidyal inhibitör faktör, *A.fumigatus* difüze olabilen

ürünü, gliotoksin, aflatoksin, okratoksin A, fumagillin ve hemolizin gibi potansiyel toksik sekonder metabolitler şeklinde sıralanabilir⁴⁴⁻⁴⁷.

A.fumigatus'un konidyasındaki hidrofobik proteinlerin bir kısmının *RODA* bir kısmının da *RODB* geni tarafından kodlandığı ve özellikle birincinin kodladığı proteinlerin, fungus-konak arasındaki ilişkilerde önemli rol oynadığı belirlenmiştir⁴⁷. Hücre duvar pigmentlerinin antioksidan etkili olduğu, DHNM'in ise reaktif oksidanları yok edilebilme yeteneğinde olduğu ve konidyalardan fagositozunu inhibe ettiği bildirilmiştir^{47,48}. DHNM'in biyosentezinde rol alan altı gen (*ALB1*, *ARPI*, *ARP2*, *ABR1*, *ABR2*, *AYG1*) tanımlanmıştır⁴⁷. Washburn ve arkadaşları⁴⁹ belirledikleri komplemanı inhibe edici faktörün, C3b'nin mantarın yüzeyine bağlanmasını azalttığını ve C3b'e bağımlı fagositoz ve öldürme işlemlerini bozduğunu saptamıştır.

Aspergillus türleri, nükleaz, fosfataz, fosfolipaz, peptidaz ve proteazlar gibi fungusa gerekli maddeleri sağlamak için kompleks makromolekülleri parçalayan çok çeşitli ekstraselüler enzimler üretmektedirler^{46,50}. *A.fumigatus*'un fosfolipaz A, B, C ve D'yi ürettiği ve bu enzimlerin konak hücre/epitel hasarına yol açarak virülans rol oynayabileceği bildirilmiştir^{47,51}. Farelerde yapılan araştırmalarda, *A.fumigatus*'un ürettiği elastaz aktivitesi ile virülans arasında bir korelasyon izlenmiştir. *A.fumigatus*'un patojenitesinde rol oynayabilecek ekstraselüler bir elastinolitik alkalın proteaz (AFAIp) tanımlanmış ve bu proteazın kollajen, fibrin, fibrinojen ve elastini parçalayabildiği saptanmıştır⁴⁶. Granet ve arkadaşları⁵² yaptıkları bir çalışmada, *A.fumigatus*'un yol açtığı invazif pulmoner aspergillozun oluşumunda metil sitrat sentazın önemli olduğunu ve virülans rol oynadığını göstermişlerdir. Proteazların, enfeksiyonun erken döneminde, fungal tutunma ve doku penetrasyonunda rol oynadığı ve pulmoner epitel hücre ayrılmasını ve deskuamasyonunu indüklediği bildirilmiştir. Bunun yanında fungal proteazların proinflatuvar sitokinlerin salınımını indüklediği de saptanmıştır⁴⁵⁻⁴⁷. Clemons ve arkadaşları⁵³ fareler üzerinde yaptıkları çalışmada, bir histidin kinaz olan *fos-1*'in *A.fumigatus*'un bir virülans faktörü olduğunu belirlemişlerdir. Bir başka çalışmada ise, farelerde enfeksiyon esnasında *fos-1* yanında sinyalleşme için gerekli olan bir ras ilişkili proteinin (*rhbA*) de anlamlı oranda transkripsiyonunun arttığı saptanmıştır⁵⁴. Patojenitede etkili antioksidan direnç faktörleri ise hidrosil parçalayıcı mannitol, H₂O₂ kullanıcısı katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD) yanında, immün sistemi baskılayan ve dokuları harap eden fosfolipaz ve proteaz gibi enzimlerdir^{44,45,47}.

Konidyal inhibitör faktörün, fagositozu ve fagositler tarafından süperoksit anyon ve hidrojen peroksit üretimini; *A.fumigatus* difüze olabilen ürününün ise fare alveolar makrofajlarında proinflatuvar sitokinlerin üretimini inhibe ettiği belirtilmiştir⁴⁶.

Çoğu *Aspergillus* türünün ürettiği toksik sekonder metabolitlerden gliotoksinin, epitel hasarı ile birlikte silier aktiviteyi yavaşlattığı, nötrofil ve makrofaj tutunmasını ve fagositozunu, T hücre aktivasyonu ve proliferasyonunu azalttığı, deneysel invazif aspergillozu alevlendirdiği ve apoptozu indüklediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir^{45,46,48,50}. *gliP* geninin gliotoksin biyosentezinin ilk aşamasını katalizleyen bir peptid sentetazı kodladığı ve bu genin mutantlarının virülansında belirgin bir azalma olduğu saptanmıştır⁵⁵. Sugui ve arkadaşları⁵⁶ da, *laeA* geninin *A.fumigatus*'da gliotoksin sentezini ve virülansı regüle ettiğini göstermiştir. *A.flavus* tarafından oluşturulan aflatoksinin immüno-süpresif ve karsinojenik olduğu, fagositozu, hücre içi öldürmeyi ve makrofajlarca spontan süperoksit üretimini baskıladığı ileri sürülmüştür^{45,46}. Ayrıca *A.fumigatus*'un ürettiği RNAz'ın ökaryot ribozomlarının 28S rRNA'sını bir noktadan kestiği, konak hücre ölümüne yol açtığı ve alerjik aspergillozda rolü olabileceği; fumagillin, helvoik asit gibi toksinlerinin siliaları inhibe ettiği, *A.fumigatus*'un ürettiği hemolizinin ise eritrositlerin parçalanmasından sorumlu olduğu bildirilmiştir⁴⁶⁻⁴⁸.

Kaynaklar

1. Hostetter MK. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. Clin Microbiol Rev 1994; 7:29-42.
2. Calderone R, Gow NAR. Host recognition by *Candida* species, pp: 67-86. In: Calderone RA (ed), *Candida* and Candidiasis. 2002, 1st ed. ASM Press, Washington DC.
3. Garcia-Sanchez S, Aubert S, Iraqui I, et al. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. Eukaryotic Cell 2004; 3:536-45.
4. Iraqui I, Garcia-Sanchez S, Aubert S, et al. The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway. Mol Microbiol 2005; 55:1259-71.
5. Hube B, Naglik J. Extracellular hydrolases, pp: 107-22. In: Calderone RA (ed), *Candida* and Candidiasis. 2002, 1st ed. ASM Press, Washington DC.
6. Pichova I, Pavlickova L, Dostal J, et al. Secreted aspartic proteinases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. Eur J Biochem 2001; 268:2669-72.
7. Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. Microbiol 2001; 147:1997-2005.
8. Zaugg C, Zepelin MB, Reichard U, Sanglard D, Monod M. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. Infect Immun 2001; 69:405-12.
9. Schaller M, Januschke E, Schackert C, Woerle B, Kortig HC. Different isoforms of secreted aspartyl proteinases (Sap) are expressed by *Candida albicans* during oral and cutaneous candidosis in vivo. J Med Microbiol 2001; 50:743-7.
10. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev 2000; 13:122-43.
11. Kunze D, Melzer I, Bennett D, et al. Functional analysis of the phospholipase C gene CaPLC1 and two unusual phospholipase C genes, CaPLC2 and CaPLC3, of *Candida albicans*. Microbiol 2005; 151:3381-94.
12. Nguyen MH, Cheng S, Clancy CJ. Assessment of *Candida albicans* genes expressed during infections as a tool to understand pathogenesis. Med Mycol 2004; 42:293-304.
13. Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. J Microbiol Immunol Infect 2003; 36:223-8.
14. Dolan JW, Bell AC, Hube B, et al. *Candida albicans* PLD I activity is required for full virulence. Med Mycol 2004; 42:439-47.
15. Soll DR. Phenotypic switching, pp: 123-42. In: Calderone RA (ed), *Candida* and Candidiasis. 2002, 1st ed. ASM Press, Washington DC.
16. Soll DR, Lockhart SR, Zhao R. Relationship between switching and mating in *Candida albicans*. Eukaryotic Cell 2003; 2:390-7.
17. Vargas K, Messer SA, Pfaller M, et al. Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-positive individuals prior to first thrush episode. J Clin Microbiol 2000; 38:3595-607.
18. Lockhart SR, Pujol C, Daniels KJ, et al. In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. Genetics 2002; 162:737-45.
19. Miller MG, Johnson AD. White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by the mating type (MTL) locus and allows efficient mating. Cell 2002; 110:293-302.
20. Lockhart SR, Wu W, Radke JB, Zhao R, Soll DR. Increased virulence and competitive advantage of a/α over a/a or α/α offspring conserves the mating system of *Candida albicans*. Genetics 2005; 169:1883-90.
21. Srikantha T, Borneman AR, Daniels KJ, et al. TOS9 regulates white-opaque switching in *Candida albicans*. Eukaryotic Cell 2006; 5:1674-87.
22. Srikantha T, Zhao R, Daniels KJ, Radke J, Soll DR. Phenotypic switching in *Candida glabrata* accompanied by changes in expression of genes with deduced functions in copper detoxification and stress. Eukaryotic Cell 2005; 4:1434-45.
23. Miller NS, Dick JD, Merz WG. Phenotypic switching in *Candida lusitanae* on copper sulfate indicator agar: association with amphotericin B resistance and filamentation. J Clin Microbiol 2006; 44:1536-9.
24. Jin Y, Samaranayake YH, Yip HK, Samaranayake LP. Characterization of switch phenotypes in *Candida albicans* biofilms. Mycopathologia 2005; 160:191-200.
25. Yücesoy M. Virulence factors and their role in the pathogenesis. Microbiologia Balkanica 2003, 3rd Balkan Conference of Microbiology, September 4-6, 2003; İstanbul. Proceedings and Abstract Book, pp: 77-85.
26. Steenbergen JN, Casadevall A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. Microbes Infect 2003; 5:667-75.
27. Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence factors of medically important fungi. Clin Microbiol Rev 1996; 9:469-88.

28. Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol* 2000;3:354-8.
29. Pirofski LA. Guest Commentary: Of mice and men, revisited: New insights into an ancient molecule from studies of complement activation by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2006; 74:3079-84.
30. Steenberg JN, Casadevall A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect* 2003; 5:667-75.
31. Diamond R. *Cryptococcus neoformans*, pp: 2707-18. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2000, Churchill Livingstone, New York.
32. Rodriguez ML, Alviano CS, Travassos LR. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanism. *Microbes Infect* 1999;1:293-301.
33. Monari C, Bistoni F, Vecchiarelli A. Glucuronoxylomannan exhibits potent immunosuppressive properties. *FEMS Yeast Res* 2006; 6:537-42.
34. Hu G, Sten BR, Lian T, et al. Transcriptional regulation by protein kinase A in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog* 2007; 3: e42.
35. Moyrad F, Janbon G. *UGD1*, encoding the *Cryptococcus neoformans* UDP-glucose dehydrogenase, is essential for growth at 37°C and for capsule biosynthesis. *Eukaryotic Cell* 2004; 3:1601-8.
36. Zhu X, Williamson PR. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res* 2004; 5:1-10.
37. Zhu X, Williamson PR. A CLC-type chloride channel gene is required for laccase activity and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 2003;50:1271-81.
38. Bahn YS, Kojima K, Cox GM, Heitman J. Specialization of the HOG pathway and its impact on differentiation and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Biol Cell* 2005; 16:2285-300.
39. Bahn YS, Kojima K, Cox GM, Heitman J. A unique fungal two-component system regulates stress responses, drug sensitivity, sexual development, and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Biol Cell* 2006; 17:3122-35.
40. Ritterhaus PC, Kechichian TB, Allegood JC, et al. Glucosylceramide synthase is an essential regulator of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest* 2006; 116:1651-9.
41. Siafakas AR, Wright LC, Sorrell TC, Djordjevic JT. Lipid rafts in *Cryptococcus neoformans* concentrate the virulence determinants phospholipase B1 and Cu/Zn superoxide dismutase. *Eukaryotic Cell* 2006; 5:488-98.
42. Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Gen Biol* 2003; 38:143-58.
43. Jung WH, Sham A, White R, Kronstad JW. Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Biology* 2006; 4:2282-95.
44. Marr KA, Patterson T, Denning D. Aspergillosis, pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. *Infect Dis Clinics North America* 2002; 16: 875-94.
45. Denning DW. *Aspergillus* species, pp: 2674-84. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2000, 5th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
46. Tomee JF, Kauffman HF. Putative virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 476-84.
47. Latgé J. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends in Microbiol* 2001; 9: 382-9.
48. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 310-50.
49. Washburn RG, Hammer CH, Bennett JE. Inhibition of complement by culture supernatants of *Aspergillus fumigatus*. *J Infect Dis* 1986; 154: 944-51.
50. Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 469-88.
51. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 122-43.
52. Granet OI, Dubourdeau M, Latgé JP, et al. Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus* is essential for manifestation of invasive aspergillosis. *Cellular Microbiol* 2008; 10:134-48.
53. Clemons KV, Miller TK, Selitrennikoff CP, Stevens DA. Fos-1, a putative histidine kinase as a virulence factor for systemic aspergillosis. *Med Mycol* 2002; 40: 259-62.
54. Zhang L, Wang M, Li R, Calderone R. Expression of *Aspergillus fumigatus* virulence-related genes detected in vitro and in vivo with competitive RT-PCR. *Mycopathol* 2005; 160:201-6.
55. Sugui JA, Pardo J, Chang YC, et al. Gliotoxin is a virulence factor of *Aspergillus fumigatus*: *gliP* deletion attenuates virulence in mice immunosuppressed with hydrocortisone. *Eukaryotic Cell* 2007; 6:1562-9.
56. Sugui JA, Pardo J, Chang YC, et al. Role of *laeA* in the regulation of *alb1*, *gliP*, conidial morphology and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell* 2007; 6:1552-61.

PNL2

LABORATUVARDA AKREDİTASYON SÜRECİNE GENEL BAKIŞ

Prof. Dr. Hakan ABACIOĞLU

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

Tıbbi laboratuvarlar, hastalıkların tanı, tedavi ve izleminde kullanılan testlerin yapıldığı birimlerdir. Hastaların sağlığı ve güvenliği açısından bu birimlerin ve dolayısıyla test sonuçlarının güvenilir olmaları gereklidir. Diğer yandan laboratuvarlar, çalışan sağlığını korumaya ve çevre güvenliğini sağlamaya yönelik yapılanmaya da sahip olmalıdır.

Akreditasyon, laboratuvarların yukarıda söz edilen çıktılarına ulaşmış ve ulaşmadığını uluslararası kabul edilen ölçütler doğrultusunda bağımsız olarak değerlendiren ve yeterliliği onaylayan bir işlemler bütünüdür. Değerlendirme ve onaylama işlevleri bağımsız ve yetkili bir kurum tarafından yerine getirilir.

Tıbbi laboratuvarlar için geçerli akreditasyon standardı ISO 15189'dur. ISO 15189 standardı 5 ana başlıktan oluşmaktadır. Bunlar; (1) Kapsam, (2) Atıf yapılan standart ve belgeler, (3) Terimler ve tanımlar, (4) Yönetimsel gereklilikler ve (5) Teknik gerekliliklerdir.

Dördüncü başlık olan yönetimsel gereklilikler büyük oranda ISO 9001 kalite yönetim standardı ile örtüşmektedir. Teknik gereklilikler başlığı ise personel, yerleşim ve çevresel koşullar, laboratuvar donanımı, pre-analitik evre, analitik evre, analitik evrenin kalitesinin temini, post-analitik evre ve sonuçların raporlanması alt başlıklarından oluşmaktadır.

ISO 15189 standardı yukarıdakilerin yanı sıra laboratuvar bilgi sistemi ve laboratuvarın uymakla yükümlü olduğu "gizlilik" gibi etik kurallara da atıf yapmaktadır.

Bu konuşmada, akreditasyon standartlarının tarihsel gelişiminden ve ülkemizdeki durumdan söz edilecek ve ISO 15189'un özellikle 4. ve 5. başlıklarına ilişkin genel bilgiler verilecektir.

MOLEKÜLER TESTLERDE YÖNTEM ONAYI VE KALİTE KONTROL

Doç. Dr. Arzu SAYINER

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

Bir laboratuvar testinden, doğru ve tekrarlanabilir sonuç vermesi ve bunu klinik açıdan anlamlı olacak kadar kısa sürede yapması beklenir. Bu özellikleri sağlayabilen mikrobiyolojik nükleik asit testleri (NAT) hızla rutin hasta hizmetine girmektedir. NAT ile sonuç verebilir aşamaya gelmek için laboratuvarın yerine getirmesi gereken bazı kurallar bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi kullanılan test yönteminin onaylanması aşamasıdır. Bu amaçla:

- Yeni bir laboratuvar tasarımı ("in-house") test kullanılacaksa, testin özellikleri belirlenmelidir (**validasyon**). Bu özellikler; duyarlılık, özgüllük, doğruluk, tekrarlanabilirlik ve ayrıca kantitatif testler için doğrusalıktır.
- Ticari bir test, üretici önerileri doğrultusunda kullanılacaksa, üreticinin belirttiği performans özelliklerinin laboratuvarda da geçerli olduğu gösterilmelidir (**verifikasyon**). Bunun için doğruluk, tekrarlanabilirlik ve kantitatif testler için doğrusalık kontrolü yapılmalıdır. Testte üreticinin belirlediğinden farklı bir değişiklik yapılacaksa (farklı bir matris kullanma, ekstraksiyon yöntemini değiştirme, vb) duyarlılık ve özgüllüğün de yeniden değerlendirilmesi gerekir.
- Sonuçların doğruluğunun ve personel performansının güvenilirliğinin sürekli olduğunu göstermek için izlem yapılmalıdır. Bu amaçla iç ve dış kalite kontrolleri uygulanmalıdır.
 - İç kalite kontrolü: Kalitatif testlerde, her çalışmada kullanılan pozitif ve negatif iç kalite kontrol örneklerinin izlemi yapılmalıdır. Kantitatif testlerde orta düzeyde ve düşük düzeyde hedef nükleik asit içeren en az iki pozitif kontrolün izlenmesi ve elde edilen kantitatif sonuçların Westgard kurallarına göre değerlendirilmesi önerilir.
 - Dış kalite kontrol programları (Yeterlilik testleri): Laboratuvarın genel performansının değerlendirilmesini, laboratuvarın ve kullanılan yöntemin diğer katılımcılarla karşılaştırılabilmesini sağlar.

İzlem sırasında sorun saptanırsa, düzeltici eylem(ler) yapılmalıdır. Burada amaç, suçlu bulmak değil, sorunun kaynağını bulmak ve bir daha tekrarlamaması için önlem almaktır. Düzeltici eylemlerin sonuçlar üzerindeki etkileri izlenmelidir. Sorunlar ve düzeltici eylemler kayıt altına alınmalı ve ilgili kişiler konu hakkında bilgilendirilmelidir. Kontaminasyonun önlenmesi için uygun alt yapı ve çalışma teknikleri kullanılmalı, personel eğitimine özen gösterilmelidir. Yalancı negatifliğin saptanabilmesi için testte internal kontrol kullanılmalıdır.

Yöntem onayı, testteki olası sorunların önceden fark edilmesini sağlar. Ayrıca yöntemin sınırlarının bilinmesi, test sonucunun doğru yorumlanması için gereklidir. Yöntem onayı ve kalite kontrolü ile birlikte yürütülen toplam kalite yönetiminin hedefi, hasta için mümkün olan en iyi hizmetin sağlanmasıdır.

Kaynaklar

- Özacar T. Moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında kalite kontrolü: Programlar ve akreditasyon. Moleküler Tanı Dergisi 2007; 3:18-21.
- Sayiner AA. Kantitatif viral nükleik asit testleri: Değerlendirme parametreleri ve yöntemleri. Moleküler Tanı Dergisi 2007; 3:59-65.

3. Rabenau HF, Kessler HH, Kortenbusch M, et al. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. 2007; 40:93-8.
4. Health Protection Agency. Good laboratory practice when performing molecular amplification assays (QSOP 38/3). www.evaluations-standarts.org.uk (Erişim tarihi: 12.4.2008)
5. Seabrook JM, Hubbard RA. Achieving quality reproducible results and maintaining compliance in molecular diagnostic testing of human papillomavirus. Arch Pathol Lab Med 2003; 127:978-83.
6. Australian Government Department of Health and Ageing. Laboratory accreditation standards and guidelines for nucleic acid detection and analysis. <http://www.ag.gov.au/cca> (Erişim tarihi: 12.4.2008)
7. Tibbets MW, Gomez R, Kannangai R, Sridharan G. Total quality management in clinical virology laboratories. Indian J Med Microbiol 2006; 24:258-62.

LABORATUVAR AKREDİTASYONUNDA ALTYAPI

Y. Doç. Dr. Özgen Alpay ÖZBEK

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

Akreditasyonun amacı, test sonuçlarının hem hasta hem de tedaviden sorumlu hekim açısından güvence altına alınmasıdır. Bu nedenle, hastaların test sonuçlarını ve tedavilerini etkileyen her türlü laboratuvar donanımının sağlanması ve yönetimi, tıbbi laboratuvarın akreditasyonu kapsamı içinde değerlendirilmektedir.

Laboratuvar donanımı

Laboratuvar donanımı ISO 15189 içinde analiz öncesi, analiz ve analiz sonrası evrede laboratuvar hizmetlerinin gerçekleştirilebilmesi için gerekli araç ve gereçler olarak tanımlanmıştır. Bu standart kapsamındaki laboratuvar donanımı şu şekilde sınıflandırılmıştır:

1. Analitik sistemler: Biyolojik örneklerde çeşitli test parametrelerinin ölçümünü yaparlar (test analizi). Ölçüm yöntemine göre spektrofotometre, atomik absorpsiyon, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi gibi; teknolojik gelişmeye göre bilgisayarlı analizörler, otomatik analizörler (otoanalizörler), bütünleşmiş analiz sistemleri, nanoanalizörler (çipler) gibi.
2. Cihazlar (enstrümanlar): Analiz dışındaki çok çeşitli işlemlerde değişik amaçlarla kullanılırlar. Vorteks, çalkalayıcı, buzdolabı, derin dondurucu, santrifüj, barkod yazıcısı, bilgisayar terminali gibi.
3. Referans materyaller: Kalibrasyon ve kalibrasyon doğrulama işleminde kullanılırlar. Referans ağırlık, termometre, kalibratör ve kontroller gibi.
4. Tüketim malzemeleri: Laboratuvarda çeşitli işlemlerde kullanılan tüketim malzemeleridir. Reaktifler, reaksiyon küvetleri, pipet ucu, yedek parçalar (plastik borular, elektrot, lamba), bakım malzemeleri gibi.

Laboratuvar donanımının sağlanmasına ilişkin standartlar ISO 15189 içinde “Dış Hizmetler ve Tedarikler” başlığı altında tanımlanmıştır. Bu bölümde, laboratuvarların satın alma, denetleme, kabul veya reddetme ve depolama prosedürlerinin oluşturulması istenmektedir. Ayrıca laboratuvara satın alınan her türlü gereç için kayıt tutulması gereklidir. Bu kayıtlar tüm donanımın sayım çizelgesini; reaktif, kontrol ve kalibratörlerin lot numaralarını, laboratuvara kabul ve hizmete giriş tarihlerini içermelidir. Bunlarla birlikte, standart laboratuvar donanımı tedarik eden satıcı firmaların değerlendirilmesini ve değerlendirme sonucuna göre onaylı tedarikçiler listesinin oluşturulmasını da istemektedir. Standartın “Laboratuvar Donanımı” başlığı, aşağıdaki teknik gereklilikleri tanımlamaktadır:

- Laboratuvar donanımının kaydı ve işaretlenmesi
- Laboratuvar donanımının koruyucu bakım ve onarımları
- Laboratuvar donanımının kalibrasyon ve kalibrasyon doğrulamaları
- Laboratuvar donanımının güvenliği

Laboratuvar Donanımının Kaydı ve İşaretlenmesi

Standartta sınıflandırılarak tanımlanmış tüm tıp laboratuvarı donanımının, laboratuvar işlemlerinde izlenebilmesi için işaretlenerek düzenli kayıtları tutulmalıdır. Bunun için laboratuvarda bulunan veya yeni gelen bir donanımın ilk kayıt ve işaretleme işlemlerinin nasıl yapılacağını açıklayan

yazılı bir belge hazırlanması uygun olur. Standartta, her donanım bileşeninin izlenebilir olması için ayırt edici şekilde işaretlenmesi gerektiği bildirilmektedir. Genellikle ilk kaydı yapılan donanıma ayırt edici, tanımlayıcı bir kod verilmesi tercih edilir. Bu kodun niteliği önemli olmasa da, laboratuvar donanımının hastane içi işlemlerinde de takibi için tüm hastane içinde kullanılan ortak bir tanımlayıcı kodun olması en idealidir. Laboratuvar donanımı, bu kod görülecek şekilde çeşitli yollarla (çıkamaz kalemle yazma, etiketleme, barkodlama, vb) işaretlenir. Laboratuvarda kayıtlı her donanım için kullanıldığı sürece en az aşağıdakileri içeren kayıtların tutulması gerekmektedir:

- Donanım bileşenlerinin tanıtımı
- Üreticinin adı, ayırt edici kimlik türü ve seri numarası veya diğer benzersiz kimliği
- Üretici ile iletişim kurulacak birey ve varsa telefon numarası veya adresi
- Alınma ve hizmete girme tarihi
- Güncel yerleşim yeri
- Alındığı zamanki durumu (örn. yeni, kullanılmış veya yeniden elden geçirilmiş)
- Varsa, yöneticinin açıklamalarını içeren belgeler veya saklandığı yer
- Donanımın kullanıma uygun olduğunu kanıtlayan güvenilirlik kayıtları
- Halihazırda yapılan ve gelecek için planlanan bakım
- Donanımdaki hasarlar veya yanlış işlevler, değiştirmeler veya onarımlar
- Mümkünse, öngörülen değiştirilme tarihi
- Gönderme yapılacak güvenilirlik/performans kayıtları
- Bu gerekliliğin bir kısmını veya tümünü yerine getirecek şekilde tüm kalibrasyonları/sertifikaları ve/veya tarihleri de kapsayan doğrulamaları, ayarlamaları, kabul ölçütleri ve varsa bakım/kalibrasyon arasında yapılmış olan kontrol sıklıkları ile birlikte kalibrasyon/doğrulanın yapılacağı tarihleri

Laboratuvar Donanımının Koruyucu Bakım ve Onarımları

Laboratuvar donanımının gerekliliklerine göre bakım programları oluşturularak arızadan korunması, yüksek performanslı ve güvenilir kullanılması sağlanmalıdır. Bunun için bakım işlemlerinin nasıl yapılacağını açıklayan yazılı bir belge hazırlanması uygundur. Standartta laboratuvar donanımının en azından üreticinin önerilerini yerine getiren koruyucu bakımlarının yapılması gerektiği bildirilmektedir. Kullanıcı veya teknik servis tarafından, bakımların yapıldığını izlemeye yarayan bir program oluşturulmalıdır. Donanım arızaları için açıklayıcı bir yazılı belge hazırlanması uygun olabilir. Bu belge açık ve kolayca anlaşılabilir ve günlük çalışmalarda uygulanabilir olmalıdır.

Laboratuvar Donanımının Kalibrasyon ve Kalibrasyon Doğrulamaları

Ölçüm yapan laboratuvar donanımları, kalibrasyon gerekliliklerine göre kalibrasyon ve kalibrasyon doğrulama programları oluşturularak kullanılmadan önce güvenilir olduğu doğrulanmalıdır. Bunun için kalibrasyon işlemlerinin nasıl yapılacağını açıklayan yazılı bir belge hazırlanması uygun olur. Analitik sistemler ve cihazların kalibrasyon gerekliliklerinin belirlenmesinde ve gerektiği durumlarda bu gerekliliklerin bir kısmının veya hepsinin yerine getirildiğinin gösterilmesinde üretici yönergeleri veya kullanıcı el kitaplarından yararlanılabilir. Laboratuvarın kontrolü altında olan ve kalibrasyon gerektiren donanım, kalibrasyon durumunu ve sonraki kalibrasyon tarihlerini gösterecek şekilde işaretlenmelidir. Donanım, laboratuvarın doğrudan kontrolünden çıktığı veya onarıma gönderildiği veya hizmetten alındığı zaman, laboratuvarda yeniden kullanıma başlanmadan önce laboratuvar tarafından kontrol

edilmeli ve güvenilir şekilde çalıştığı doğrulanmalıdır. Donanımın hasarlı olduğu saptandığı zaman, hizmetten alınmalı, arızalı olduğu açıkça etiketlenmeli ve onarılıp, kalibrasyon, doğrulama veya testin belirlenmiş kabul ölçütlerini sağladığı gösterilinceye kadar uygun bir şekilde saklanmalıdır.

Laboratuvar Donanımının Güvenliği

Standartta laboratuvar donanımının güvenliği açısından aşağıda belirtilen çeşitli gereklilikler mevcuttur:

- Donanım, yalnız yetkilendirilmiş personel tarafından çalıştırılmalıdır. Personel eğitimi için kullanıcıların üretici firma temsilcileri tarafından eğitilerek sertifikalandırılması tercih edilebilir. Ayrıca laboratuvar çalışanları için donanım ile ilgili tüm kullanım kitapları her zaman erişilebilir olmalıdır.
- Donanım çalıştırılırken güvenli çalışma koşulları sağlanmalıdır. Bunun için, üretici önerileri ve açıklamalarına uyulmalıdır.
- Donanımın çevresinde, onarımlar ve personeli koruyucu yeterli alan ayrılmalıdır.
- Donanımın taşınması, saklanması ve kullanımı sırasında bulaş veya yıpranmalardan korunması için güvenliği sağlayacak prosedürler belirlenmelidir.
- Donanım ve ekleri (sabit disk, yazılım, referans materyaller, tüketim materyalleri ve analitik sistemler), geçersiz analiz sonuçlarına neden olacak ayarlama veya kurcalamalardan korunacak şekilde düzenlenmelidir. Bunun için şifreleme ve kilitleme gibi ulaşımın yalnız yetkilendirilmiş personele sağlandığı çeşitli yollar tercih edilebilir.
- Bilgisayar veya otomatize donanımların kullanıldığı durumlarda aşağıdakilerin yerine getirildiğinden emin olunması gerekmektedir:
 - Donanımın bilgisayar yazılımının kullanılmaya elverişli olduğu kanıtlanmalı ve belgelenmeli
 - Verilerin bütünlüğü sürekli korunacak şekilde prosedürler oluşturulmalı ve uygulanmalı
 - Donanımın bakımı, veri güvenliği sağlanarak yapılmalı
 - Rastgele veya yetkili olmayan kişilerin erişimi, değişiklik yapmaları veya hasar vermeleri engellenmelidir.

PNL4

TARAMA TESTLERİNDE MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Uzm. Dr. N. Banu Pelit KILIÇ

Türkiye Kan Merkezleri ve Transfüzyon Derneği, İstanbul.

Transfüzyonla bulaşan enfeksiyonlar uzun yıllardan beri transfüzyonun en önemli yan etkilerinden olmuştur. Etkin tarama testlerinin kullanımıyla enfeksiyonlara bağlı yan etkiler belirgin miktarda azaltılsa bile transfüzyonun bilinen gerçeği; “**riskin asla sıfır olamayacağı**”dır.

In vitro nükleik asitlerin amplifiye edildiği PCR ve benzeri yaklaşımlar (LCR: ligase chain reaction, NASBA: nucleic acid sequence-based amplification, TMA: transcription-mediated amplification), NAT (nucleic acid amplification testing) adı altında birleştirilmiştir. Kan bankacılığında NAT, özellikle tarama testleriyle tanınabilmesi için antikor oluşması gereken HCV ve HIV gibi virusların direk olarak genetik materyallerinin gösterilmesi temeline dayanan bir test tekniğidir. 1980’li yıllarda AIDS’in gündeme gelişi, 1990’larda ise moleküler biyolojideki teknolojik gelişmeler NAT’ın kan ürünlerinde tarama amaçlı kullanımı düşüncesini doğurmuş ve 1995 yılında Avrupa Plazma Endüstrisinde kullanılmaya başlanmıştır. Lisanslı serolojik testlerle saptanamayan pencere dönemindeki viral enfeksiyonların NAT ile gösterilebiliyor olması bu teknolojiye olan ilgiyi artırmıştır. İlk olarak Almanya’da SD (solvent deterjan) inaktive plazmaların kalite kontrolü amacıyla kullanılmış; ardından Frankfurt’taki özel bir kan merkezinde üç virus da (HBV, HCV, HIV) “in-house” PCR ile çalışılmış, bundan sonra NAT, Avrupa ülkelerinde bağışçı taramalarında yerini almıştır. Sonraki yıllarda serolojik taramaları yapılmış ve negatif olarak değerlendirilmiş bağışçı serum örneklerinde havuz yapılarak NAT uygulamasına başlanmıştır. Ardından havuz NAT (MP, minipool) yerini tek serumda kullanılan NAT (ID, individual)’a bırakmıştır.

Pek çok gelişmiş ülkenin kan bankaları birlikleri ve yasal düzenlemelerinde NAT uygulamalarında HCV ve HIV konusunda ortak kararlar kolaylıkla alınırken, HBV halen tartışma konusudur. NAT’ın etkinliği, hem pencere döneminin süresi hem de o enfeksiyonun toplumdaki prevalansı ile ilişkilidir. Ciddi seroprevalans farklılıkları, serolojik tarama testlerindeki değişkenlikler, tarama testinin bir antijen testi olması ve bazı ülkelerde çok yüksek duyarlılıkta (0.1 ng/ml) kitlerin kullanılması, mutant suşlar ve en önemlisi HBsAg pozitif ancak NAT (yani DNA) negatif %3’lük bir örnek grubunun olması, bu tartışmanın nedenleri arasında sayılabilir. HCV açısından durum değerlendirildiğinde, uzun seronegatif dönemi nedeniyle anti-HCV’ye göre NAT’ın belirgin bir avantaj sağladığı kabul edilmektedir. Ancak son yıllarda geliştirilen ve kan bankalarında da denenen HCV antijen testlerinin seronegatif yani pencere dönemini NAT’a yakın sürelerde kısalttığı bildirilmektedir.

Uluslararası Kan Transfüzyon Derneği (ISBT, International Society of Blood Transfusion), periyodik dergisi Vox Sanguinis’de 2005 yılında yayınladığı bir “International Forum”da, 18 ülkenin (4’ü Avrupa dışı, 14’ü Avrupa ülkesi) bağışçı taramalarında NAT uygulamalarıyla ilgili durumunu özetlemiştir. Bu foruma katılan ülkelerdeki NAT uygulamaları Tablo I’de görülmektedir.

Ülkemizde bu konuda yapılmış en geniş serili (10.989) çalışma, İstanbul/Çapa Kızılay Kan Merkezi’ne aittir (Tablo II).

Uludağ Üniversitesi Raşit Durusoy Kan Merkezi’nin bir çalışmasında ise HBsAg negatif, anti-HBc pozitif serumlar arasından anti-HBs pozitifler elenmiş ve kalan serumlarda (izole anti-HBc pozitif örneklerde) HBV-DNA çalışılmıştır. HBsAg negatif 9282 örnekte anti-HBc pozitifliği %18 (1679) olarak saptanmış; 1679 örneğin 179’u yetersiz olduğundan tekrar test edilememiş; kalan ör-

neklerden 225'i (%15) anti-HBs negatif bulunmuştur. İzole anti-HBc pozitifliğinin %2.7 olarak saptandığı çalışmada, bir örnek HBV-DNA pozitif sonuç vermiştir. Çalışma dışı bırakılan örnekler hariç tutulduğunda, 1:8333 seronegatif, DNA pozitif HBV bulaştıracılığından söz edilmektedir.

Ülkemizde kan merkezlerinde, moleküler yöntemlerin kullanımıyla ilgili herhangi bir yasal zorunluluk bulunmamaktadır. Kaldı ki mevcut hastane bazlı kan merkezi yapılanmasıyla böyle bir kararın alınması da son derece hatalı olacaktır. Ek olarak halen serolojik taramalarda yöntem seçimi standardize edilememiştir. Seronegatif taranmış örneklerde NAT uygulamasına geçebilmek için bölgesel kan merkezi yapısı geliştirilmeli ve bu merkezlerde yöntem, algoritma, kalite kontrol çalışmaları yasalarla standart hale getirildikten sonra konu ele alınmalıdır.

Tablo I. Çeşitli Ülkelerde HCV, HIV ve HBV NAT Uygulamaları

Ülke	HCV NAT			HIV-1 NAT		HBV NAT
	Uygulama durumu	Uygulama başlangıcı	HCV antijen	Uygulama durumu	Uygulama başlangıcı	Uygulama durumu
Avusturya	Z	Nisan 1999	/	ZD		E
Belçika	Z	Ekim 2002	/	Z	Ekim 2002	H
İngiltere	Z	1999	/	ZD (kısmen)	Kasım 2003	H
Finlandiya	Ö	Eylül 2000	/	ZD	2005	H
Fransa	Z	Temmuz 2001	/	Z	Temmuz 2001	T
Almanya	ZD→Z	Nisan 1997→ Nisan 1999	/	ZD→Z	Nisan 97→ Mayıs 2004	E-Kızılhaç
Yunanistan	Ö	2003	Tüm merkezlerde	Ö	2003	P-2004
İtalya	Z	Haziran 2002	Haziran 2002	ZD		H
Hollanda	Z	Eylül 1999	/	Z	Ocak 2001	H
Norveç	Z	Nisan 2000	/	/		H
Slovenya	Z	Mart 2000	/	/		H
İspanya	Z	Ocak 2003	Ocak 2003	/		P-2005
İsveç	/	/	/	/		
İsviçre	Z	Ocak 1999	/	ZD	Ocak 2002	H
Avustralya	Z	Haziran 2000	/	Z	Haziran 2000	H
Kanada	Z	Ekim 1999	/	Z	Mayıs 2001	P
Hong Kong	Ö	Haziran 2002	/	Ö	Haziran 2002	P
ABD	Z	Mart 1999	/	Z	Mart 1999	T

Z: Zorunlu; ZD: Zorunlu değil; Ö: Öneriliyor; E: Evet; H: Hayır; P: Planlanıyor; T: Tartışmalı

Tablo II. Kızıl Kan Merkezi Verileri

Sonuç	Anti-HCV	Anti-HIV	HBsAg
Seroloji (+), NAT (-)	40	11	12
Seroloji (-), NAT (+)	2	-	4
Seroloji (+), NAT (+)	6	1	189

İMMÜNOHEMATOLOJİDE MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Doç. Dr. İdil YENİCESU

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD Pediatrik Hematoloji ABD
Beşevler, Ankara

Kan grubu antijenleri kalıtsal geçiş gösteren, polimorfik ve eritrosit membranının dış yüzeyinde yer alan protein, glikoprotein veya glikolipid özelliğinde yapılardır. Bir kişi kendi eritrosit yüzeyinde bulunmayan bir eritrosit antijeni ile karşılaşarsa bu antijene karşı antikor yanıtı meydana getirir. Bu antikorlar transfüzyon uyumsuzluğu, materno-fetal uyumsuzluk ve otoimmün hemolitik anemiye neden olabilir.

Kan grubu antijenleri ve antikorlarını tespit için bir yüzyılı aşkın süredir kullanılan klasik metod ‘hemagglütinasyon’ yöntemidir. Hemagglütinasyon, eritrosit antijenlerinin reaktanlarda bulunan antikorlar ile reaksiyona girmesi prensibine dayanır. Hem ucuz hem de basit bir yöntemdir. Uygun şekilde gerçekleştirildiğinde, özgüllük ve duyarlılığı çoğu hastanın ihtiyacını karşılayacak yeterliliktedir. Ancak hemagglütinasyon yönteminin bazı alanlarda yeterli olmayabileceği unutulmamalıdır (Tablo I). Bu sınırlamaları kısmen de olsa azaltmak için immünohematoloji referans laboratuvarlarının kullandıkları yöntemlere nükleik asit temelli teknolojiler eklenmiş, böylece kan bankacılığı terminolojisinde ‘moleküler immüno-hematoloji’ terimi kullanılmaya başlanmıştır. Moleküler immünohematolojide eritrosit antijenlerini kodlayan genlerin genotiplendirmesi yapılarak indirek yoldan eritrositlerin fenotipi saptanır. İlk başlarda eritrosit kan grubu antijenlerinin genotiplendirmesinin karmaşık, pahalı, otomasyonunun güç olduğu ve öngörülebilir gelecekte rutin kullanımının pek olası olmadığı düşünülüyordu. Ancak, eritrosit genotipi ile fenotipi arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılması, kan grubu genlerinin ve fonksiyonlarının detaylı olarak tanımlanması, eritrosit nükleotid polimorfizminin saptanmasında nano ve chip teknolojisinin kullanılabilir hale gelmesi ve genotiplendirmenin hemagglütinasyon için değerli bir tamamlayıcı olduğunun anlaşılması, genotiplendirme teknolojisinin kan merkezlerinde yaygın olarak kullanılmasını olanaklı hale getirmiştir. Moleküler immünohematolojik metodlar öncelikle özellikli hastalara hizmet veren referans immünohematoloji merkezlerinde kullanılmalıdır. Transfüzyon tıbbında moleküler tekniklerin kullanılmaya başlanması, homolog kan ürünlerinin transfüzyonunda daha uyumlu transfüzyonların yapılmasına olanak sağlayacaktır.

Tablo I. Hemagglütinasyon yönteminin yeterli olmadığı immünohematolojik problemler

1	Yenidoğanın hemolitik hastalığı açısından risk altındaki fetüslerin belirlenmesi
2	Yakın dönemde transfüzyon almış olan hastaların eritrosit antijenlerinin tespit edilmesi
3	Eritrositleri IgG ile kaplı hastaların eritrosit antijenlerinin tespit edilmesi
4	D-pozitif kişilerde RHD zigozitesinin tam olarak gösterilmesi
5	Nadir eritrosit antijeni taşıyan az sayıdaki donörün tiplendirilmesi ve bununla ilişkili dökümantasyonun hazırlanması
6	Nadir eritrosit antijenlerine özgül antiserum hazırlanması
7	Volüm, zayıf reaksiyon veya bulunulabilirlik açısından sınırlı olan antikorların kullanılmasını gerektiren durumlar

Bu bölümde moleküler tekniklerin transfüzyon tıbbında özellikle de hemagglütinasyon yönteminin yeterli olmadığı alanlardaki kullanımı özetlenmiştir.

A. Eritrosit antijen genleri ve genotiplendirme

Şu anda serolojik olarak belirlenmiş olan yaklaşık 270 eritrosit antijeni vardır. Uzun yıllar süren detaylı serolojik ve moleküler/genetik araştırmalar sonucunda bazı eritrosit antijenlerinin genlerine karşılık gelen protein ve karbonhidrat parçalarının basit bir yapıda olmadığı ortaya çıkmıştır. Aynı kan grubu fenotipini ifade eden birçok genetik varyasyon tanımlanmıştır. Örneğin ABO fenotipi için 100'ün üzerinde allel olduğu görülmüştür. Şu anda genotiplendirme sayesinde tanımlanmış olan ve eritrositleri kodlayan allellerdeki bu karmaşıklık ile bunlara karşılık gelen antikor oluşumu, transfüzyonu içinden çıkılması oldukça güç bir hale getirmektedir. Bu konuya verilebilecek en güzel örneklerden biri MNS kan grubudur. Bu sistem oldukça polimorfik bir yapıdadır ve en azından 43 antijen içermektedir. Bu antijenlerin çoğuna nadir olarak rastlanır ve çoğunlukla aminoasit eklentileri veya GYPA - GYPB arasındaki yeniden düzenlemeler sonucu ortaya çıkar. MNS kan grubu sisteminde düşük sıklıkta görülen antijenler Cl^a, DANE, Dantu, ERIK, Far, HAG, He, Hil, Hop, Hut, MARS, M^c, M^g, Mi^a, MINY, Mit, Mt^a, Mur, MUT, M^v, Nob, Ny^a, Or, Os^a, Ri^a, S^d, sat, St^a, TSEN, Vr ve Vw'dur. Bu sistemde gen delesyonu sonucu ortaya çıkan fenotipler de bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak verilen En(a-)'de MN antijenleri bulunmamaktadır. Son olarak ISBT Eritrosit Yüzey Antijenleri Terminolojisi Çalışma Grubu tarafından henüz sınıflandırmaya dahil edilmemiş, glikoforin A'nın 2, 3 ve 4. rezidülerinde değişmiş glikolizasyon sonucu oluşan Tm, Sj, Can, Sext ve Hu antijenleri de vardır. Antijenik farklılıklara neden olan genetik, protein ve karbonhidrat değişiklikleri MNS grubunda olduğu gibi eritrosit antijenlerinin serolojik olarak tanımlanmasını zaman zaman olanaksız hale getirebilir. Şu anda belirlenmiş 29 kan grubu sisteminin 28'ine ait genler klonlanmış ve dizi analizleri yapılmıştır. Yalnızca P sisteminin çözülmesi henüz tamamlanmamıştır. Geçtiğimiz 10 yıl boyunca deneysel immünohematoloji laboratuvarları, kan grubu antijenlerini kodlayan bir çok gende özgül tek nükleotid polimorfizmlerini saptamak için moleküler yöntemleri kullanmaya başlamışlardır. Buna ek olarak, çok sayıda örneğin hızla analizini yapabilmek için birçok değişik 'mass-scale' genotiplendirme teknolojileri geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Bu yöntemlerde hedef genin çoğaltılması PCR ile yapıldıktan sonra analizleri; RFLP (restriction fragment length polymorphism), "real-time" PCR, "multiple sequence specific primer PCR", "single base extension", "high-throughput bead technology" veya microarray yöntemlerinden biri kullanılarak gerçekleştirilmektedir.

B. Masif transfüzyon yapılan hastalarda kan grubu tespiti

Masif transfüzyon yapılan kişilerde periferik kanda bulunan donör eritrositleri, hastanın kan grubu tayinini geçersiz hale getirebilir. Genotip tayini bu sorunun çözülmesini sağlar. Kan grubu genlerine uygulanan PCR işlemleri, tüm allellerde bulunan gen bölgelerini hedefleyip, amplifiye ederek donör kaynaklı DNA'ların etkileşimini önler. Bu yaklaşım, tek bir özgül allelin hedeflenip amplifiye edilmesinin aksine, transfüzyon sonrasında alınan kan örneğinden hazırlanan DNA'dan güvenilir bir biçimde kan grubu tayinine olanak sağlar.

C. Direk antiglobülin testi pozitif olan eritrositlerin tiplendirmesi

Otoimmün hemolitik anemisi olan hastalar veya hemoliz olmadan eritrositleri IgG ile kaplı olan kişilerde yapılan kan grubu tayini geçersiz olabilir. IgG'nin uzaklaştırılmasını sağlayan teknikler her

zaman yararlı olmayabilir. Aynı zamanda eritrositin antijen yapısına zarar verebilir. Böyle durumlarda genotipik tiplendirme yararlıdır.

D. Reaktanların elde edilemediği durumlarda donör ünitelerinin taranması

Bu durum için Dombrock kan grubu polimorfizmi en sık verilen örnektir. Donörlerin Do^a ve Do^b açısından tiplendirilmesinde DNA-temelli değerlendirmeler hızlı, sağlam ve tekrarlanabilir sonuç verir.

E. Antikor taramada reaktan eritrositler

Eritrosit alloantikorlarının tetkiki ve tanımlanması, iyi karakterize edilmiş reaktan eritrositlerin kullanımına bağlıdır. Karşılık gelen alloantikoru ekarte etmek için hastanın plazması ile ideal olarak, antijeni eksprese eden genler açısından homozigot olan bir kişiden alınan eritrositler karşılaştırıldığında hemaglutinasyon görülmemesi gereklidir. Antikor tarama ve eritrosit panelinin tanımlanmasında kullanılan eritrosit reaktanlarının fenotiplendirmesinde şu an serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Homozigoziteyi belirlemenin zor olduğu kan grupları vardır. Özellikle Fy^a/Fy^b buna örnek verilebilir. Ayrıca serolojik testlerin uygulanamayacağı kan grubu antijenleri vardır. Bu özellikle düşük prevalanslı antijenler için geçerlidir. Hasta serumunda düşük prevalanslı antijenlere karşı gelişmiş antikor varsa, alloantikorum tanımlanması yapılamaz. Reaktan eritrositleri bağışlayan kişilerde DNA genotiplendirmesinin uygulanması sayesinde eritrositlerin antijen için “double-dose” ekspresyonu saptanabilir. Böylece eritrosit alloantikorlarının varlığı ekarte edilebilir.

F. RHD zigozitesinin test edilmesi

Donasyon merkezlerinin D-negatif ürünleri uygun şekilde etiketlemesi gerekir; böylece D-negatif bir ürün alan hastanın aldığı eritrositlere karşı anti-D oluşturmaları engellenmiş olur. Donasyon merkezlerinde şu anda D antijenini saptamak için tiplendirme reaktanları kullanılmaktadır. Bu reaktanların duyarlılığını artırmak için, testin antiglobülin fazı da (zayıf D testi) uygulanmaktadır. Ancak bu uygulama fazladan zaman, reaktan ve kontrollere mal olmaktadır. Eğer donörün eritrositlerinde direk antiglobülin testi pozitif ise antiglobülin fazı yanlış pozitif reaksiyon verir. Bu durumda D tipinin belirlenmesi, ileri çalışmaların yapılmasını gerektirir. Wagner ve arkadaşları, RHD dizisine özgül primer PCR ile 8442 D-negatif donasyonu taradıklarında beş D-pozitif donör saptamışlardır. Ancak moleküler genotipleme ile resesif D(-) allellerin varlığının saptanması zigozitenin belirlenmesine olanak sağlar. Genetik açıdan meydana gelen pek çok olay D(-) fenotipin oluşmasına neden olur. Avrupalılarda, D(-) fenotipinin moleküler temeli genellikle RHD'nin total delesyonu ile ilişkilidir. D negatif olan Japonların yaklaşık 1/3'ünde ise sağlam ancak inaktif RHD bulunur ve eritrositleri anti-D ile nonreaktif olan Japon donörlerin ancak %10'u delesyon fenotipine sahiptir. D(-) olan Afrika kökenli Amerikalıların yaklaşık 1/4'ünde bir RHD psödogeni bulunur. Bu psödogen, D antijenini kodlamaz. Tüm bu D varyantlarının tespiti ancak moleküler yöntemler ile mümkün olacaktır. Sonuç olarak moleküler tiplendirmenin kullanılması ile donörlerin %0.1 oranında D-negatif olarak yanlış etiketlenmesi ve hastalarda potansiyel alloimmünizasyon ortaya çıkması önlenmiş olur. Prenatal uygulamalarda, paternal RHD zigozitesinin test edilmesi, annenin anti-D'ye sahip olması durumunda, fetal D durumunun saptanması açısından önemlidir. Eğer baba RHD homozigot ise fetus D-pozitif olacaktır. Bu durumda gebeliğin izlenmesi gereklidir. Eğer baba heterozigot ise fetusün D tipinin belirlenmesi invazif ve gereksiz testlerin yapılmasını engelleyecektir.

G. Fetüsün tiplendirilmesi

Fetüsün annede klinik öneme sahip bir antikor oluşturabilecek paternal bir antijene kalıtsal olarak sahip olup olmadığını prenatal dönemde belirlemek ancak genetik tiplendirme ile mümkün olacaktır. Eğer fetüs bu antijen açısından negatif olarak bulunursa, yenidoğanın hemolitik hastalığı veya neonatal alloimmün trombositopeni açısından risk altında değildir ve annenin agresif takibi ile gereksiz immünomodülatör ilaç kullanması önlenmiş olur. Antijen durumunu belirlemek için amniyosentez veya koryon villus örneğinden elde edilen fetal DNA kullanılır. Alternatif olarak, beşinci gebelik haftasından sonra annenin serumundan veya plazmasından hücresiz, fetal kaynaklı DNA elde etmek mümkündür. Bu teknik sayesinde invazif girişimlere gerek olmaksızın anneden fetal DNA elde edilmesi sağlanır. Anne plazmasındaki fetal DNA, apoptotik sinsityotrofoblastlardan kaynaklanır ve gebelik haftası arttıkça miktarı artar; ancak doğum ile birlikte hızla kaybolur. Annenin kanında veya cildinde yıllarca kalabilen fetal lenfositlerin aksine hücresiz fetal DNA'lar şu anki gebelik ile önceki gebelikler arasında karışıklık oluşmasına neden olmazlar. Gerçek zamanlı PCR tekniği ile anne plazmasından elde edilen fetal DNA çalışıldığı zaman fetüsün D durumunu belirlemek mümkün olabilir. Çok sayıda geniş ölçekli çalışma, bu testin validasyonunu sağlamaya çalışmaktadır. Teorik olarak anne plazmasının bu açıdan incelenmesi yaklaşık %40 D(-) kadına, D(-) fetüs taşıdıkları halde gereksiz Rh immüno globülini verilmesini önleyecektir. Yeterli fetal DNA elde edildiğini gösteren pozitif kontrol kullanılması önemlidir. Böylece negatif sonuçların validasyonu sağlanır. Fetüs erkek ise Y kromozomu belirgeç olarak kullanılabilir. Eğer fetüs kız ise polimorfik paternal belirleyicilere ihtiyaç vardır. Standart protokollerin belirlenmesi ile birlikte bu invazif olmayan işlem rutin kullanım alanına girecektir.

Kell kan grubu sistemi ve trombosit HPA-1a antijeninin fetal tiplendirmesi de önemlidir. Bu antijenlerin kalıtımı, genin varlığı veya yokluğundan ziyade tek nükleotid polimorfizmi ile belirlenir. Fetal DNA kaynağı olarak amniyosit tercih edilir.

H. Reaktanlar ile yapılan serolojik tiplendirmedeki uyumsuzlukların çözümü

Eritrositler, farklı monoklonal antikorlar ile test edildiğinde serolojik tiplendirmede uyumsuzluklar oluşabilir. Özellikle D antijeni tiplendirmesinde bu tarz sorunlar sık görülür. Çünkü çok sayıda farklı RHD geni, D antijeninin sunumunu, potansiyelliğini, yapısını ve epitoplarını belirlemede rol alır. Yüzden fazla RHD geni olduğu bilinmektedir. Bu genlerin 50'si zayıf D'nin farklı formlarını, yaklaşık 40'ı parsiyel D antijenlerini ve çok sayıda RHCE geni ise RhCE proteini üzerindeki D epitoplarını kodlamaktadır. Piyasadaki reaktanların içinde bulunan farklı monoklonal antikor klonları, bu varyant D antijenleri ile farklı reaksiyon gösterirler. D antijen ekspresyonundaki değişkenlik, antikor klonu, test yöntemindeki farklılıklar (tüp yöntemi, katı faz, jel, otomatik analizatör, vb) bu uyumsuzluklara neden olabilir. Genotiplendirme ile bu sorun çözülebilir.

Yüzden fazla farklı ABO alleli rapor edilmiştir. Birçok farklı mutasyon, antijen azalmasına neden olarak A ve B alt gruplarının oluşumuna neden olur. Bazı non-delesyonel O allelleri ise çok zayıf A antijen sunumuna yol açar. Böyle durumlarda antijen seviyesi azalmış veya zayıf iken izohemaglutinin düzeyi tespit edilemez. ABO tiplendirmesinde uyumsuzluk oluşur. Aynı Rh tiplendirmesinde olduğu gibi, piyasada bulunan farklı monoklonal antikorlar da zayıf A ve B alt grupları ile farklı reaksiyon verirler. Bu da sonuçlarda belirsizliğe yol açabilir. Ayrıca edinsel ABO fenotiplerini kalıtsal fenotiplerden ayırmak bazen mümkün olmayabilir. Tüm bu hallerde genotip tayini uyumsuzluğun çözümünü sağlamaktadır.

I. Zayıf D ile kısmi D ayrımının yapılması

Daha önce bahsedildiği gibi, D antijen sunumunda değişiklik nadir görülen bir durum değildir. Zayıf D, tek aminoasit değişikliği sonucu membrandaki protein miktarının etkilenmesi ile oluşur. Böylece eritrosit yüzeyindeki D antijenik bölgesi sayı olarak azalır. Parsiyel D'de ise, D epitoplarını değiştiren aminoasit değişiklikleri bulunur. Bunlar çoğunlukla RhCE parçalarına bağlı olan hibrid proteinlerdir. Zayıf D ile kısmi D arasında fenotipik ayırım yapılması klinik önem taşır. Çünkü kısmi D, anti-D oluşumuna yol açabilir. Rutin serolojik tiplendirmede kullanılan reaktanlar bu ayrımı yapmakta yetersiz kalır. Ancak genotiplendirme sayesinde bu ayırım sağlanabilir.

İ. Donasyon merkezinde eritrosit ürünlerinin fenotiplendirilmesi

Transfüzyon tıbbındaki şu anki genel uygulama ABO ve D antijenlerinin uygunluğuna bakmak şeklindedir. Ancak alıcıda alloantikör varlığında veya orak hücreli anemi gibi kronik transfüzyon uygulanan hastalarda, çoklu antijen negatif eritrosit istemi yapılabilmektedir. Kronik transfüzyon tedavisi gerektiren hastalıklarda alloimmünizasyon gelişme olasılığı %5 civarındadır. Ancak orak hücreli anemi hastalarında bu oran %20'lerin üzerine çıkmaktadır. Orak hücreli anemi hastalarında oluşan çok sayıda alloantikora uygun antijen negatif kanın bulunması problem haline gelebilir. Birçok transfüzyon programında orak hücreli anemi hastalarına transfüze edilecek olan eritrositler, alloantikör sıklığını ve riskini azaltmak için D, C, E ve Kell antijenleri açısından karşılaştırılır. Buna rağmen Rh allellerinin kodladığı D, C, E antijenlerine karşı sıklıkla alloantikör gelişir. Konvansiyonel Rh karşılaştırmasına rağmen alloantikör gelişmesi, orak hücreli anemi hastalığının sık görüldüğü ırkta aynı zamanda varyant RHD ve RhCE genlerine sık rastlanması ile ilişkilidir. Multipl alloantikörleri olan alıcılara antijen negatif olan uygun eritrositlerin temin edilmesi güç olup, kan bankalarında defalarca fenotiplendirme işleminin uygulanması gerekmektedir. Taranan ürünlerin sayısı, antijen prevalansı ve negatif olması gereken antijen sayısı ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Bu durum ise, kan merkezine göz ardı edilemeyecek bir yük getirmektedir. Laboratuvar teknisyenlerinin zamanı, eritrosit stoğu ve uygun reaktanların temini gibi...

"Mass-scale" genotiplendirme işlemleri sayesinde daha çok sayıda hastaya genotip/fenotip uygunluğuna sahip kan temin edilebilir ve kaliteli bir sağlık hizmeti verilebilir. Fenotipi uygun ürünlerin sağlanmaya çalışılmasındaki temel amaç, alloantikör gelişimini ve bunun sonucunda oluşacak hemolitik transfüzyon reaksiyonlarını önlemektir. Bu işlem rutinde uygulanırsa, donasyon ve transfüzyon merkezi için şu anki tabloyu içinden çıkılmaz bir hale getirebilir. Bunun yerine kronik transfüzyon tedavisi uygulanan ve alloantikör geliştirme riski yüksek hastalarda kullanılabilir. Fenotipi uygun ürünler C, E, K antijenleri ile sınırlı tutulabilir veya genişletilip Fy^a, Jk^a, Jk^b, S ve başka antijenler de eklenebilir. Amerikan nadir donör programına (ARDP) 30.000 aktif gönüllü kan bağışçısı kayıtlıdır. Bu liste AABB ve Amerikan Kızıl Haç'ı tarafından oluşturulmuştur. Bu kişilerin sahip olduğu kan grupları, toplumda 1:10000 oranında görülür. Ancak bu program ile elde edilen ürünlerin çoğu ABD'nde kullanılmaktadır. Bu ürünlerin oluşturulmasında yukarıda bahsedilen moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Ayrıca ISBT de bir nadir donör programı yürütmektedir ve bu program uluslararası kan grubu referans laboratuvarı tarafından işletilmektedir. "Large-scale" genotiplendirme yöntemleri sayesinde bu eritrosit ürünleri ve buna sahip donörler daha kolay ve sık saptanabilir.

Moleküler test metodları kan bankaları ve transfüzyon tıbbi alanında son on yıldır kullanılmaktadır. Bu süre içinde gerçekleştirilen çalışmalar; kan gruplarının genotip-fenotip ilişkisini veya farklı etnik topluluklarda eritrosit antijenlerindeki genotipik değişiklikleri açıklamaya yönelik olmuştur. Hedef genlerin validasyonu, araştırılması ve farklılıkların açıklanmasında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir.

ABO ve Rh kan grubu sistemlerinde moleküler yöntemlerin kullanılması ile çok sayıda A ve B alt grubuna ve inaktif O kan grubuna neden olan mutasyonlar, Rh varyant ve hibrid Rh genleri bulunmuştur.

Yüz yılı aşkın süredir kan grubu antijenlerinin tanımlanmasında kullanılan hemaglutinasyon yöntemi, özellikle yukarda bahsi geçen alanlarda yerini moleküler yöntemlere bırakmaktadır. İlk kuşak moleküler yöntemler RFLP ve “allele specific assay” idi. Bu yöntemler, örneğin PCR işlemi ile çoğaltılmasına ve jel elektroforezinde yürütülmesine ihtiyaç duyuyordu. Zaman alıcı ve yoğun emek gerektiren bu teknik yerini artık “real-time” PCR yöntemine bırakmıştır. Bu teknik ile tek bir kapalı tüp içinde birçok kan grubu sisteminin çoğaltılması ve “automated fluorescence discrimination of alleles” ile de çoğalmış olan bu gen bölgelerinin analizi sağlanmaktadır. Böylece çok sayıda örneğin kısa sürede moleküler analizi yapılabilmekte, genotipi ortaya konulmakta ve moleküler tekniklerin kan bankacılığında yaygın kullanımındaki en büyük engel olan zaman sorunu aşılmaktadır. Moleküler yöntemlerin transfüzyon tıbbında yaygın olarak kullanımı ile ilerde alloimmünizasyon dahil birçok alanda önemli gelişmeler sağlanacağı kaçınılmaz bir gerçektir.

Kaynaklar

1. Chiu RW, Murphy ME, Fidler C, et al. Determination of RhD zygosity; comparison of a double amplification refractory mutation system approach and a multiplex real-time quantitative PCR approach. *Clin Chem* 2001; 47: 667-72.
2. Colin Y, Cherif-Zahar B, Le Van Kim C, et al. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood* 1991; 78: 2747-52.
3. Daniels G, Gren C, Smart E. Differences between RhD- negative Africans and RhD-negative Europeans. *Lancet* 1997; 350: 862-3.
4. Daniels G, van der Schoot CE, Olsson ML. Report of the First International Workshop on molecular blood group genotyping. *Vox Sang* 2005; 88: 136-42.
5. Denomme GA, Van Oene MM. High-throughput multiplex single-nucleotide polymorphism analysis for red cell and platelet antigen genotypes. *Transfusion* 2005; 45: 660-6.
6. Gautier E, Benachi A, Giovannardi Y, et al. Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two- year experience. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 666-9.
7. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485-7.
8. Molecular methods in immunohematology. *Transfusion* 2007; 47:10s-16s.
9. Petrik J. Microarray technology: the future of blood testing? *Vox Sang* 2001; 80: 1-11.
10. Reid ME, Rios M, Powell VI, et al. DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. *Transfusion* 2000; 40: 48-53.
11. Reid ME. Applications of DNA-based assays in blood group antigen and antibody identification. *Transfusion* 2003; 43: 1748-57.
12. Storry JR, Westhoff CM, Charles-Pierre D, et al. DNA analysis for donor screening of Dombrock blood group antigens. *Immunohematol* 2003; 19: 73-6.
13. Van der Schoot CE, Soussan AA, Koelewijn J, et al. Non-invasive antenatal RhD typing. *Transfus Clin Biol* 2006; 13: 53-7.
14. Wagner FF, Gassner C, Muller TH, et al. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999; 93: 385-93.
15. Wenk RE, Chiafari PA. DNA typing of recipient blood after massive transfusion. *Transfusion* 1997; 37: 1108-1110.
16. Westhoff CM. Molecular testing for transfusion medicine. *Current Opinion in Hematology* 2006; 13: 471-5.
17. Westhoff CM. Review: The Rh blood group D antigen.. dominant, diverse and difficult. *Immunohematology* 2005; 21: 155-63.

PNL5

İMMÜN SİSTEMİ BASKILANMIŞ HASTALARDA TOXOPLASMOSIS TANISINDA MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Prof. Dr. Yüksel GÜRÜZ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, 35100, İzmir.

İmmün sistemi baskılanmış hastalarda (organ ve kemik iliği transplantasyon alıcıları, kemoterapi alanlar, kortikosteroid tedavisi uygulananlar, vb), toxoplasmosis hayatı tehdit eden kliniklere yol açabilmektedir. Günümüzde ileri teknoloji ve bilimsel ilerlemeler sayesinde pek çok organ ve dokunun transplantasyonu başarıyla yapılmakta ve bu sayede transplantasyon uygulanan hasta sayısı hızla artmaktadır. Transplantasyonu takiben “Graft-versus-host” (GVH) hastalığı riskini önlemek için uygulanan yoğun immünosüpresyon sıklıkla toxoplasmosis reaktivasyonuna, nadiren de primer toxoplasmosis gelişmesine zemin hazırlamaktadır. Hücresel ve humoral immünitinin baskılanması ile *T.gondii*’ye karşı savunma mekanizmasının çalışmaması, klinik tablonun şiddetinin artmasına sebep olur. Yoğun immünosüpresyon uygulanan hastalarda humoral immün yanıtın baskılanması sonucu, reaktivasyona bağlı olarak IgG antikor cevabında anlamlı bir artış ortaya çıkmamakta, hatta IgG düzeyinde azalma saptanabilmektedir. Primer enfeksiyonlarda ise IgM antikor yanıtı oluşmamakta, veya oluşan yanıt testin eşik (cut-off) düzeyinin altında kalabilmektedir. IgG antikor yanıtı, hastalığın erken döneminde rutin serolojik testler ile saptanacak seviyeye ulaşmadığından yanlış negatif sonuçlara sebep olmaktadır. Sonuçta, toxoplasmosis immün sistemi baskılanmış hastalarda, tanısal zorluklar nedeniyle tedavide gecikmeye ve nihayetinde yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olmaktadır.

Transplantasyon sonrasındaki değerlendirmelerde primer enfeksiyon veya reaktivasyonun saptanmasında duyarlılığı ve özgüllüğü sınırlı kalan serolojik testler yerine direk tanı tekniklerinin tercih edilmesi gerektiği belirtilmektedir. Bu amaçla en sık kullanılan direk tanı testi PZR’dir. Bu hasta grubunda özgül IgM saptanmasının yanında, örneklerin PZR ile pozitif bulunmasının anlamlı olduğu ileri sürülmektedir.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Moleküler Parazitoloji laboratuvarında immünosüpresyon uygulanan kök hücre ve karaciğer transplantasyon hastaları ilk defa dört ay boyunca düzenli aralıklarla “nested” PZR, “real-time” PZR ve serolojik yöntemlerin birlikte kullanılması izlenmiştir. Toxoplasmosis sıklığının her iki PZR testinin bir arada kullanılmasıyla kök hücre transplantasyon hastalarında %23.3 (7/30) ile literatürdeki en yüksek oranda bulunması ve karaciğer transplantasyon hastalarında elde edilen %10’luk (3/30) oranın bu konuda elde edilen ilk veri olarak literatüre geçmesi sağlanmıştır. PZR pozitif saptanan hastaların ancak %20’sinde IgG, %30’unda da IgM pozitifliği saptanabilmiştir. Allojenik kök hücre transplantasyonu yapılan hastaların üçünde akut GVH hastalığı gelişmiş ve bu nedenle uygulanan yoğun immünosüpresyon ve trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMX) profilaksisi kesilmiştir. Bunu takiben, hastalarda PZR pozitifleşmiş, profilaksinin tekrar başlanmasıyla izlemlerde PZR sonuçlarının negatifleştiği görülmüştür. Sonuç olarak bu çalışmada transplantasyon hastalarında toxoplasmosis profilaksisinin herhangi bir sebeple kesilmesiyle, hastaların düzenli aralıklarla “real-time” ve “nested” PZR ile birlikte izlenmesinin erken tanı, tedavi ve tedavinin etkinliğinin izlenmesinde fayda sağlayacağı, immün sistemi baskılanmış hastalarda serolojik takipten ziyade PZR sonuçlarının ön planda tutulmasının hasta lehine olacağı ortaya konulmuştur.

LEISHMANIASIS TANISINA VE PARAZİTLERİN TÜR TAYİNİNE MOLEKÜLER YAKLAŞIM

Prof. Dr. Seray ÖZENSOY TÖZ

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

Leishmania parazitleri, mitokondrilerinde DNA içeren "kinetoplast" yapısı ile tanımlanan kamçılı protozoon parazit grubu içerisinde yer almaktadır. *Leishmania* parazitlerinin etkeni olduğu leishmaniasis, tedavisiz kendiliğinden iyileşen derideki bir yaradan (kütanöz leishmaniasis; KL), ölüme yol açabilen sistemik hastalığa (visseral leishmaniasis; VL) kadar uzanabilen bir hastalıklar grubudur. Dünya genelinde 20'den fazla *Leishmania* türü bu hastalıklara neden olmaktadır.

Leishmaniasis tanısında kullanılan yöntemler, avantaj ve dezavantajları ile birlikte aşağıda karşılaştırılmıştır:

Mikroskop ve kültür: Parazit boyutlarının çok küçük olması nedeniyle mikroskopik bakışı deneyim gerektirmektedir; parazitin kültürü ise yine deneyim gerektirmesinin yanı sıra zahmetli ve zaman alıcıdır. Bu yöntemlerin uygulanabilmesi için parazitin yerleştiği organdan örnek alınması gereklidir (VL de kemik iliği aspirasyonu, KL ve mukokütanöz leishmaniasis de (MKL) lezyon aspirasyonu gibi). Tanıdaki hassasiyetleri VL de serolojik ve moleküler yöntemlere göre, KL de ise moleküler yöntemlere göre daha düşüktür. Kültürün avantajı parazitin izole edilebilmesidir. Parazit izole edilebilirse referans laboratuvarına gönderilerek daha sonra izoenzim analizi ile parazitin tür tayini yapılabilmektedir. Tedavi takibinde hassasiyetleri parazit sayısının azalması ile birlikte diğer yöntemlere göre daha da düşmektedir ve VL de tekrarlayan kemik iliği aspirasyon uygulaması serolojik yöntemlere göre daha invazifdir.

Serolojik yöntemler: 1980'li yıllardan itibaren yüksek hassasiyet ve özgüllükleri ile direk tanının yanında önem kazanmışlardır. Rekombinant bir proteinin üretimi ile birlikte hızlı tanı testi (rK39 dipstick) tüm dünyada standart olarak uygulanabilir hale gelmiş, ancak yapılan çalışmalarda hastalığı oluşturan *Leishmania* türüne göre değişen farklı hassasiyet oranları elde edilmiştir. Yüksek hassasiyetin elde edildiği *Leishmania* türünün bulunduğu ülkelerde, rutin laboratuvarlarda ve sahada uygulama kolaylığı avantaj sağlamaktadır. Serolojik testler ile tedavi takibinde, antikor titrelerinin uzun süreli pozitif kalması nedeniyle ancak hastadan alınan ardışık serumların paralel çalışılması ile sonuç alınabilmektedir. Bu da hasta serumlarının uzun süreli saklandığı laboratuvarlarda mümkün olabilmektedir. İdrar örneğinde antijen saptama yönteminin hassasiyetinin saptanmasına yönelik çalışmalar halen farklı bölgelerde devam etmektedir.

Moleküler yöntemler: Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) şu anda dünyada leishmaniasis tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır ve klasik tanı yöntemleriyle PZR sonuçlarının karşılaştırıldığı bir çok araştırma yayınlanmıştır. Direk tanı olarak kabul edebileceğimiz parazit DNA'sının saptanabilme hassasiyeti, serolojik yöntemlerin düzeyine yükselmiş ve hatta üzerine çıkmıştır. VL de kemik iliği aspirasyon ve doku örneklerinin yanı sıra kan "buffy coat" örneğinde de çalışılabilmektedir. Nükleer ve kinetoplastik DNA, intergenik ve protein kodlayan DNA bölgelerini hedefleyen çok sayıda PZR yöntemi geliştirilmiştir. Yöntemlerin çoğu *Leishmania* cinsine özgül olup PZR-RFLP (PZR ve restriksiyon enzim analizi) gibi bazıları da diğer yöntemlerin eklenmesiyle etken olan *Leishmania* türünün tanımlanmasını da sağlamaktadırlar. PZR ve oligokromatografiyi kombine eden moleküler dipstick testlerinin geliştirilmesi için çalışmalar sürdürülmektedir. Son yıllarda kantitatif nükleik asit dizi tespitine dayalı amplifikasyon (QT-NASBA) ve gerçek zamanlı PZR yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler yüksek

hassasiyet ve özgüllüklerinin yanı sıra, ilaç tedavisi sırasında parazit yükünün takibini ve ilaç direncinin hızlı tanımlanmasını da sağlamaktadırlar. Tedavi takibinde “buffy coat” örneklerinin kullanılması nedeniyle, kemik iliği mikroskopisinin ve ardışık serum örneklerin saklanması gibi zahmetli ve invazif olan klasik yöntemlere göre avantaj sağlamaktadır. Antikor yanıtının düşük olabildiği immün yetmezlikli hastalarda da (HIV+VL gibi) tanıda serolojik yöntemlere göre avantaj sağlamaktadır. Donanımlı bir laboratuvar gerektirmesi nedeniyle her rutin laboratuvarda uygulanamamaktadır^{4-6,13}.

Türkiye’de VL ve KL olmak üzere hastalığın iki tipi görülmektedir. Aşağıda belirtilen nedenlerden dolayı leishmaniasis ülkemizde giderek daha büyük önem kazanmaktadır:

- Ülke içerisindeki göçlerin artışı ile birlikte parazitlerin epidemik/endemik olduğu bölgeden diğer bölgelere taşınması,
- Küresel ısınma sonucu meydana gelen sıcaklık artışı nedeniyle kum sineklerinin vektörlük yapabildiği sürenin uzaması ve görüldükleri yüksekliklerin artması,
- Serolojik yöntemlerin gelişmesiyle birlikte hastalığın daha kolay tanınır ve düşünülür hale gelmesi,
- VL’in en önemli rezervuarı olan köpeklerin insanlara göre çok daha fazla oranda enfekte olması ve ülkemizde “canine leishmaniasis” (CL) prevalansının hemen tüm bölgelerimizde yüksek olması,
- Köpeklerdeki hastalığın önemli bir oranda asemptomatik seyretmesi ve hasta olabileceğinin fark edilmemesi (parazit kaynağı olabileceğinin anlaşılamaması),
- Ülkemizde görülen KL’in büyük oranda tedavisiz kendi kendine iyileşebilmesi nedeniyle, özellikle gelir düzeyi düşük hasta gruplarında, hastaların tedavi konusunda ısrarcı olmamaları ve kaynaklık etmeye devam etmeleri,
- VL’in, bağışıklık sistemi henüz gelişmemiş olan çocuklarda ve yine bağışıklık sistemi iyi gelişmemiş gelir düzeyi düşük iyi beslenemeyen ve hijyenik olmayan koşullarda yaşayan kişilerde daha yaygın olarak görülmesi ve bu hastaların tanı için gerekli olan ileri düzeyde laboratuvar testlerinin uygulandığı sağlık kuruluşlarındaki hizmete ulaşmalarının zorluğu,
- VL ve KL klinik bulgularının diğer bir çok hastalığa benzemesi nedeniyle hastaları ilk gören hekimlerin (özellikle endemik bölge dışında) hastalığı öncelikle düşünmemesi, ancak hastaların uygulanan diğer tedavilere yanıt vermemesi üzerine ayırıcı tanıda akıllarına gelmesi,
- Tanı konan olguların genellikle yayınlanmaması nedeniyle hastalığın ülkemiz genelinde olduğundan daha düşük oranlarda görüldüğüne dair yanlış bir genel kanı bulunması,
- Leishmaniasis’in direk parazitolojik tanısının deneyim gerektirmesi ve Türkiye genelinde rutin sağlık hizmetinde çalışan yeterli sayıda parazitoloji uzmanı bulunmaması.

Ülkemizde VL ve KL tanıları klasik olarak kemik iliği ve deri lezyonundan hazırlanan Giemsa ile boyanmış yayma preparatların mikroskopik bakışı ile konmaktadır. “In-house” olarak hazırlanan IFAT ile tanı, belirli merkezlerde uygulanmaktadır. rK39 dipstick testi ticari olarak satılmaktadır ve son yıllarda giderek daha fazla sayıda merkezde kullanılırken, parazit izolasyonu için NNN besiyeri ve mikrokültür yöntemleri ile moleküler tanı yöntemleri henüz araştırma amaçlı olarak kullanılmaktadır¹⁻³.

Yukarıdaki tüm nedenleri bir arada düşünecek olursak, elimizde tanı için yüksek hassasiyet gösteren serolojik yöntemler bulunmaktadır. Uzmanlık gerektiren direk tanı ise, yine serolojik yöntemlerde olduğu gibi kişisel deneyimden çok teknolojiye dayalı ve standardize edilmiş yüksek hassasiyette yöntemlerin uygulanması gerekmektedir. Bu testlerin ekonomik olarak ülkeye getireceği yükün, bu konuda donanımlı merkezlerde yapılması ile aşılabilmesi mümkündür. PZR yöntemi, direk tanıdaki deneyimli uzman gereksinimini en aza indirerek bu konuda yararlı olabilir.

Türkiye’de leishmaniasis alanında tanı ve araştırma amaçlı bugüne kadar yapılan moleküler çalışmalar aşağıda sıralanmıştır:

- Türkiye’de üç ayrı merkezde uygulanan çalışmalar sonucunda, 13A-13B primerlerinin kullanılarak *Leishmania* kinetoplastik DNA’sının sabit bir bölümünün hedeflendiği PZR yöntemi ile VL/KL hastaları ile CL tanısında bir parazitin bile saptanabildiği, yüksek duyarlılığa ulaşılmış, yöntemin tedavi izleminde de çok yararlı olduğu belirtilmiştir⁷⁻⁹. Bu primerler, yurtdışında da leishmaniasis’in PZR ile tanısında en hassas primerlerden birisi olarak gösterilmektedir¹⁰.
- *Leishmania* izolatları kullanılarak optimize edilen *ssu rRNA* gen bölgesinin hedeflendiği “real-time” PZR yöntemi, CL tanısında seroloji ve 13A-13B PZR yöntemleri ile karşılaştırılmıştır.
- Adana ili çevresindeki VL/KL hastalarında, *Leishmania* mini-ekzon gen bölgesi, PZR ile çoğaltıldıktan sonra “EaeI” restriksiyon enzimi ile kesilmiştir (PZR-RFLP). Bu yöntem ile ülkemizde *L.tropica*’nın yanı sıra *L.infantum*’un da KL’ye neden olduğu, *L.infantum*’un ayrıca VL etkeni olduğu saptanmıştır³. Bu yöntem, bir çalıştayda Türkiye genelinde katılan araştırmacılara uygulamalı olarak sunulmuştur.
- Farklı bölgelerimizden VL/KL izolatlarının ribozomal ITS bölgesi PZR ile çoğaltıldıktan sonra “Taq I” enzimi kullanılarak PZR-RFLP yönteminin uygulandığı bir çalışmada, *L.tropica* ve *L.infantum*’un birbirinden ayrılabilirdiği gibi, Uluslararası Referans merkezinde izoenzim analizi ile bu türler içerisinde saptanan tür içi farklılıklar da analiz edilebilmiştir¹².
- Şanlıurfa ili KL olgularının da dahil edildiği yurtdışında uygulanan bir çalışmada, kantitatif nükleik asit sekansına dayalı amplifikasyon (QT-NASBA) yönteminin *Leishmania* tanısı ve parazit kantitasyonundaki verimliliği araştırılmıştır. *ssu rRNA* geninin hedeflendiği QT-NASBA yöntemi ile en az iki parazitin saptanabildiği ve parazit miktarının kantitatif olarak belirlenebildiği bildirilmiştir. Araştırmacılar, yöntemin tanı ve tedavi izleminde kullanılabileceğini belirtmişlerdir¹¹.

Daha çok tanıya yönelik olmak üzere, gerek leishmaniasis’de gerekse diğer parazitler hastalıklarda moleküler yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı’nda bir Moleküler Parazitoloji Laboratuvarı kurulmasının gerekliliği ortaya çıkmıştır. Buradan yola çıkarak oluşturulan laboratuvar ile;

- Ulusal ve uluslararası alanda laboratuvarlar arası işbirliği çok daha kolay ve üst düzeyde gerçekleşebilecek,
- Sarf malzemesi, makina-teçhizat ve personelin ortak kullanılması ile ciddi anlamda bir tasarruf sağlanacak ve rutin hizmetler daha uygun bir şekilde verilebilecek,
- Standardizasyonun sağlanması çok daha kolay olabilecek,
- Proje yazımı ve alınmasında kolaylıklar sağlanacak,
- Bitirilen çalışmaların en önemli ürünü olan makalelerin hazırlanması kolaylaşacaktır.

Her anlamda güçbirliğinden elde edilecek birçok yararın, kuşkusuz ülkemizdeki parazitoloji alanında da ciddi faydalar sağlayacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Gurel MS, Ulukanlıgil M, Ozbilge H. Cutaneous leishmaniasis in Sanliurfa: epidemiologic and clinical features of the last four years (1997-2000). Int J Dermatol 2002; 41: 32-7.
2. Toz SO, Chang KP, Ozbel Y, Alkan MZ. Diagnostic value of rK39 dipstick in zoonotic visceral leishmaniasis in Turkey. J Parasitol 2004; 90:1484-6.

3. Serin MS, Daglioglu K, Bagirova M, et al. Rapid diagnosis and genotyping of *Leishmania* isolates from cutaneous and visceral leishmaniasis by microcapillary cultivation and polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism of miniexon region. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53: 209-14.
4. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 2004; 27: 305-18.
5. World Health Organization. World Health Report, pp: 186-91. 2002. WHO, Geneva.
6. Salotra P, Singh R. Rapid and reliable diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2005; 122: 464-7.
7. Özensoy Töz S, Özbek Y, Atay MG ve ark. İnsan ve köpeklerden alınan klinik örneklerle leishmaniasis tanısı için PZR uygulanması. *T Parazitol Derg* 2002; 26: 239-44.
8. Ergin M, Erdogan S, Gumurdulu D, Tuncer I. Cutaneous leishmaniasis: evaluation by polymerase chain reaction in the Cukurova region of Turkey. *J Parasitol* 2005; 91: 1208-11.
9. Culha G, Uzun S, Ozcan K, Memisoglu HR, Chang KP. Comparison of conventional and polymerase chain reaction diagnostic techniques for leishmaniasis in the endemic region of Adana, Turkey. *Int J Dermatol* 2006; 45: 569-72.
10. Nasereddin A, Eregat S, Azmi K, Baneth G, Jaffe CL, Abdeen Z. Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Paletsine. *J Parasitol* 2006; 92:178-83.
11. van der Meide WF, Schoone GJ, Faber WR, et al. Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5560-6.
12. Güneş K. Klinik örneklerde PZR-RFLP yöntemi kullanılarak *Leishmania* parazitlerinin tür tayini. Doktora Tezi, 2006. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
13. Jaffe CL. Advances in molecular diagnosis of leishmaniasis. Annual Meeting of Israel Society for Parasitology, Protozoology and Tropical Diseases and The Second Regional Leishmaniasis Workshop. 2007, Tel Aviv, Israel.

MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN TRICHOMONIASIS TANISINA GETİRDİĞİ YENİLİKLER

Doç. Dr. Hatice ERTABAKLAR

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın.

Kamçılı bir protozoon olan *Trichomonas vaginalis*, cinsel yolla bulaşan hastalıkların viral etkenlerden sonra en sık nedenidir. Dünyada yaygın olarak görülmekte ve Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre yılda 170 milyon kişinin bu parazitle enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Enfeksiyon sıklıkla vajinit, uretrit ve prostatite sebep olmakta, aynı zamanda pelvik inflamatuvar hastalık ve tübal infertilite riskini artırabilmektedir. Trichomoniasis'in gebelikte de önemli olduğu, erken doğum ve düşük doğum ağırlıklı bebek doğumlarına yol açtığı bilinmektedir. Ayrıca servikal kanser oluşumunda predispozan etkisi olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise *T.vaginalis*'in özellikle HIV-1'in geçişini artırdığı ileri sürülmektedir.

Trichomoniasis tanısında tanımlanan pek çok yöntem [direk mikroskopi, kültür, hücre kültürü, floresan antikör testi, lateks aglütinasyon, PAP smear, boyama yöntemleri (Gram, akridin oranj,vb), ELISA, DNA prob, PZR, vb] olmasına karşın, ülkemizde ve tüm dünyada kullanılan en yaygın tanı yöntemi direk mikroskopi (DM)'dir. Halen kültür yöntemi, uzun zaman (2-7 gün) ve deneyim gerektirir de "altın standart" olarak kabul edilmekte, ancak sadece belirli merkezlerde uygulanabilmektedir. Bu yöntemlerin her ikisinde de canlı mikroorganizmalar saptandığından duyarlılıklarının düşük olduğu ve gelişmelerin hız kazandığı çağımızda daha duyarlı ve daha hızlı tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir.

T.vaginalis izolatlarının yüksek oranda fenotipik varyasyon göstermesi nedeniyle ekspresyon seviyesinde ve/veya genomik sekanslarında farklılıklar gösterdiği ve bu nedenle PZR bazlı tanı yöntemlerinin geliştirilmesini zorlaştırdığı bilinmektedir. PZR bazlı tanı testleri 1992 yılında ilk olarak denendikten sonra geliştirilmiş ve dezavantajları aşılmaya çalışılmıştır. Henüz tüm dünyada araştırma amaçlı olarak kullanılmakta, rutin olarak kullanılmamaktadır. Değişik araştırmacılar tarafından her geçen gün yeni PZR teknikleri (klasik PZR, TaqMan real-time PZR, Real-Time Roche Light Cycler, nested PZR, PZR-ELISA, vb) bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda, kültür yönteminin duyarlılığının PZR ile karşılaştırıldığında %35-78 arasında değiştiği, özgüllüğünün ise %100 olduğu bildirilmektedir. Benzer olarak DM'nin özgüllüğünün genellikle yüksek olduğu, buna karşın duyarlılığının PZR ile karşılaştırıldığında zayıf olduğu ve %34.2 ile %58.5 arasında değiştiği bildirilmektedir.

PZR yönteminde değişik araştırmacılar tarafından değişik primerler tanımlanmıştır. Genellikle DNA'nın sık tekrar eden bölümlerinin hedef olarak seçildiği primerler tercih edilmektedir. 1992 yılında *T.vaginalis* tanısında genomik A6p sekansından seçilen TVA5-TVA6 (112 bp) primerlerinin kullanımından sonra pek çok araştırmacı tarafından primerler geliştirilmiştir. Bu primerler ile yapılan çalışmalarda duyarlılıklarının %85-100 arasında değiştiği bildirilmiştir. Daha sonra geliştirilen primerlerden en yaygın olarak kullanılanlar ve en yüksek saptama oranına sahip olanlar, DNA fragmanının 2000 baz çiftlik sık tekrar eden bölümünün içinden seçilen *T.vaginalis*'e özgül oligonükleotid primerler olan TVK3 ve TVK7'dir. Bu primerler geliştirilirken, insan DNA'sı ve diğer enfeksiyon ajanları ile reaksiyona girip girmedikleri test edilerek incelenmiş ve hiçbir reaksiyona girmediği belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarda bu primerlerin tek bir paraziti bile saptadıkları ifade edilmektedir.

Primer seçiminde diğer bir hedef bölge olarak β -tubulin geni seçilebileceği ve bu bölgeden (β TUB; β tub1, β tub2 ve β tub3) seçilerek hazırlanan çok sayıda değişik primerlerin de kullanıldığı

bildirilmiştir. Fakat bu bölgeden seçilen primerlerin de suş farklılıklarından dolayı bazı hastaları saptayamadığı bildirilmiştir. Ayrıca ribozomal RNA geninin 18S alt ünitesini saptayan TV1-TV2 primerleri de kullanılmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar “real-time” PZR üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu yöntemin avantajı, PZR sonrası amplikonlar ile işlem uygulanmaması ve böylece amplikon kontaminasyonunun engellenmesidir. Ayrıca işlemlerin 2.5 saat gibi kısa bir sürede tamamlanabildiği bildirilmiştir. Kültür ve DM ile karşılaştırıldığında, duyarlılığının yüksek olmasına karşın tanı ve tarama testi olarak kullanılabilirliği araştırılmaktadır. Bu teste diğer cinsel yolla bulaşan mikroorganizmaları saptayan sistemin eklenmesi ile, yüksek risk gruplarında tarama açısından oldukça avantajlı olabileceği düşünülmektedir.

Trichomoniasis tanısı için hem kadın hem erkekte değişik örnekler kullanılabilmektedir ve kullanılan testlerin duyarlılık ve özgüllükleri kullanılan örneğe bağlı olarak değişmektedir. En yaygın kullanılan örneğin kadınlarda vajina arka forniksinden pamuklu eküvyon ile alınan sürüntü örneği ve erkeklerde ise sabah ilk idrar olduğu bildirilmektedir. Fakat son zamanlarda kadınların kendilerinin evde alabildiği vajinal sürüntü örnekleri giderek yaygınlaşmaktadır.

Ticari olarak temin edilebilen “Affirm VP sistem (MicroProbe Corp, Bothwell, Wash)”, *Gardnerella vaginalis* ve *T.vaginalis*’i saptamak amacıyla kullanılan bir yöntem olup, oligonükleotid prob ile tek bir vajinal örnekten her iki mikroorganizmanın da saptanmasını mümkün kılmaktadır. Bu yöntemin direk mikroskopik incelemeden daha iyi olduğu, ancak kültür ile karşılaştırıldığında yalnızca negatif sonuçların saptandığı bildirilmiştir. Kültür pozitif örneklerle karşılaştırıldığında duyarlılığının %80 olduğu saptanmıştır.

PZR yönteminin pahalı bir yöntem olmasına karşın tanısal duyarlılığı artırdığı ve daha fazla olgunun tedavi edilmesini sağlayarak cinsel yolla bulaşan bu hastalığın etkilerinin ve komplikasyonlarının hafiflemesine yol açarak klinikte önemli bir geri dönüş sağladığı, yapılan çalışmalarda üzerinde durulan önemli bir unsurdur.

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de trichomoniasis yaygın olarak görülmektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, *T.vaginalis* saptanma oranı, incelenen gruba göre değişmekle birlikte %3-70 oranlarında değişen geniş bir aralıktadır. *T.vaginalis* enfeksiyonunun %10-50’sinin asemptomatik olduğu bilinen bir gerçektir. Bu bilgiden yola çıkarak cinsel yönden aktif kadın ve erkeklerde, ayrıca hamile kadınlarda daha yoğun taramaların yapılması gerekliliği doğmaktadır.

Anabilim Dalımızda yapılan bir çalışmada, *T.vaginalis*’e özgül TV-E650-1 klonun sık tekrar eden sekansından seçilen primerlerin (P1, P2), vajinitli olgulardan elde edilen 20 adet *T.vaginalis* suşunu PZR yöntemi ile tanıdığı ve üç parazite kadar saptadığı gösterilmiş olup, diğer parazitlerden *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* ve *Plasmodium vivax* DNA örnekleri ile reaksiyona girmedikleri saptanmıştır. Ayrıca vajinal örneklerden PZR çalışmamız halen devam etmektedir. Bu bilgiler ışığında yapabileceklerimiz şunlardır:

1. Öncelikle en yaygın olarak kullanılan primerler başta olmak üzere yayınlanan primerlerin ülkemizdeki suşları tanıyıp tanımadığı denenmelidir.
2. Laboratuvarımızda elde edilen suşların dizi analizinin yapılması, gen bankasına başvurularak depolanması ve kendi primerlerimizin dizayn edilmesine çalışılmalıdır.
3. Suş bankası oluşturulması, değişik bölgelerden elde edilen izolatların moleküler yöntemlerle karşılaştırılması ve saklanması sağlanmalıdır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, suşlar izole edilmekte ancak pasajları sağlanamadığı için çoğunlukla kaybedilmektedir. Suşların bir merkezde toplanması sağlanabilirse, pasajlarının yapılması ve dondurularak saklanmaları mümkün olabi-

lır. Böylece saklanan suşlar, bilimdeki gelişmelere paralel olarak yeni çalışmalarda kullanılabilir. Ülkemizde referans suşların toplandığı bir bankanın oluşturulması önemli bir gereksinimdir. Nitekim en büyük suş koleksiyonuna sahip ATCC'de 1950'li yıllarda izole edilen suşların saklandığı bilinmektedir. ATCC'den standart her bir suşun temin edilebilmesi için en az 400 dolar ödenmesi gerekmektedir. Ülkemizde kurulacak bir suş bankası, birçok araştırma için (moleküler, genetik, izoenzim, ilaç denemeleri, vb) büyük potansiyel oluşturacaktır.

4. Hastalığın gerçek prevalansını belirleyici çok merkezli çalışmaların yapılması gereklidir.
5. Geliştirilen primerlerin yine Türkiye'nin her tarafından izole edilen suşları tanıyıp tanımadığı test edilmelidir.
6. Her bölgede, en azından üniversite hastanelerinde, referans merkezleri oluşturulup bu merkezlerde referans testler çalışılmalıdır (her merkezde farklı yöntemler ve besiyerleri kullanılabilir).

Sonuç olarak pek çok parazit hastalığında olduğu gibi, ülkemizin büyük olması ve her bölgede parazitoloji alanında yetişmiş uzman olmaması nedeniyle, yapılan çalışmalar ne yazık ki yöresel olarak kalmakta ve ortak bir platform oluşturmakta zorluklar yaşanmaktadır. Buna karşın çalışarak, bilgilerimizi ve deneyimlerimizi paylaşarak bu engelleri aşabileceğimiz umudunu taşımaktayım.

PNL6

METİSİLİNE DİRENÇLİ STAPHYLOCOCCUS AUREUS'UN MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ

Doç. Dr. Abdullah KILIÇ

Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Etlik, Ankara.

Staphylococcus aureus hareketsiz, *Staphylococcus* cinsi içinde bulunan gram-pozitif bir koktur. *S.aureus* hem hastane kaynaklı hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Aseptomatik kolonizasyondan, hayatı tehdit eden çoklu organ yetmezliğine kadar değişebilen klinik tablolar ile kendini gösterebilmektedir. Bakteri sıklıkla akut ve piyoenik enfeksiyonlara neden olmaktadır. Deri enfeksiyonları fronkül, karbonkül, impetigo ve sellülit şeklinde ortaya çıkmaktadır. Eğer organizma kana karışırsa diğer organlara da yayılmakta ve osteomyelit, pnömoni, endokardit, miyokardit, menenjit, santral sinir sistemi enfeksiyonu, abse ve intraabdominal enfeksiyonlar gibi yaygın klinik bulguların oluşmasına neden olabilmektedir. *S.aureus* enfeksiyonları genellikle steril bölgelerde kullanılan kateter ve yabancı cisimler ile ilişkili olarak ortaya çıkmaktadır. Çok sık olarak cerrahi alan enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Bazı *S.aureus* suşları, salgıladıkları toksinler ile besin zehirlenmeleri ve toksik şok sendromu gibi klinik bulguların ortaya çıkmasına neden olmaktadır¹.

S.aureus diğer mikroorganizmalardan daha kolay dirençli hale gelebilme yeteneğine sahiptir. Son 50 yıl içerisinde klinik olarak kullanılan hemen hemen tüm ajanlara karşı direnç kazanmışlardır. Penisilin 1941'de kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra (1944) penisilinaz üreten *S.aureus* suşları bildirilmiştir. Penisilinazlar, 1950 yılında penisilin kullanıma girmeden önce *Escherichia coli* izolatlarında tespit edilmiştir. Penisilinazlar plazmid tarafından kodlanan enzimlerdir ve beta-laktam halkasını parçalayarak penisilin aktivitesini bozmaktadırlar. Bu enzime bu yüzden beta-laktamaz ve bu yapıyı içeren antibiyotiklere de beta-laktam antibiyotikler adı verilmektedir^{1,2}. 1950'li yıllarda, neredeyse tüm dünyada izole edilen *S.aureus*'ların büyük bir bölümü penisilinlere dirençli hale gelmiştir. Çok kısa bir süre içinde bu izolatlar penisilin yanında tetrasiklin, streptomisin ve eritromisine de dirençli hale gelmişlerdir. *S.aureus* izolatlarının hızlı bir şekilde penisilinlere direnç geliştirmesinden sonra penisilina karşı daha stabil olan metisilin ve oksasilin gibi semisentetik penisilin türevleri geliştirilmiştir. Ancak metisilin klinik olarak 1960 yılında kullanıma girmesinden bir yıl sonra Avrupa'da ilk metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) izolatı bildirilmiştir³.

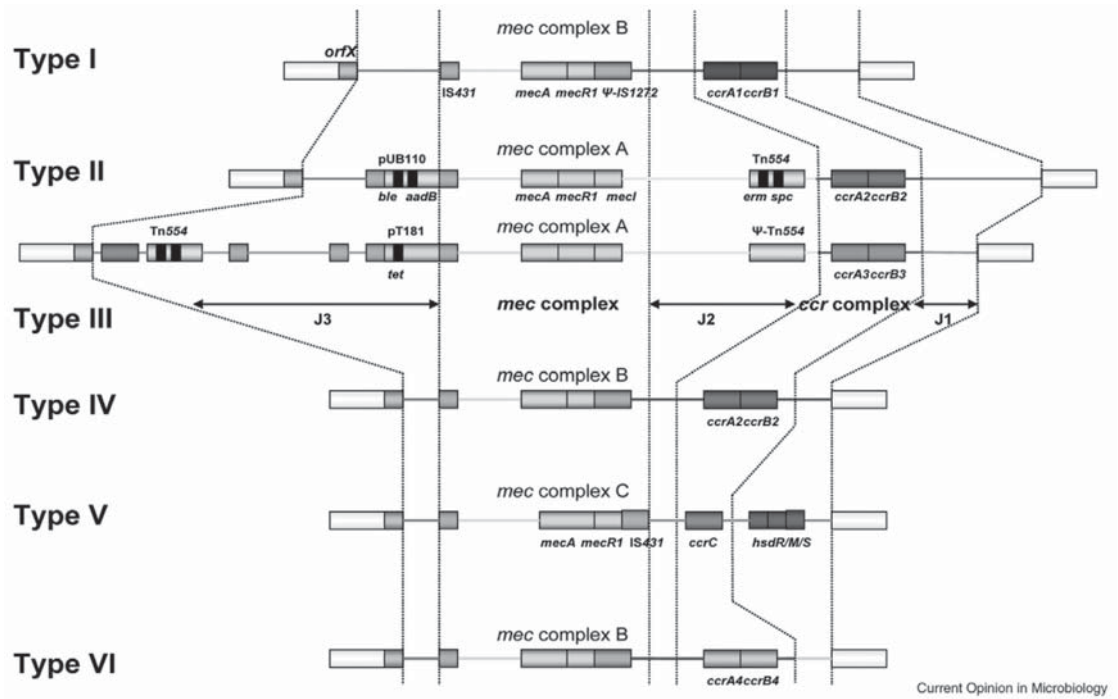
MRSA, beta-laktam antibiyotiklere düşük afiniteli farklılaşmış penisilin bağlayan protein (PBP2a)'yı kodlayan *mecA* geni kazanımı ile oluşmaktadır. *MecA* geni stafilokok kaset kromozom *mec* (SCC*mec*) olarak isimlendirilen mobil yapılar tarafından taşınmaktadır⁴. *S.aureus* suşlarında beklenen zamanlarda vankomisin direnci de bildirilmeye başlanmıştır. Mayıs 1996 yılında Japonya'da bir hastadan izole edilen *S.aureus* izolatında orta düzey glikopeptid direnci (MİK 8-16 µg/ml) bildirilmiştir. Bir yıl sonra New Jersey'de yetişkin diyabetli bir hastanın kan kültüründen, Michigan'da kronik böbrek yetmezlikli ve diyabetli bir hastanın yara kültüründen orta düzey glikopeptid dirençli *S.aureus* izolatı bildirilmiştir. Temmuz 2002 yılında Michigan'da böbrek yetmezlikli, diyabetli ve periferik damar hastalığı olan 40 yaşında bir hastadan vankomisine dirençli (MİK ≥32 µg/ml) *S.aureus* izole edildiği rapor edilmiştir⁵. Bundan iki ay sonra diğer bir vankomisine dirençli *S.aureus* suşu, Pensilvanya'da ayak ülserli, muhtemel osteomyelitli hastadan izole edilmiştir⁶. Her iki vakada da, enterokoklardan kaynaklanan *VanA* geni tespit edilmiştir^{5,6}.

MRSA 1990'lı yıllara kadar hastane enfeksiyonlarından sorumlu iken, hastane veya hastane personeli ile ilişkisi olmayan ve herhangi bir risk faktörü bulunmayan hastane dışı kişilerde de tüm dünyada izole edilmeye başlanmıştır⁷. Mikroorganizmanın yayılımını kontrol etmek için epidemiyolojik çalışmalar yapılmaktadır. Çeşitli moleküler yöntemler MRSA klinik izolatlarının başarılı bir şekilde tiplendirilmesinde, majör klonun belirlenmesinde, yeni epidemik klonların ortaya çıkarılmasında kullanılmaktadır. Bunlar ribotiplendirme, "pulse field gel electrophoresis", PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), *spa* tiplendirme ve MLST (multilocus sequence typing) olarak sayılabilir¹.

MRSA suşlarında direnç, PBP2'a'yı kodlayan *mecA* geni temelinde gelişmektedir. *MecA* geni vahşi ve evcil hayvanların sıklıkla derilerinde kolonize olan beta-laktam duyarlı *Staphylococcus sciuri* suşlarında bulunmaktadır⁸. Bu gen SCC*mec* diye bilinen 21-67 kb uzunluğundaki mobil DNA parçalarında bulunmakta ve bunların vasıtasıyla taşınmaktadır. SCC*mec* yapısı, *S.aureus* kromozomlarının replikasyon bölgesindeki *attB*cc olarak adlandırılan bölgede, *orfX* (fonksiyonu bilinmiyor) geni ile birleşmiş olarak bulunmaktadır. Bu yapı bakteriyofaj, patojenite adaları ve konjugatif transpozonlara yapısal olarak benzerdir. Fakat bunlar yapısal ve virülansdan sorumlu genler içermemektedirler. Sadece beta-laktam veya beta-laktam dışı antibiyotikler için direnç geni taşımaktadırlar. SCC*mec* elementleri, faj transduksiyonu veya diğer genetik transfer sistemleri ile taşınabilmektedir⁹. *S.aureus*'larda iki esas genetik yapı tipine göre şu ana kadar beş farklı SCC*mec* gen kaseti tanımlanmıştır. Bunların ilki "cassette chromosome rekombinase" (*ccr*) gen kompleks bölgesidir ve SCC*mec* gen kaset bölgesinin mobilitesinden yani *S.aureus* kromozomuna girmesi ve çıkmasından sorumludur. Aminoasit tipine göre *ccrA* ve *ccrB* olmak üzere iki tipi ve dört farklı allotipi (*ccrA* için *ccrA1*, *ccrA2*, *ccrA3* ve *ccrA4*, *ccrB* için *ccrB1*, *ccrB2*, *ccrB3* ve *ccrB4*) bulunmaktadır⁸ son zamanlarda *ccrC* olarak üçüncü bir tip bildirilmiştir. *CcrAB* tip I-IV SCC*mec* gen kaset yapısında bulunurken, *ccrC* sadece tip-V SCC*mec* gen kaset bölgesinde bulunmaktadır. *Ccr* gen kompleksleri içinde, sadece tip 1 SCC*mec* yapısında bulunanlar fonksiyonel olarak görev yapmaktadır. SCC*mec* gen kaset yapısında bulunan ikinci oluşum SCC*mec* komplekstir. Bu yapı IS431*mec*, *mecA* ve düzenleyici genler olan *mecR1* ve *mecI*'nin bütünü veya bir parçasını taşımaktadır. Bu da 4 farklı sınıfa ayrılmaktadır (sınıf A, IS431-*mecA*-*mecR1*-*mecI*; sınıf B, IS431-*mecA*- Δ *mecR1*-IS1272; sınıf C, IS431-*mecA*- Δ *mecR1*-IS431; ve sınıf D, IS431-*mecA*- Δ *mecR1*)¹⁰. SCC*mec* gen kaset bölgesinin diğer kısımları J bölgesi (junkyard, J1, J2 ve J3) olarak bilinmektedir. Bu bölge özellikle SCC*mec* gen kaset tiplerinin alt tiplendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bakteri hücresi için gerekli veya yararlı ürünler içermemektedir. Sadece beta-laktam dışındaki antibiyotiklerin direnç genlerini ve ağır metalleri içermektedir. J1 kromozomun sağ birleşme bölgesi ile *ccr* kompleks arasında, J2 *mec* kompleks ile *ccr* kompleks arasında, J3 ise *mec* kompleks ile sol birleşme bölgesinde bulunmaktadır. Bu yüzden SCC*mec* kaset gen yapısı J3-*mec*-J2-*ccr*-J1 olarak özetlenebilmektedir. Tablo I ve Şekil 1'de SCC*mec* tiplerinin sahip oldukları yapılar görülmektedir^{8,11}.

Tablo I. *Ccr* ve *mec* taşıyan SCC*mec* kaset gen tipleri

	<i>Ccr</i> gen kompleksi	<i>Mec</i> gen kompleksi
Tip I	Tip-1 <i>ccrA1</i> ve <i>B1</i>	Sınıf B <i>mec</i> (1B)
Tip II	Tip-2 <i>ccrA2</i> ve <i>B2</i>	Sınıf A <i>mec</i> (2A)
Tip III	Tip-3 <i>ccrA3</i> ve <i>B3</i>	Sınıf A <i>mec</i> (3A)
Tip IV	Tip-2 <i>ccrA2</i> ve <i>B2</i>	Sınıf B <i>mec</i> (2B)
Tip V	Tip-5 <i>ccrC</i>	Sınıf C <i>mec</i> (5C)
Tip VI	Tip-4 <i>ccrA4</i> ve <i>B4</i>	Sınıf B <i>mec</i> (4B)



Şekil 1. SCCmec kaset gen tiplerinin yapısal görüntüsü

MRSA, hastane kaynaklı (HK-MRSA) enfeksiyonlara neden olurken, 1990'lı yıllardan sonra toplum kaynaklı (TK-MRSA) enfeksiyonlardan da izole edilmeye başlanmıştır. SCCmec kaset gen tiplendirme sistemi, HK- ve TK-MRSA suşlarının ayırımında bağımsız bir kriter olarak kullanılmaktadır. Esas olarak HK-MRSA suşları, 34-67 kb uzunluğunda üç tip SCCmec gen kaseti (I, II ve III) taşımaktadırlar. Fakat iyi tanımlanmış çoklu dirençli olmayan TK-MRSA suşları, daha çok tip IV ve V SCCmec kaset gen tipleri taşımaktadır. Yapılan çalışmalar, TK-MRSA suşlarında tespit edilen yeni SCCmec kaset gen tiplerinin, HK-MRSA suşlarından evrimsel olarak bağımsız olduğunu göstermektedir. Bu olay bize, TK-MRSA kökeninin HK-MRSA suşlarından bağımsız olarak geliştiğini ve toplum kaynaklı *S.aureus* suşlarının transformasyonu sonucu oluşabileceğini düşündürmektedir. Tip IV SCCmec kaset gen bölgesi 1970'li yıllarda *Staphylococcus epidermidis* suşlarında kommensal olarak bulunmuş ve 1980 yılında ilk kez *S.aureus*'ta bildirilmiştir. Bu durum da, 1980'li yıllarda SCCmec IV'ün *S.epidermidis*'ten *S.aureus*'a transfer olduğunu düşündürmektedir; yani *mecA* geni bir stafilokoktan diğerine vertikal olarak aktarılabilmektedir. TK-MRSA suşları beta-laktam dışındaki kloramfenikol, klindamisin ve florokinolon grubu (bölgesel farklılıklar gösterir) gibi antibiyotiklere genellikle duyarlı iken, HK-MRSA suşları genellikle dirençlidir. Bunun en önemli nedeni, hastanelerde kullanılan antibiyotiklerin dirençli suşların seleksiyonuna neden olmasıdır. Bu aynı zamanda hangi tip SCCmec kaset gen yapısı taşıdığı ile de ilişkilidir. Tip I, II ve III SCCmec kaset gen tipleri, direnç genlerinin bulunduğu geniş J (J1, J2 ve J3) bölgelerine sahipken, tip IV SCCmec kaset gen yapısı kısa ve basittir. Şu ana kadar boyutu 20-24 kb arasında değişen farklı SCCmec tip IV'ler bildirilmiştir. Yapısının kısa olmasından dolayı da stafilokok türleri arasında kolaylıkla (muhtemelen faj

transdüksiyonu ile) yayılabilmektedir¹². Ayrıca TK-MRSA, altta yatan bir hastalığı ya da uzun süre hastanede yatma gibi herhangi bir risk faktörü olmayan hastalardan izole edilebilmektedir. Özellikle askeri birlikler, bakım evleri, atletler gibi yakın temasta bulunan bireylerde hastalık tablosu oluşturmaktadır. Çoğu toplumda son zamanlarda artık HK-MRSA'ların yerini almaya başlamışlardır¹³. TK-MRSA özellikle çocuklarda deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olmaktadır¹⁴. Ancak, invazif, hızlı ilerleyen, nekrotizan pnömoni, şiddetli sepsis, nekrotizan fa-siit gibi enfeksiyonlara da neden olabilmektedir. Nekrotizan pnömoni ile ilişkili olan sepsisler 24-48 saat içinde ölümlere neden olmaktadır. Ayrıca fulminant purpura ve disemine intravas-küler koagülasyona yol açabilirler. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde TK-MRSA suşlarının neden olduğu ölümler bildirilmiştir¹⁵.

TK-MRSA'nın önemli bir özelliği de Panton-Valentin lökositidin (PVL) ile birlikte bulunma-sıdır. Bu yüzden daha virülen olarak kabul edilmektedir. PVL, 1932 yılında deri ve yumuşak doku ile ilişkili olarak lökotoxin olarak tanımlanmıştır. Daha sonra deri ve yumuşak doku ile nekrotizan pnömoni tablosuna neden olan vakalardan izole edilen metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) suşlarında *pvl* geni ile ilişkili olarak tanımlanmıştır. Enterotoksin süperantijenleri ve eksofoliyatif toksin ile kıyaslandığında, TK-MRSA suşlarında sıklıkla transfer edilen toksin olarak bulunmaktadır. Fakat nazal TK-MRSA izolatlarında bulunmamaktadır¹⁶. MLST ve PFGE tek-nikleri ile bölgesel olarak yaygın olan HK-MRSA suşlarının, TK-MRSA suşlarından genetik te-melde farklı oldukları da ortaya çıkmıştır. ABD'nde çoğu TK-MRSA suşu tip-IV SCCmec kaset gen taşıyan ST1/USA 400 ve ST8/USA 300 iken, dolaşan HK-MRSA suşları SCCmec II taşıyan ST5/pulsotip USA 100 veya ST36/pulsotip 200 (EMRSA-16)'dür. Avrupa'da ise ST8 (USA 300), ST30 (okyanus klonu, USA1100) ve ST80 TK-MRSA suşlarında yaygınken, HK-MRSA suşlarında ST36/pulsotip 200 (EMRSA-16) sık olarak izole edilmektedir^{17,18}. Kore ve Japonya'da ST5-MRSA-II yaygın iken, diğer Asya ülkelerinde ST239 (veya ST241)-MRSA-III (veyaIIIA) yaygındır¹⁹. Son zamanlarda kabul edilen hipotez, MSSA suşlarının PVL'yi kodlayan lukS-PV ve lukF-PV genle-rinin (*pvl*) lizojenik faj (*phiSLT*) ile alınması, daha sonra da *mecA* geni taşıyan metisilin direnç kasetlerinin (SCCmec IV, V) horizontal olarak PVL pozitif MSSA suşlarına transfer olması ve *phiSLT* bölgesinden başka bir bölgeye integre olmasıdır. Böylece MSSA suşları, PVL pozitif olan MRSA haline gelir¹⁶. Türkiye'de SCCmec kaset gen ve PVL gen araştırmasına yönelik sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Tekeli ve arkadaşları²⁰, 134 MRSA izolatının 109'unda (%81.3) SCCmec tip-III saptamışlardır. Ayrıca izolatların 87'sinde (%64.9) PVL genini pozitif olarak bildirmişler ve poliklonal bir yayılım olduğunu vurgulamışlardır²⁰. Özkul ve arkadaşları²¹, 55 MRSA izolatında PVL geni araştırmışlar ve hiç birinde tespit edememişlerdir. Anabilim Dalımızda yapılan çalış-mada, SCCmec kaset genlerinin tip-I, II, III, IV, V, tiplendirilemeyen ve PVL oluşumu sırasıyla; 11 (%2.8), 3 (%0.8), 316 (%82.1), 20 (%5.1), 20 (%5.1), 15 (%3.9) ve 5 (%1.3) olarak tespit edil-miştir²². Bu çalışmada, SCCmec kaset gen tip I/II/III taşıyan MRSA izolatlarının, yoğun bakım ünitesi bulunan cerrahi kliniklerden, SCCmec kaset gen tip IV/V taşıyan izolatlara göre daha sık olarak izole edildiği saptanmıştır ($\chi^2=13.560$, $p<0.001$). Çalışmada ayrıca, SCCmec kaset gen tip I/II/III taşıyan MRSA izolatlarının, esas olarak kan akımı enfeksiyonlarına neden olduğu (%53, $p=0.014$); SCCmec kaset gen tip IV/V taşıyan izolatların ise deri ve yumuşak doku enfeksiyonla-rından izole edildiği görülmüştür (%55, $p<0.001$). PVL geninin ise SCCmec kaset gen tip IV/V taşıyan izolatların %10'unda, SCCmec kaset gen tip I/II/III taşıyan izolatların ise %0.3'ünde ($\chi^2=25.164$, $p<0.001$) pozitif olduğunu belirlenmiştir²².

Kaynaklar

1. Riley LW. Hospital Infections: *Staphylococcus aureus*, pp: 249-80.
In: Molecular Epidemiology of Infectious Diseases: Principles and Practices. 2004, ASM Press, Washington DC.
2. Hiramatsu K, Kuroda M, Baba T, Ito T, Okuma K. Application of genomic information to diagnosis, management and control of bacterial infections: the *Staphylococcus aureus* model, pp: 407-18. In: Persing DH (ed), Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice. 2004, ASM Press, Washington DC.
3. Jevons MP. "Celebenin"-resistant staphylococci. Brit Med J 1961; 1:124-5.
4. Damkjær Bartels M, Boye K, Rhod Larsen A, Skov R, Westh H. Rapid increase of genetically diverse methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Copenhagen, Denmark. Emerg Infect Dis 2007; 13:1533-40.
5. Centers for Disease Control and Prevention: *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin - United States, 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2002;51:565-7.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Public health dispatch: vancomycin-resistant. *Staphylococcus aureus* - Pennsylvania, 2002. MMWR 2002; 51: 902-3.
7. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerg Infect Dis 2001; 7: 178-82.
8. de Lencastre H, Oliveira D, Tomasz A. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. Curr Opin Microbiol 2007; 10: 428-35.
9. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcal cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 1549-55.
10. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1955-63.
11. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. Drug Resist Update 2003; 6: 41-52.
12. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2005; 43: 5026-33.
13. Ho PL, Cheung C, Mak GC, et al. Molecular epidemiology and household transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Hong Kong. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 57: 145-51.
14. Kilic A, Li H, Stratton CW, Tang YW. Antimicrobial susceptibility patterns and staphylococcal cassette chromosome *mec* types of, as well as Pantone-Valentine leukocidin occurrence among, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children and adults in middle Tennessee. J Clin Microbiol 2006; 44: 4436-40.
15. Centers for Disease Control and Prevention. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*--Minnesota and North Dakota, 1997-1999. JAMA 1999; 282: 1123-5.
16. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantone-Valentine leukocidin. Lab Invest. 2007; 87: 3-9.
17. Tristan A, Bes M, Meugnier H, et al. Global distribution of Pantone-Valentine leukocidin—positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. Emerg Infect Dis 2007; 13: 594-600.
18. Montesinos I, Delgado T, Riverol D, et al. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with the emergence of EMRSA-16 at a university hospital. J Hosp Infect 2006; 64: 257-63.
19. Soo Ko K, Peck KR, Sup Oh W, Lee NY, Hiramatsu K, Song JH. Genetic differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Korea and Japan. Microb Drug Resist 2005; 11: 279-86.
20. Tekeli A, Koyuncu E, Dolapçı I, Akan ÖA, Karahan ZC. 2002-2003 Yılları Arasında İzole Edilen Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının Moleküler Epidemiyolojisi. 4. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi. 25-28 Nisan 2006, Ankara. Kongre Kitabı, PBP-9.
21. Ozkul H, Oktem IM, Gulay Z. Investigation of the presence of pantone-valentine leukocidin (PVL) in *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples. Mikrobiyol Bul 2007; 41: 357-62.

22. Kilic A, Uskudar Guclu A, Senses Z, Aydogan H, Basustaoglu AC. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) characterization and Panton-Valentine leukocidin gene occurrence for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Turkey, from 2003 to 2006. International Conference on Emerging Infectious Diseases. March 16-19, 2008. Hyatt Regency Atlanta, GA, USA. Board 109.

CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS

Doç. Dr. Mehmet Ali SARAÇLI

Gülhane Askeri Tıp Akademisi Mikrobiyoloji ve
Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Etlik, Ankara

TARİHÇE

Cryptococcus neoformans ilk kez 1894 yılında insan patojeni olarak tanımlanmış olup, ilk kriptokokkoz olgusu Alman hekimler Otto Buse ve Abraham Buschke tarafından 31 yaşındaki bir kadın hastanın tibia lezyonunda tanımlanmış ve etken o zaman *Saccharomyces hominis* olarak adlandırılmıştır¹. 1900'lerde *C.neoformans*'ın bir patojen olarak tanımlandığı olgu sayıları giderek artmış, ancak patojenin ekolojisi ile ilgili olarak 1950'lere kadar bir gelişme sağlanamamıştır. Önceleri hastalığın kaynağının endojen ve gastrointestinal sistem olduğu düşünülmekle birlikte, 1950'de Emmons tarafından kuş ve özellikle güvercin dışkıları ile kontamine toprakta etkenin varlığının gösterilmesi ile çevresel olabileceği ortaya çıkmıştır. Staib ise kuş yeminden (*Guizotia abyssinica* tohumları) hazırladığı besiyerinde mantarın melanin sentezlemesine bağlı olarak kahverengi pigmentli koloniler oluşturduğunu göstermiş, takiben çok sayıda özgün besiyeri tanımlanmıştır. Kriptokokkoz tedavisinde amfoterisin B'nin tedaviye girmesi de yine 1950'lerde olmuştur¹.

Cryptococcus neoformans'ın antijenik özellikleri ile ilgili çalışmalar 1930'larda başlamış, Evans ve arkadaşları A, B ve C serotiplerini tanımlamışlar, serotip D ise 1960'larda tanımlanabilmiştir¹. 1980'lerde ise hem A hem D serotiplerine ait antijenik determinantlar taşıyan serotip AD tanımlanmıştır. Bu çalışmalar aynı zamanda hastalığın serolojik tanısı için de zemin hazırlamıştır.

1970'lerde Kwon Chung, A ve D serotiplerini varyete *neoformans*, B ve C serotiplerini ise varyete *gattii* altında toplamıştır. Ancak, serotip A ve D'nin gerek fenotipik, gerekse genotipik (URA5 baz dizilimi, CNRE-1 RFLP patern farklılıkları ve rDNA D2 bölge farklılıkları) ve epidemiyolojik (serotip A, AIDS'lilerde yaygın, serotip D Fransa, İtalya ve Danimarka gibi belirli coğrafyalarda sınırlı) farklar göstermeleri sebebiyle serotip A'nın var. *grubii*, serotip D'nin ise var. *neoformans* olarak adlandırılması önerilmiştir². *C.neoformans*'ın eşeyli ürediğinin fark edilmesi ile birlikte, eşeyli formları *Filobasidiella* genusu altında sınıflandırılmış, mantarın epidemiyolojisi, ekolojisi ve sınıflandırılması ile ilgili yeni bir çalışma alanı oluşmuştur. 1970'lerin sonlarına doğru giderek artan kriptokokkoz insidansı, AIDS pandemisi ile birlikte mikozlar arasında bir "uyanık dev" olarak kendisini göstermiş ve 1990'larda ABD'de kriptokokkoz epidemileri tanımlanmıştır³. 1990'lı yıllar aynı zamanda kriptokokkoz alanında moleküler çalışmaların başlangıcı için de bir dönüm noktası olmuştur. Birçok virülans faktörü ile ilgili genlerin tanımlanması birbirini izlemiştir. Varyete *gattii*'nin ekolojik kaynağı olarak ökaliptus ağaçlarının (özellikle *Eucalyptus camaldulensis*) tanımlanmasından sonra varyete, ekoloji ve patogenezi arasındaki ilişkiler üzerindeki yoğunlaşmalar gerçekleşmiştir⁴. Sadece *C.neoformans* ve kriptokokkoz üzerine 1989 yılından beri uluslararası katılımlı kongreler düzenlenmekte olup, bu kongrelerin yedincisi 11-14 Eylül 2008 tarihleri arasında Japonya'da gerçekleştirilecektir.

MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLER

Kapsül

Cryptococcus neoformans'ın üç temel virülans faktöründen birisi olan polisakkarit yapısındaki kapsülün kalınlığı, kökene ve kültür şartlarına bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte, genellikle 4-10 µm'dir. Ancak 5-80 µm kalınlıkta olan kapsüller de bildirilmiştir. Kapsül kalınlığı muhtemelen yüksek karbon-dioksit konsantrasyonuna bağlı olarak dokuda in vitro kültür şartlarından daha kalındır. Kapsül yapıları varyeteler arasında farklılıklar gösterir. Kapsülün temel polisakkaridi glukronoksilomannan yapısındadır⁵. Kapsül, mantarın dış ortamda canlı kalmasını sağlamasının yanı sıra, hem mantarın yüzey yapılarını maskeleyerek hem de fagositik hücreler için reseptörler taşınamaması nedeniyle antifagositik özellikler de sağlar. Kapsül, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella* spp. ve *Trichosporon beigelii* ile antijenik benzerlikler gösterir. Özellikle *T.beigelii*, lateks antijen testinde en önemli yalancı pozitiflik nedenidir. Birçok virülans faktöründen diğer iki önemli virülans faktörü ise 37°C'de üreyebilme ve melanin sentezidir.

Eşeyli şekiller

Cryptococcus neoformans konakta ve muhtemelen doğada anamorfik şekilde ürerken, zayıf besiyeri ortamında (V-juice, ot tohumu agar gibi) eşeyli (teleomorfik) şekiller ortaya çıkar. *C.neoformans*'ın teleomorfik şekli basidiosporlar oluşturur. Varyetelerin anamorfik şekilleri (maya formu) aynı iken teleomorfik şekiller farklılıklar gösterir; var. *neoformans*'ın basidiosporları küresel, elips veya silindirik şeklinde ve duvarları ince pürüklü iken, var. *gattii*'nin basil şeklinde ve düzgün duvarlıdır. Varyete *neoformans* ve var. *grubii*'nin eşeyli formu *Filobasidiella neoformans*, var. *gattii*'nin eşeyli şekli ise *F.bacillispora* olarak adlandırılır. Varyeteler arasında eşeyli üreme görülmesi taksonomik açıdan varyetelerin yeterince farklı olmadıklarını gösterir. Bundan dolayı eşeyli şekiller de tür olarak değil varyeteler şeklinde, *F.neoformans* var. *neoformans* ve *F.neoformans* var. *bacillispora* olarak isimlendirilir.

Cryptococcus neoformans kökenlerinin yaklaşık üçte ikisi haploid ve heterotallik olup, eşeyli üreme MATa ve MATa allelleri tarafından kontrol edilir. Klinik ve çevresel örneklerin %90'ında α eşeyli (MATa) şekli bulunur⁶. Bu lokuslarda feromon ve feromon reseptör genleri bulunmaktadır. MATa lokusuna sahip kökenlerin enfeksiyöz basidiosporlar ve vejetatif hifler oluşturabildikleri ve A ve D serotipleri için daha virülan oldukları görülmüştür⁷. Varyete *gattii* için eşeyler arasında virülans farkı bildirilmemiştir. Varyeteler arasında eşeyli üreme sonucunda AD gibi hibrid formlar oluşur ve bu formların sporları genellikle kısırır. Türkiye'de yapılan bir çalışmada incelenmiş olan 26 var. *neoformans* (serotip A veya D) kökeninin 20'si MATa (17 AMATa, 3 DMATa) olarak saptanırken, dördü DMATa ve biri de aa (AMATa/ DMATa) olarak tiplendirilmiştir. Bir köken ise tiplendirilememiştir⁸. AMATa tipi oldukça nadir olup, yaklaşık 1500 serotip A kökeninde sadece iki tane gibi sınırlı sayıda bildirim bulunmaktadır⁹.

Üreme özellikleri

Cryptococcus neoformans birçok genel amaçlı mantar besiyerinde üreyebilir. Üremesi için oksijen önemli bir gerekliliktir ve kan kültür şişelerine hidrojen peroksit eklenmesi muhtemelen bu sebeple soyutlanma oranını artırır. 37°C'de üreyebilmekle birlikte daha yüksek sıcaklıklara toleransı zayıftır. Güneş ışığı ve UV canlılıklarını yitirmelerine neden olur. Nemin düşüklüğü üremelerini olumsuz etkilemekle birlikte, güneş ışığına doğrudan maruz kalmamış kurumuş güvercin dışkısında bir yıldan fazla canlı kalabilmektedir. Canavanine-glycine-bromothymol blue (CGB) agar besiyerinde var. *gat-*

tii kökenleri l-canavanine'e dirençli olmaları nedeniyle ürerler ve glisinden alkali ürünler oluşturarak mavi yeşil renk meydana çıkarmaları ile var. *neoformans*'dan ayırt edilebilirler¹⁰.

Melanin üretimi

Cryptococcus neoformans sahip olduğu fenol oksidaz aktivitesi sayesinde difenolik bileşiklerden ve santral sinir sisteminde yaygın olarak bulunan dopa, dopamin, epinefrin ve norepinefrin gibi katekolaminlerden melanin sentezleme yeteneğine sahiptir. Melanin, mantarın güneş kaynaklı radyasyona, çevresel ve fagositler içindeki oksidanlara dayanabilmesini sağlar¹¹. Fenol oksidaz, ilave olarak mantarın çürümüş odunda yaşayabilmesi için odunun yıkılmasında da görev almaktadır.

EKOLOJİ

Dünyanın her yerinden kriptokokkoz olguları bildirilmektedir ve birçok farklı çevresel odaklarda kriptokokların yaşamlarını sürdürdükleri görülmektedir. Varyete *neoformans* iklimsel farklılık göstermeksizin tüm dünyada yaygın olarak bulunur ve çoklukla güvercin olmak üzere özellikle kanatlı çıktıkları ile ilişkilidir. Ayrıca daha az oranda çürümüş ağaç bölümlerinden soyutlandığı da bildirilmiştir. Buna karşılık, var. *gattii* tropikal ve subtropikal iklim bölgelerinde sıklıkla ve okaliptüs ağaçları ile ve özellikle Avustralya'da bu ağaçlarda yaşamlarını sürdüren koalalar ile ilişkilidir¹². Ancak, bu tropikal/subtropikal bölgeler dışındaki okaliptüs ağaçlarından var. *gattii* soyutlanmasına ilişkin güvenilir verilerin olmaması ve aksine tropikal/subtropikal bölgelerde okaliptüs ağaçları dışı kaynaklardan bildirilen olguların varlığı, iklimsel faktörleri ön plana çıkarmaktadır. Kanatlı dışkılarının içindeki yüksek kreatinin miktarının, *C.neoformans* için bir azot kaynağı olarak işlev gördüğü bilinmektedir. Bu kaynağı tüm varyetelerin de kullanabilmesine karşın var. *gattii*'nin dışkılarda bulunmaması ise metabolik farklılıklara bağlanmaktadır. Bu konuda bir açıklamaya göre; var. *gattii*'de kreatinin deiminaz enzimi, azot metabolizması ürünü olan amonyak tarafından inhibe edilmediğinden, dışkı süre geçtikçe alkali hale gelmekte ve mantarın ölmesine neden olmaktadır. Varyete *neoformans*'da ise enzimatik inhibisyon olmaktadır¹³.

EPİDEMİYOLOJİ VE KLİNİK GÖRÜNÜM

Diğer birçok mantar enfeksiyonu gibi kriptokokkozun da insandan insana geçmediği kabul edilir. *C.neoformans* genellikle maya veya basidiosporların inhalasyonu sonucunda konağa bulaştıktan sonra sahip olduğu virülans faktörleri, inokulum sayısı ve konağın immünolojik durumuna bağlı olarak konakta üremesini sürdürerek enfeksiyon tablosuna neden olur. Hem sağlam hem de immün yetersiz kişilerde hastalık yapabilme yeteneğindedir. Genellikle sporadik olgular şeklinde görülür. HIV pandemisi ile birlikte artan kriptokokkoz prevalansı, bu hasta grubunda ABD için %5-10, Afrika kıtası için ise %5-30 aralığındadır. Üç varyetesinden, var. *grubii* (serotip A) klinik etken olarak en sık soyutlanan varyetedir; tüm dünyada yaygın olarak bulunur ve çoğunluğu itibarıyla AIDS'li hastalardan soyutlanır. Buna karşın, var. *neoformans* (serotip D) Fransa, İtalya ve Danimarka gibi belirli coğrafyalarda sınırlı olarak bildirilmiştir. Bu iki varyete, fırsatçı patojen olarak kabul edilir. Buna karşılık, var. *gattii* AIDS'li hastalarda nadiren yaygın enfeksiyonlara neden olur, ancak sağlam

bireylerde de enfeksiyon yaptığı için primer patojen olarak kabul edilir. Serotip B ise serotip C'den daha sık soyutlanmaktadır. Mortalite oranı var. *gattii* dışındaki kriptokokkoz olgularında daha siktir. Kolonizasyon ile invazif hastalık arasındaki ilişki ve risk bilinmemektedir. Ancak, sağlıklı insanlardan soyutlanması ile ilgili bildirimler nadirdir ve genellikle geçici olarak kabul edilir¹⁴. Ayrıca, A ve D serotiplerinin temel ekolojik kaynağı olan güvercinlerde yaygın enfeksiyon gelişmediği gibi, güvercin besleyenlerde de seropozitiflik gerçekleşse bile tablo asemptomatik veya latent seyretmektedir. Kriptokokkozun hem bir latent enfeksiyonun alevlenmesi ile hem de bir dış kaynaktan yeni alınmasına bağlı olarak ortaya çıktığını gösteren genetik çalışmalar da mevcuttur. Varyete *gattii* enfeksiyonlarının ise ökaliptüs ağaçlarının çiçeklenme döneminde basidiosporlar ile kontamine olmuş otlar ile bulaştığı fikri mevcuttur. Kabul gören görüşe göre, çevresel kaynak olarak güvercin dışkılarının kriptokokkoz oluşumu için risk oluşturduğu, ancak kesin bir neden olamayacağı ifade edilmektedir.

MOLEKÜLER BİYOLOJİ

Kapsül varlığı nedeniyle diğer mantarlarda kullanılan bazı enzimler kriptokoklardan sferoplast elde etmede başarısız bulunmuştur. Uygun olan enzimler Novozyme 234, *Trichoderma harzianum*'dan elde edilen litik enzim ve mureinaz olup, özellikle üremenin orta ve geç logaritmik evrelerinde bu basamağın uygulanması DNA elde edilmesinin verimini artırmaktadır. Kapsüler polisakkaritin yeterince uzaklaştırılmadığı nükleik asit izolasyonları rutin PCR uygulamaları ve çoğu restriksiyon enzim kesileri için genellikle sorun oluşturmazken, ligasyon çalışmaları ve bazı restriksiyon enzimleri için ilave polisakkarit uzaklaştırma çalışmaları gerekli olmaktadır¹⁵.

Cryptococcus neoformans'da intronik bölümler ve allelik varyasyonlar sık gözlenir. Varyasyonların genellikle intronlarda üçüncü kodon pozisyonunda ortaya çıkan baz değişiklikleri şeklinde olması nedeniyle, aminoasit dizilimi etkilenmez. Varyete *gattii* ile diğer varyeteler arasında genomun moleküler özellikleri açısından da farklılıklar görülmektedir. Örneğin, en küçük kromozomun boyutu var. *gattii* için 400-700 kb iken, diğerlerinde yaklaşık 770 kb'dır. Ortalama kromozom sayısı da daha az olup, 13 yerine 12 olarak saptanmıştır. Bununla birlikte, ortalama genom büyüklüğü 23 Mb olup, kromozom sayıları da 8-13 arasında değişkenlik gösterir. Yine var. *gattii*'de genlerin kromozomlar üzerindeki yerleşimi daha polimorfiktir¹⁵.

MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİ

Cryptococcus neoformans'ın moleküler tiplendirilmesinde multilocus enzim elektroforezi, PFGE (Pulsed-field jel elektroforezi) ile elektroforetik karyotiplendirme, RFLP (restriction fragment length polymorphism), hibridizasyona dayanan çeşitli DNA parmak izi çalışmaları, mitokondrial DNA problemleri ile tiplendirme, mikrosatellit incelemeleri ve RAPD (random amplified polymorphic DNA) gibi birçok yöntem denenmiştir. Tekrarlayıcı genomik eleman olan CNRE-1 (*C. neoformans* repetitive element) sıklıkla kullanılan bir prob olup, bazı kökenlerde en az yedi farklı kromozom üzerinde bulunabilmektedir. Bunun dışında *URA* genini içeren UT-4p probu, mikrosatellit gen bölgelerine yönelik olarak tasarlanmış (GT)₈, (GTG)₅, (GATA)₄ ve (GACA)₄ gibi birçok prob RFLP analizlerinde kullanılmıştır. Tekrarlayan elemanlara yönelik primerler ile gerçekleştirilmiş başarılı DNA parmak

izi çalışmaları ve 6-10 nükleotidlik rasgele seçilmiş primerler ile gerçekleştirilmiş RAPD çalışmaları da mevcuttur. *URA5* geni baz dizisinin kıyaslanması epidemiyolojik olarak sık kullanılan bir diğer yöntemdir. Farklı yöntemler kullanılmış olsa da, çalışmaların büyük çoğunluğu var. *neoformans* ve *grubii* için büyük bir heterojenite göstermektedir. PFGE CHEF sistemi ile yapılan karyotipik çalışmalar, var. *gattii*'nin çevresel kökenlerinin klonal patern gösterdiğini, diğer varyetelerin ise hem çevresel hem de klinik kökenlerinde yüksek düzeyde karyotipik heterojenitenin gözlemlendiğini ortaya koymuştur¹⁶. Türkiye'nin farklı bölgelerinden soyutlanmış 26 *C.neoformans* var. *neoformans/grubii* kökeninin 24 farklı karyotipik paternde toplanmış olması da bu bulgu ile uyumludur⁸.

Kaynaklar

1. Casadevall A, Perfect JR. Introduction to the pathogen, pp: 1-40. In: *Cryptococcus neoformans*. 1998, ASM Press, Washington DC.
2. Franzot SP, Salkin I, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. J Clin Mic 1999; 37: 838-40.
3. Currie BP, Casadevall A. Estimation of the prevalence of cryptococcal infection among HIV infected individuals in New York City. Clin Infect Dis 1994; 19:1029-33.
4. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var *gattii*. J Clin Mic 1990; 28:1642-4.
5. Cherniak R, Sundstrom JB. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 1994; 62: 1507-12.
6. Kwon Chung KJ, Bennett JE. Distribution of "alpha" and "a" mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. Am J Epidemiol 1978; 108:337.
7. Wickes BL, Mayorga ME, Edman U, Edman JC. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans* association with alpha-mating type. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:7327-31.
8. Saracli MA, Yildiran ST, Sener K, Gonlum A, Doganci L, Keller SM, Wickes BL. Genotyping of Turkish environmental *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolates by pulsed field gel electrophoresis and mating type. Mycoses 2006; 49:124-9.
9. Nielsen K, Cox GM, Wang P, Toffaletti DL, Perfect JR, Heitman J. Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and virulence of congenic a and alpha isolates. Infect Immun 2003; 71: 4831-41.
10. Min KH, Kwon Chung KJ. The biochemical basis for the distinction between two *Cryptococcus neoformans* varieties with CGB medium. Zentralbl Bakteriol Hyg A 1986; 261: 471-80.
11. Wang Y, Casadevall A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. Appl Environ Microbiol 1994; 60:3864-6.
12. Kwon Chung KJ, Bennett JE. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. Am J Epidemiol 1984; 120:23.
13. Kwon Chung KJ. The discovery of creatinin assimilation in *Cryptococcus neoformans*, and subsequent work on characterization of the two varieties of *C. neoformans*. Zentralbl Bakteriol 1991; 275: 390-5.
14. Randhawa HS, Paliwal DK. Occurrence and significance of *Cryptococcus neoformans* in the oropharynx and on the skin of a healthy human population. J Clin Microbiol 1977; 6:325-7.
15. Casadevall A, Perfect JR. Molecular Biology, pp: 115-44. In: *Cryptococcus neoformans*. 1998, ASM Press, Washington DC.
16. Kwon Chung KJ, Wickes BL, Stockman L, Roberts GD, Ellis D, Howard DH. Virulence, serotype, and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. Infect Immun 1992; 60:1869-74.

İNSAN PAPİLLOMAVİRUSLARI

Y. Doç. Dr. Kenan ŞENER

GATA Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Viroloji Bilim Dalı, Ankara.

İnsan siğillerinin viral özellikleri ilk defa 1907’de tanımlanmış; ilk papillomavirus 1933’de Richard Shope tarafından tavşanlardan izole edilmiştir. Bu kadar erken tanımlanmış olmalarına rağmen insan papillomavirusları (HPV) ile ilgili geniş çaplı çalışmalar 1970’lerde başlayan ileri moleküler viroloji gelişmelerine kadar beklemiştir. Bu nedenle de günümüze kadar HPV’nin in vitro replikasyonu yapılmamıştır. Bugünkü bilgilerimizin çoğu sığır papillomaviruslarından elde edilmiştir.

Yapı: Papilloma viruslar küçük, zarfsız, ikozahedral simettrili, yaklaşık 52-55 nm çapında partiküllerdir. Kapsidi, üçgenleşme katsayısı $T=7$ olan 60 hekzon, 12 penton olmak üzere toplam 72 kapsomerden oluşmaktadır. Biri major (L1 geni tarafından kodlanan), biri minör (L2) olmak üzere iki kapsid proteini vardır. Papillomavirusların genomu çembersel, çift zincirli, yaklaşık 8 kbp büyüklüğündedir ve kromatinlerdeki benzer şekilde hücrel histonlarla ilişkilidir.

İsimlendirme: Geçmişte polyomaviruslar ile birlikte *Papovaviridae* ailesinde olduğu kabul edilmekteydi. Günümüzde ise bu virusların iki ayrı aile olduğu sonucuna varılmıştır. Papillomavirus ailesi (*Papillomaviridae*) Uluslararası Virus Taksonomi Konseyi (International Council on Taxonomy of Viruses-ICTV) tarafından resmen onaylanmıştır. Papillomaviruslar için kısaltma olarak PV harfleri kullanılır. Günümüzde Papillomavirus Referans Merkezi (Heidelberg/Almanya) yeni bulunan tipleri onaylamaktadır. Bunun için kriter, izolatların L1 geninin %10 üzerinde nükleotid dizi farklılığı göstermesidir. Eğer bu dizi farklılığı %2-10 arasında ise bu izolatlar “subtip-alttip” olarak ifade edilmektedir. %2’den daha az farklılık varsa bunlar “varyant” olarak kabul edilmektedir. Buna göre daha önce alttip olarak nitelendirilen bazı izolatların (HPV-6a, HPV-6b, HPV-6c gibi) aslında alttip değil varyant olduğu, daha ilginç eskiden ayrı birer tip olarak kabul edilen HPV 46, HPV 55 ve HPV 64’ün de sırasıyla HPV 20, HPV 44 ve HPV 34’ün alttipleri olduğu gösterilmiştir.

HPV-Kanser İlişkisi: Papillomavirus cilt ve mukozanın skuamöz epitelinde kronik bir enfeksiyon oluşturur. Bu enfeksiyonun oluşabilmesi için virusun uzun süre proliferasyon kapasitesi olan epitel hücreleri enfekte etmesi gerekir. Virusun bazal tabakaya ulaşması, üst tabakada meydana gelen bir mikrotravma sonrası gerçekleşir. Genital HPV’nin bulaşması da, duyarlı kişilerde cinsel birleşme esnasında benzer mekanizmayla olur. Genital HPV tipleri genital bölgede cildi, vajina veya serviksi enfekte edebilir.

Yüksek dereceli displazilerde, özellikle E6 ve E7 olmak üzere sınırlı sayıda ORF eksprese olur ve bu ekspresyon bazalde gerçekleşir. Düşük düzeylerde eksprese olduğunda E6 proteinini niceliksel olarak ölçmek zordur. İki gen de tek bir promotörden eksprese olur, ekspresyon düzeylerindeki farklılık ise farklı “splicing” paterninden kaynaklanır. Buna bağlı olarak yüksek dereceli hastalık gelişimi E7 üretimi yönündeki bir “splicing” paterni ile ilişkili olabilir. Bazı dolaylı kanıtlara göre, erken lezyonlarda, E7 düzeyi E6’dan çok daha sınırlıdır. E6 ve E7 pek çok genin ekspresyonunu regüle eder. Uzun süreli enfeksiyon esnasında, bu iki gen en önemli rolü üstlenir; çoklu mekanizmalarla bir seri patojenik değişikliği adeta bir orkestra gibi yönlendirerek yüksek dereceli displazi ve kanser gelişimine yol açar.

HPV DNA'sının hücre kromozomuna integrasyonu, non-homolog rekombinasyon yoluyla, E6/E7'nin yüksek ekspresyonuna neden olur ve bunun çok ciddi lezyonlarla ilişkisi vardır. Bir çalışmada 155 örnekten normal ve CIN2 lezyonların hiç birisinde integrasyon görülmezken CIN2 lezyonların %5'inde, CIN3 lezyonların %16'sında ve invazif kanserlerin %87'sinde integrasyon saptanmıştır. Diğer çalışmalara göre CIN3 lezyonlarda daha yüksek oranlarda integrasyon görülmektedir. Viral DNA integrasyonu genom boyunca pek çok bölgede görülebilir. Fakat özellikle de genomun kırılğan bölgelerinde bulunur. Çoğu tümör hücresi E6/E7 eksprese eder.

Viral DNA integrasyonu karakteristik olarak viral genomun geniş segmentinin delesyonu ve LCR ile birleşik bölgeden itibaren "downstream" dizilerin transkripsiyonu ile ilişkilidir. E6 ve E7 ORF'leri de integre viral DNA'da bozulmadan kalır. Viral E1 ve E2 genlerinin bozulması, E6 ve E7'nin yüksek düzeyde transkripsiyonuna izin verir. İntegrasyon bölgesinin yakınındaki hücresel promoter elementleri de viral gen ekspresyonunun artışına katkıda bulunurlar.

Viral DNA integrasyonu çoğu tümör hücresinde veya HPV-18 ve HPV-16 taşıyan tümör kökenli hücre serilerinde görülür. Ancak bazı HPV-16 tümörlerinde ve hücre serilerinde viral DNA epizomal olarak kalmaktadır. Servikal kanserlerden köken alan çoğu hücre serilerinde HPV-16 veya HPV-18'den birine ait HPV DNA'sı vardır. Bunlar E6 ve E7'yi sürekli eksprese eder. Bu durum virusun canlılığını koruması ve çoğalabilmesi için gereklidir. E6 ve E7 proteinlerinin pek çok fonksiyonu ve biyolojik özelliklere katkı sağlayan bir çok biyokimyasal özelliği vardır. Ancak tüm bunların yanında E6'nın p53, E7'nin ise pRb inaktivasyonu bu proteinlerin ana özellikleridir. Servikal ve anal kanserlerden köken alan HPV-16 ve HPV-18 pozitif hücre serilerinde, p53 ve pRb'nin "wild" tipleri bulunurken HPV negatif, tümör kökenli hücre serilerinde bunların mutant formları vardır. Displazi ve kanserlerin bir diğer özelliği de, çoğu hücrelerin E7'ye bağlı pRb inaktivasyonuna bir tepki olarak p16 eksprese etmeleridir. Birden fazla viral DNA integrasyon bölgesi olduğunda, viral gen ekspresyonu, diğer bölgelerin motivasyonu ile tek bir bölgede baskın olur.

Viral DNA integrasyonu öncesinde sentrozom anomalileri ve anöploidi gelişimi iki önemli patolojik süreç olarak karşımıza çıkar ki, bunlar muhtemelen viral DNA integrasyonuna katkıda bulunur. Yüksek riskli HPV tipleri, anormal sentrozom duplikasyonunu indükler ve buna bağlı olarak genomik instabilite ve anöploidi görülür. Bu mitotik olayın kontrolden çıkmasının E6 ve E7'ye bağlı olduğu görülmektedir; özellikle E7 bu etkiden en fazla sorumludur. Anöploidi ve viral DNA integrasyonu sıklığının karşılaştırıldığı bir çalışmada, her ikisinin de displazinin artışıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Viral DNA integrasyonu olan lezyonların %95'inde (19/20) anöploidi görülürken, anöploidi görülen lezyonların sadece %59'unda (19/32) viral DNA integrasyonu saptanmıştır. Sonuç olarak kontrol dışı viral onkogen ekspresyonu, viral DNA integrasyonunu takiben kromozomal instabilite ve anöploidizasyon ile sonuçlanır.

Kanserle ilişkili olarak HPV'ye bağlı bir diğer önemli etki telomeraz aktivasyonudur. İnsan keratinositlerinde öncelikle E6, büyük ölçüde p53'ten bağımsız bir mekanizmayla bu aktivasyonu indükler. Her ne kadar yapılan çalışmalar servikal kanser patogenezinde E6 ve E7'nin merkezi rolünü ortaya koysa da, E5 geni de patogeneze katkıda bulunmaktadır. Yüksek düzeyde EGF-R ekspresyonu ve buna bağlı oluşan ErbB4 proteini ile E5 proteini ilişkili bulunmuştur ki, bu proteinlerin transforme hücrelerle kooperasi olduğu gösterilmiştir.

Epidemiyoloji: İnsan papillomavirusların, siğil oluşturmalarının yanı sıra cinsel yolla bulaşan ajanlar olduğu çok iyi bilinmektedir ve birçok invazif servikal kanserin veya ilişkili prekanseröz lez-

yonların gelişiminde bu virusların rolü vardır. Bu nedenle bu sunumda özellikle servikal kanser epidemiyolojisi üzerinde durulacaktır. Bugüne kadar servikal kanser riski farklılık gösteren pek çok HPV tipi belirlenmiştir. İnsanlarda anogenital bölgede enfeksiyona neden olabilen 40'ın üzerinde HPV tipi vardır. Farklı ülkelerde yapılan vaka-kontrol çalışmalarının sonuçlarına göre, servikal kanser gelişiminde rol oynayan 15 yüksek riskli, 3 muhtemel yüksek riskli, 12 düşük riskli ve 3 risk düzeyi belirlenememiş HPV tipi ortaya konmuştur.

İnsan papillomaviruslarının neden olduğu enfeksiyonlar arasında en önemli yere sahip olan şüphesiz genital HPV enfeksiyonlarıdır ve bunun da cinsel yönden aktif ve güvenli cinsel yaşamı olmayan bireylerde görülme olasılığı yüksektir. Yapılan çalışmalara göre, kadınlar arasında HPV enfeksiyonları prevalansının %2-44 arasında olduğu tahmin edilmektedir. Prevalansın bu şekilde geniş bir aralıkta bulunması ise, incelenen popülasyonların yaş gruplarındaki farklılığa ve HPV enfeksiyonunun saptanmasında kullanılan DNA yönteminin duyarlılığına bağlı olarak açıklanmaktadır. DNA temelli testlere ilave olarak HPV kapsid antijenlerine karşı tipe özgül antikorların kullanıldığı testler de değerlendirmeye alındığında cinsel yönden aktif kadınların çoğu (>%50) herhangi bir zamanda bir veya daha fazla HPV tipi ile enfekte olmaktadır. ABD'nde yaş ortalaması 25 olan kişiler arasında yapılan bir çalışmada, yüksek risk HPV enfeksiyon prevalansı %27.4 olarak bulunmuştur. Farklı zamanlarda farklı araştırmacılar tarafından ABD ve Kanada'lı bayan üniversite öğrencileri arasında yapılan çalışmalarda da benzer bir prevalans görülmüştür. İskoçya'da yapılan bir çalışmada ise, yaş ortalaması 36.6 olan kadınlardan alınan rutin servikal örneklerde PCR ile HPV-DNA pozitifliği yaklaşık %20.5 olarak bulunmuş ve bunların da %15.7'sinin yüksek riskli tipler olduğu görülmüştür. Sitolojisi normal olan kadınlar arasında en sık görülen tipin HPV-16 olduğu ve bu tipin servikal kanserlerinde de en sık görülen tip olduğu bildirilmektedir.

Dünyadaki kanser olgularının dağılımına bakıldığında, kadın kanserleri arasında serviks kanseri meme kanserlerinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2006 yılı verilerine dayanarak tüm dünyada 510.000 yeni serviks kanseri olgusunun tanı aldığı ve 288.000 olgunun da serviks kanserinden öldüğü bildirilmektedir. Bu olguların %80'i gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir. Amerikan Kanser Derneği'nin 2007 yılındaki yayınına göre, servikal sitoloji ve taramalara giderek daha fazla önem verilmesiyle, invazif serviks kanseri belirgin olarak azalmıştır. Bu derneğin verilerine göre ABD'de 2006 yılında 9.710 yeni olgu bildirilmiş, buna karşın 3.700 olgu serviks kanserinden ölmüştür. Avrupa'da, batı ve doğu Avrupa arasında serviks kanser insidansı farklılık göstermektedir. Batı Avrupa'da her yıl yaklaşık 13.000 yeni olgu serviks kanseri tanısı alırken, doğu Avrupa'da yeni olgu sayısı yıllık yaklaşık 31.000'dir. Batıda 6.000 kişi serviks kanserinden ölürken, doğuda bu sayı 17.000'e çıkmaktadır. Dünyada serviks kanseri görülme oranları en yüksek Zimbabve, Brezilya, Peru'da 100.000'de sırasıyla 67, 64 ve 53 iken, en düşük görülme oranları İsrail, İtalya ve Çin'de 100.000'de sırasıyla 2.9, 2.7 ve 2.6 olarak bildirilmektedir. Ülkemizde ise Sağlık Bakanlığı'nın 2002 verilerine göre sekiz ilde (Ankara, Antalya, Eskişehir, Edirne, Erzurum, İzmir, Samsun, Trabzon) toplumun %20'sini kapsayacak çalışmanın sonuçları olarak, serviks kanseri insidansı 100.000'de 3.96'dır. Yine Sağlık Bakanlığı'nın 2000 yılı verilerine göre ülkemizde serviks kanseri tüm kanserler arasında altıncı sırada yer almaktadır. Ülkemizde HPV ile ilgili yapılan diğer çalışmalardan bazıları ise Tablo I'de özetlenmiştir.

Tablo I. Ülkemizde Yapılmış HPV ile İlgili Çalışmalar

Araştırmacı (Yıl)	Olgu sayısı (özellik)	Sonuç
Ağaçfıdan A (2001)	420 (pap-smear testinde atipik değişiklik görülenlerde)	%16.9 yüksek-riskli HPV; %3.3 düşük-riskli HPV
Ağaçfıdan A (2001)	179 (asemptomatik olgular)	%6.1 yüksek-riskli HPV; %5 düşük-riskli HPV
Aktepe OC (2003)	502 (genital akıntı+servikal lezyonu olanlar)	HPV DNA (-); CIN (-)
Altuğlu I (2002)	148 (endoservisitli hastalar)	%5.4 HPV DNA (+)
Bozdayı G (2003)	96 (kolposkopide lezyon görülen hastalar)	3 hastada HPV-18, 6 hastada HPV-16
Bulut Y (2007)	50 (ASCUS örnekleri)	25 örnekte HPV (+) → 19'u tip 18, 13'ü tip 16, 7'si tip 18+16; HPV (+)'li ile IL-10 1082 polimorfizmi arasında ilişki bulunamamış.
Dede M (2007) -GATA-	132 (vaginal kondillomlu hastalar)	%63.6 HPV-6; %15.2 HPV-6 + HPV-11; %9 HPV-11; %12.2 tiplendirilemeyen
Eren H (2007)	61 (servikte prekanseröz lezyonu olanlar)	%45.9 HPV DNA (+); en sık karşılaşılan tipler 51, 52, 53, 56, 58, 59
Ergünay K (2007)	35 (atipik servikal sürüntü örneği)	%80 HPV DNA (+) → %78.6 yüksek-riskli HPV; %7.1 orta-riskli HPV; %14.3 düşük-riskli HPV
Erol D (2007)	100 (gastrointestinal tümör dokuları) + 106 (tümöre komşu normal dokular)	Tümör dokularında %41 HPV DNA (+) → 8 örnekte tip 16, 3 örnekte tip 18, 5 örnekte tip 33. Normal dokularda %31.1 HPV (+)
Gökahmetoğlu S (2003)	100 (smear ve servikal sürüntü örnekleri)	93 normal hastadan 7'sinde, düşük grade CIN olan 4 hastadan birinde, yüksek grade CIN olan 3 hastanın 3'ünde HPV (+)
Güney A (1996)	20 benign 19 malign prostat dokusu (in situ hibridizasyon ve Digene Hybride Capture)	Benign prostat dokularının birinde, malign olanların 3'ünde HPV (+)
Güney AI (1997)	21 (gebelerin servikal örnekleri) + 20 (parafin bloğa gömülmüş biyopsi örnekleri)	Gebelerin 2'sinde HPV DNA (+) Biyopsi örneklerinde → %30 in situ hibridizasyon ile; %45 PCR ile pozitiflik
Karaoğlu D. (1996)	33 (CIN tanısı alanlar)	%54.5 HPV-16, %45.4 HPV-18
Korkmaz E (2007)	75 (üst solunum yolları malignitesi olan hasta dokuları)	%146 HPV-16, %10.6 HPV-18, bir olguda tip 16 + 18 birlikteliği, HPV 31 ve 33 ise belirlenememiş
Midilli K (2003)	144 (sağlıklı kadınlar)	%6.95 orta/yüksek-riskli HPV; %6.25 düşük-riskli HPV genotipleri
Onan MA (2005)	94 (CIN tanısı alanlar)	HPV (+) → %4.2 CIN I; %14.8 CIN II; %45 CIN III
Özçelik B (2003)	230 (düşük risk grubunda-Digene Hybride Capture)	<45 yaş → %5.9; >45 yaş → %7.7 HPV DNA (+)
Öztürk S (2004)	206 (servikal sürüntü-Digene Hybride Capture)	%4-9 HPV DNA (+)
Sapmaz E (2002)	40 hasta (CIN tanısı konulanlar) + 40 kontrol (normal servikal bulgusu olanlar)	13 hastada tip 16, 2 hastada tip 18; 2 olguda tip 16; 1 olguda tip 18 pozitifliği
Ünsal A (2001)	44 enfekte kadının erkek partnerleri (kondillomlu hastalarda)	44 erkeğin %57'sinde HPV DNA (+)

Genital enfeksiyonlar arasında HPV'nin rolü giderek artmaktadır. Burada bir diğer önemli konu da HPV'ye bağlı olarak gelişen genital siğillerdir. ABD'nde genital siğil nedeniyle doktora başvuran olguların sayısı her yıl artarak yıllık ortalama 70.000'den 360.000'e çıkmıştır. HPV dünyada kadınlarda görülen cinsel yolla bulaşan en yaygın virustur. Burada temel risk faktörü, seksüel partner sayısı olarak gösterilmektedir. Serviks kanseri, CIN ve HPV enfeksiyonu ile ilgili tüm risk faktörleri aynıdır. Seksüel partner sayısının fazlalığı dışındaki diğer risk faktörleri ise erken yaşta başlanan cinsel ilişki, sigara içimi, fazla doğum yapmış olmak, düşük sosyoekonomik durum, ırk ve oral kontraseptif kullanımıdır. Sigara içenlerde, içmeyenlere göre akciğer kanserine yakalanma riski 8 kat daha fazladır. HPV ile serviks kanseri arasındaki ilişkide ise bu oranın daha fazla olduğu görülmüştür. Günümüzde enfeksiyon kökenli olduğu bilinen tüm solid tümörlerin %5.2'si HPV tarafından oluşturulmaktadır. Bu oran mide kanseri etiyolojisinde rol oynadığı bilinen *Helicobacter pylori*'ninki kadar yüksektir.

Günümüzde HPV enfeksiyonunun bazı yardımcı faktörlerin etkisiyle kansere yol açtığı kabul edilmektedir. Tüm serviks kanserleri %99.7 oranında HPV DNA'sı içerir. Deri ve mukozalarda tespit edilen bu virusun 200'den fazla tipi vardır ve bunların 40'dan fazlası anogenital epitelde görülür. Bunların da bir kısmı genital siğillerden diğer bir kısmı da bu bölgenin kanserlerinden sorumludur.

Düşük risk grubu (DR-HPV): Anogenital HPV tiplerinden 6, 11, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 62 ve 66 düşük "grade"li servikal lezyonlarda bulunur. Dış genital kondillomlarında en sık karşılaşılan tipler 6 ve 11'dir. Bu tipler %15 oranında CIN1'de de görülebilmektedir. HPV 42, 43 ve 44 ise daha çok serviks, vulva ve penisin düşük "grade"li veya benign lezyonlarında tespit edilir. Tüm bu HPV tiplerinin E6 ve E7 bölge proteinleri, p53 ve pRB tümör süpresör genlere çok zayıf bağlanabilmekte ve sonuç olarak keratinositleri ölümsüz hale getirmektedir. Ayrıca bu HPV tipleri DNA'larını konak hücre genomuna entegre edememekte çoğu zaman epizomal olarak kalmaktadır.

Yüksek risk grubu (YR-HPV): Bu gruba dahil edilen tipler 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82'dir. Üç HPV tipi 26, 53, 66 ise *olası yüksek riskli* grubu oluşturur. İleri evre CIN ve servikal kanserde en sık görülen tip HPV-16 olup, skuamöz hücreli kanserde %50, adenokanserde %30 oranında görülür. CIN ve servikal kanserde birbirine yakın olaylarda tespit edilebilen HPV-16'ya vulva, vagina, penis ve anüs intraepitelyal neoplazilerinde hatta penis ve vulvanın 'Bowenoid papüllozis' lezyonunda dahi rastlanabilmektedir. Tüm bunların yanı sıra düşük "grade"li ve benign servikal lezyonlarda da %30 oranında görülebilmektedir.

HPV-18 ise tip 16'nın tersine CIN olgularında %5 gibi düşük oranda, invazif servikal kanserde ise ikinci sıklıkta (%22-25) görülür. Adenokanserlerde ise tip 16'dan daha fazla rastlanılmaktadır. İnvazif olgularda çok sık görülmesine rağmen, CIN'lerde az görülüyor olması, bu tipin çok invazif olması ve prekürsör lezyonları çok hızlı geçerek invazyona ilerlediğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda HPV-18'in in vitro ortamda daha erken tümör oluşumuna neden olduğu, HPV-18 içeren kanserli hasta grubunun tip 16'ya kıyasla 8-12 yaş daha genç olup, nükslerin üç kat daha fazla görüldüğü bildirilmektedir. Bunun yanı sıra servikal sitolojisi negatif olup da bir yılın sonunda invazif kanser gelişen kadınlarda HPV-18, HPV-16'ya göre 2.6 kat daha sık rastlanılmaktadır. Ayrıca endoservikal hücrelerin, ektoserviks hücrelerine kıyasla HPV-18'e daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. Tüm bunlardan da anlaşılacağı gibi HPV-18, başlı başına kötü prognostik faktör olarak karşımıza çıkmaktadır.

Yüksek risk grubundaki diğer HPV tipleri nükleotid zinciri olarak daha çok HPV-16'ya benzerlikte ve daha çok serviks ve vajinanın yassı epitel hücreli kanserinde tespit edilmektedir. Bu tipler invazif kansere (%10) göre daha çok ileri CIN'de (%30) saptanmaktadır.

Bilimsel yayınlar HPV varlığının servikte kanser gelişimi için 'gerekli' olduğunu vurgularken, 'yeterli' olmadığı konusunda da birleşmektedirler. Öyle ki, HPV-16 enfeksiyonu oluştuğunda serviks kanseri gelişimi için risk oranları artışı 434 kat olarak hesaplanmıştır. HPV-18 için bu oran 248 katır. Tüm yüksek riskli HPV tiplerinin serviks kanserine yol açması söz konusu değildir. HPV'nin tek başına kanser yapması mümkün değildir. Bir takım yardımcı kanserojen faktörlerin de devreye girmesi gerekmektedir. Yüksek riskli HPV enfeksiyonundan etkilenen kişilerin ancak %10'u persistan enfeksiyon haline gelmektedir. Bunların da %1'i invazif kansere gidiş göstermektedir.

HPV Aşılması: HPV aşıları profilaktik ve terapötik amaçlı olmak üzere iki grupta incelenebilir. Ancak günümüzde daha çok profilaktik aşılardan yararlanılmaktadır. Profilaktik aşılar virusun L1 proteinini eksprese eden virus benzeri partiküller (VLP) kullanılmaktadır. Bu VLP'ler onkojenik potansiyele sahip HPV DNA'sını taşımamaktadır. VLP'ler hayvan modellerinde nötralizan antikor titrelerini artırmış ve intramusküler enjeksiyon ile verildiklerinde mukozal enfeksiyona karşı koruyucu etki göstermiştir. Bunlar nötralizan antikor cevabı yanında hücresel immün cevabı da indüklemektedir. Günümüzde 2006 yılında FDA onayı almış ve tip 6, 11, 16 ve 18'e karşı koruyuculuk sağlayan quadrivalan bir aşı (Gardasil-Merk) ve 2008'de FDA onayı alması beklenen ve tip 16 ve 18'e karşı hazırlanmış bivalent aşı (Cervarix-Glaxo&SmithKline) mevcuttur.

Kaynaklar

1. Ağaçfıdan A, Beka H, Önel M, Bilgin M, Önel D, Badur S. Kadınlarda insan papillomavirusu (HPV) ve *Chlamydia trachomatis* araştırılması, s: 325-6. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti 70. Yıl Bilimsel Toplantısı Kitabı. Yayın No: 40. 2001, İstanbul
2. Ağaçfıdan A. İnsan papilloma virusları, s: 132-9. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti 70. Yıl Bilimsel Toplantısı Kitabı. Yayın No: 40. 2001, İstanbul.
3. Aktepe OC, Altıdiş M, AktepeF, Yılmaz M, Fenkçi V. Risk altındaki kadınların servikal örneklerinde human papillomavirus araştırılması, s: 337. Ustaçelebi Ş, Badur S, Abacıoğlu H (ed), 1. Ulusal Viroloji Kongresi Kitabı, 2003.
4. Altuğlu I, Terek MC, Özacar T, Özşaran AA, Bilgiç A. The prevalence of human papillomavirus DNA in women with mucopurulent endocervicitis. Eur J Gynaecol 2002; 23:166-8.
5. American Cancer Society. Guideline for Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Use to Prevent Cervical Cancer and Its Precursors. CA Cancer J Clin 2007; 57: 7-28.
6. Arvas M, Gezer A. Genital HPV. 2007, 1. Baskı. İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul.
7. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. J Clin Virol 2005; 32S: 16-24.
8. Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. J Clin Virol 2005; 32S: 1-6.
9. Bosch FX, de Sanjose S. Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. J Natl Cancer Inst Monogr 2003; 31:3-13.
10. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. Ann Oncol 2005, 16: 481-8.
11. Bozdayı G, Bağrıaçık EÜ, Biri A, Biberöğlu K, Rota S. Human papillomavirus tip 16-18 ve *Chlamydia trachomatis* ile servikojenital ko-enfeksiyon, s: 342. Ustaçelebi Ş, Badur S, Abacıoğlu H (ed), 1. Ulusal Viroloji Kongresi Kitabı, 2003.
12. Bulut Y, Etem EÖ, Dilek AR ve ark. Serviksin sitolojik anomalilerinde human papillomavirus pozitifliği ve IL-10 promotör-1082 gen polimorfizmi, s: 273. Ustaçelebi Ş, Badur S, Abacıoğlu H (ed), 3. Ulusal Viroloji Kongresi Özet Kitabı, 2007.
13. Burchell AN, Winer RL, Sajose S, Franco EL. Epidemiology and transmission dynamics of genital infection. Vaccine 2006, 24: 52-61.
14. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 1-17.
15. Cann AJ. Pathogenesis, pp: 208-48. In: Principles of Molecular Virology. 2005, 4th ed. Elsevier Academic Press, USA.
16. Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, et al. Multiple high-risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. J Clin Pathol 2004a; 57: 68-72.
17. Cox T. The development of cervical cancer and its precursors: what is the role of human papillomavirus infection? Curr Opin Obstet Gynecol 2006; 1 (Suppl 19): S5-13.

18. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. *Fields Virology*. 2007, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, USA.
19. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17-27.
20. Dede M, Kubar A, Yenen MC, et al. Human papillomavirus-type predict the clinical outcome of imiquimod therapy for women with vulvar condylomata acuminata. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2007; 86: 968-72.
21. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005; 32S: 7-15.
22. Eren H, Özgüneş N, Güzin K, Yazıcı S. Serviksın prekanseröz lezyonlarındaki human papillomavirus prevalansı, s: 255. Ustaçelebi Ş, Badur S, Abacıoğlu H (ed), 3. Ulusal Viroloji Kongresi Özet Kitabı, 2007.
23. Ergünay K, Mısırlıoğlu M, Fırat P, Tunecr ZS, Tuncer S, Ustaçelebi Ş. Sitolojik olarak anomali saptanan serviks örneklerinde insan papillomavirus DNA'sının araştırılması ve virusun tiplendirilmesi *Mikrobiyol Bul* 2007; 41: 219-26.
24. Erol D, Bulut Y, Yüce H, Özercan İH. Gastrointestinal sistem adenokarsinom örneklerinde insan papilloma virüs tespiti, s: 253. Ustaçelebi Ş, Badur S, Abacıoğlu H (ed), 3. Ulusal Viroloji Kongresi Özet Kitabı, 2007.
25. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999; 180:1415-23.
26. Gökahmetoğlu S, Eşel D, Özçelik B ve ark. Servikal örneklerde human papillomavirus DNA'sının hibrid yakalama yöntemi ile araştırılması, s: 339. Ustaçelebi Ş, Badur S, Abacıoğlu H (ed), 1. Ulusal Viroloji Kongresi Kitabı, 2003.
27. Bernard C, Mougın C, Laurent R, Lab M. Oncogene activation: an informative marker for the human papillomavirus-lesions severity. *Cancer Detect Prev* 1994; 18: 273-82.
28. Guney AI, Ince U, Kullu S, Pekin S, Çırakoglu B. Detection and typing of human papillomavirus in cervical specimens of Turkish women. *Eur J Gynaecol Oncol* 1997; 18: 546-50.
29. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338: 423-8.
30. International Agency for Research on Cancer. Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human papillomaviruses. Vol 64. 1995. IARC, Lyon.
31. Karaloglu D, Yazıcı H, Alaltı C, et al. Detection of HPV 16 and HPV 18 infection in patients with cervical neoplasia. *Eur J Gynaecol Oncol* 1996; 17: 296-8.
32. Korkmaz E, Bulut Y, Seyrek A, Özercan İH, Toraman ZA. Üst solunum yolu malign lezyonlarında human papillomavirus tip 16, 18, 31 ve 33 sıklığının araştırılması, s: 252. Ustaçelebi Ş, Badur S, Abacıoğlu H (ed), 3. Ulusal Viroloji Kongresi Özet Kitabı, 2007.
33. Kulasingam SL, Hughes JP, Kiviat NB, et al. Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. *JAMA* 2002; 288:1749-57.
34. Liaw KL, Glass AG, Manos MM, et al. Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 954-60.
35. Midilli K, Benian A, Ergin S ve ark. Sağlıklı Türk kadınlarında human papillomavirus (HPV) ve human herpes virus 8 (HHV 8) araştırılması, s: 338. Ustaçelebi Ş, Badur S, Abacıoğlu H (ed), 1. Ulusal Viroloji Kongresi Kitabı, 2003.
36. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.
37. Munoz N, Castellsague X, Gonzales AB, Gissmann L. HPV in etiology of human cancer. *Vaccine* 2006; 24 S3: 1-10.
38. Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, et al. Relation of human papillomavirus status to servical lesions and consequences for servical cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999; 354: 20-5.
39. Onan MA, Taskiran C, Bozdayı G. Assesment of human papilloma viral load of archival cervical intra-epithelial neoplasia by real time polymerase chain reaction in a Turkish population. *Eur J Gynaecol Oncol* 2005; 26:632-5.
40. Özçelik B, Serin IS, Gokahmetoglu S, Basbug M, Eren R. Human papillomavirus frequency of women at low level of developing cervical cancer: a preliminary study from a Turkish University hospital. *Eur J Gynaecol Oncol* 2003; 24:157-9.
41. Ozsaran AA, Dikmen Y, Akercan F, et al. Triage of squamous cell abnormalities of cervical cytology by human papillomavirus screening. *Eur J Gynaecol Oncol* 2003; 24:535-8.
42. Öztürk S, Kaleli I, Kaleli B, Bir F. Servikal örneklerde insan papillomavirus DNA varlığının hibrid yakalama yöntemi ile araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2004; 38:223-32.

43. Pagluisi S. World Health Organization. Human Papillomavirus infection and cervical cancer. Available at: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/hpv/en/, 2006.
44. Richardson H, Kelsall G, Tellier P, et al. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12:485-90.
45. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı, Kanser kayıtlarında öncelik verilecek 8 il raporu, 2002.
46. Sapmaz E, Şimşek M, Çelik H, Kumru S, Doymaz MZ. Bölgemizde servikal intraepitelyal neoplazi vakalarının HPV 16 ve 18 genomlarının PCR yöntemi ile araştırılması T Klin Jineköl Obst 2002; 12:203-7.
47. Ünsal A, Çimentepe E, Sağlam R. Human papillomavirus ile infekte kadınlarda partner çalışması: enfeksiyonun sıklığı ve tedavisi. *Türk Üroloji Dergisi* 2001; 27: 197-201.
48. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-9.
49. WHO/IARC Globocan, 2002 <http://www.dep.iarc.fr/globocan/database.htm>
50. Woodman CB, Collins S, Winter H, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2001; 357:1831-6.

ENTAMOEBA HISTOLYTICA

Prof. Dr. Mehmet TANYÜKSEL

GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Parazitoloji Bilim Dalı,
Ankara.

Entamoeba histolytica Meksika, Hindistan ve Bangladeş gibi başta gelişmekte olan ülkelerde daha sık olmak üzere tüm dünyada yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan; amibik kolit ve karaciğer apsesine yola açan bir protozoondur. Meksika'da, 30 yıl önce dizanterili bir hastadan izole edilen *E.histolytica*'nın HM-1 suşu hala deneysel olarak hayvanlarda hastalık oluşturmakta ve amibin hemen hemen tüm immünolojik, biyokimyasal ve moleküler biyolojik çalışmalarında kullanılmaktadır. Morfolojik olarak *E.histolytica*'dan ayırt edilemeyen *E.dispar*, kolon lümeninde yaşamakta ve hastalık oluşturmamaktadır. *E.histolytica* ile *E.dispar*'ın *ssurRNA* gen dizileri arasında %1.7'lik bir farklılık bulunmaktadır. *E.histolytica* haploid genomu 14 kromozom içerir ve yaklaşık 20 Mb'dır. Homolog kromozomların uzunluk ve sayısı değişiklik gösterir ki, bu da onun poliploid olabileceğini düşündürmektedir. Bu bilgilerin varlığı sayesinde etken hakkında daha fazla bilgi bize hastalığın patogenezini, dolayısıyla tanı ve aşı çalışmalarının hızlanmasına imkân vermektedir.

E. histolytica'nın oluşturduğu amibiyaz, insanlığın en yaygın parazit enfeksiyonlarından biridir. Parazit üzerinde farklı yönlerden yapılan araştırmalar; *Entamoeba* türleri ile yakınlık gösteren *E.dispar* ve *E.moshkovskii* gibi diğer amiplerin keşfi dahil, özellikle son 20 yıldır büyük gelişmeler göstermiştir. *E.histolytica* ve *E.dispar*'ın yeniden tanımlanması ve *E.moshkovskii*'nin hastalardan keşfine ait son çalışmalar, toplumda farklı *Entamoeba* türleri prevalansını anlamayı dramatik olarak değiştirmiştir. İnvazif amibiyaz tanısı, genellikle dışkı örneklerinin mikroskopisi ve ELISA testiyle özgül antijen saptamasıyla birlikte yapılmaktadır. "Real time" PCR dahil moleküler yöntemlerin gelişimi, son yıllarda güvenilir ve gerçek tanıyı sağlamada büyük gelişmeler olarak kayda geçmiştir.

Farklı *E.histolytica* klinik izolatları arasındaki ilişkiler tam bilinmemektedir. Henüz *E.histolytica* izolatlarını ayırt edebilecek monoklonal antikorlar yoktur. Şuşların çoğu iki ana zimodem grubuna ayrıldığı için izoenzim grupları ya da zimodemlerinin *E.histolytica* şuşlarının ayrımı için yararlı olduğu kanıtlanmamıştır. Bunlara ilaveten parazitlerin ayrımında kullanılan heksokinaz (HK) ve fosfoglukomutaz (PGM) enzimlerini kodlayan gen sekansları, *E.histolytica* ve *E.dispar* izolatları arasında herhangi bir heterojeniteyi göstermede başarısızdır. "Internal transcribed spacer" (ITS); Meksika'dan izole edilen *E.histolytica* ile *E.dispar* izolatlarını ayırt etmede başarısız bulunmuştur. Bunun aksine; *E.histolytica* aksenik şuşlarının ayrımı, K2 proteini olarak da bilinen "ser-rich" *E.histolytica* proteinini (SREHP) kodlayan genlerin PCR-RFLP ile saptanmasıyla yapılabilmektedir. SREHP, amibin yüzeyinde bulunan N terminal sinyal dizisi ve hidrofobik C terminal çıkasından oluşmaktadır. SREHP önemli bir amip aşı adaydır.

Amibiyaz patogenezinde *E.histolytica*'ya özgül virülans faktörleri Tablo I'de özetlenmiştir. İlk basamak, *E.histolytica*'nın kolon epitel hücresine Gal/GalNAc lektin aracılığıyla adhezyonu ile başlamaktadır. Lektin, ağır ve hafif alt birimler ile bunların non-kovalen birliktelik gösterdiği intermediate alt birimin oluşturduğu 260 kDa'lık bir heterodimer yapı göstermektedir ve oluşan bu yapı, patogenezde önemli bir rol oynayan virülans faktörü olarak bilinmektedir. Bir başka virülans faktörü olarak hücre dışı *E.histolytica* sistein proteinazların (SP) rolünün kanıtı, *E.histolytica* hücre lizatlarından üretilen ve hücre dışı salınan sistein proteinazların miktarının, *E.dispar* ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak bin kat daha fazla olmasıdır. Sistein proteinazlar, trofozoitlerin invaziv hastalık oluşturmak için penetre ol-

mak zorunda oldukları hücre dışı matriksin elementleri olan kollajen, elastin, fibrinojen ve laminini ayırma gücüne sahiptir. *E.histolytica* genom projesinin tamamlanmasından sonra SP'leri kodlayan en az 40 genin varlığı gösterilmiştir. Tüm SP'lerden sadece *ehcp1* ve *ehcp5*, *E.histolytica*'ya özgüdür.

Değişik ülkelerdeki amibiyazlı olgulardan elde edilen klinik izolatlara yapılan çalışmalarda, lektinin ağır alt birimindeki CRD (carbohydrate recognition domain) diye isimlendirilen bölgesinde mutasyonun görülmemesi, bu konu üzerinde çok önemli araştırmaların yoğunlaşmasını sağlamıştır.

Tablo I. *E.histolytica* Virülans Faktörleri

Virülans faktörü	Özellikler
Sistein proteinazlar	Konak proteinlerinin bozulması Mukus ve debride hücrelerin harabiyeti sonrasında hücreye yapışmayı kolaylaştırma ve konak hücre proteolitik döngünün uyarılması
Amebapor	Sitoplazmik granüllerde birikme ve hedef hücre teması sonrası serbest kalması Hem ökaryotik hücrelerde hem de fagosite edilmiş bakteri membranında iyon kanalları oluşumu
Galactose/ N-acetyl-D-galactosamin (Gal/GalNAc) bağlayan lektin	Hedef hücre adhezyonu Sitotoksiste Kompleman direnci Endositozis Aktin polimerizasyonu
Lipofosfopeptidoglikan yüzey molekül kompleksi	Trofozoit yüzeyinde bulunarak konak hücreye adhezyon ve temasa bağlı sitoliz
Hücre çatısı aktomyozin	Aktin polimerizasyonu, amip hareketi, fagositoz, hücre ve membran uzaysal reorganizasyonu

Her yıl yaklaşık 500 milyon yeni *E.histolytica* / *E.dispar* enfeksiyonu olduğu, bunların da %90'ından non- patojen, morfolojik aynı tür olan *E.dispar*'ın sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte enfeksiyonlardan sorumlu patojen *E.histolytica*'nın her yıl 40-100 bin ölüme yol açtığına inanılmaktadır. *E.histolytica*'nın değişik coğrafik yerleşim yerlerine göre değişik klinik tablolar göstermesi, enfeksiyonun tanımlanmasında da sıkıntılarının yaşanmasına neden olmaktadır. Çünkü her 10 *E.histolytica* enfeksiyonunun sadece birinde klinik tablo oluşmaktadır. Nasıl olduğu konusunda kesin bir bilginiz olmamasına karşın, belki de bunun nedeni genotip farklılıkları olabilir. Amibiyaz araştırmalarının en önemli sorunlarından birisi; *E.histolytica* ve/veya *E.dispar* ile enfekte bireyler arasında gözlenen klinik tablodaki belirti ve bulguların net olarak ortaya konmamasıdır. Bu nedenle, aynı hastada her iki tür parazit ve farklı suşların varlığı klinik tabloyu etkileyebilmektedir. Türe özellikli belirteçlerin gösterilebilmesi; her iki parazitin bulaş yollarının araştırılması, hastalığın seyrinde parazitin varyasyonunun rolünün belirlenmesi ve tür içi polimorfizmlerin saptanabilmesi ile mümkün olabilecektir. Genetik farklılıklar konağa, parazite ya da çalışılan koşula bağlı olarak değişiklikler göstermektedir. *E.histolytica*'nın genetik farklılığını göstermede, gerek ulusal gerekse uluslararası çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan birisi de; SREHP gen polimorfizmidir. Türkiye'de yapılan bir çalışmada 26 klinik izolatta "nested" PCR ve RFLP analizi sonrası 12 farklı patern olduğu görülmüştür. Bunlara ilaveten genotiplendirme yönünden son zamanlarda çok daha güvenilir, tekrarlanabilirliği yüksek bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde, *E.histolytica*'nın değişik

suşlarındaki genotiplendirme sonucu tRNA genleri arasındaki bölgelerin kısa tekrarlayan yapılar (STR) içerdiği gösterilmiştir. Bu yöntemle, *E.histolytica*'nın tRNA genlerine bitişik STR bölgelerinin tümü araştırılarak *E.histolytica*'ya özgül primerlerle genotiplendirme yapılmaktadır. Genotiplendirme modeli oluşturulan yöntemde, ülkemizdeki altı örnekte üç STR bölgesi kullanılarak (D-A, A-L ve R-R) üç genotip bulunduğu, bu genotiplerin de Gürcistan'a ait DNA örneklerinden farklı oldukları gözlenmiştir. Ayrıca Türkiye'de iki farklı coğrafi bölgede 17 izolatta altı STR bölgesi (D-A, A-L, N-K, S-D, S-Q ve R-R) çalışılarak 12 farklı genotip olduğu, "nested" PCR'ın bu konuda %95'den fazla başarıya ulaştığı gösterilmiştir. Bangladeş'teki bir çalışmada da, benzer şekilde, tRNA bağıntılı polimorfik belirteçlerin kullanılmasıyla parazit genotipi ile *E.histolytica* enfeksiyonuna bağlı klinik tablo arasında bir ilişki olduğu kanıtlanmıştır. Böylelikle tüm dünyada farklı genotiplerin varlığını göstermek, *E.histolytica* polimorfizmleri ile klinik görünüm arasındaki ilişkinin öğrenilmesine yardımcı olacaktır. Aynı bölgede farklı suşların varlığı söz konusu olduğundan klinik görünümü etkileyebilmektedir. Bu nedenle de, amibiya tanısı ve patogeneze temelli çalışmalarında geniş, kapsamlı, bilinçli ve organize moleküler epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. *E.histolytica*'nın genomunun yayınlanmasıyla bakteriyel genlerin lateral gen transferleri (LGT), diğer protistler arasında şimdiye kadar tanımlanmayan yeni reseptör kinazların varlığı, virülans, vezikül transportu ve fagositoz gibi birçok fonksiyonel yapıların tanımlanması, gelecekte yeni açılımlara imkân tanımıştır.

Postgenomik çağ bir gelişme ve mikroarray teknolojisinin kullanılması ile büyük değişim sağlayan bir uygulamadır. DNA mikroarray'ler, patojenleri saptamak için kullanılan hızlı, duyarlı ve yeni geliştirilen bir teknolojidir. Bu yöntem dört bölümden oluşmaktadır: genomik DNA ekstraksiyonu, hedef DNA amplifikasyonu, bir mikroarray'de immobilize oligonükleotid problemlerle işaretli DNA hibridizasyonu ve data analizi. Bir mikroarray temelli genotiplendirme yöntemi (karşılaştırmalı genomik hibridizasyonu), sonraları *E.histolytica* (HM-1:IMSS) genomik DNA klonları kullanılarak geliştirilmiştir. Bu ilk genom çaplı *Entamoeba* suşlarının analizi olmuştur. Böylece bu yöntem, *E.histolytica*'nın *E.dispar*'dan ayrımını sağlamakta, potansiyel genotip-fenotipik birliktelikler ve virülans suşların genlerini tanımlamada kullanılmıştır. Mikroarray yöntemi şu zamanda sıklıkla bir araştırma aracıdır ve nadiren parazitlerin tanımlanmasında ve ayrımı için klinik tanı laboratuvarlarında kullanılmaktadır. *E.histolytica*, *E.dispar* ve *E.moshkovskii* için tiplendirmede kullanılan gen hedefleri Tablo II'de özetlenmiştir. *E.histolytica*'nın farklı suşlarını tanımlamak için hızlı, güvenilir ve tekrarlanabilir yöntemlere gereksinimlerimiz vardır. Günümüzde kullanılan yöntemler Tablo III'de özetlenmiştir.

Tablo II. *E.histolytica*, *E.dispar* ve *E.moshkovskii* için Tiplendirmede Kullanılan Gen Hedefleri

Gen hedefleri
<i>E.histolytica</i> strain spesifik gen (SSG)
<i>E.histolytica</i> serin gen (SREHP)
<i>E.histolytica</i> kitinaz gen
Lokus 1-2 (<i>E.histolytica</i> ve <i>E.dispar</i>)
Lokus 5-6 (<i>E.histolytica</i> ve <i>E.dispar</i>)
<i>E.moshkovskii</i> Arg gen
<i>E.histolytica</i> ve <i>E.dispar</i> aktin ve süperoksit dismutaz genler arası intergenik bölge
<i>E.histolytica</i> ve <i>E.dispar</i> tRNA gen

Tablo III. Klinik Örneklerde *E. histolytica*'nın Tanısı İçin Moleküler Yöntemler

Moleküler tiplendirme yöntemleri
Dot blot
Reverse line blot hibridizasyon
PCR temelli teknikler
Tür farklılığını çalışmak
Real time PCR
Suş farklılığını çalışmak
STR (short tandem repeat)
SREHP genotipleri
Kitinaz
Genetik marker olarak transpozon kullanımı
REP PCR (tekrarlamalı ekstragenik PCR)
SNP (Tekli nükleotid polimorfizm)
Mikroarray

Laboratuvar tanısına birçok yeni teknolojilerin girmesiyle, *Entamoeba* türlerinin farklı bakış açı- larını anlamamız amibiyaz çalışmalarını çok heyecanlı kılmaktadır. *E.histolytica*'ya özgü moleküler epidemiyolojik çalışmalar sadece amibiyaz tanısı için değil, aynı zamanda hastalığın tedavisinde göz- lenen çoklu ilaç direnç geni EhPgp1 (*E.histolytica* P-glikoprotein 1)'in transkripsiyon faktörleri kadar *Rab* small GTPaz gen promotordaki aktivatör ve süpresör motifleri yani *E.histolytica* gen ekspresyo- nundaki diğer kontrol elementleri de ortaya çıkaracaktır.

Kaynaklar

1. Ackers JP, Mirelman D. Progress in research on *Entamoeba histolytica* pathogenesis. Curr Opin Microbiol 2006; 9: 367-73.
2. Ali IKM, Mondal U, Roy S, Haque R, Petri WA, Jr, Clark CG. Evidence for a link between parasite genotype and outcome of infection with *Entamoeba histolytica*. J Clin Microbiol 2007; 45: 285-9.
3. Ali IKM, Zaki M, Clark CG. Use of PCR amplification of tRNA gene-linked short tandem repeats for genotyping *Entamoeba histolytica*. J Clin Microbiol 2005; 43: 5842-7.
4. Ayeh-Kumi P, Ali IKM, Lockhart L, Petri WA, Jr, Haque R. *Entamoeba histolytica*: Genetic diversity of clinical isolates from Bangladesh as demonstrated by polymorphisms in the serine-rich gene. Exp Parasitol 2001; 99: 80-8.
5. Beck DL, Tanyuksel M, Mackey AJ, et al. *Entamoeba histolytica*: Sequence conservation of the GalNAc lectin from clinical isolates. Exp Parasitol 2002; 101:157-63.
6. Clark CG, Methods for the investigation of diversity in *Entamoeba histolytica*. Arch Med Res 2006; 37: 259-62.
7. Clark CG, Ali IKM, Zaki M, Loftus BJ, Hall N. Unique organisation of tRNA genes in *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 2006; 146: 24-9.
8. Fotedar R, Stark D, Bebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. Clin Microbiol Rev 2007; 20: 511-32.
9. Ghosh S, Frisardi M, Ramirez-Avila L, et al. Molecular epidemiology of *E.histolytica* spp.: Evidence of a bottleneck (demographic sweep) and transcontinental spread of diploid parasites. J Clin Microbiol 2000; 38: 3815-21.
10. Gilchrist CA, Petri WA, Jr. Virulence factors of *Entamoeba histolytica*. Curr Opin Microbiol 1999; 2: 433-7.
11. Haghighi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Thammapalerd N, Nozaki T. Geographic diversity among genotypes of *Entamoeba histolytica* field isolates. J Clin Microbiol 2003; 41: 3748-56.

12. Loftus B, Anderson I, Davies R, et al. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* 2005; 433: 865-8.
13. Simonishvili S, Tsanava S, Sanadze K, et al. *Entamoeba histolytica*: The serine-rich gene polymorphism – based genetic variability of clinical isolates from Georgia. *Exp Parasitol* 2005; 110: 313-7.
14. Tachibana H, Cheng X-J, Masuda G, Horiki N, Takeuchi T. Evaluation of recombinant fragments of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin intermediate subunit for serodiagnosis of amebiasis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1069-74.
15. Tanyuksel M, Petri WA, Jr. Amebiasis, pp: 66-71. In: Rakel RE, Bope ET (eds), *Conn's Current Therapy*. 2006, Saunders Elsevier. Philadelphia.
16. Tanyuksel M, Tachibana H, Petri WA, Jr. Amebiasis, an emerging disease, pp: 197-212. In: Scheld WM, Craig WA, Hughes JM (eds), *Emerging Infections*. 2001, ASM Press, Washington DC.
17. Tanyuksel M, Ulukanligil M, Yilmaz H, et al. Genetic variability of the serine-rich gene of *Entamoeba histolytica* in clinical isolates, Turkey. *Tr J Med Sci*, 2008 (baskıda).
18. World Health Organization. Amoebiasis. *Weekly Epidemiol Record* 1997; 72: 97-100.
19. Zaki M, Reddy S, Jackson TFGH, Ravdin JI, Clark CG. Genotyping of *Entamoeba* species in South Africa: Diversity, stability, and transmission patterns within families. *J Infect Dis* 2003; 187: 1860-9.

PNL7

BULAŞICI HASTALIKLARIN SÜRVEYANSINDA MOLEKÜLER YÖNTEMLER NEDEN GEREKLİ?

Y. Doç. Dr. Alper AKÇALI

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı, Çanakkale.

Sürveyans (surveillance); verilerin sistematik olarak toplanması, biriktirilmesi ve özellikle elde edilen sonuçlara göre harekete geçecek kişiler başta olmak üzere bu sonuçlara ihtiyacı olan birimlere hızla geri bildirimini sağlayacak şekilde verilerin değerlendirilmesi sürecidir.

Özellikle kültürü zor ve zaman alan etkenler ile kültürü mümkün olmayan çoğunlukla viral ajanlar gibi enfeksiyöz ajanların saptanması amacıyla son yıllarda polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) mikrobiyolojide en çok tercih edilen moleküler yöntem olmuştur. Bu yöntemin geliştirilmesiyle gelecekte de oldukça geniş kullanım alanı bulacaktır. Burada bulaşıcı hastalıkların sürveyansında moleküler yöntemlerin, etkenin saptanmasından öte epidemiyolojik tiplendirilmesi amaçlı kullanımının yeri ve önemi üzerinde durulacaktır.

Epidemiyolojik tiplendirme sistemleri salgın araştırmalarında, bir veya daha fazla epidemik suşun yayılım şeklini anlamak ve doğrulamak için kullanılabilir. Bunun yanı sıra, bu suşların şüphelenilen kaynaklarının ve yayılımına katkıda bulunan etkenlerin doğrulanması ve epidemik organizmaların rezervuarlarının izleminde de kullanılmaktadırlar. Tiplendirme, zaman içinde enfekte topluluktaki epidemik suşların sıklığı ve dolaşımı hakkında bilgi sağlayarak epidemiyolojik sürveyansa ve kontrol önlemlerinin değerlendirilmesine de katkıda bulunur. Salgınlar geniş bir topluluğun etyolojik ajana maruz kalmasıyla ortaya çıkmaktadır. Genellikle salgına yol açan etyolojik ajan, kaynak organizmayla genetik olarak eş veya çok yakın ilişkili bir hücreden köken alır. Farklı zamanlarda, farklı coğrafik alanlarda, farklı kaynaklardan köken alan ve tür seviyesinde aynı olan organizmalar, ancak tiplendirme yöntemleri ile birbirlerinden ayrılabilir, alttiplere veya suşlara sınıflandırılabilirler.

Moleküler epidemiyoloji, enfeksiyon hastalıkları araştırmasının salgın incelemesi, sürveyans ve klinisyenler, mikrobiyologlar, immünologlar, laboratuvar teknisyenleri ve sağlık çalışanlarının dahil olduğu önlem stratejilerinin belirlenmesi gibi tüm seviyelerinde direk etkisi olan yeni bir alandır. En temel hedefi morbidite ve mortalitenin önlenmesidir. Fenotipik yöntemlerin sınırlamalarını ortadan kaldıran, tiplendirebilirlikleri, tekrarlanabilirlikleri ve ayırıştırma güçleri yüksek olan ve nispeten daha hızlı sonuç veren DNA temelli genotipik yöntemler, epidemiyolojik tiplendirmede tercih edilmeye başlanmıştır. Bu yöntemlerin çoğunda, organizmaların DNA fragmanlarını, tüm kromozomu veya plazmidlerini elektrik alanları içinde ayırıştırarak, özel boyalar veya nükleik asit problemleri yardımıyla gözle görülür hale getirerek özgül paternler veya bir nevi parmak izi çıkarılır. Epidemiyolojik ilişkili izolatlar aynı DNA profili veya parmak izine sahipken, sporadik veya epidemiyolojik ilişkisiz izolatlar farklı paternlere ayrışırlar.

Genomik analizlerdeki gelişmeler, oldukça duyarlı ve aynı zamanda çok sayıda örneğin işlenmesine olanak sağlayan sistemleri ortaya çıkarmışlardır. Günümüzde kullanılan moleküler tiplendirme yöntemleri Tablo 1'de sıralanmıştır.

Moleküler epidemiyolojinin ana hipotezi şudur; epidemiyolojik pencereden bakılarak; incelenen izolatlar ayırt edilemez karakteristiklere (örneğin aynı genetik parmak izi) sahip olduklarında; klo-

nal olarak ilişkili (aynı suş [strain]) kabul edilmelidirler veya izolatlar farklı karakteristiklere sahip iseler farklı suşlar olarak kabul edilmelidirler. Ancak unutulmaması gereken, özgün bir soru veya hipotez olmadan, kullanılacak yöntemlerle elde edilecek sonuçlar; popülasyonun belirli bir zaman-daki veya aralıktaki genomik temellerinin anlık fotoğrafı olmak dışında bir işlev göremeyecektir. Vurgulayacak olursak; tiplendirme yöntemlerinin sonuçları tek başına sürveyansta çok anlam ifade etmeyecek olup, incelenmekte olan enfeksiyon hastalığı ile ilişkili elde olan tüm epidemiyolojik, klinik ve demografik verilerin birlikte değerlendirilmesiyle kullanılabileceklerdir.

Genotipik tiplendirme yöntemleri ile elde edilen verilerin bir kütüphane sistemi yardımıyla saklanmasıyla, sürveyans için önemli olan organizmaların coğrafik yayılımı, endemik veya epidemik kökenlerin sıklıklarındaki değişimler gibi bilgiler elde edilebilmektedir. Ayrıca hastalarda kolonizasyona veya enfeksiyona neden olan izolatların ayrılmasında, kontaminasyon ve enfeksiyon ayırımının yapılmasında, hastane içinde hastalar arası çapraz enfeksiyonların belgelenmesinde, bir enfeksiyon nedeniyle tedavi edilen hastalarda reenfeksiyon veya relapsın değerlendirilmesinde de başarıyla kullanılmaktadırlar.

Tablo I. Günümüzde Kullanılan Moleküler Tiplendirme Yöntemleri

Mekanizma	Yöntem
Nükleik asit temelli	Plazmid profilleri
	RFLP (Restriction fragment length polymorphism)
	PFGE (Pulsed field gel electrophoresis)
	Parçalı (segmented) RNA jel elektroforezi
	Ribozomal RNA jel elektroforezi
	Bir veya daha fazla bölgenin direk olarak dzenmesi (gen dizi analizi)
	MLST (Multilocus sequence typing)
PZR temelli	Bir patojenin özgül hedefine yönelik çoğaltma
	Bilinen tekrarlayan dizilerin (repetitive sequences) hedeflendiği yöntemler: ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences), REP (repetitive extragenic palindromic sequences), DRE (double repetitive element), BOX, IS (insertional sequences), PGRS (polymorphic guanine/cytosine-rich repetitive sequences)
	Multilocus variable number tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA)
	RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), AP-PCR (arbitrary primed PCR)
	Tek bir çoğaltılmış bölgenin restriksiyon endonükleazlarla kesilmesi
Gen ekspresyonu temelli	AFLP (Amplified fragment length polymorphism)
	RT (Reverse transcriptase)-PZR
Hibridizasyon temelli	Microarray teknolojileri
	Ribotiplendirme

Moleküler testlerin bulaşıcı hastalıkların süreyansında kullanımının önemini bazı örneklerle açıklayabiliriz.

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* ve *Campylobacter* izolatlarının ülke genelindeki laboratuvarlarda standardize edilmiş yöntemlerle PFGE paternleri PulseNet ağı ile 1996 yılından beri izlenmektedir. Böylece gıda kaynaklı vaka kümelenmeleri belirlenmekte, ortak kaynaklı salgınlar daha hızlı ortaya çıkarılabilmekte, gıda güvenliğini düzenleyen kuruluşların önlem alınması gereken noktalar hakkında bilgilendirilmesi sağlanmakta ve ülke genelindeki laboratuvarların ve uluslararası ağların iletişimi sağlanabilmektedir. Aynı ağın Avrupa bağlantısı olarak PulseNet Europe ağına 30 ülkeden 58 enstitü katılmaktadır. Ülkemizde Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü bu ağa üyedir ve özellikle enterik bakteriler başta olmak üzere PFGE analizlerini yürütmektedir. ABD, Avrupa, Kanada, Latin Amerika, Asya pasifik bölgesi ağlarının birleşmesiyle "PulseNet International" oluşturulmuş olup, eş zamanlı bilgi paylaşımı ile birden çok ülkeyi ilgilendiren ortak gıda kaynaklı salgınların erken saptanması hedeflenmiştir.

ABD'de 1997-2001 yıllarında gözlenen kızamık vakalarında yapılan epidemiyolojik bir çalışmada; 55 klinik izolatin moleküler tiplendirmesinde 11 genotip saptanmıştır. İlginç olarak bunların çoğunluğunu D6 (Avrupa), D5 (Japonya), D4 (Hindistan yarımadası) ve G2 (bilinmeyen) genotiplerinin oluşturduğu saptanmıştır. Bu çalışma ile kızamık için birçok ithal (imported) kaynağın olduğuna ve ABD'de kızamık için endemik bir suşun olmadığına karar verilmiştir. Ülkemizde de aynı dönemde D6 genotipi tanımlanmıştır.

Kabakulak süreyansında, SH geninin sekanslarının kullanılmasıyla, dünya genelinde A-M arasında genotipler belirlenmiş ve virusun dolaşımının belirlenmesinde kabul görmüştür. Ülkemizde 2006-2007 yıllarında dolaşımdaki kabakulak virusunun H genotipi olduğu saptanmıştır. Bu veri ülkemizde ulusal bağışıklama programına alınan kabakulak aşısının etkinliğinin değerlendirilmesinde ve ülke genelinde dolaşımdaki virusların ilişkisinin belirlenmesinde kullanılabilecektir.

Diğer bir çalışmada, 2001 yılında Bulgaristan'da üç çocukta görülen polyomyelit olgularından izole edilen virusların dizi analizinde, tek bir kaynaktan köken aldıkları, Avrupa izolatları ile %90 uyumlu olmalarına karşın, Hindistan'da 2000 yılında izole edilen bir poliovirusu ile %98.3 benzerlik taşıdıkları saptanmıştır. Türkiye'de polio süreyansı sırasında 1998 yılında izole edilen poliovirusların kendi içlerinde kümelendiği, ancak çevre ülkelerdekilerden farklı olduğu belirlenmiştir.

SARS etkeninin kaynağı araştırılırken, Çin'de oldukça popüler olarak tüketilen "civet" kedisinden izole edilen bir virusun SARS hastalarından izole edilen virus ile dizi kıyaslamasında, 29 ekstra nükleotid dışında tamamen aynı olduğu görülmüştür. Bu, SARS coronavirusunun kaynağı hakkında bir ipucu olabilecektir.

Görüleceği gibi bulaşıcı hastalıkların süreyansında, elde edilecek izolatların moleküler yöntemlerle tiplendirilmesi; etkenlerin ülke içinde yayılımı, hareketi, antimikrobiyal dirençlerin moleküler düzeyde izlenmesi, salgınların doğrulanması ve kaynaklarının saptanması, aşılama programlarının belirlenmesi ve düzenlenmesi gibi pek çok alanda bilgi kaynağı olacaktır. Fenotipik yöntemlerle kıyaslandıklarında ise ayırım güçleri daha yüksek olduğundan elde edilen veriler epidemiyolojik ilişkileri saptamada daha değerli olacaktır.

Kaynaklar

1. Akçalı A, Levent B, Akbaş E, Esen B. Antimikrobiyal duyarlılık ve "Pulsed Field Gel Electrophoresis" yöntemleriyle *Shigella sonnei* izolatlarının epidemiyolojik tiplendirilmesi. XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. 2003, İstanbul.
2. Akçalı A, Uyar Y, Özkaya E, et al. Genotyping of mumps virus circulating in Turkey in 2006-2007. (Yayınlanmamış veri)

3. Fey PD, Rupp ME. Molecular epidemiology in the public health and hospital environments. *Clin Lab Med* 2003; 23: 885-901.
4. Foxman B, Riley L. Molecular epidemiology: Focus on Infection. *Am J Epidemiol* 2001; 153:1135-41.
5. Foxman B, Zhang L, Koopman JS, et al. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiological studies. *Epidemiol Perspect Innov* 2005; 2:10.
6. Hall GB, Barlow M. Phylogenetic analysis as a tool in molecular epidemiology of infectious diseases. *Ann Epidemiol* 2006; 16:157-69.
7. Hasnain SE. Molecular epidemiology of infectious diseases: a case for increased surveillance. *Bulletin WHO* 2003; 81:474.
8. Korukluoglu G, Liffick S, Guris D, et al. Genetic characterization of measles viruses isolated in Turkey during 2000 and 2001. *Virol J* 2005; 2:58.
9. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1661-9.
10. Ozkaya E, Ishiko H, Miura R, et al. Phylogenetic analysis of wild-type 1 polioviruses isolated during the final period of transmission in Turkey. *J Gen Virol* 2004; 85(Pt 6):1591-5.
11. Urwin R, Maiden CJ. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol* 2003; 11: 479-87.
12. Van Belkum A, Struelens M, de Visser A, et al. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetic, and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 547-60.
13. Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *CMI* 2007; 13 (Suppl 3): 1-46.
14. Van Belkum A. High-throughput epidemiologic typing in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 86-100.
15. Versalovic J, Lupski J. Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. *Trends Microbiol* 2002; 10 (10 Suppl): S15-S21.
16. <http://www.cdc.gov/pulsenet/>
17. <http://www.pulsenet-europe.org/>

DÜNYADA VE ÜLKEMİZDE GIDA VE SU KAYNAKLI ENFEKSİYONLARIN SÜRVEYANSINDA MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİK YÖNTEMLER

Uzm. Dr. Belkıs LEVENT

Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü,
Sıhhiye, Ankara

Gıda ve su kaynaklı hastalıklara bağlı olarak her yıl tüm dünyada yaklaşık 4 milyar ishal vakası ve çoğunluğu 5 yaş altında olmak üzere 1.8 milyon ölüm gözlemlendiği tahmin edilmektedir. Bu kadar çok insanı etkileyen bu enfeksiyonlara neden olan geniş çeşitteki bakteriyel, paraziter ve viral etkenlerin tanı ve tiplendirmesinde, günümüzde moleküler yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyotiplendirme, serotiplendirme, faj tiplendirmesi ve antimikrobiyal duyarlılık testleri gibi klasik fenotipik tiplendirme yöntemleri epidemiyolojik amaçlar için yeterli bilgiyi sağlayamamaktadır. Moleküler genetik yöntemlerin kullanıma girmesi, mikrobiyal etkenlerin izlenmesinde devrim yaratmıştır.

Pulsulu alan jel elektroforezi (PFGE), bir çok gıda kaynaklı bakteriyel patojenin epidemiyolojik araştırmasında başarı ile kullanılmaktadır. Çeşitli restriksiyon enzimleri kullanılarak uygulanan PFGE, bakteri alt tiplendirmesinde altın yöntemdir. Yeni nokta mutasyonu, delesyon, insersiyon, plazmit kaybı ya da kazanımı bakterilerin alt tip profillerinde ufak farklılıklara yol açar. Önceleri zaman alan ve emek yoğun bir test olarak düşünülse de günümüzde daha kısa protokollerin tanımlanması ile PFGE yaygın olarak kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Elde edilen sonuçların bilgisayar analizinin yapılabilmesi ve genomik profillerin elektronik veritabanı kütüphanesinde toplanması nedeniyle uzun dönemli sürveyansta yaygın şekilde kullanılmaktadır. PFGE ile bakteriyel genomun tümünün restriksiyon paternleri analiz edilmekte ve karşılaştırılabilmektedir.

Çeşitli fenotipik özellikler gösteren 2500'ün üzerinde *Salmonella* serotipi, PFGE ile genotiplendirilebilmekte ve PFGE profilleri elektronik formatta kütüphanelerde saklanabilmektedir. Bu analizler sonucunda farklı faj tiplerine sahip *Salmonella* Enteritidis suşları arasında SENTXB.0001 PFGE tipinin en sık gözlemlendiği ortaya konulmuş, buna karşılık *S. Typhimurium* suşları arasında dominant bir PFGE tipi belirlenememiştir. Farklı bölgelerde ve yıllarda ortaya çıkan *S. Enteritidis* salgınlarında izole edilen suşların PFGE ve plazmit paternlerinin karşılaştırılması sonucunda, aynı suşun birbirinden uzak şehirlerde ve farklı dönemlerde salgınlara neden olduğu tespit edilmiştir. Değişik ülkelerde gözlenen salgınlara kaynağına yönelik bilgi de elde edilebilmektedir.

Plazmit profil tiplendirmesi ucuz, kolay uygulanabilir ve çabuk sonuç veren bir yöntem olmasıyla, epidemiyolojik çalışmalarda özellikle salgın araştırmalarında ilk sırada tercih edilen bir genotipik inceleme yöntemidir. Bakteriyel suşların plazmit analizi, serotiplendirme ve faj tiplendirmesi gibi klasik tiplendirme yöntemleriyle birlikte oldukça değerli bilgiler sağlar. Plazmit profil tiplendirmesi *S. Muenchen*, *S. Goldcoast* ve *S. Berta* suşlarının ayırımında, yanısıra bazı *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis* faj tiplerinin ileri tiplendirmesinde başarı ile kullanılmıştır.

Enterik patojen *E. coli*'lerin ayırımında moleküler yöntemler oldukça önemli yer tutmaktadır. Shiga toxin (Stx) üreten *Escherichia coli* (STEC) enfeksiyonunun tanısı, klinik olarak şüpheli vakaların dışkı kültürlerinde üreyen suşlarda *stx* 1, *stx* 2 ve *E. coli* yapışma ve silinmeyi kodlayan gen bölgeleri (*eae*) varlığının polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile belirlenmesi ile konmaktadır. *stx*, enterohemolizin (*ehly*) ve STEC otoaglutinasyon adezini (*saa*) genleri, *eae* veya *eae* alt tiplerinin (a, b, g, d, e) ya da STEC serotiplerinin eş zamanlı olarak belirlenmesi için multipleks PCR geliştirilmiştir.

Virülans genleri veya O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 ve O157 serogruplarını tespit etmek için real-time PCR kullanılmaktadır. İzolatlardan olduğu kadar, direkt dışkı örneğinden hazırlanan fekal ekstarktlardan da PCR çalışılabilmektedir. Özellikle hastalığın ilerleyen dönemlerinde dışkı ile atılan STEC sayısının azaldığı durumlarda yararlıdır. Ancak dışkıda inhibitörler ve kanın bulunması, sonucu olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu nedenle kalite kontrol amacıyla mutlaka internal kontrol kullanılmalıdır.

STEC suşunu saptamak için bazen bir kültürden yüzlerce koloninin PCR ile incelenmesi gerekebilir. Bu durumda *stx* genini taşıyan kolonileri belirlemek için, koloni hibridizasyon yöntemi kullanılır. Sınırlı fragman uzunluk polimorfizmi (RFLP) analizinin PCR ile kombinasyonu (PCR-RFLP), gıda kaynaklı patojenlerin tanısı, ayrımı ve sürveyinde başarı ile uygulanmıştır. *HincII*, *AccI*, *HaeII* ve *PvuII* gibi restriksiyon enzimleri kullanılarak, PCR-RFLP yöntemiyle verotoksin genlerinin alt tiplendirmesi yapılabilmektedir. Faj tiplendirmesi ile birlikte *stx* alt tipinin belirlenmesi, STEC suşlarının uluslararası düzeyde karşılaştırılabilmesine olanak sağlamaktadır. Hayvan ve insandan izole edilen STEC suşlarının PFGE ile karşılaştırılması, insan enfeksiyonlarına neden olan STEC suşlarının hayvanlarla veya gıdalarla bağlantısını ortaya koymuştur.

Campylobacter'lerin alt tiplendirmesinde fenotipik yöntemlerin ayırım gücü genotipik yöntemlere göre oldukça düşüktür. Ancak *Campylobacter* türleri genomik yapı açısından da stabil olmayıp, genetik olarak heterojenite göstermektedir. Bir ya da birkaç enzimin birlikte uygulanması ile hazırlanan PFGE, epidemiyolojik araştırmalarda ve tiplendirmede yaygın olarak kullanılmaktadır. Sero-tiplendirme ile birlikte salgınların belirlenmesinde, insan, su ve hayvan izolatlarının karşılaştırılmasında oldukça yararlı bir yöntemdir. Lipo-oligosakkarid biyosentezi genlerinin PCR-RFLP yöntemi ile tiplendirilmesinin serotiplendirme sonuçları ile iyi bir korelasyon gösterdiği belirlenmiş olup, bu yöntemin serotiplendirilemeyen suşların tiplendirilmesinde de yararlı olabileceği düşünülmektedir. *C. jejuni*'nin flagella (*fla*) geni hem iyi korunmuş hem de değişken bölgelere sahip olması ile, PCR-RFLP için uygun bir bölgedir. Farklı kaynaklardan izole edilen *C. jejuni* suşlarının tiplendirilmesinde ya da nalidiksik asite duyarlı ve dirençli *C. lari* suşlarının ayırt edilmesinde amplifiye fragman uzunluk polimorfizmi (AFLP) yöntemi kullanılmıştır.

Listeria monocytogenes'in serotiplendirmesi epidemiyolojik çalışmalarda oldukça yararlı bir yöntem olmakla birlikte, sporadik enfeksiyonlara ve salgınlara yol açan çoğu suş 1/2a, 1/2b veya 4b serotiplerine aittir. 1/2a serotip suşları oldukça heterojendir ve bu nedenle herhangi bir moleküler yöntemle kolayca ayrılabilir. Daha yakın ilişkili olan 4b serotipi suşlarının tiplendirilmesi için birkaç yöntemin birlikte kullanılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Ribotiplendirme, PFGE, AFLP ve polimorfik DNA'nın rastgele amplifikasyonu (RAPD) yöntemleri, *L. monocytogenes*'in tiplendirmesinde kullanılabilir. PFGE *L. monocytogenes*'in tiplendirilmesinde takrarlanabilirliği ve ayırım gücü ile tercih edilen bir yöntemdir. PFGE paternlerinin kompleksliği bazı suşların karşılaştırılmasını güçleştirse de, yüksek frekansta kesen *EcoRI* gibi restriksiyon enzimlerinin kullanılması ile elde edilen paternler, epidemiyolojik araştırmalarda faydalı sonuçlar vermiştir. Elektronik kütüphanelerde saklanan PFGE profillerinin geriye dönük olarak karşılaştırılması, önceden farkedilmeyen enfeksiyon kümelenmelerini ortaya koymuştur.

PFGE ile birlikte ribotiplendirme, farklı serotiplerdeki *L. monocytogenes* suşlarının ayrımı ve serotip içindeki, özellikle salgınlarda en sık gözlenen 4b serotipi içindeki alt tiplendirme için kullanılmaktadır. Salgınlardaki epidemiyolojik araştırmalarda ribotiplendirme tek başına yeterli ayırım gücüne sahip olmadığı halde, otomatize ribotiplendirme sistemleri hızlı ve kolay uygulanabilir olmaları

ile, hastalık kümelenmelerinin başlangıç tanısı ile gıda üretim tesislerinde ve çevresinde bulunan *L. monocytogenes*'in, geçici ve uzun dönem kalıcı suşlarının identifikasyonu için değerlidir. İyi korunmuş gen bölgeleri veya virülans faktörlerini kodlayan genlerin sekanslarının karşılaştırılmasına dayalı, ayırım gücü yüksek bir yöntem olan "Multilocus sequence typing" (MLST), *L. monocytogenes* tiplendirmesinde son zamanlarda kullanılmaya başlanmıştır.

Yersinia enterocolitica, pek çok serotip ve biyotipe sahip olmasına karşın, özellikle O:3, O:5,27, O:8 ve O:9 serotiplerine ait suşların insan enfeksiyonlarına neden olduğu, 1A biyotipine ait suşların genellikle avirülan olduğu bilinmektedir. *Y. enterocolitica*'nın patojenitesinin belirlenmesinde kromozom ya da plazmitte yerleşen virülans genleri PCR ile ortaya konabilmektedir. RFLP, RAPD ve ribotiplendirmenin yanı sıra *NotI*, *ApaI* ve *XhoI* enzimleri kullanılarak hazırlanan PFGE de epidemiyolojik tiplendirmede kullanılmıştır. *Y. enterocolitica*'nın patojenik izolatlarının tiplendirilmesinde ribotiplendirmeye göre daha faydalı olduğu bulunan PFGE, özellikle aynı biyotipe ait suşların ayrımında başarı ile kullanılan altın standart bir yöntemdir. Son zamanlarda multilokus enzim elektroferizi (MLEE) de *Yersinia* türlerinin ayrımında kullanılan yararlı yöntem olarak değerlendirilmiştir.

Ortama bulunması ve insan barsak florasının bir elemanı olması nedeniyle, gıda kaynaklı enfeksiyonların bir diğer etkeni olan *Clostridium perfringens* suşlarında enterotoksin (*cpe*) geninin PCR ile belirlenmesi gerekir. Epidemiyolojik verilerle birlikte değerlendirilen PFGE, suşların tiplendirilmesinde yararlıdır. Ayrıca plazmit analizi, ribotiplendirme ve AFLP de *C. perfringens*'in tiplendirilmesinde kullanılmıştır.

Real-time PCR yöntemi, *Listeria monocytogenes*'in saptanması ve sayımında, *S. enterica*, *V. parahaemolyticus*, *C. jejuni* ve STEC gibi çeşitli ishal etkeni bakterilerin simültane olarak saptanmasında kullanılmıştır. DNA çipleri de çeşitli gıda kaynaklı patojenlerin analizi için kullanılmıştır. *Campylobacter* türlerinin, yakın ilişkili *L. monocytogenes* izolatlarının simültane olarak ayrımında kullanılan hızlı bir yöntemdir. Bazı STEC O157 suşlarının genom sekanslarındaki tüm genleri içeren bir mikroarray de hazırlanmıştır.

Gastroenterit etkeni virüsleri genotiplendirmesi, hem bu patojenlerin sınıflandırmasında hem de epidemiyolojilerinin anlaşılacak viral gastroenteritleri önleyici stratejilerin geliştirilmesinde önemlidir. PCR ve "reverse transcriptase-PCR" (RT-PCR), gastroenterit virüslerinin tanısında ve sekanslama ile birlikte epidemiyolojik çalışmalarda kullanılan en duyarlı yöntemlerdir. RT-PCR testi, VP7 (G genotipi) ve VP4 (P genotipi) genlerinin özel bir bölgesini hedef alan tip spesifik primerlerle, A grubu rotavirüslerin G ve P tiplendirmelerinde uygulanmıştır. RT-PCR, *Norovirus* ve *Sapovirus*'ü içeren kalisivirüsler ve astrovirüslerin genetik varyasyon ve genotiplendirme çalışmalarında kullanılmıştır. Bu çalışmalarda RNA polimeraz bölgesi gibi genellikle yapısal olmayan viral protein bölgelerindeki viral genomun iyi korunmuş bölgelerini hedef alan primerler yaygın olarak kullanılmakta ve ardından sekanslama yapılmaktadır. Yüksek düzeyde çeşitliliğe sahip olan norovirüs, sapovirüs ve astrovirüslerin tüm suşlarını saptayacak tek bir primer çifti mevcut değildir. Bu nedenle genomun farklı bölgelerini hedef alan çoklu primer setlerinin kullanımı, genetik olarak uzaktan ilişkili suşların saptanma şansını artırmaktadır. PCR ve RT-PCR yöntemleri, enterik adenovirüsler, koronavirüsler, torovirüsler, pikobirnavirüsler ve Aichi virus tanısında da artan sıklıkta kullanılmaktadır. Adenovirüs genomik DNA restriksiyon enzim analizi enterik adenovirüslerin (40 ve 41 tipleri) ayrımında kullanılmıştır.

Real-time PCR gibi ileri teknolojiler, PCR ürünlerinin kantitatif ölçümünü ve doku kültüründe üremeyen virüsler için viral yük tayinini mümkün kılmaktadır. Viral gastroenteritlerin tanısı için gen çip teknolojileri geliştirilmiş olsa da henüz yaygın olarak kullanılmamaktadır.

Gıda ve su kaynaklı enfeksiyonların bir diğer sebebi parazitler etkenlerdir. *Entamoeba histolytica* ve *Entamoeba dispar*'ın saptanması ve ayrımı için PCR kullanılmaktadır. Klasik PCR; dışkı, karaciğer veya beyin aspiratları gibi örnekler üzerine uygulanmış olup, hem trofozoit hem de kist DNA'sını saptayabilmektedir. Çeşitli çalışmalarda, PCR'ın mikroskopiden daha duyarlı ve özgül olduğu ve en az antijen saptama yöntemleri kadar duyarlı olduğu belirlenmiştir. Real-time PCR hem *E. histolytica* ve *E. dispar*'ın saptanmasında hem de taze ya da korunmuş dışkıda *E. histolytica*, *Giardia intestinalis* (*G. intestinalis*) ve *Cryptosporidium parvum*'un eşzamanlı olarak tespitinde kullanılmıştır. Dışkı örneklerinden *G. intestinalis* ve diğer parazitlerin tanısı için, duyarlılığı ve özgüllüğü oldukça yüksek olan oligonükleotid çipler de geliştirmiştir. Salgınlardaki epidemiyolojik araştırmalara yardımcı olmak üzere *G. intestinalis*'e özgü genotiplerin saptanması için multipleks PCR testi de uygulanmıştır.

Şebeke sularının kontaminasyon potansiyeli nedeniyle, parazitik protozoonların suda rutin olarak izlenmesi bir halk sağlığı kontrol önlemi olarak tavsiye edilmektedir. *G. intestinalis* kistleri soğuk suda 2-3 ay canlı kalabilmekte ve rutin klor uygulamasına oldukça direnç gösterebilmektedir. DFA testlerinin yanısıra PCR, su örneklerinde *G. intestinalis* kistlerinin saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Floresan testler ve özel boya kullanılan testlerle karşılaştırıldığında PCR'ın avantajı, duyarlılığının daha yüksek olmasıdır. Kötü su kalitesini daha iyi belirleyebilmek için canlı organizmaları tespit edecek moleküler yöntemlerin de geliştirilmesine çalışılmaktadır.

Çeşitli PCR-RFLP'ye dayalı genotipik yöntemler *Cryptosporidium* saptanması ve tür düzeyinde ayrımı için kullanılmıştır. Bu tekniklerin çoğu küçük bir rRNA alt ünitesine dayalıdır. *C. parvum* ve *C. hominis*'in alt tiplendirmesi için yaygın olarak kullanılan tekniklerden biri mikrosatellit analizidir. Alt tiplendirme yöntemlerinin yararlılığı kriptosporidiozisin gıda ve su kaynaklı salgınlarından örneklerin analizinde gösterilmiştir.

Ülkemizde çeşitli moleküler yöntemler *Salmonella*, *Shigella* ve STEC suşlarının karakterizasyonu, ilaç dirençlerinin belirlenmesi ve rotavirüslerin tiplendirilmesinde kullanılmıştır.

Tüm bu moleküler yöntemlerin uluslararası düzeyde standardizasyonlarının yapılmış olması hem tekrarlanabilirlik hem de laboratuvarlar arası verilerin karşılaştırılabilmesi için önemli bir kriterdir. PulseNet (National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance), 1996'da Amerikan Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'nin (CDC) öncülüğünde, çeşitli eyalet halk sağlığı laboratuvarları, Amerikan Tarım Bakanlığı (USDA) ile Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kurulmuş, gıda kaynaklı patojenlerin ulusal moleküler alt tiplendirme ağıdır. Sistem, çeşitli bölgelerden elde edilen suşları karşılaştırmak için pulslu alan jel elektroforezi (PFGE) tekniğini kullanmaktadır. *Salmonella* dahil çeşitli gıda kaynaklı patojenleri kapsayan bu programda değişik kaynaklardan elde edilen izolatların karşılaştırılması için moleküler tiplendirme metodları epidemiyolojik araştırmalarla kombine edilerek salgınların hızlı tanısı sağlanmaktadır. ABD'de oldukça yaygın bir ağ oluşturan PulseNet, Kanada, Asya-Pasifik, Latin Amerika'nın yanısıra Avrupa'da da kurulmuştur.

Avrupadaki halk sağlığı, gıda ve veterinerlik enstitülerinin üye olduğu ve gıda kaynaklı hastalıkların gerçek zamanlı araştırılması için kurulmuş olan PulseNet Europe, *Salmonella* ve verotoksijenik *Escherichia coli*'nin yanısıra *L. monocytogenes*'in PFGE yöntemi ile tiplendirilmesini kapsamaktadır. Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi Başkanlığı Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarı bu ağın bir üyesi olup, düzenlenen dış kalite kontrol programlarına aktif olarak katılmaktadır.

2001-2004 yılları arasında Avrupa Komisyonu tarafından finanse edilen ve Enter-net üyesi dokuz ülkenin katılımı ile oluşturulan Salm-gene projesi, moleküler suş tiplendirmesi ve ayrımı yolu ile uluslararası düzeyde *Salmonella* sürveyansını güçlendirmeyi hedeflemiştir. Projenin amaçları uluslararası

salgınların zamanında tanınmasını sağlayacak PFGE ve polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayalı moleküler tiplendirme tekniklerinin geliştirilmesi, *Salmonella* suşlarına ait uluslararası gerçek zamanlı moleküler verilerin toplanıp saklanması, alt tipleri belirlenmiş *Salmonella* suşlarına uygulanan çeşitli moleküler yöntemlerin maliyet ve etkinliğinin belirlenmesi olmuştur. Dokuz üye Avrupa ülkesinden 25000'in üzerinde *Salmonella* suşu PFGE ile tiplendirilmiş ve veritabanı oluşturulmuştur. Ülkeler arasında veri paylaşımını sağlayan bu proje ile Avrupada en sık karşılaşılan *Salmonella* serotip ve faj tipleri tespit edilmiştir. PFGE yönteminin ve analizinin standardize edilmesi ile laboratuvarlar arası karşılaştırma yapılabilmesi sağlanmış ve uluslararası salgınların daha kısa sürede ortaya konmasına olanak tanınmıştır. Bu proje ile toplanan veriler daha sonra kurulan PulseNet Europe ağına aktarılmıştır.

FBVE (Food-borne Viruses in Europe) ağı ise, viral gastroenteritler ile akut A ve E hepatiti virüslerine ait epidemiyolojik, virolojik ve moleküler tanı verilerinin Avrupa çapında paylaşılması için kurulmuştur. Onüç ülkeden 26 enstitünün katılımı ile oluşturulan bu ağ ile 2001 yılından beri web tabanlı olarak viral gastroenterit salgın bildirimleri yapılmaktadır. Bu ağın veritabanında 16 000'den fazla salgın yer almakta olup, elde edilen verilerle göre, salgın araştırmalarında *Norovirus* genotiplendirmesi için ORF2 sekansına dayalı, kapsid temelli tiplendirmenin en iyi ayrımı sağladığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak geliştirilen çeşitli moleküler genetik yöntemler, mikroorganizmaların karakterizasyonu ve ayırımında, özellikle salgınların ve vaka kümelenmelerinin tespit edilmesinde yeni bir bakış açısı sağlamıştır. Bu yöntemlerin klasik fenotipik yöntemlerle birlikte değerlendirilmesi ile önemli bilgiler elde edilmiştir. DNA çipleri ve MLVA'nın kullanıma girmesi, epidemiyolojik süveyansa yeni boyutlar kazandırmıştır. Verilerin bölgesel, ulusal ve uluslararası düzeyde paylaşılması ve değerlendirilmesi gıda ve su kaynaklı enfeksiyonların süveyansına önemli katkılar sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. Amar CF, Dear PH, Pedraza-Diaz N, Looker N, Linnane E, McLauchlin J. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 446-452.
2. Aslantaş Ö, Erdoğan S, Cantekin Z, Gülaçtı İ, Evrendilek GA. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from Turkish cattle. *Int J Food Microbiol* 2006; 106: 338-342.
3. Chizhikov V, Wagner M, Ivshina A, Hoshino Y, Kapikian AZ, Chumakov K. Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2398-2407.
4. Duizer E, Kroneman A, Siebenga J, Verhoef L, Vennema H, Koopmans M, the FBVE network. Typing database for noroviruses. *Euro Surveill* 2008;13(19):pii=18867.<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18867>.
5. Evangelopoulos A, Spanakos G, Patsoula E, Vakalis N, Legakis N. A nested, multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces. *Ann Trop Med Parasitol* 2000; 94: 233-240.
6. Glaberman S, Moore JE, Lowery CJ, Chalmers RM, Sulaiman I, Elwin K, Rooney PJ, Millar BC, Dooley JS, Lal AA, Xiao L. Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 631-633.
7. Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 276-282.
8. Horby PW, O'Brien SJ, Adak GK, Graham C, Hawker JI, Hunter P, et al. A national outbreak of multi-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type (DT) 104 associated with consumption of lettuce. *Epidemiol Infect* 2003; 130:169-78.
9. Iijima Y, Asako NT, Aihara M, Hayashi K. Improvement in the detection rate of diarrhoeagenic bacteria in human stool specimens by a rapid real-time PCR assay. *J Med Microbiol* 2004; 53(Pt 7):617-22.

10. Lazaro D, Hernandez M, Scortti M, Esteve T, Vazquez-Boland JA, Pla M. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* targets and AmpliFluor technology. *Appl Environ Microbiol* 2004;70: 1366–77.
11. Lovmar L, Fock C, Espinoza F, Bucardo F, Syvanen AC, Bondeson K. Microarrays for genotyping human group rotavirus by multiplex capture and type-specific primer extension. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5153-5158.
12. Lukinmaa S, Schildt R, Rinttilä T, Siitonen A. *Salmonella* Enteritidis phage types 1 and 4 pheno- and genotypic epidemiology of recent molecular methods for food-borne pathogens outbreaks in Finland. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2176–82.
13. Lukinmaa S, Nakari UM, Eklund M, Siitonen A. Application of molecular genetic methods in diagnostics. *APMIS* 2004; 112: 908-929.
14. Lyytikäinen O, Koort J, Ward L, Schildt R, Ruutu P, Japissón E, et al. Molecular epidemiology of an outbreak caused by *Salmonella enterica* serovar Newport in Finland and the United Kingdom. *Epidemiol Infect* 2000;124:185–92.
15. Ng CG, Gilchrist CA, Lane A, Roy S, Haque R, Houpt ER. Multiplex real-time PCR assay using Scorpion probes and DNA capture for genotype-specific detection of *Giardia lamblia* on fecal samples. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1256-1260.
16. Rochelle PA, De Leon R, Stewart MH, Wolfe RL. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia Lamblia* in water. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 106-114. Rodriguez
17. Tanyuksel M, Petri Jr. WA. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 713-729.
18. Verweij JJ, Blange RA, Templeton K, Schinkel J, Brien EA, van Rooyen MA, van Lieshout L, Polderman AM. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1220-1223.



Sözel Bildiriler

S1

OXA-58 Üreten Karbapeneme Dirençli *Acinetobacter baumannii* Salgın Suşlarının Tanımlanması

Canan Külâh¹, Marlies Mooij², Füsün Beğendik Cömert¹, Elif Aktaş¹, Güven Çelebi³, Nagihan Özlü¹, Paul Savelkoul²

¹Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Zonguldak.

²Vrije University, Medical Microbiology and Infection Control, Amsterdam.

³Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Zonguldak.

Hastanemizde Ağustos 2005’de karbapeneme dirençli (KD) *Acinetobacter baumannii* izolasyonunda ani bir artış gözlenmiştir. Bu çalışmada KD *A.baumannii* izolatlarının moleküler epidemiyolojik değerlendirilmesi ve karbapeneme direnç mekanizmalarının araştırılması amaçlanmıştır. 2003-2006 yılları arasında izole edilmiş hastane kaynaklı 145 KD *A.baumannii* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. İmipenem ve meropenem direncinde E-test kullanılarak MİK değerleri belirlenmiştir. Antibiyotik duyarlılık profillerine göre antibiyotikler oluşturulmuştur. Suşların tümü “Amplified Fragment Length Polymorphism” (AFLP) analizi ile tiplendirilirken, Haziran 2005-Şubat 2006 arasında izole edilen 50 suş PFGE yöntemi ile de tiplendirilmiştir. Karbapenemaz direnç genlerinin saptanması amacıyla metallo-beta-laktamaz genleri; GIM-1, SIM-1, SPM-1, IMP-like, VIM-like ve oksasilineaz genleri; blaOXA-24 like, blaOXA-23 like, blaOXA-51 like ve blaOXA-58 polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile araştırılmıştır. AFLP analizi ile sırasıyla 72, 20 ve 12 suş içeren başlıca üç kümeleşme belirlenirken, altı adet küçük küme ve 23 adet tekil suş saptanmıştır. PFGE yöntemi ile ise üç PFGE genotipi belirlenmiştir. Predominant olan PFGE genotipinde 50 suştan 45’i yer alırken bunların 35’inin AFLP analizindeki ana genotipe karşılık geldiği gözlenmiştir. Çevre taraması sonucunda hasta monitörü yüzeyinden izole edilen bir suş, her iki tiplendirme yöntemi ile de ana salgın genotipi ile ilişkili bulunmuştur. Başlıca üç AFLP tipi üç antibiyotik duyarlılık profiline karşılık gelmiştir. Çalışılan tüm suşlara karşı in vitro olarak genellikle etkili tek antimikrobiyalin tobramisin olduğu belirlenmiştir. PZR analizi ile üç ana kümede yer alan suşlarda ve kalan suşların %79’unda blaOXA-51 like ve blaOXA-58 genleri saptanmıştır. Hastanemizde birden fazla KD *A.baumannii* klonu ile uzun süreli bir salgın gelişmiştir. Karbapenem direncinden OXA-58 tipi oksasilineaz üretimi sorumlu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, karbapenemaz, OXA-58, salgın.

S2

Antibiyotik Kullanımına Bağlı İshalli Hastalarda *Clostridium difficile* Kökenlerinin Toksin Genlerinin Araştırılması

Umut Deniz, Nurver Ulger, Burak Aksu, Güner Söyletir

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

Clostridium difficile, antibiyotik kullanımına bağlı, kendiliğinden iyileşen akut ishalden fulminant pseudomembranöz enterokolite kadar değişen yelpazede hastalıklara yol açan, gram pozitif, sporlu, anaerob bakteridir. Hastalığın patogenezinin toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin) üretimi sorumludur. Son yıllarda hastane salgınlarına da neden olan “binary toksin” (BT) varlığı tanımlanmıştır. Çalışmamızda, hastane laboratuvarımıza *C.difficile* toksin varlığının araştırılması için gönderilen dışkı örneklerinden *C.difficile* kökenlerinin izolasyonu ve toksin genlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Eylül 2006-Mart 2008 tarihleri arasında toplam 633 dışkı örneği işleme alınmış, CCFA (sikloserin, sefoksitin-fruktoz agar) seçici besiyerine ekilerek anaerob ortamda inkübe edilmiştir. Gerek dışkı örneği gerekse izole edilen kökenlerden enzim immunoassay (ImmunoCard-Meridian) yöntemi ile toksin varlığı araştırılmıştır. Toplam 50 hastadan *C.difficile* kökenleri izole edilmiş, PZR ile toksin A varlığı için *tcd A*, toksin B varlığı için *tcd B* ve BT için *cdt A* ve *cdtB* genleri bakılmıştır. *C.difficile* üretilen dışkıların 30’unda toksin pozitifliği saptanmış, toksin negatif olan dışkılarından izole edilen 20 kökenin kültüründen yeniden toksin çalışıldığında altı kökende toksin üretiminin olduğu saptanmıştır. Kültürden ve dışkıdan pozitiflik saptanan toplam 36 kökende (%72) toksin A ve toksin B genleri pozitif bulunmuş, hiç bir kökende BT geni saptanmamıştır. Sonuçlarımız, belli bir zaman diliminde hastanemizde antibiyotiğe bağlı gelişen ishalli hastalardaki *C.difficile* kökenlerinin toksin geni durumunun bilinmesi, ileride gelişebilecek değişiklikleri izleyebilmek için bir veri tabanı oluşturacaktır.

Anahtar Kelimeler: Binary toksin, *Clostridium difficile*, toksin A, toksin B.

S3

***Helicobacter pylori* Virülans Faktörleri ve Konak İnterlökin-1 Polimorfizminin Prognosa Etkisi**Erkan Yula¹, Deniz Pekmezci³, Harun Yerhan², Bülent Kantarçeken², Fatih Köksal¹¹Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana.²Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Kahramanmaraş.³Hıfzıssıhha Enstitüsü, Adana.

Helicobacter pylori enfeksiyonlarının prognozunu, bakteriye ait *cagA/vacA* genotipleri ve *vacA* gen allelleri ile konağa ait proinflatuvar sitokin *IL1β* ve *IL1RN* (IL-1 reseptör antagonisti) genotiplerindeki polimorfizmin etkilediği ileri sürülmüştür. *IL1β* geninin regülatör bölgesindeki -511'de C/T ve/veya -31'de T/C nokta mutasyonuna sahip kişilerde aşırı IL-1β üretimi ile inflamatuvar cevap ve gastrik lezyonun arttığı, gastrik asit seviyesinin azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca *IL1RN* geninin 2. intronunda yer alan tekrarlayan dizilerin sayısal polimorfizminin de IL-1β üretimini etkilediği, iki tekrara sahip kısa allellerin (2/2) uzun allelik tiplere göre IL-1β üretimini aşırı derece artırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada çeşitli gastroduodenal patolojisi olan hastalardan izole edilen *H.pylori* suşlarının virülans genleri ve allelleri ile hastaya ait *IL1β* ve *IL1RN* genlerindeki polimorfizmin prognoza etkisi araştırılmıştır. Çalışmaya 103 hastadan alınan toplam 176 antrum ve korpus biyopsi örneği dahil edilmiştir. Qiagen DNA doku kiti ile ekstrakte edilen DNA örneklerinde “in-house” PCR ile önce *glmM*; *glmM* pozitif bulunan örneklerde de *cagA* ve *vacA* ile *vacA*'nın “s1/s2” ve “m1/m2” allelik subtipleri çoğaltılmıştır. *IL1β* regülatör bölgelerindeki mutasyonların tayini için PCR-RFLP, *IL1RN* gen polimorfizminin tayini için ise PCR-VNTR yöntemi kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 103 hastanın 91'inde (%88.3) *glmM* pozitifliği bulunmuştur. Örneklerin 53'ünde (%58.2) *H.pylori* TipI (*cagA*+/*vacA*+), 38'inde (%41.7) TipII (*cagA*/*vacA*-) suşlarının kolonizasyonu belirlenmiştir. TipI suşları ile kolonize hastaların ikisinde (%3.8) ve *glmM* negatif hastaların üçünde (%25) PCR-VNTR ile *IL1RN* 2/2 polimorfizmi tespit edilmiştir. Hastaların *IL1β* genotipik dağılımında en sık karşılaşılan genotipin -511'de (51/103) CT, -31'de ise (53/103) TC genotipi olduğu görülmüştür. Duodenal ülserli hastalarda *H.pylori*'nin *IL1RN* polimorfizminden bağımsız risk faktörü olduğu; *H.pylori* ile kolonize olmayan hastalarda %25 oranında pozitiflik gösteren *IL1RN*'nin ise bağımsız bir risk faktörü olabileceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Helicobacter pylori*, IL1β, IL1RN, CagA, VacA, polimorfizm.

S4

Optik Okuyucu Elektroforez Sistemi ve Otomatik Molekül Büyüklüğü Belirleyicisi

Tanıl Kocagöz¹, Erkan Mozioglu², Sinem Öktem³, Doruk Engin⁴, Yavuz Sezen⁵

¹Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD., İstanbul.

²TÜBİTAK, Ulusal Metroloji Enstitüsü

³Yeditepe Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, İstanbul.

⁴Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD., Ankara.

⁵Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mikrobiyoloji AD., Gebze.

Bilindiği gibi moleküler incelemelerde kullanılan elektroforez ve jel görüntüleme, değerlendirme işlemleri birbirinden ayrı, birbirini izleyen şekilde yapılmaktadır. Bu çalışmada bu iki sistemin bir araya getirilmesi hedeflenmiştir. Jel elektroforezi ile birbirinden ayrılan moleküllerin optik bir okuyucu aracılığı ile doğrudan izlenebileceği bir aygıt geliştirilmiş ve DNA molekülleri, floresans uyarıcı ışık kaynağı olarak parlak mavi LED' lerle görünür hale getirilmiştir. Jel elektroforezi ile ayrılmış molekülleri kendiliğinden saptayabilen bir aygıt hazırlanmış ve günümüzde yaygın bir şekilde ışık algılayıcı olarak kullanılan, ışık yayan diyot (LED), ışıltı-direnç (LDR) ışık algılayıcı olarak denenmiştir. Özel olarak geliştirilmiş sinyal çevirici ve yine özel olarak tasarlanmış bir bilgisayar programı ile ışık sinyalleri bilgisayar ekranında çizge haline getirilmiştir. Bu aygıt sayesinde, mor-ötesi ışık kaynaklarına gereksinim olmadan, elektroforez yapıldığı sırada moleküller izlenebilecek ve bilgisayar programı tarafından yorumlanabilecektir. DNA parmak izi incelemesi, restriksiyon enzim kesimi ile mutasyon analizleri ve polimeraz zincirleme tepkimesi ile enfeksiyon etkenlerinin tanısı gibi işlemler bu aygıtlarla çok kolay ve otomatik olarak yapılabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Elektroforez, optik okuyucu, jel görüntüleme.

S5

***Mycobacterium tuberculosis* Klinik İzolatlarında Kinolon Direncinin Klasik ve Moleküler Yöntemlerle Saptanması**

Emrah Ruh, Zeynep Sarıbaş, Alpaslan Alp

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

Son yıllarda, çoklu ilaç direncine sahip *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının yaygınlaşması, florokinolonları, dirençli olgularda umut veren ilaçlar olarak gündeme getirmiştir. Bu nedenle *M.tuberculosis* izolatlarında kinolon direncinin hızlı ve doğru bir şekilde saptanmasına yönelik çalışmalar büyük önem kazanmıştır. Bu çalışmanın amacı, *M.tuberculosis* klinik izolatlarında siprofloksasin, sparfloksasin ve moksifloksasin direncini hem klasik yöntemle, hem de *gyrA* genindeki mutasyonların saptandığı moleküler yöntemlerle belirlemektir. Bu amaçla birinci sıra antitüberküloz ilaçlardan en az birine dirençli olduğu saptanmış 100 adet *M.tuberculosis* klinik izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. Bu izolatların siprofloksasin, sparfloksasin ve moksifloksasin için MİK değerleri agar dilüsyon yöntemiyle Middlebrook 7H10 katı besiyeri kullanılarak belirlenmiştir. Siprofloksasin, sparfloksasin ve moksifloksasin MİK değerleri sırasıyla 0.25-8 µg/ml, 0.125-2 µg/ml ve 0.06-1 µg/ml aralığında bulunmuştur. Agar dilüsyon yöntemiyle test edilen bu üç ilaçtan en az birine dirençli bulunan 41 *M.tuberculosis* izolatında kinolon direncini 1-2 gün gibi kısa bir sürede test edebilmek için floresans rezonans enerji transferi (FRET) yönteminin kullanıldığı gerçek zamanlı PCR uygulanmıştır. Gerçek zamanlı PCR'ın duyarlılığı agar dilüsyon yöntemiyle karşılaştırıldığında %83 olarak bulunmuştur. Dirençli izolatlarda *gyrA* genindeki mutasyonların yerlerinin saptanması için DNA dizi analizi yapılmış ve 88, 90, 91 ve 94. kodonlarda daha önce kinolon direncine neden olduğu gösterilmiş mutasyonlar farklı izolatlarda saptanmıştır. Bu çalışma sonucunda moksifloksasin ve sparfloksasin MİK aralıklarının siprofloksasine oranla daha düşük olması nedeniyle, bu iki ilacın *M.tuberculosis* izolatlarına karşı daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Kinolon direncinin kısa sürede saptanmasında gerçek zamanlı PCR yönteminin kullanılabileceği, ancak rutin uygulamada bunun klasik agar dilüsyon yöntemiyle birlikte kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis*, kinolon direnci, gerçek zamanlı PCR.

Vajinal Kandidozlu Hastalardan İzole Edilen *Candida albicans* Suşlarında Adezyon Genlerinden ALS, HWP ve SAP İfadesinin Gösterilmesi

Tuncay Nas¹, Ayşe Kalkancı², Işıl Fidan², Kenan Hızıl³, Sezen Bolat², Sultan Yolbakan², Ercan Yılmaz¹, Seçil Özkan⁴, Semra Kuştımur²

¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Ankara.

²Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

³Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara.

⁴Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Ankara.

Vulvovajinal kandidoz, östrojen seviyesinin yükseldiği koşullarda daha sık görülmektedir. Bu sık rastlanılan hastalığın ve özellikle de rekürren vulvovajinal kandidoz olarak tanımlanan özel formunun patogenezi tam olarak anlaşılmış değildir. Vajinal kandidoz ile östrojen düzeyi arasında belirgin bir ilişki belirlenmiştir. Bu çalışmanın amacı, farklı östrojen düzeyi olan hasta gruplarından izole edilen *Candida albicans* suşlarında, virülans faktörlerinden biri olan adezyondan sorumlu gen ifadenmesinde farklılık olup olmadığının araştırılmasıdır. Bu amaçla, 'agglutinin like sequence' (ALS), 'hypha wall protein' (HWP), ve 'secreted aspartyl proteinase' (SAP) genleri hedeflenmiştir. Vulvovajinal kandidozu olan 10 gebe, dört menapoz, 15 doğurganlık çağındaki kadından izole edilen toplam 29 *C.albicans* suşundan mRNA elde edilmiş ve SAP4, ALS1 ve HWP1 genleri 'reverse-transcriptase polymerase chain reaction' (RT-PCR) ile çoğaltılmıştır. Bütün olguların %68.9'unda ALS1, %62'sinde HWP1, ve %37.9'unda SAP4 ifadesi bulunmuştur. Gebelerden izole edilen *C.albicans* suşlarının %70'inde ALS1, %60'ında HWP1, %40'ında SAP4 gen ifadesi gösterilmiştir. Menapozdaki vajinit olgularından izole edilen *C.albicans* suşlarının %75'inde ALS1, %25'inde HWP1 ve %50'sinde SAP4 gen ifadesi gösterilmiştir. Doğurganlık çağındaki vajinit olgularından izole edilen *C.albicans* suşlarının %66.6'sında ALS1, %73.3'ünde HWP1, ve %33.3'ünde SAP4 gen ifadesi gösterilmiştir. Farklı östrojen düzeyi olan vajinitli olgulardan izole edilen *C.albicans* suşları arasında, adezyondan sorumlu gen ifadesi açısından, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$). Bu çalışma sonucunda, östrojen düzeyi yüksek olgularda, daha fazla adezyon geni ifadelendiği gösterilmemiştir. Östrojen yüksekliği ile kandidoz arasındaki ilişkinin, adezyon genlerinden bağımsız başka bir mekanizma ile gerçekleştiği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: ALS1, *Candida*, gen ifadesi, HWP1, RT-PCR, SAP4, vajinit.

S7

Mersin’de Lamivudin ve Adefovir İle Tedavi Edilmekte Olan Kronik Hepatit B’li Hastalarda İlaç Direncine Sebep Olan HBV Polimeraz Mutasyonlarının Gümüş Boyama Tabanlı “Cycle-Sequencing” Metodu İle Araştırılması

Mehmet Sami Serin¹, Fatma Ebru Bekiroğlu¹, Seda Tezcan², Gönül Aslan², Orhan Sezgin³, Engin Altıntaş³, Gürol Emekdaş², Mahmut Ülger², Serpil Polat¹

¹Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

²Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

³Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Mersin.

Son yıllarda HBV virion DNA’larının klonlanması, sekanslanması ve ekspresyonu ile HBV replikasyon aşamaları netleştirilmiştir. Bu bilgiler, güvenli ve etkili aşıların, hassas tanı kitlerinin ve çeşitli nükleozid/-tid analogu ilaçların geliştirilmesine büyük katkı sağlamıştır. Ancak tüm bu gelişmelerin yanı sıra HBV enfeksiyonlarından korunma ve tedavide halen ciddi sıkıntıların olduğu da bilinmektedir. HBV bir DNA virusu olmakla beraber, hata yapmaya açık bir revers transkriptaz (RT) enziminin rol oynadığı, pregenomik RNA’nın revers transkripsiyon olayı ile replike olmaktadır. Dolayısıyla genom içerisinde değişik mutasyonları olan geniş bir “quasispecies” havuzu oluşturmaktadır. Virus, immünite ve ilaç ile indüklenen seleksiyon baskısı altında yüksek varyasyonlar oluşturup, zamanla aşı ile ilişkili kaçak mutantlar ve ilaca dirençli mutantlar olarak ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızda ortalama 2 yıllık lamivudin (LAM) ve/veya adefovir (ADV) tedavisi alan kronik hepatit B’li 61 hasta serumundan, LAM ve ADV direncinden sorumlu, mutasyonların sıklıkla belirlendiği HBV *polA* geninin RT özelliği gösteren bölgesindeki C ve D kangallarını içeren 422 baz çift (bp)’lik fragmenti, “nested” PCR ile amplifiye edilerek “cycle-sequencing” ile dizileme reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Bu ürünler, 30x40 cm’lik jelde (PAGE) ayrılarak gümüş boyamayla görüntülenmiştir. Diziler, gen bankasının Z35716 kabul no’lu dizisi ile karşılaştırılmıştır. Ortalama 2 yıllık tedavi sonunda 61 hastanın 12’sinde (%19.6) LAM direncinden sorumlu tutulan M204I (%14.2), M204V (%3.3) ve L179M (%1.6) mutasyonları, ayrıca bu hastaların 5’inde (%8.2) ADV direncinden sorumlu tutulan K241E (%4.9) ve N236T (%3.3) mutasyonları tespit edilmiştir. Çalışmamızda uyguladığımız gümüş boyama tabanlı DNA dizi analizi metodu, özellikle kısa fragmentlerin (max. 500 bp) araştırılmasında yeterince hassas ve radyoaktif olmadığı için de güvenli olup, ekonomik özelliği dolayısıyla araştırma laboratuvarları için uygun bir seçenek oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: DNA dizileme, hepatit B virusu, nükleozid analogu, direnç

Kan Bağışçılarının Anti-HCV Tarama ve Doğrulaması İçin Akış: Çok Merkezli Bir Çalışma

Ayşe Esra Karakoç¹, Rukiye Berkem¹, Hasan Irmak², Ali Pekcan Demiröz², İdil Yenicesu³, Nigar Ertuğrul⁴, Önder Arslan⁵, Sabri Kemahlı⁶, Sevinç Yılmaz⁷, Osman Özcebe⁸, Abdurrahman Kara⁹, Gülsüm Özet¹⁰, Ziya Cibali Açıkgoz¹¹, Tülin Açıkgoz¹²

¹S.B.Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara.

²S.B.Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları, Ankara.

³Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kan Merkezi, Ankara.

⁴S.B.Ankara Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kan Merkezi, Ankara.

⁵Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İbni Sina Kan Merkezi, Ankara.

⁶Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Serpil Akdağ Kan Merkezi, Ankara.

⁷S.B.Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kan Merkezi, Ankara.

⁸Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kan Merkezi, Ankara.

⁹S.B.Dr.Sami Ulus Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kan Merkezi, Ankara.

¹⁰S.B.Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kan Merkezi, Ankara.

¹¹S.B.Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kan Merkezi, Ankara.

¹²S.B.Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kan Merkezi, Ankara.

Düşük riskli popülasyonların anti-HCV taramasında halen hatalı pozitiflik oranları oldukça yüksektir. Kan bağışçılarında anti-HCV tarama testi ile “reaktif” sonuç elde edildiğinde, çalışmanın çift kuyuda tekrarlanması; üç çalışmanın en az ikisinde reaktif sonuç elde edildiğinde “tekrarlayan reaktif (TR)” tanımlaması yapılması; doğrulamada RIBA ve PCR yöntemlerinin kullanılması önerilmektedir. Bu çalışmada Ankaradaki 11 kan merkezinden toplanan, kan bağışçılarında ait anti-HCV reaktif serum örneklerinde elde edilen ELISA sinyal/cut off (S/CO) oranları ile gerçek pozitiflik arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. TC Sağlık Bakanlığı, Strateji Geliştirme Başkanlığı tarafından onaylanan proje kapsamında, anti-HCV testi ELISA yöntemi ile reaktif bulunan, kan bağışçılarında ait 197 plazma örneğinde kemilüminesan ELISA ve mikroELISA yöntemleri ile çift çalışma yapılmıştır. Tekrarlayan reaktif örneklerin tümünde anti-HCV RIBA ve HCV-RNA PCR testi çalışılmıştır. ELISA yöntemlerinden en az birisi ile çift çalışmada en az bir reaktif sonuç elde edilen 64 örnek (%32.5) TR, 133 örnek (%67.5) hatalı pozitif kabul edilmiştir. TR 64 örneğin 12’si (%18.8) RIBA veya PCR testlerinden en az birinin pozitif bulunması ile gerçek pozitif kabul edilmiştir. PCR pozitif bulunan yedi örneğin tümünde RIBA pozitif ve her iki ELISA TR bulunmuştur. Gerçek pozitif örneklerin S/CO oranları değerlendirildiğinde; 12 örnekten HCV-RNA pozitif olan yedisinin S/CO oranları kemilüminesan ELISA’da 20 eşik değerinin ve mikroELISA’da 15 eşik değerinin üzerinde tespit edilmiştir. Bu çalışmada 64 örneğin 17’sinde ise (%26.6) RIBA ile “indeterminate” sonuç elde edilmiştir. Anti-HCV testi başlangıçta reaktif tespit edilen kan bağışçı örneklerinde hatalı pozitiflik oranı oldukça yüksektir (%67.5). Hatalı pozitifliklerde bu kişilerin bağışçı havuzuna geri kazanılması önemlidir. Kan bağışçılarında anti-HCV tarama ve doğrulaması için ulusal bir akış önerisi gereklidir.

Anahtar Kelimeler: Anti-HCV doğrulama, Anti-HCV tarama, Kan bağışçısı

S9

Şanlıurfa *Plasmodium vivax* Suşlarının PCR İle Tiplendirilmesi ve Circumsporozoit Protein (CSP) Gen Farklılıkları

Fadile Yıldız Zeyrek¹, Mehmet Fehmi Yüksel¹, Ayşegül Taylan Özkan², Hande Dağcı³,
Georges Snounou⁴

¹Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Şanlıurfa.

²Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Parazitoloji Laboratuvarı, Ankara.

³Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD, İzmir.

⁴Parasitologie Comparée et Modèles Expérimentaux, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France.

Plasmodium vivax her yıl 75 milyondan fazla kişiyi etkileyen dünyada en yaygın görülen ikinci *Plasmodium* türüdür. Ülkemizde de halen önemli bir halk sağlığı sorunu olan sıtmanın başlıca etkeni *P.vivax*'dır. *P.vivax* circumsporozoit proteini (Pvcsp) rekombinant sıtma aşı çalışmalarının başlıca hedefidir. Ülkemizde bugüne kadar yapılmış, bir aşı adayı öncüsü olarak kabul edilen circumsporozoit protein geninin diversitesi konusunda bir çalışma ve bilgi yoktur. Pvcsp'nin amino asit sekansının, her biri tekrarlayan karakteristik tandemler içeren, VK210 ve VK247 olmak üzere başlıca iki tip olduğu ortaya konmuştur. Ülkemizin sıtma endemik bölgesi olan Şanlıurfa'dan direk mikroskopi ile sıtma tanısı konulan 88 hastanın kan örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA'lar dört farklı *Plasmodium* türü için ayrı primerler kullanılarak "nested" PCR yöntemi ile tiplendirilmiş ve 88 hastanın tümü *P.vivax* olarak tanımlanmıştır. *P.vivax* olduğu belirlenen 88 hastadan elde edilen genomik DNA'larının 58'inden *P.vivax* Pvcsp amplifiye edilmiş ve amplifiye edilen gen bölgesine PCR-RFLP analizi uygulanmıştır. Buna göre örneklerin %65.5'i VK210, %34.5'i VK247 olarak tanımlanmıştır. İzolatların hiç birinde karışık tipe rastlanılmamıştır. Bu ön çalışma, ülkemizde parazitlerin çeşitliliği için ilk bilgileri ortaya koymakta olup, ileride yapılacak olan *P.vivax* moleküler epidemiyolojik çalışmaları için temel bir veri sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Circumsporozoit protein, PCR, *Plasmodium vivax*, RFLP, VK210, VK247



Poster Bildiriler

P1

***Staphylococcus aureus* Suşlarında Metisilin Direncinin Saptanmasında Sıvı Mikrodilüsyon, Phoenix Sistemi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemlerinin Karşılaştırılması**

Nevgün Sepin Özen, Dilara Ögünç, Hatice Yazısız, Gözde Öngüt, Dilek Çolak, Meral Gültekin
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

Staphylococcus aureus hem toplum hem de hastane kökenli enfeksiyonlardan izole edilen ve metisilin direnci varlığında tedavisinde zorluklar yaşanan bir mikroorganizmadır. *S.aureus* suşlarında metisilin direncinin doğru ve hızlı bir şekilde belirlenmesi, hastaların tedavisi ve hastane içi yayılımın önlenmesi açısından önemlidir. Bu çalışmada, metisilin direncinin belirlenmesinde sıvı mikrodilüsyon, Phoenix otomatize sistemi ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemlerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'na gelen klinik örneklerden izole edilen 170 *S.aureus* suşu alınmıştır. Kültürde üreyen mikroorganizmalar Gram boyama, katalaz, tüp koagülaz testleri ile *S.aureus* olarak tiplendirilmiştir. Phoenix (BD, USA) otomatize sistemi ile bakteri tanımlaması ve duyarlılık testleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Metisilin direncini belirlemede Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'in önerileri doğrultusunda izolatların minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. Bakteri kolonilerinden DNA ekstraksiyonu yapılarak PZR yöntemiyle *nuc* ve *mecA* geni araştırılması referans yöntem olarak kabul edilmiştir. Tüm testlerde kontrol suşu olarak *S.aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır. PZR yöntemi ile suşların 99'unda (%58.2) *mecA* geni varlığı saptanmıştır. Sıvı mikrodilüsyon ve Phoenix otomatize sisteminin metisilin direncini saptamada duyarlılıkları sırasıyla %100, %98 ve özgüllükleri %97.3 olarak bulunmuştur. Çalışmamızın sonuçlarına göre değerlendirilen yöntemler yüksek duyarlılık ve özgüllükleri nedeniyle metisilin direncini saptamada klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılabilecek doğru ve güvenilir yöntemlerdir. Ancak PZR yöntemi hızlı tanıda, hastane enfeksiyonu kontrol önlemleri ve acil tedavi yaklaşımlarında kısa sürede sonuç vermesinden dolayı tercih edilebilir.

Anahtar Kelimeler: *S.aureus*, metisilin direnci, *mecA*.

P2

***Staphylococcus aureus* İzolatlarında Metisilin Direncinin Belirlenmesinde Sefoksitin Disk, Oksasilin Disk ve PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması**

Çiğdem Özaydın, Tevfik Yavuz, İdris Şahin, Selda Acar

Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Düzce.

Bu çalışmada metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatlarının saptanmasında genotipik ve fenotipik yöntemlerin güvenilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon yöntemleri ve PCR ile *mecA* geni tespiti karşılaştırılmıştır. Çalışmaya Düzce Üniversitesi Hastanesi ve Bolu İzzet Baysal Devlet Hastanesinde çeşitli klinik örneklerden izole edilen 130 *S.aureus* suşu alınmış ve suşlara CLSI kriterlerine göre oksasilin (1µg) ve sefoksitin (30µg) disk difüzyon testi uygulanmıştır. Suşların *S.aureus* olduğunu doğrulamak için *nuc* geni; MRSA/MSSA ayrımı için ise altın standart kabul edilen *mecA* geni, PCR yöntemiyle araştırılmış ve jel elektroforez yöntemi ile elde edilen bantlar görüntülenmiştir. Oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon testi ile 130 *S.aureus* suşundan 38'i MRSA, 92'si ise MSSA olarak tanımlanmıştır. MRSA suşlarından 35'inin *mecA* geni taşıdığı, üç suşun *mecA* geni taşımadığı tespit edilmiştir. MSSA olarak tanımlanan 92 suşun ise üçünde *mecA* geni varlığı belirlenmiştir. Oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon yöntemlerinin özgüllük, duyarlılık, pozitif ve negatif prediktif değerleri her ikisi için de aynı olmak üzere sırasıyla; %96.9, %92.1, %92 ve %95 olarak bulunmuştur. Oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon yöntemlerinin inokulum miktarı, besiyerinin pH'sı ve tuz konsantrasyonu gibi çeşitli faktörlerden etkilenmesi, dirençli ve duyarlı izolatların birbirinden ayrımını zorlaştırmaktadır. Disk difüzyon yöntemlerinde özgüllüğün duyarlılıktan yüksek olması, yalancı pozitiflik oranının yalancı negatiflik oranından daha yüksek olduğunu göstermektedir. *MecA* tespiti, metisilin direncinde altın standart yöntem olmakla beraber aradaki farkın azlığı ve maliyetler göz önünde bulundurulunca, oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon yöntemlerinin rutin laboratuvarlarında tercih edilmesi daha uygun gözükmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Staphylococcus aureus*, metisilin direnci, PCR.

P3

Bir Eğitim Hastanesi Yoğun Bakımında Ortaya Çıkan Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*'a (MRSA) Bağlı Bir Epideminin Tanımlanması

Tuğrul Hoşbul¹, Tunçer Haznedaroğlu¹, Şaban Çavuşlu², Bülent Bozdoğan³,
Oral Öncül², Mustafa Özyurt¹

¹GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul.

²GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve
Klinik Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul.

³Adnan Menderes Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

Bu çalışmanın amacı, GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi'nde aynı dönem içinde kalp ve damar cerrahisi operasyonları sonrası metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'a (MRSA) bağlı nozokomiyal enfeksiyon izlenen üç olguda PFGE yöntemi ile kaynağın irdelenmesidir. Kalp ve damar cerrahisi servisinde, 2006 yılı Kasım ayında gerçekleştirilen operasyonlardan sonra yapılan takip sırasında bir haftalık dönemde üç olguda ard arda enfeksiyon bulguları izlenmiştir. Birinci olguya ait kan, ikinci olguya ait trakeal aspirat ve üçüncü olguya ait derin insizyonel kesi yeri örneklerinden MRSA izole edilmiştir. Bunun üzerine söz konusu olgular epidemiyolojik takibe alınmıştır. Laboratuvar tanısını takiben kaynağa yönelik olarak; serviste yatan hastalar, servis ve yoğun bakım personeli ile ameliyat ekibinden oluşan 31 kişiden tarama kültürleri (burun ve el sürüntüleri) yapılmıştır. Tarama sonrasında bir sağlık personeline ait burun kültüründen benzer fenotip-te MRSA suşu izole edilmiştir. Olgulardan izole edilen suşlar ile sağlık personelinde izole edilen MRSA suşunun tür düzeyinde tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi rutin laboratuvar metodları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen suşların tamamı ayrıca "Pulsed Field Gel Electrophoresis" (PFGE) yöntemi ile genotipik olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, dört suşun PFGE değerlendirmesinde benzer genetik özellikler taşıdığı ve aynı klona ait suşlar oldukları gösterilmiştir. MRSA, özellikle son yıllarda önemi gittikçe artan bir hastane enfeksiyonu olarak karşımıza çıkmaktadır. MRSA enfeksiyonları hastane içi ya da hastaneler arası yayılım gösterebilmekte, cansız objeler ve/veya hastane çalışanlarının da bu tür enfeksiyonların yayılımında önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. PFGE ve diğer moleküler yöntemler hastane enfeksiyonlarının epidemiyolojik özelliklerinin ortaya konulmasında büyük önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, hastane enfeksiyonu, epidemi, PFGE.

P4

Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*'un Etken Olduğu Diyabetik Ayak Enfeksiyonlu Hastalarda MRSA Nazal Taşıyıcılığı

Çiğdem Özyayın¹, Tevfik Yavuz¹, Necati Çatakoğlu², İdris Şahin¹, Selda Acar¹

¹Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Düzce.

²Bolu İzzet Baysal Devlet Hastanesi, İç Hastalıkları Servisi, Bolu.

Bu çalışmada, diabetes mellitus (DM)'lu hastalarda MRSA nazal taşıyıcılık oranının saptanması, diyabetik ayak enfeksiyonlu hastalarda risk faktörlerinin belirlenmesi ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) nazal taşıyıcılığı ile izole edildiği diyabetik ayak enfeksiyonu arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya Mart 2007 - Temmuz 2007 arasında Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Bolu İzzet Baysal Devlet Hastanesinde diyabet tanısı ile takip edilen tip 1 ve tip 2 DM'lu 250 hasta alınmıştır. Hastaların 47'sinde diyabetik ayak ülseri vardır. Ayak ve burundan alınan örnekler standart mikrobiyolojik tekniklerle değerlendirilmiş ve *S.aureus* olarak tanımlanan suşlar PCR ve jel elektroforez yöntemi ile *nuc*, *mecA* ve *PVL* genleri yönünden araştırılmıştır. Çalışmaya alınan 250 hastanın 104'ünde (%41.6) burunda *S.aureus* taşıyıcılığı tespit edilmiştir. Burundan izole edilen *S.aureus*'ların 26'sı (%25) MRSA, 78'i (%75) metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) olarak tanımlanmıştır. Diyabetik ayak ülseri olan hastaların ise 26'sının ayak lezyonundan *S.aureus* (9 MRSA, 17 MSSA) izole edilmiş ve ayağından MRSA izole edilen dokuz hastanın beşinin (%55.5) aynı zamanda MRSA nazal taşıyıcısı olduğu görülmüştür. Dokuz MRSA ayak izolatu ile beş MRSA burun izolatının antibiyotik duyarlılık paternleri; penisilin, vankomisin, eritromisin, tetrasiklin, klindamisin, trimetoprim-sülfametoksazol, gentamisin, siprofloksasin, rifampisin, linezolid ve mupirosin diskleri kullanılarak araştırılmış ve hastaların %22.2'sinin (2/9) ayak ve burun suşlarının antibiyogramlarının aynı olduğu saptanmıştır. Burun ve ayaaktan izole edilen toplam 130 *S.aureus* suşunun tamamında (%100) *nuc*, ikisinde (%1.5) ise *PVL* geni saptanmış; 35 MRSA suşunun hepsinde *mecA* gen pozitifliği belirlenmiştir. Çalışmamızda DM'lu hastalarda MRSA nazal taşıyıcılığının arttığı ve bunun ayak enfeksiyonu için bir risk faktörü oluşturduğu belirlenmiştir. *PVL* geninin ayaaktan alınan örneklerde çok düşük oranda tespit edilmesi ve aynı hastaların burnunda tespit edilmemesi, fenotipik olarak aynı görünseler dahi etkenin aynı olmadığını ve toplum kaynaklı suşların daha düşük oranda bulunduğunu göstermektedir. Diyabetik ayak enfeksiyonundan izole edilen MRSA'ların kaynağının nazal taşıyıcılık olduğunu ispat etmek için filogenetik analize ihtiyaç olmakla beraber, DM' lu hastalarda nazal taşıyıcılık her zaman enfeksiyon için risk faktörü oluşturmaktadır ve gerekli önlemler alınmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Diyabetik ayak enfeksiyonu, metisiline dirençli *S.aureus*, *mecA*, *pvl*, nazal taşıyıcılık.

P5

Metisiline Duyarlı ve Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının RAPD PCR Yöntemi İle Tanımlanması

Esra Deniz Üslü, Işıl Seyis Bilkay, Nilüfer Aksöz

Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) görülme sıklığındaki artış ve vankomisin direncinin ortaya çıkması, izolatların tanımlanmasının hızlı ve güvenilir bir şekilde yapılmasını ve hastanelerde klonal yayılımın saptanmasını gerekli kılmaktadır. Patojen mikroorganizmaların tanımlanmasında en sık tercih edilen genotiplendirme yönteminin, biyolojik çeşitliliğin tanımlanması, hastalıkların temelinin aydınlatılması, mikroorganizma-konak ilişkisindeki konakçı yatkınlığının belirlenmesi, bireyin genotipine göre ilaç geliştirilmesi ve adli konuların aydınlatılması gibi işlemlerde de oldukça önemli bir yeri vardır. Özellikle polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'na dayalı yöntemler, mikroorganizmalarda genotip çeşitliliğinin saptanmasında ve teşhiste büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Bu çalışmanın amacı, metisiline duyarlı ve dirençli *S.aureus* suşlarına ait RAPD bant modellerindeki varyasyonu ve bunlar arasındaki sistematik ilişkiyi ortaya çıkarmaktır. Çalışmaya 67 *S.aureus* suşu ile kontrol olarak *S.aureus* ATCC 29213, *S.epidermidis* ve *S.saprophyticus* suşları alınmış ve 45 farklı primer ile rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) PCR tekniği kullanılarak analiz edilmiştir. Bir kısmı literatür taraması ile bir kısmı ise rasgele seçilen 45 primerden 15'i informatif bulunmuştur. Tüm veriler ile UPGMA metodu (Unweighted pair group method using arithmetic averages/ aritmetik ortalamayı kullanan ağırlıksız çift grup metodu) kullanılarak 2 farklı dendrogram çizilmiştir. Dendogramlar sonucunda; izolatlar MRSA ve MSSA olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. "Dice eşitliği" temel alınarak yapılan analizde izolatlar arasındaki en düşük benzerlik oranı 0.1052 değeri ile *Staphylococcus saprophyticus* ve D31, en yüksek benzerlik oranı ise 1.0000 değeri ile H1-H2 ve D40-D43 örnekleri arasında bulunmuştur. Çalışmamızdan elde edilen veriler, izolatların antibiyotip paternleri ile RAPD paternlerinin birbiri ile benzer olduğunu göstermektedir.

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 104 T 481 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, RAPD-PCR, UPGMA.

P6

Oksasilin Disk Difüzyon ve PCR Yöntemleri İle Sığırlarda Mastit Etkeni Koagülaz Negatif Stafilokoklarda Metisilin Direncinin Belirlenmesi

Emel Banu Büyükkunal Bal

Sütçü İmam Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kahramanmaraş.

Stafilokok suşlarında metisilin direncinin belirlenmesi, hastalığın tedavisinde doğru antibiyotiklerin seçimi konusunda büyük önem taşımaktadır. Ancak metisilin direncinin heterojen özellik gösterbilmesi, direnç belirlenmesinin doğru olarak yapılmasını sınırlandıran en önemli faktörlerden biridir. Son yıllarda daha kesin sonuç verdiği kabul edilen moleküler metotlardan PCR yöntemi ile metisiline direnç oluşumundan sorumlu PBP2a proteinini kodlayan *mecA* geninin varlığının araştırılması ön plana çıkmıştır. Bu çalışmada, subklinik tipteki sığır mastit olgularından izole edilen 35 koagülaz negatif stafilokok (KNS) izolatında iki farklı yöntemle metisilin direncinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, *S.haemolyticus* (13), *S.simulans* (12), *S.hominis* (4), *S.auricularis* (2), *S.warneri* (1), *S.capitis* (1), *S.epidermidis* (1) ve *S.sciuri* (1) türleri dahil edilmiştir. İzolatların %14.2'sinde oksasilin disk difüzyon (ODD) yöntemiyle, %2.9'unda ise PCR yöntemiyle metisilin direnci saptanmıştır. ODD yöntemi ile metisiline dirençli olduğu saptanan beş örnekten sadece *S.haemolyticus* türüne ait bir örnek PCR ile pozitif sonuç verirken, dört tanesi PCR ile negatif sonuç vererek “yanlış pozitif” olarak değerlendirilmiştir. Bu dört örneğin ikisi *S.simulans*, birisi *S.capitis* ve birisi de *S.auricularis* olarak saptanmıştır. Her iki yöntem ile pozitif sonuç veren izolatın beta-laktam grubunda yer almayan beş antibiyotiğe (kloramfenikol, neomisin, streptomisin, klindamisin, kanamisin) karşı da direnç gösterdiği bulunmuştur. Çalışma sonuçları ülkemizde farklı kaynaklardan elde edilen stafilokok suşlarındaki metisilin direnç oranları ile karşılaştırıldığında oldukça düşük düzeyde bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Koagülaz negatif stafilokok, mastit, metisilin direnci, PCR.

P7

Kan Kültürlerinden İzole Edilen Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının SCCmec Gen Tiplerinin ve Filogenetik İlişkilerinin Belirlenmesi

Mert Sudağdan¹, Ali Aydın²

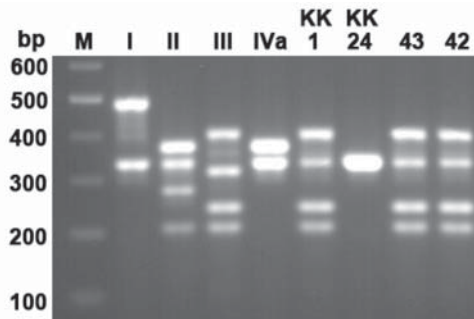
¹İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Merkezi Araştırma Laboratuvarı, İzmir.

²İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakltesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Avcılar, İstanbul.

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), hastanede tedavi gören hastalar için büyük problem teşkil eden bir bakteridir. Toplum kaynaklı (TK-) ve hastanede kazanılmış (HK-) MRSA enfeksiyonlarına neden olan suşların birbirinden tamamen ayrı özellikte olduğu düşünülmektedir. TK-MRSA suşların az sayıda antibiyotiğe direnç göstermesi yanında stafilokokal kromozomal kaset mec (SCCmec) tip IV genini taşıdığı bulunmuştur. HK-MRSA suşları ise çoklu ilaç direnci göstermesi yanında SCCmec tip II genini taşıdığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada Ege Üniversitesi, Tıp Fak. Hastanesi'nde kan kültürlerinden izole edilen 55 adet MRSA suşunda *mecA* geni ve SCCmec I, II, III, IV gen tiplerinin varlığı multipleks PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Ayrıca izole edilen suşlar arasındaki filogenetik ilişki PFGE-RFLP analiziyle belirlenmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak *S.aureus* 10442 (SCCmec tip I), *S.aureus* N315 (SCCmec tip II), *S.aureus* 85/2082 (SCCmec tip III) ve *S.aureus* 4744 (SCCmec tip IVa) kullanılmıştır. Multipleks PCR sonucunda elde edilen ürünler %2'lik agaroz-TAE jelinde görüntülenmiştir. Elde edilen band profilleri pozitif kontroller ve beklenen ampikon büyüklükleri ile karşılaştırılmıştır. Tüm suşlar *mecA* geni için pozitif sonuç vermiştir. Çalışmada sadece KK-24 suşu SCCmec tip IV band profili gösterirken diğer tüm suşlar SCCmec tip III'un 3 bandı ile aynı büyüklükte ampikon vermeleri yanında tip I, tip II ve tip IV'de bulunan 342 baz çifti büyüklüğünde DCS gen bölgesi için de pozitif sonuç vermişlerdir. MRSA suşlarının SmaI restriksiyon enzimi ile PFGE analizi sonuçlarına göre 17 farklı band profili elde edilmiştir. A ve H olarak isimlendirilen PFGE band profilleri sırasıyla 15 ve 11 suş ile suşlar arasında en sık rastlanılanlar olarak kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlar, MRSA suşlarının aynı SCCmec gen tipi göstermeleri yanında suşlar arasında filogenetik ve klonal farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, PFGE, SCCmec gen tipleri.

Multipleks PCR ile SCCmec genlerinin belirlenmesi



%2'lik agaroz-TAE jelinde SCCmec tip I-IV pozitif kontrolleri ve çalışmada izole edilen MRSA KK-1, KK-24, 43, 42 suşları. M: 100 bp DNA standartı (Fermentas)

P8

Yatan Hastaların Yara ve Abse Örneklerinden İzole Edilen Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Kökenlerinin Klonalitesinin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması

Sevin Kırdar¹, Uğur Arslan², İnci Tuncer², Duygu Fındık², Bülent Bozdoğan^{1,3}

¹Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

²Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya.

³Adnan Menderes Üniversitesi BİLTEM Epidemiyoloji Birimi, Aydın.

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatları, nozokomiyal patojen olarak hastanede, yatan hastalarda morbidite ve mortalitenin başlıca nedenlerinden biridir. MRSA suşları son zamanlarda toplum kaynaklı enfeksiyon etkeni olarak da izole edilmeye başlanmıştır. Bu çalışmada hastane ortamında gelişen cerrahi yara, abse ve drenaj örneklerinden izole edilen MRSA kökenlerinde virülans faktörü olarak Panton-Valentin lökositidin (PVL) varlığı ve kökenler arasındaki genetik ilişki araştırılmıştır. Cerrahi yara, abse ve drenaj örneklerinden izole edilen 37 köken çalışmaya alınmıştır. Kökenler arası klonalite PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) yöntemi ile, virülans faktörlerinden PVL'nin varlığı ise PCR yöntemi ile araştırılmıştır. PFGE incelemesinde 37 suştan 31'inin A tipi pulsotip ve varyantlarına ait olduğu ve kalan altı suştan üçünün B, diğer üçünün ise C pulsotipi olduğu görülmüştür. A tipi tüm cerrahi ve yoğun bakım ünitelerinde, pulsotip B ağırlıklı olarak ortopedi ve C pulsotipi ise nöroloji ve beyin cerrahisi bölümlerinden izole edilmiştir. Çalışılan kökenlerin hiçbirinde PVL toksin geni bulunamamıştır. PFGE yöntemi ile hastanemizdeki cerrahi yara, abse ve drenaj örneklerinden izole edilen MRSA suşları arasında yaygın bir klonun varlığı saptanmıştır. MRSA'nın olgular arasındaki geçişinde en önemli faktörün hastane personeli olduğu da göz önüne alınarak, hastane enfeksiyon kontrolü konusunda gerekli önlemlerin alınmasıyla bu tür enfeksiyonlarda ve hastane enfeksiyonlarıyla oluşabilecek morbidite ve mortalite oranlarında azalma sağlanabilir. Toplum kaynaklı MRSA'larda daha sık görülen ve hastane kaynaklı MRSA suşları arasında nadir bulunan PVL toksini hastanemizde izole edilen suşlarda da bulunamamıştır. Bu toksinin hastane kaynaklı MRSA suşlarındaki varlığı sürekli gözlenmelidir.

Anahtar Kelimeler: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, Panton-Valentin lökositidin, PFGE, pulsotip.

P9**Stafilokok DNA Ekstraksiyonunda Yeni Bir Yöntem: Kum Yöntemi**

Fikret Şahin, Djursun Karasartova, Kerem M. Çalgın, Devran Gerçekler, Murat T. Özsan
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Stafilokok DNA'sı elde etmede kullanılan fenol-kloroform, DNAzol, proteinaz K ve kaynatma gibi farklı yöntemler olmasına karşın, hepsinde gerekli olan ve kullanılan ilk uygulama, bakterinin sferoblast formuna dönüştürülmesi yani hücre duvarının ortadan kaldırılması işlemidir. Bu işlem yapılmadan yukarıda adı geçen yöntemlerin etkili olmadığı bilinmektedir. Bu nedenle bakterinin sferoblast formuna dönüşmesi amacıyla, bakteri en az 1 saat 37°C'de lizostafin enzimi ile inkübe edilmektedir. Bu çalışmada lizostafin enziminin yerini alacak bir yöntemin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Kum yöntemi olarak adlandırdığımız bu yöntemde, inşaatlarda kullanılan ince elenmiş farklı büyüklüklerde partiküller bulunduran kum kullanarak stafilokok hücre duvarının ortadan kalkması sağlanmıştır. Öncelikle kum, küçük partiküllerini kaybetmeyecek şekilde yıkanmış, HCl ile inkübe edilmiş ve otoklavlandıktan sonra DNA ekstraksiyon yönteminde kullanılmıştır. Bir öze dolusu bakteri, 100µg kum bulunduran ve 20µl 0.2mM EDTA'lı tampon içerisinde karıştırılmış ve 5 dakika vorteksleme işlemi yapıldıktan sonra içerisinde proteinaz K bulunduran rutin ekstraksiyon işlemi tamamlanmıştır. Öncelikle, kumdan kontamine olarak gelebilecek DNA araştırılmıştır. Bakteri ilave edilerek yapılan ekstraksiyon yöntemi ile DNA elde edilirken, sadece kum bulunduran ekstraksiyonda DNA'ya rastlanmamıştır. Sferoblast oluşturmada kullanılan cam boncuklar kullanarak aynı işlem aynı sürede denendiğinde, kum yöntemi ile elde edilen DNA elde edilememiştir. Sonraki çalışmada, bu yöntemle elde edilen DNA'da PCR inhibitörü olup olmadığını araştırmak amacıyla stafilokinaz geni veya enterotoksin geni taşıyan stafilokoklardan bu yöntemle DNA ekstrakte edilmiş, PCR uygulanmış ve beklenen büyüklükte, özgül ve güçlü bantlar oluşturan PCR ürünleri elde edilmiştir. Kum yöntemi olarak adlandırdığımız bu yöntemin hızlı olması ve lizostafin enzimi kullanımını ortadan kaldırması nedeniyle, stafilokok DNA'larının elde edilme işlemini daha kolay ve ucuz hale getireceği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Stafilokok, DNA ekstraksiyon, lizostafin.

P10

Mikroorganizmaların DNAz Aktivite Tayininde Yeni Bir Yöntem: Tüpte DNAz Yöntemi

Fikret Şahin, Emel Elyürek, Saeid Barkar, Devran Gerçekler, Kerem M. Çalgın,

Mehmet Kıyan, Murat T. Özsan

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

DNAz testi, katı besiyeri içerisinde DNA'nın parçalanmasının gösterilmesine dayalı bir yöntem olup mikroorganizmaların DNAz aktivitelerinin araştırılmasında kullanılmaktadır. DNAz testi *Serratia* grubunun *Enterobacter* grubundan, *S.aureus*'un koagülaz-negatif stafilokoklardan (KNS), *Moraxella catarrhalis*'in *Neisseria* türlerinden ayrımında kullanılabilir. Farklı modifikasyonlara rağmen yüksek miktarda bakteri gerekliliği, besiyeri içerisinde yüksek miktarda DNA gerekliliği, testin duyarlılığının düşüklüğü ve eklenen boyaların bakteri üremesi üzerine etkileri gibi sorunlar devam etmesine karşın, en önemli sorun test sonuçlarının gözlenebilir aşamaya gelmesi için 24-48 saat süreye gereksinim göstermesidir. Bu çalışmamızda çok daha hızlı, daha az DNA ve bakteri gerektiren "Tüpte DNAz Yöntemi" olarak adlandırdığımız bir yöntem geliştirilmiştir. Kısaca, ependorf tüp içerisine agaroz jelde görülecek miktarda DNA (10µl) total 250µl sıvı besiyeri içerisine eklenmiş, sonra üzerine DNAz aktivitesi araştırılacak bir öze dolusu bakteri ilave edilmiş ve 37°C'de karıştırıcı inkübatörde karıştırıldıktan sonra 20µl örnek alınıp santrifüj yapılmıştır. Daha sonra süpernatant agaroz jelde yürütüldüğünde DNAz aktivitesi olan bakterilerin DNA'yı ortadan kaldırdıkları belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmalarda, *Serratia* grubu ilk yarım saat sonunda DNA'yı parçalarken, *Enterobacter* suşları 24 saatlik takip sonucunda DNA parçalanmasına neden olmamıştır. Aynı şekilde *S.aureus* standart suşu ile yaptığımız çalışmada ilk yarım saat sonunda *S.aureus*'un besiyeri içerisindeki DNA'yı parçaladığı gözlenmiştir. Daha sonra, klinik örneklerden izole edilen 25 adet *S.aureus* ve 25 adet KNS suşunda DNAz aktivitesi tüpte DNAz yöntemi ile araştırılmıştır. Sonuç olarak dünyada ilk defa yapılan bir çalışma olan tüpte DNAz testinin, çok daha hızlı sonuç vermesi, ucuz ve uygulama kolaylığı nedeniyle, kullanımda olan DNAz test agar yönteminin yerini alacağına inanmaktayız.

Anahtar Kelimeler: DNAz test agar yöntemi, DNAz aktivitesi.

P11

Mide Biyopsi Örneklerinden *Helicobacter pylori*'nin Moleküler Tanısında *ureA* ve *glmM* Genlerinin Duyarlılıklarının Kıyaslanması

Erkan Yula¹, Harun Yerhan², Bülent Kantarçeken², Taner Bozkurt¹, Arzu Kipalev¹, Zafer Altun¹, Fatih Köksal¹

¹Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana.

²Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Kahramanmaraş.

Helicobacter pylori'nin mide biyopsi örneklerinden direk tanısında; *ureA*, *glmM*, 16S *rRNA*, 23S *rRNA* ve *Hsp65* genlerini hedef alan çeşitli primerlerin kullanıldığı moleküler yöntemler uygulanmaktadır. Birçok çalışmada *ureA* ve *glmM* genlerinin, hedef bölgeye ve kullanılan primerlere göre değişmek üzere, yüksek duyarlılık ve özgüllükleri sebebi ile tanı değerlerinin yüksek olduğu vurgulanmıştır. Bu çalışmada gastrik biyopsi örneklerinden PCR yöntemi ile *H.pylori* tanısında *ureA* genindeki 411 bp'lik özgül dizileri hedef alan primerler ile *glmM* (*ureC*) genindeki 294 bp'lik özgül bölgeyi hedef alan primerlerin kullanıldığı PCR testlerinin duyarlılık ve kabul edilebilirlik değerleri kıyaslanmıştır. Aralık 2006-Eylül 2007 tarihleri arasında bölgemizdeki çeşitli hastanelerin Gastroenteroloji polikliniklerine gastroduodenal yakınmalarla başvuran ve endoskopi endikasyonu alan 103 hastadan alınan toplam 176 antrum ve korpus mide biyopsi örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. Örneklerden DNA ekstraksiyonunda QIAGEN DNA doku kiti kullanılmıştır. Antrum ve korpus biyopsi örneklerinden elde edilen ekstraktlardaki *H.pylori ureA* genine ait hedef bölgenin amplifikasyonunda F 5'-GCCAATGGTAAATTAGTTCC-3' ve R 5'-CTCCTTAATTGTTTTTACAT-3' primerleri, *glmM* genine ait hedef bölgenin amplifikasyonu içinde F 5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3' ve R 5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3' dizileri kullanılmıştır. *UreA* primerleri ile toplam 176 antrum ve/veya korpus biyopsi örneğinden 127'sinde (%72.2) *H.pylori* genomu tespit edilirken, *glmM* primerleri ile 143'ünde (%81.3) tespit edilmiştir. Daha yüksek pozitiflik elde ettiğimiz *glmM*-PCR'ın duyarlılığı %100 olarak kabul edildiğinde, *ureA*-PCR'ın duyarlılığının daha düşük (%89.9) olduğu görülmüştür. Sonuç olarak biyopsi örneklerinde *H.pylori*'nin PCR ile analizinde kullandığımız *glmM* primerleri ile amplifikasyonun *ureA*-PCR'a göre daha duyarlı olduğu izlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Helicobacter pylori*, *ureA*, *glmM*, PCR

P12

***Helicobacter pylori* Genotiplerinin Gastrik Lokalizasyonu İle Gastroduodenal Patoloji Arasındaki İlişkinin Tespiti**

Toğrul Nağıyev¹, Ülkü Oral Zeytinli¹, Salih Çolakoğlu², Fatih Köksal¹

¹Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana.

²Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Anabilim Dalı, Adana.

Helicobacter pylori ülser dışı dispepsiden gastrik adenokarsinomalara kadar değişen gastroduodenal patolojiden sorumludur. Enfeksiyonun prognozunda bakteriye ait *cagA*, *vacA* ve *iceA* gibi virülans genleri ile hastaya ait faktörlerin etkili olduğu ileri sürülmektedir. Mikroorganizmanın gastrik lokalizasyonunun da hastalığın prognozunu etkilediği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmada farklı hasta gruplarında *H.pylori*'nin antrum ve korpus kolonizasyonu ve kolonize suşların *CagA* ve *VacA* toksinlerinin prognoza olan etkisinin tespiti amaçlanmıştır. Gastroenteroloji polikliniklerinde gastroduodenal patoloji sebebi ile endoskopik biyopsi endikasyonu alan, 158'i gastrit ve/veya mide ülserli (G/MÜ), 73'ü duodenal ülserli (DÜ) olmak üzere toplam 231 hastadan alınan antrum ve korpus biyopsi örnekleri PCR yöntemi ile değerlendirilmiştir. Örneklerden QIAGEN ekstraksiyon kiti ile ekstrakte edilen DNA, önce *ureC* (*glmM*) geni amplifiye edilerek *H.pylori* varlığı yönünden araştırılmıştır. *H.pylori* pozitif olan DNA örnekleri, *cagA* ve *vacA* genlerinin tespiti için amplifiye edilmiştir. Çalışma sonunda 131'i (%82.9) G/MÜ'li ve 70'i (%95.9) DÜ'li toplam 201 (%87) hastanın antrum biyopsi örneğinde *H.pylori ureC* geni bulunmuş iken, tamamı antrum pozitif hastalar arasından olmak üzere 113'ü (%86.3) G/MÜ'li ve 41'i (%58.6) DÜ'li toplam 154 (%76.6) hastanın korpus biyopsi örneğinin de *H.pylori ureC* geni yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir. Antrumda kolonize suşların %84.1'inin, korpusta kolonize suşların ise %92.9'unun Tip-I suşlar (*cagA*+*vacA*+) olduğu belirlenmiştir. Bu oranlar G/MÜ'li ve DÜ'li gruplar için antrumda sırasıyla %78.6 ve %94.3, korpusta ise sırasıyla %90.3 ve %100 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak, *H.pylori* Tip-I suşlarının prevalansının DÜ'li hastalarda G/MÜ'li hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu, korpus kolonizasyonunun hastalığın prognozunu her iki grupta da antrum kolonizasyonuna göre daha çok etkilediği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Helicobacter pylori*, *cagA*, *vacA*, *ureC*.

P13

***Helicobacter pylori* Genotiplerinin Antrum Kolonizasyonu ve Gastroduodenal Patoloji İle İlişkilerinin Tespiti**

Toğrul Nağıyev¹, Erkan Yula¹, Salih Çolakoğlu², Fatih Köksal¹

¹Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Adana.

²Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Ana Bilim Dalı, Adana.

Helicobacter pylori enfeksiyonunun prognozunu; yaş, cinsiyet, beslenme alışkanlıkları ve immünolojik yapı gibi konağa ait faktörler ile, CagA ve VacA toksin üretimi ve bu toksinleri kodlayan genlerdeki polimorfizm gibi bakteriye ait faktörlerin etkilediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmada gastrit ve mide ülseri ile duodenal ülserli olgularda antrum mukozasına kolonize *H.pylori* genotiplerinin hastalığın prognozuna muhtemel etkisi araştırılmıştır. Çalışmaya Gastroenteroloji polikliniklerine başvuran, daha önce tedavi almamış, endoskopik muayenede gastrit ve/veya mide ülseri (G/MÜ) tanısı alan 158 hasta ile duodenal ülser (DÜ) tanısı alan 73 hastadan alınan toplam 231 antrum biyopsi örneği dahil edilmiştir. QIAGEN DNA ekstraksiyon kiti ile ekstrakte edilen DNA örneklerinde, *H.pylori* kolonizasyonu ureC-PCR ile gösterilmiştir. Özgül primerlerin kullanıldığı PCR yöntemi ile, *H.pylori* pozitif bulunan örneklerde *cagA* ve *vacA* genleri, *vacA* pozitif bulunan örneklerde de *vacA* geninin “s” (s1a, s1b, s1c, s2) ve “m” (m1a, m1b, m2) allelleri araştırılmıştır. Böylece, *H.pylori* suşlarının Tip-I (*cagA*+*vacA*+) ve Tip-II (*cagA*-) genotiplerine ek olarak, *vacA* geninin allelik kombinasyonları da belirlenmiştir. *H.pylori* kolonizasyonu 131’i (%82.9) G/MÜ’li ve 70’i (%95.9) DÜ’li olmak üzere toplam 201 (%87) hastaya ait biyopsi örneğinde gösterilmiştir. *H.pylori* Tip-I suşların prevalansı DÜ’li hastalarda %94.3, G/MÜ’li hastalarda ise %78.6 oranında tespit edilmiştir. G/MÜ’li hastalarda en sık karşılaşılan allelik kombinasyonun 33 örnekle s1c/m1b olduğu, DÜ’li hastalarda ise 27 örnekle s1a/m1b’nin en sık görülen kombinasyon olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, *H.pylori* kolonizasyonunun gösterilmesi ile birlikte genotip ve allelik kombinasyonun da tespit edilmesinin, özellikle gastrik kansere kadar ilerleme riski olan s1c alleleline sahip suşlarla oluşan enfeksiyonların erken tanısı ve eradikasyonuna imkan sağlayacağı için önemli olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *H.pylori*, *cagA*, *vacA*, allel.

P14

Nazal Polip ve Mukoza Örneklerinde *Helicobacter pylori* DNA'sının Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Erime Eğrisi Analizi İle Saptanması

Mustafa Özyurt¹, Atilla Güngör², Koray Ergünay¹, Evren Erkul², Engin Çekin²,
Tunçer Haznedaroğlu¹

¹GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul.

²GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi KBB Servisi, İstanbul.

Helicobacter pylori ile kolonizasyon, gastrit ve peptik ülser oluşumunun dışında, gastrik adenokarsinom ve MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) lenfoması ile ilişkilidir. Ek olarak son yıllarda çeşitli ektragastrik dokularda da *H.pylori* varlığı saptanmış olup, bu durumun çeşitli hastalıklarla bağlantılı olabileceği öne sürülmektedir. Bu çalışmada nazal polip ve normal nazal mukoza örneklerinde *H.pylori* DNA'sının varlığı ticari bir gerçek zamanlı (real-time) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve erime eğrisi analizi yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmaya Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Servisine başvuran toplam 30 nazal polip olgusuna ait dokular ve 29 normal nazal biopsi örneği, bilgilendirilmiş onam alınarak dahil edilmiştir. Doku örneklerinin tanıları, hematoksilen eozin boyama ile mikroskopik incelemede doğrulanmış, örneklerden DNA saflaştırılması amacıyla QIAamp™ DNA Mini Kit (Qiagen, ABD) doku protokolü minör modifikasyonlar uygulanarak üreticinin önerileri doğrultusunda kullanılmıştır. *H.pylori* DNA'sının saptanması amacıyla da Fluorion™ “*Helicobacter pylori* DNA Detection Kit QLS 1.0” (İontek Biyoteknoloji, İstanbul) sistemi uygulanmış, tüm amplifikasyonlar iCycler IQ™ “Thermal Cycler” (Bio-Rad, ABD) cihazında gerçekleştirilmiştir. *H.pylori*'ye ait DNA, nazal polip dokularının 17'sinde (%56.7), normal mukoza biyopsilerinin ise 20'sinde (%69) saptanmıştır. Her iki grupta izlenen saptama sıklıkları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuçlar gerçek zamanlı PZR gibi duyarlı yöntemler kullanıldığında, nazal poliplere ek olarak normal nazal mukozada da *H.pylori*'nin saptanabildiğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Helicobacter pylori*, nazal polip, gerçek zamanlı PCR.

P15

Dispeptik Hastalardan İzole Edilen *Helicobacter pylori* cagA 3' Uç Bölgesi EPIYA Motiflerinin Analizi

Barık Salih¹, Bora Kazım Bölek¹, Soykan Arıkan²

¹Fatih Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İstanbul.

²İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Cerrahi Bölümü, İstanbul.

Helicobacter pylori cagA 3' bölgesinin allelik varyasyonlarının biyolojik önemi ve bunun hastalık sonuçlarına etkisi üzerine yapılan çalışmalar çelişkilidir. Bu çalışmanın amacı, *H. pylori* izolatlarının cagA 3' değişken bölgesindeki EPIYA motiflerinin tiplerinin belirlenmesi ve bunların hastalık sonuçlarıyla ilişkilerinin araştırılmasıdır. Yaşları 17-79 arasında değişen 34 dispeptik hastadan toplanan biyopsiler homojenize edilerek Columbia agar besiyerine ekilmiştir. Her bir kültürden altı tek koloni izole edilmiş ve klonlamak için üç kez pasaj yapılmıştır. Tüm klonlardan QIAamp kiti ile (Qiagen) DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. 170 suşun cagA 3' değişken bölgesi ve EPIYA-A-B-C motifleri PZR ile belirlenip ABI Prism 310 genetic analyzer ile DNA dizi analizi uygulanmıştır. Toplam 27 cagA pozitif izolattan 17 gastrit hastasının 15'inde ABC ve ikisinde ABCC; sekiz duodenum hastasının dördünde ABC, üçünde ABCC ve birinde ABC ve ABCCCC suşlarının karışımı (ilk kez belirtilmektedir); bir mide ülseri hastasında ABCC ve bir mide kanseri hastasında ACC motifleri bulunmuştur. BLAST programıyla DNA dizileri amino asit dizilerine dönüştürülmüş ve Clustal W2 programı kullanılarak izolatların amino asit dizileri iki referans suşla (26695 ve J99) karşılaştırılmıştır. Filogramda bazı gastrit ve duodenum ülseri hastalarının aynı EPIYA motiflerine sahip izolatlarında dizi benzerlikleri belirlenmiştir. Bu çalışma, farklı mide patolojilerine sahip hastaların değişken sayıda EPIYA motif tekrarlarını içeren suşlara (Batı tipi cagA kodlayan) sahip olduğunu ve bu motif tipleri ve sayılarıyla hastalık sonuçları arasında önemli bir bağlantının bulunmadığını göstermektedir. Fazla sayıda EPIYA motife sahip olmanın artan yaşla bir ilişkisi yoktur.

Anahtar Kelimeler: cagA, EPIYA motifi, *Helicobacter pylori*.

P16

Biyopsi Örneklerinde PZR Yöntemiyle *Helicobacter pylori* Varlığının Araştırılması

Ihsan Hakkı Çiftçi¹, Birol Şafak², Ihsan Uslan³, Gülşah Aşık¹, Orhan Cem Aktepe¹

¹Kocatepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD Afyonkarahisar.

²Sağlık Bakanlığı, Atatürk Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Zonguldak.

³Kocatepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji AD Afyonkarahisar.

Helicobacter pylori, spiral şekilli, gram-negatif ve üreaz üretebilen mikroaerofilik bir bakteridir. *H.pylori* enfeksiyonları, kronik gastrit, peptik ülser, gastrik karsinomlar ve mukozayla alakalı lenfoid doku lenfomalarına sebep olmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), kültür ortamında zor üretilen bu etkenin klinik örneklerde kısa sürede belirlenmesini sağlayan, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir metottur. Çalışmamızda, biyopsi örneklerinde PZR yöntemiyle *H.pylori* varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya 147 hastadan alınan antral biyopsi örnekleri dahil edilmiş, örneklerden DNA izolasyonu DZ DNA kiti aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. PZR çalışmalarında *H.pylori* 16S rRNA gen bölgesinin varlığı aranmıştır. PZR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinin ardından, etidyum bromürle boyanarak görünür hale getirilmiş ve UV ışık kaynağı üzerinde incelenmiştir. Çalışılan 147 antral biyopsi örneğinin 108'inde (%73.5) *H.pylori* 16S rRNA pozitifliği saptanmıştır. PZR metodu özellikle kültürü zor olan mikroorganizmaların belirlenmesinde en çok kullanılan, standardize edildiği takdirde ise oldukça duyarlı ve özgül olan bir metottur. Bu metodun duyarlılığını ve özgüllüğünü belirleyen en önemli parametrelerden birisi kullanılan seçilmiş primer çiftleridir. Çalışmamızda kullanılan 16S rRNA primerleri literatürle uyumlu olarak *H.pylori* varlığını %73.5 oranında gösterebilmiştir. Çalışmamızda kullanılan yöntemin duyarlılık ve özgüllüğünün histopatoloji, kültür ve/veya üre nefes testi gibi standart yöntemler yardımıyla hesaplanması gereklidir. Sonuç olarak, kliniğimizde ilk kez gerçekleştirilen bu çalışma ile biyopsi örneklerinde *H.pylori* varlığına ilişkin sonuçların literatürle uyumlu olması sonraki çalışmalar için umut verici bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Helicobacter pylori*, biyopsi, PZR.

P17

Biyopsi Örneklerinde FISH Yöntemi İle *Helicobacter pylori* Tanısında Mikrobiyolog ve Patologların Sonuçlarının Karşılaştırılması

Ihsan Hakkı Çiftçi¹, Fatma Hüsniye Dilek², Birol Şafak³, Gülşah Aşık¹, Gürsel Acartürk⁴

¹Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar.

²Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar.

³Sağlık Bakanlığı, Atatürk Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Zonguldak.

⁴Kocatepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji AD Afyonkarahisar.

Floresan in-situ hibridizasyon (FISH) yönteminin *Helicobacter pylori*'nin varlığını tespit etmede hızlı, doğru ve uygun maliyetli bir yöntem olduğu bildirilmektedir. Endoskopi sonrası üç saat içerisinde klinisyene tedavide yol gösterecek sonucu genotipik olarak verilebilmektedir. Ayrıca son yıllarda *H.pylori*'nin major ilaç direncinin belirlenmesindeki avantajları nedeniyle mikrobiyoloji laboratuvarlarında da sıkça kullanılmaya başlamıştır. Bu çalışmada, biyopsi örneklerinde FISH yöntemi ile *H.pylori* varlığının gösterilmesi için yapılan mikroskopik çalışmalarında mikrobiyologlara ve patolojlara ait sonuçlarının irdelenmesi amaçlanmıştır. Çalışma, histopatolojik inceleme amacıyla patoloji laboratuvarına gönderilen 100 örnek ile Seafast® *H.pylori* Combi Kit (Izinta, Hungary) kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda patoloji ve mikrobiyoloji laboratuvarlarının eşgüdümü ile gerçekleştirilmiştir. Floresan mikroskopik inceleme, her iki bilim dalından uzmanlar tarafından örnekler hakkında hiçbir ön bilgi olmaksızın sonuçlandırılmıştır. Patoloji uzmanı tarafından FISH için yapılan değerlendirmede örneklerin %59'u *H.pylori* pozitif bulunurken, mikrobiyoloji uzmanı örneklerin %48'inin *H.pylori* pozitif olduğunu bildirmiştir. Patoloji laboratuvarı kayıtlarının geriye dönük incelemesi sonunda, örneklerin %56'sının *H.pylori* pozitif olduğu bilgisine ulaşılmıştır. Bu veriler ışığında patoloji laboratuvarı kayıtları temel alınarak yapılan hesaplamalarda duyarlılık, özgüllük, doğruluk, pozitif kestirim ve negatif kestirim değerlerinin mikrobiyolog için sırasıyla %82.1, %95.8, %93, %95.8, %84.6; patolog için de sırasıyla; %98.2, %90.9, %95, %93.2, %97.5 olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, biyopsi örnekleri ile gerçekleştirilen FISH çalışmalarında her iki bilim dalından uzmanlar arasında duyarlılık, özgüllük, doğruluk, pozitif kestirim ve negatif kestirim değerleri arasında küçük sapmalar olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: *Helicobacter pylori*, biyopsi, FISH.

P18

Farklı Klinik Örneklerden İzole Edilen Karbapeneme Dirençli *Acinetobacter baumannii* Suşlarında İntegron Taşıyıcılığının Araştırılması

İştar Dolapçı¹, Zeynep Ceren Karahan¹, İpek Mumcuoğlu², Ebru Us¹, Derya Çöloğlu¹,
Mehtap Ulusoy², Alper Tekeli¹

¹Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara.

²Sağlık Bakanlığı Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji ve
Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

Bu çalışmada hastane enfeksiyonu etkeni olan *Acinetobacter baumannii* izolatlarında class 1 integron taşıyıcılığı sıklığının saptanması amaçlanmıştır. Bunun için Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde Eylül 2006 – Ağustos 2007 tarihleri arasını kapsayan bir yıllık dönemde farklı klinik örneklerden hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen karbapeneme dirençli toplam 89 adet *A.baumannii* suşu değerlendirilmiştir. İzolatların class 1 integron taşıyıcılıkları 5'CS ve 3'CS primerleri kullanılarak, korunmuş bölgelerle sınırlanmış değişken bölgeleri içeren kromozomal DNA bölümü amplifiye edilerek araştırılmıştır. Bunun sonucunda suşların %93.3'ünün (83/89) class 1 integron yapısı taşıdıkları ortaya konulmuştur. Araya giren gen kasetlerinin boyutlarının 100-3000 baz çifti arasında değiştiği izlenmiştir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda *Acinetobacter* türlerinde class 1 integron yapısının yaygın olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da %93.3 oranı ile class 1 integron pozitifliği yüksek olarak bulunmuştur. İzolatların PFGE (pulsed field gel electrophoresis) yöntemi ile tiplendirilmeleri sonucunda 13 farklı gruba ayrıldıkları ve iki grupta yoğunlaşma olduğu izlenmiştir (grup A: 29, grup C: 21 izolat). Class 1 integron yapısını taşımayan toplam altı izolatın (6/89; %6.7) beşinin aynı PFGE paternini (grup: C) gösterdikleri saptanmıştır. İntegronlar antibiyotik direnç genlerinin dağılımında ve suşların nozokomiyal yayılımında önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle suşların taşıdığı epidemik potansiyeli ortaya koymada integronların araştırılması faydalı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, integron, PFGE.

P19

**Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi'nde
2004-2007 Yılları Arasında İzole Edilen Karbapeneme Dirençli
Klebsiella pneumoniae Suşlarının Moleküler Epidemiyolojisi**

Ebru Uş¹, Alper Tekeli¹, Özay Arıkan Akan², İftar Dolapçı¹, Fikret Şahin¹, Zeynep Ceren Karahan¹

¹Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara.

²Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İbn-i Sina Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı, Ankara.

Bu çalışmada Şubat 2004-Nisan 2007 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi'nde çeşitli kliniklerden izole edilen 26 adet karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatının moleküler epidemiyolojik özellikleri incelenmiştir. Suşların tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıkları mini API veya VITEK 2 Compact (bioMerieux) sistemleri ile çalışılmış, imipenem ve meropenem dirençleri ayrıca E-test (AB, Biodisk) ile doğrulanmıştır. Total genomik DNA'nın Xba I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesiminin ardından, "pulsed field gel electrophoresis" yöntemi ile elde edilen makrorestriksiyon profilleri karşılaştırıldığında 26 izolatın yedi patern oluşturduğu gözlenmiştir. Paternler arası ilişki incelendiğinde, paternlerin genetik olarak birbirleri ile ilişkili oldukları belirlenmiş; antibiyotik duyarlılık özellikleri diğer paternlerdeki izolatlardan farklı olan B paterninin sadece 2006 yılı izolatlarında görüldüğü ortaya çıkmıştır. Aynı dönemlerde dirençli izolatların elde edildiği bölümlerden izole edilen ve karbapeneme dirençli olmayan suşların ise, gözlemlenen yedi paternden farklı paternler oluşturdukları görülmüştür. Hastanemizde hakim olan karbapeneme dirençli izolatların birbirleri ile genetik olarak ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Karbapenem, direnç, *Klebsiella pneumoniae*, moleküler epidemiyoloji, PFGE.

P20

Kandan İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında PER-1 Enzimi Varlığının Araştırılması

Yeşim Beşli, Gülçin Bayramoğlu, Celal Kurtuluş Buruk, Uğur Dinç, Neşe Kaklıkkaya, Faruk Aydın.
Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı, Trabzon.

Pseudomonas aeruginosa, *Pseudomonadaceae* ailesinde yer alan ve primer olarak hastane kaynaklı önemli bir patojendir. *Paeruginosa* enfeksiyonlarının eradikasyonu, intrinsek ve kazanılmış mekanizmalarla birçok antibiyotik ve dezenfektana yüksek düzeyde direnç göstermesinden dolayı genellikle zordur. *Enterobacteriaceae* türlerinde önemli bir direnç mekanizması olan geniş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL), *Pseudomonas* kökenlerinde yaygın değildir. Bununla birlikte son zamanlarda bir GSBL olan PER-1'in *Paeruginosa*'da yüksek oranda bulunduğu rapor edilmektedir. Bu çalışmada Ekim 2005 - Nisan 2008 tarihleri arasında KTÜ Tıp Fakültesi, Farabi Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarında kan örneklerinden izole edilen seftazidime dirençli 26 *Paeruginosa* izolatında PER-1 enziminin varlığının araştırılması amaçlanmıştır. PER-1 geni, 5' -ATGAATGTCATTATAAAAGC-3' ve 5' -AATTTGGGCTTAGGGCAGAA-3' primerleri kullanılarak PZR yöntemiyle araştırılmıştır. Çalışmamızda 26 izolatın birisinde (%3.8) PER-1 geni saptanmıştır. Bu oranın düşük olması, çalışmaya alınan suş sayısının azlığı ile ilişkili olabileceği gibi, bu enzimin bölgemizde yaygın olmayışından da kaynaklanabilir. Bu çalışmanın, daha sonra yapılacak ve bölgedeki PER-1 oranını yansıtacak daha geniş kapsamlı araştırmalar için veri tabanı oluşturacağı düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, geniş spektrumlu beta-laktamaz, PER-1, PZR.

P21

Kan Kültürlerinden İzole Edilen GSBL Pozitif *Escherichia coli* ve *Klebsiella* Spp. Suşlarında TEM, SHV, CTX-M Tipi Beta-Laktamaz Genlerinin Dağılımı

Necla Cebeci Güler, Celal Kurtuluş Buruk, Gülçin Bayramoğlu, Ilknur Tosun, Uğur Dinç, Murat Ertürk
Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.

Gram negatif bakterilerde, beta-laktam grubu antibiyotiklere direnç gelişiminde en önemli mekanizma beta-laktamaz enzimi üretimidir. Her türde beta-laktam antibiyotik, günümüzde sayıları 350'yi aşan değişik beta-laktamazlardan bir ya da daha fazlası tarafından hidrolize edilerek etkisizleştirilir. Geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten bakteriler üçüncü kuşak sefalosporinlere (sefotaksim, seftazidim, seftriakson) ve aztreonama dirençlidirler. Bu çalışmada, 2006 yılı süresince KTÜ Tıp Fakültesi, Farabi Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen kan örneklerinden izole edilen ve otomatize sistemle tanımlanan GSBL pozitif *Escherichia coli* ve *Klebsiella* türlerinde TEM, SHV ve CTX-M tipi beta-laktamaz genlerinin varlığının PZR ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Bir yıllık süreçte kan örneklerinden izole edilen GSBL pozitif 32 *E.coli*, 26 *K.pneumoniae*, 6 *K.oxytoca* suşu çalışmada kullanılmıştır. TEM, SHV ve CTX-M'ye özgül primerler kullanılarak yapılan beta-laktamaz geni varlığı araştırılmasına ait bulgular tabloda verilmiştir. TEM tipi beta-laktamazların hem *E.coli* hem de *Klebsiella* türlerinde, SHV tipi beta-laktamazların ise *Klebsiella* türlerinde daha yaygın olarak bulunduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *E.coli*, *Klebsiella* türleri, geniş spektrumlu beta-laktamaz, TEM, SHV, CTX-M.

E.coli ve *Klebsiella* türlerinde TEM, SHV, CTX-M, TEM+SHV, TEM+CTX-M, SHV+CTX-M, TEM+SHV+CTX-M genlerinin dağılımı

Beta-laktamaz türü	<i>E.coli</i> (n=32)		<i>Klebsiella spp.</i> (n=32)		<i>K.pneumoniae</i> (n=26)		<i>K.oxytoca</i> (n=6)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
TEM	31	96.9	32	100	26	100	6	100
SHV	2	6.2	24	75	23	88.4	1	88.4
CTX-M	28	87.5	22	68.7	17	65.4	5	83.3
TEM + SHV	2	6.2	24	75	23	88.4	1	16.7
TEM + CTX-M	27	84.4	22	68.7	17	65.4	5	83.3
SHV + CTX-M	0	0	17	53.1	16	61.5	1	16.7
TEM + SHV + CTX-M	0	0	17	53.1	16	61.5	1	16.7

P22

***Klebsiella pneumoniae*, *E.coli* ve *Enterobacter cloacae* Kökenlerinde Yeni Bir Geniş Spektrumlu Beta-Laktamaz IBC-1'in Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Saptanması**

Gülşen Altınkanat, Güner Söyletir

Marmara Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

IBC-1 son yıllarda sadece Yunanistan'da, *E.cloacae*'de tanımlanan yeni bir geniş spektrumlu sınıf A beta-laktamazdır. IBC-1 geninin sınıf I integron olan ve aktarılabilir plazmidde yer alan In111'de kodlandığı ve çoklu ilaç direncinden sorumlu olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda, hastanemizde nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *E.coli*, *K.pneumoniae* ve *E.cloacae* kökenlerinde IBC-1'in varlığı araştırılmıştır. Çalışmaya alınacak kökenlerin belirlenmesinde CLSI'nin önerileri doğrultusunda antibiyotik duyarlılıkları agar dilüsyon ve/veya disk difüzyon yöntemi ile saptanmıştır. Bu doğrultuda IBC-1 fenotipi kriterleri olan beta-laktam ve beta-laktamaz inhibitörlerine direnç veya azalan duyarlılık gösteren, CAZ dirençli, İMP duyarlı 12 *K.pneumoniae*, 11 *E.coli* ve yedi *E.cloacae* kökeni çalışmaya alınmıştır. GSBL üretimi seftazidim-seftazidim/klavulanik asit ve sefotaksim-sefotaksim/klavulanik asit E-testleri ile değerlendirilmiştir. IBC-1 enziminin varlığının fenotipik olarak saptanmasında İMP, TZP, AMC ile CAZ diskleri kullanılarak çift disk sinerji (ÇDS) yöntemi kullanılmıştır. Sadece İMP ve CAZ arasında zon genişlemesi olması IBC-1 enzimi varlığı açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca epidemiyolojik verilere katkı sağlamak amacıyla kökenlerimizde IBC-1 geninin yanı sıra SHV, TEM ve CTX-M genleri de uygun primerler kullanılarak moleküler yöntemlerle araştırılmıştır. Kökenlerimizin 26 tanesi E-test yöntemi ile GSBL pozitif bulunurken, dört tanesi tanımsız bulunmuştur. ÇDS yöntemi ile yedi köken IBC-1 enzimi varlığı açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir. Kökenlerimizin (n=30) PCR ile 22'sinde TEM, 18'inde SHV, 17'sinde CTX-M genleri pozitif olarak saptanırken, hiçbirisinde IBC-1 genine rastlanmamıştır. Gelecekte bu enzimi üreten kökenlerin izole edilebileceği göz önünde bulundurularak, bu tür çalışmaların belirli aralıklarla tekrar edilmesinde büyük yarar vardır.

Anahtar Kelimeler: *E.coli*, *E.cloacae*, *K.pneumoniae*, GSBL, IBC-1.

P23

Tifo Ön Tanısı Almış Pediatrik Olgularda Kan Kültürü, Widal Aglütinasyon Testi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemlerinin Tanısal Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Koray Ergünay¹, İlker Devrim², Gülten Seçmeer², Deniz Gür³, Şemsettin Ustaçelebi¹, Ateş Kara², Ali Bülent Cengiz², Hasan Tezer², İnci Yiğitkanlı², Mehmet Ceyhan²

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

²Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Ankara.

³Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi, Klinik Patoloji Laboratuvarı, Ankara.

Günümüzde tifo tanısında altın standart, *Salmonella typhi*'nin hastadan izolasyonu olarak kabul edilmektedir. Ancak çeşitli nedenlerle hastaların bir bölümünde kan kültürlerinden etkenin izolasyonu mümkün olamamaktadır. Tanıda tercih edilen serolojik yöntem olan Widal aglütinasyon testinin kullanımı ise orta düzey duyarlılık ve özgüllük nedeniyle sorunlara neden olabilmektedir. Bu çalışmada, tifo ön tanısı ile izlenen olgularda klasik yöntemler olan kan kültürü ve Widal aglütinasyon testine ek olarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yönteminin tanısal etkinliği karşılaştırılmıştır. Çalışmaya klinik bulgular ile tifo ön tanısı konulan 45 pediatrik olguya ait kan örnekleri dahil edilmiş, kan kültürleri ve Widal aglütinasyon testi standart yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Örneklerden nükleik asit saflaştırılması amacıyla fenol-kloroform yöntemi uygulanmış, “in-house” PZR için önceden tanımlanan *invA* genini hedefleyen primerler kullanılmış, beklenen 389 bazçiftlik ampikonlar agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. Olguların 11’inde olguda (%24.5; grup 1) klinik semptomların başka hastalıklar nedeniyle (Kawasaki hastalığı, hemofagositik lenfhistiositoz, *E.coli*’ye bağlı sepsis, osteomyelit, sistemik juvenil artrit, kolanjit, menenjit, vb.) ortaya çıktığı anlaşılmış; 6’sında (%13.3; grup 2) kan kültürlerinden *Salmonella* grup D izole edilmiş; 28’inde (%62.2; grup 3) ise klinik bulgulara rağmen kan kültürleri negatif olarak izlenmiştir. Widal aglütinasyon testi grup 1’de %36.4 (4/11), grup 2’de %66.7 (4/6) ve grup 3’de %39.3 (11/28) oranında pozitif bulunmuştur. PZR pozitifliği ise birisi kültür pozitif (grup 2), diğeri kültür negatif (grup 3) olmak üzere iki olguda gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, uygulanan PZR yönteminin klinikte tanısal bir yöntem olarak performansının yeterli düzeyde olmadığını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Salmonella*, tifo, Widal, aglütinasyon, PZR.

P24

Askeri Birliklerden İzole Edilen *Neisseria meningitidis* İzolatlarının Moleküler Analizi

Abdullah Kılıç¹, Bulent Beşirbellioğlu², Ahmet Celal Başustaoglu¹, Can Polat Eyigün²

¹GATA Mikrobiyoloji AD, Etlik, Ankara.

²GATA Enfeksiyon Hastalıkları AD, Etlik, Ankara.

Neisseria meningitidis insan nazofarengeal florasında doğal olarak bulunabilmekte, çocuklarda ve genç erişkinlerde menenjit ve yaygın bakteriyel enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu çalışmanın amacı, bir aylık süre içinde üçü menenjit olgularından, dördü taşıyıcılardan olmak üzere izole edilen toplam yedi *N.meningitidis* izolatının genetik ve antijenik özelliklerinin belirlenmesidir. Hastalardan alınan beyin omurilik sıvısı örnekleri modifiye Thayer-Martin agar plaklarına ekilmiş ve inkübasyon sonunda plaklar tipik *N.meningitidis* kolonileri açısından değerlendirilmiştir. Şüpheli kolonilerin oksidaz aktivitesine bakılmış ve Gram ile boyanmıştır. Oksidaz pozitif ve Gram-negatif diplokok görüntüsüne sahip olanlar API NH (BioMerieux, Fransa) ile ileri tanımlama işlemine alınmıştır. İzolatların serogruplandırması lam aglütinasyon tekniği ile (Difco, ABD) üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır. İzolatların klonal ilişkileri “pulse field gel electrophoresis” (PFGE) yöntemi ile NheI enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolatlarının altısının serogrup W-135, birinin serogruplandırılmayan tip olduğu saptanmış, PFGE ile dört farklı pulsotipe ayrıldıkları görülmüştür. Üç izolatın PFGE görüntüsünün Türkiye’de ilk kez menenjitli bir hastadan izole edilen sekans tip (ST)-2754 ile uyumlu olduğu izlenmiştir. Sonuç olarak bu bulgular, serogrup A ve C’ye karşı koruyuculuğu olan bivalan aşı uygulanan bireylerde, sporadik olarak serogrup W-135 ile enfeksiyonların ortaya çıkabileceğini göstermektedir. Olgularımızda ST-2754 klonunun hakim olduğu ve bu klonun hastalığın kontrolü açısından epidemiyolojik takibinin yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Neisseia meningitidis*, PFGE, ST-2754.

P25**Eskişehir’de Tıp Fakültesi Hastanesi’nde Vankomisine Dirençli Enterokokların Moleküler Epidemiyolojik Analizi**

Buket Yayla¹, Gül Durmaz², Abdurrahman Kiremitçi², Tercan Us², Yurdanur Akgün²

¹Diyarbakır Doğumevi Hastanesi, Diyarbakır.

²ESOGÜ Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.

Bu çalışmada Mayıs 2006-2007 tarihleri arasındaki bir yıllık bir zaman dilimi içinde ESOGÜ Tıp Fakültesi Hastanesi yoğun bakım ünitesi hastalarında, haftada bir kez alınan sürveyans kültürleriyle vankomisine dirençli enterokok (VRE)’lerin gastrointestinal sistem taşıyıcılığının araştırılması ve elde edilen VRE izolatlarının direnç genotiplerinin ve genetik yakınlıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma süresince çeşitli klinik örneklerden patojen olarak soyutlanan VRE suşları da çalışmaya dahil edilmiştir. Glikopeptid direnç genotipini saptamada multipleks PCR, klonal ilişkinin belirlenmesinde ise PFGE yöntemleri kullanılmıştır. Sürveyans kültürlerinin %4.8’inde (58/1200), klinik örneklerden izole edilen enterokok izolatlarının %0.5’inde (3/529) VRE saptanmıştır. Bu suşların tümü *E.faecium* olarak tanımlanmıştır. E-test ile suşların tümünde vankomisin ve teikoplanin MİK değerleri 256 mg/L üzerinde bulunmuştur. Moleküler testlerle suşların hepsinin *vanA* genotipinde olduğu ve tek bir klondan köken aldıkları saptanmıştır. Hastanemizdeki ilk olarak 2002 yılında kolonizan olarak iki VRE suşu tanımlanmıştır. Takiben 2005 yılında alınan sürveyans kültürlerinde %5.9 (25/420) oranında VRE saptanması ve bizim bulgularımız hastanemizdeki VRE enfeksiyonlarının karşımıza çıkmaya devam edeceğini düşündürmektedir. Bu nedenle VRE tespiti ve yayılımının önlenmesi konusunda etkin enfeksiyon kontrol uygulamaları, bu sorunun gelecekteki boyutunu belirlemede anahtar rol oynayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Enterokok, multipleks PCR, PFGE, vankomisine dirençli enterokok.

P26

Endüstriyel Enzim Üreticisi Yerel *Bacillus* İzolatlarının Moleküler Tiplendirme Yöntemleriyle Tanımlanması

Saliha İşsever Öztürk, Merve Tuzlakoglu Öztürk, Nagihan Akbulut, Ş. Serda Kayman, Füsün Gümüşel

Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji AD, Kocaeli.

Genotipler arasındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesinde DNA temeline dayalı tekniklerin büyük bir potansiyeli vardır. Ribozomal RNA'lar ve diğer evrensel moleküller, genomun geri kalan kısmının anlaşılmasında kullanılan başlıca referanslar arasında yer almaktadır. PCR'a dayalı teknolojilerin gelişmesi, gerek biyolojik çeşitliliğin belirlenmesi ve taksonomik çalışmalar için, gerekse patojenlerin hızla tanımlanması adına yeni araçlar sağlamıştır. Bu çalışmada, Bursa, Afyon, Gönen ve Edremit yakınlarındaki sıcak su kaynakları ve alkali topraklardan toplanan örneklerden ve zeytin kara suyundan izole edilen, lipaz, amilaz veya alkalin proteaz üretkenlikleri temelinde taranarak seçilen ve konvansiyonel yöntemler kullanılarak tür düzeyinde tanımlanan yerel *Bacillus* soyları, moleküler analizler kullanılarak tiplendirilmiştir. Yerel izolatlardan PCR ile çoğaltılan 16S rRNA genlerinin dizi analizi ve yine PCR temeline dayalı AFLP (amplified fragment length polymorphism) analizleri, kapiller elektroforez sistemi kullanılarak yapılmıştır. ARDRA (amplified rDNA restriction analysis) çalışmalarında PCR ile çoğaltılan 16S rRNA genleri ve *rrn* operonları Sau 3AI, Mbo II ve Cfo I restriksiyon enzimleriyle sindirilerek değerlendirilmiştir. Ribotiplendirme çalışmalarında, Bcl I, Sma I, Eco RV, Cla I veya Hind III enzimleri ile ayrı ayrı sindirilen genomik DNA'lar, *rrn* operonuna yönelik olan ve DIG-dUTP işaretli farklı probalar kullanılarak irdelenmektedir. Bakteri tiplendirme ve sınıflandırması için önemli bir gösterge olan bakteriyel kromozomların G+C içeriğinin belirlenmesine yönelik çalışmalar sürdürülmektedir. Yerel *Bacillus* izolatlarının tiplendirilmesi amacıyla kullanılan gerek klasik manuel testler ve ticari kitler gerekse uygulanan ilk moleküler temelli yöntemler soyların bazıları için farklı sonuçlar vermiştir. Bu nitelikteki bakteriyel soyların tiplendirme çalışmaları, güncel ve ayırım gücü yüksek yeni teknikler (*rrn*-operonu ISR ve ITS analizleri, MLSA, korunmuş *ftsY* ve *recN* genlerinin kapiller sistemde dizilenmesi) kullanılarak tamamlanacaktır.

Anahtar Kelimeler: AFLP, amilaz, ARDRA, *Bacillus*, lipaz, PCR, proteaz, 16S rDNA, ribotiplendirme.

P27

Diziye Özgül Polimeraz Zincirleme Tepkimesi İle Mikobakteri Türlerinin Saptanması

Tanıl Kocagöz¹, Kaya Köksalan², Yeşim Gürol¹, Gülçe Şınık³, İnci Tüney⁴,
Nihan Aytekin³, İskender Karaltı¹

¹Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, İstanbul.

²İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İstanbul.

³İnovatif Biyoteknoloji Organizasyonu (Tibo), İstanbul.

⁴Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İzmir.

Tüberküloz Türkiye’de ve dünyada en önemli sağlık sorunlarından biri olmaya devam etmektedir. İnsanda en sık enfeksiyona yol açan mikobakteri türü *Mycobacterium tuberculosis*’tir. Ancak *M.tuberculosis* dışında yaklaşık yirmi farklı mikobakteri türünün daha insanda çeşitli enfeksiyonlara yol açtığı bilinmektedir. Günümüzde 140 kadar mikobakteri türünün varlığı saptanmıştır ve bu sayı tiplendirmede moleküler yöntemlerin ağırlık kazanmasıyla her geçen gün artmaktadır. Hasta örneklerinden yapılan kültürlerde, mikobakteri üretildiği zaman türünün mutlaka saptanması gerekir. Zira insanda tüberküloza sıklıkla yol açan *M.tuberculosis* enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan ilaçlar, diğer mikobakteri enfeksiyonlarında genelde etkili olmamakta ve tedavide başka antimikobakteriyel ilaçlar kullanılmaktadır. Kültürleri kontamine eden ancak insanda enfeksiyona yol açmayan mikobakteriler için türlerin belirlenmesi, hastaların gereksiz tedavi almasını engellemektedir. Mikobakteriler için klasik tür saptama yöntemi, kültürde üreme hızı, pigment oluşturma ve çeşitli biyokimyasal özelliklerine dayanmaktadır. Yavaş üreyen *M.tuberculosis* gibi mikobakterilerde bu yöntemle tür saptama 2 ay kadar sürmekte ve birçok kez kesin olmayan sonuçlar verilmektedir. Tür saptamasını hızlandırabilmek ve özgüllüğünü artırabilmek için çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmiştir. En gelişmiş ticari kitler dahi sadece 16 mikobakteri türünü saptayabilmektedir. Bu çalışmada, polimeraz zincirleme tepkimesine dayanan mikobakteri türlerininin tamamını kolayca ayırt etmesi beklenen bir yöntem geliştirilmiştir. Mikobakterilerin ribozomal RNA, *hsp65* ve *gyrB* gen dizilerine özgül primerler ile çoğaltma ürünü elde edilip edilmemesine dayalı bu yöntemde, tek türe özgül DNA dizileri yerine, türleri gruplara bölen aşamasal ayırma sistemi kullanılmaktadır. Bu yeni yaklaşımla, az sayıda diziye özgü primer ile tüm mikobakteri türlerinin kolayca saptanması ve maliyetinin daha az olması olanaklı kılınacaktır.

Anahtar Kelimeler: Mikobakteri, *Mycobacterium tuberculosis*, polimeraz zincir tepkimesi.

P28

Vajinit Etkenlerinin Tanısında DNA Prob Analizi ve Klasik Yöntemlerin Karşılaştırılması

Abbas Yousefi Rad¹, Burcu Saygan Karamürsel², A. Şafak Bulut³, N. Yasemin Ardıçoğlu⁴, Selçuk Kılıç⁵

¹Özel MESA Hastanesi, Klinik Laboratuvarı Mikrobiyoloji, Söğütözü, Ankara.

²Özel MESA Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum, Söğütözü, Ankara.

³Özel MESA Hastanesi, Patoloji Laboratuvarı, Söğütözü, Ankara.

⁴Özel MESA Hastanesi, Klinik Laboratuvarı Biyokimya, Söğütözü, Ankara.

⁵Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hast. Arş. Md., Ankara.

Vajinal akıntının sebebi sıklıkla bakteriyel vajinoz (BV), vulvovajinal candidiasis ve trichomoniasis'dir. Her üç enfeksiyon grubu için klinik belirtiler özgül değildir ve birbirinden ayırt edilemezler. Olguların yaklaşık %25'de karışık enfeksiyonlar gelişmektedir. Her üç etkenin tedavisi birbirinden farklıdır ve başta *Trichomonas* enfeksiyonu olmak üzere farkedilmez veya tedavi edilmezlerse endometrit ve pelvik inflamatuvar hastalığa neden olabilirler. Çalışmamızda klasik mikrobiyolojik yöntemler, vajinal yayma ve DNA hibridizasyon yöntemlerinin karşılaştırması amaçlanmıştır. Vajinoz semptomu olan 50 kadın hastadan üç vajinal sürüntü örneği ve vajinal yayma alınmış, tüm örnekler alındıktan hemen sonra laboratuvara ulaştırılmıştır. Örneklerden birisi direk mikroskopi için, diğeri kültür için (%5 insan kanlı agar, mantar için kromogen agar, *Trichomonas vaginalis* için Diamond besiyeri) kullanılmıştır. Son sürüntü örneğine de, Affirm VPIII (BD, USA) prosedürüne uygun olarak DNA hibridizasyon testi uygulanmıştır. Vajinal yayma örnekleri sıvı bazlı test (PAP spin) yöntemi ile hazırlanmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar tabloda verilmiştir. Toplam 50 hastada DNA hibridizasyonu ile %40, mikroskopik inceleme ile %32, kültür ile %38 ve sıvı bazlı PAP testi ile %34 oranında vajinoz etkenleri saptanmıştır. Vajinal yayma, mikrobiyolojik inceleme ve kültür gibi yöntemler 24-48 saatlik bir sürece ihtiyaç duymaktadır. Çalışmamızda kullandığımız DNA hibridizasyon yöntemi, daha hızlı ve floradaki etkenlerin belli konsantrasyonun üzerinde olduğu durumlarda sonuç vermektedir. Nükleik asit bazlı hibridizasyon tekniğinde kullanılan bu tip standardize kitler, yakın zamanda klinik mikrobiyoloji alanında daha geniş kullanım alanı bulacaktır.

Anahtar Kelimeler: Vajinit, vajinal sürüntü, DNA hibridizasyon, Pap testi, kültür, tanı.

Farklı yöntemlerle vajinozlu 50 hastadan elde edilen sonuçların karşılaştırılması

Etken	DNA Hibridizasyon Sayı (%)	Mikroskopik inceleme Sayı (%)	Mikrobiyolojik Kültür Sayı (%)	Pap yayması Sayı (%)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	13 (26)	10* (20)	11 (22)	8** (16)
<i>Candida</i> spp.	6 (12)	5 (10)	7 (14)	8 (16)
<i>Trichomonas vaginalis</i>	1 (2)	1 (2)	1 (2)	1 (2)
Negatif	30 (60)	34 (68)	31 (62)	33 (66)

* Clue cell ** Bakteriyel vaginosis olarak raporlanmıştır.

P29**“Cobas TaqMan Real-Time PCR” Yöntemiyle HBV-DNA Kantitasyonunda Üç Farklı Nükleik Asit İzolasyon Yönteminin Karşılaştırılması**Alpaslan Alp, Gülşen Hasçelik

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

Günümüzde serum örneklerinde HBV-DNA kantitasyonu, bu virusla enfekte hastaların takibinde büyük önem kazanmıştır. Bu testlerin duyarlılığı, PCR öncesinde uygulanan nükleik asit izolasyon yöntemlerinden önemli ölçüde etkilenmektedir. Bu çalışmanın amacı, serum örneklerinden “TaqMan real-time PCR” yöntemiyle HBV-DNA kantitasyonu öncesinde kullanılan klasik manuel izolasyon yöntemi, otomatize MagNA Pure sistemi ve otomatize AmpliPrep sisteminin etkinliklerinin karşılaştırılmasıdır. Bu amaçla, HBsAg pozitif olduğu bilinen 36 hastadan alınmış kan örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. Bu örneklerden nükleik asit izolasyonu manuel “Total Nucleic Acid Isolation” kiti (Roche Diagnostics), “MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation” kiti (Roche Diagnostics) ve “Cobas AmpliPrep” kiti (Roche Diagnostics) kullanılarak yapılmıştır. Bu üç yöntemle elde edilen nükleik asitler “Cobas Taqman 48” (Roche Diagnostics) cihazında gerçek zamanlı PCR yöntemiyle çoğaltılmış ve kantitatif olarak saptanmıştır. Manuel izolasyon yöntemi, MagNA Pure sistemi ve AmpliPrep sistemi ile elde edilen HBV-DNA kopya sayıları sırasıyla; 10-86.000.000 (ortalama: 9.501.141) IU/ml, 10-94.000.000 (ortalama: 10.420.372) IU/ml ve 27-90.100.000 (ortalama: 12.628.890) IU/ml aralıklarında bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, AmpliPrep sistemi ile elde edilen HBV-DNA sayılarının diğer iki yönteme göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Düşük HBV-DNA kopya sayısı içeren örneklerden her üç yöntemle de verimli bir şekilde izolasyon yapılabildiği gözlenmiştir. Bu çalışma sonucunda, klinik örneklerden HBV-DNA izolasyonu için üç yöntemin de güvenle kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Ancak AmpliPrep ve MagNA Pure sistemleriyle daha yüksek miktarda HBV DNA'nın daha kısa sürede elde edilebilmesi, bu yöntemleri özellikle örnek sayısı yüksek olan rutin laboratuvarlar için daha uygun seçenekler haline getirmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hepatit B virusu, viral yük, DNA saflaştırma, TaqMan, PCR.

P30

Afyon Bölgesindeki Kronik Hepatit B'li Hastalarda Genotip, Mutasyonel Analiz ve İlaç Direncinin Araştırılması

Mustafa Altındış¹, Raike Kalaycı¹, Cihangir Gülamber¹, Neşe Demirtürk², Yusuf Akcan³, Tuna Demirdal², Orhan Cem Aktepe¹

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar.

²Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji, Afyonkarahisar.

³Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar.

Hepatit B virusu (HBV)'nin mutasyon hızı oldukça yüksek olup, mutant formlar tanıda ve tedavide bazı sorunlara yol açmaktadır. Özellikle nükleozid analoglarının kullanımı ile ortaya çıkan veya naif hastalarda var olan ilaç dirençlerinin belirlenmesi, tedaviye başlama kararı ve takipte yardımcı olacaktır. Bu çalışma, Eylül 2007-Mart 2008 tarihleri arasında, Afyon Kocatepe Üniversitesi Hastanesi polikliniklerine başvuran, Kan Merkezinden alınan ya da taramalar esnasında saptanan hepatitli bireylerden HBV DNA'sı pozitif, toplam 44 hastada yapılmıştır. Hastaların 25'i (%56.8) hiç lamivudin tedavisi almamış, 19'u (%43.2) ise halen lamivudin tedavisi alanlardan seçilmiştir. Hastaların yaş aralığı 17-71 yıl (ortalama: 42.02±13.5 yıl) arasında olup, 31'i (%70.5) erkektir. Hastaların tümü HBsAg ve HBV-DNA yönünden pozitif, anti-HCV ve anti-delta total antikorları açısından negatif bulunmuştur. Hepatit serolojisi Diapro MikroELISA ve Vitros/Orto-diagnostic kitleri ile, HBV-DNA ise RT-PCR (Rotorgene, RG-3000) ile çalışılmıştır. Test edilen 44 serum örneğinden QIAGEN QIAamp MinElute Virus Spin Ekstraksiyon kiti ile (QIAGEN, 57704) HBV-DNA izole edilmiş ve bu örneklerde de sekans yöntemi (ABI 310, AB) ile genotiplendirme, mutasyonel analiz ve ilaç direnci araştırılmıştır. Dizi analizi için DNA polimeraz geninin 120-260. kodonları arasındaki bölge çoğaltılmıştır. Hastaların tamamı genotip D olarak belirlenmiş, aynı dizilerde yapılan mutasyonel analiz ve ilaç direnci araştırmalarında ise; 6 (%13.6) hastada M204I mutasyonu (Lamivudin direnci), 2 (%4.5) hastada Q215S mutasyonu (Lamivudin-LAM direnci) ve birer (%2.3) hastada olmak üzere V214A mutasyonu (Adefovir-ADV direnci), L80I+M204I mutasyonu (LAM direnci), A181T+N236T mutasyonu (ADV direnci), V84M+V173L mutasyonu (ADV ve LAM direnci), L80V+M204I mutasyonu (LAM direnci), Q215S+M204I mutasyonu (LAM direnci) ve M204I+L180M mutasyonu (LAM direnci) saptanmıştır. Geri kalan 29(%65.9) hastada mutasyon ya da ilaç direncine rastlanmamıştır. Sonuç olarak HBV'li hastaların tamamında genotip D saptanmış olup, belirlenen genotip, ilaç dirençleri ve mutasyonlar, bölgemizdeki kronik hepatitli olguların takip ve tedavisinde yol gösterici olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Hepatit B virusu, mutasyon analizi, ilaç direnci.

P31**Hepatit B Virus Tanısında HBV-DNA ve ELISA Sonuçlarının Önemi**

Aziz Ramazan Dilek¹, Pınar Demirel Öner¹, Selahattin Karakoç¹, Yasemin Bulut¹,
Kutbettin Demirdağ², Ahmet Kizirgil¹, Zülal Aşçı Toraman¹

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

²Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Elazığ.

Kronik karaciğer hastalığı, siroz ve karaciğer kanserine neden olan hepatit B virusu (HBV), ülkemizde ve dünyada insan sağlığını ciddi oranda etkilemeye devam etmektedir. Farklı tanı yöntemlerinin B hepatiti hastalığının tanısındaki değerlerinin araştırılması konusundaki çalışmalara katkıda bulunmak amacıyla, bu çalışmada hastanemize başvuran ve HBV ile ilgili tetkik yapılmış olan bireylerden elde edilmiş ELISA ve PCR sonuçları değerlendirilmiştir. Çalışmaya laboratuvarımıza gönderilen toplam 284 serum örneği dahil edilmiştir. Bu örneklerden, ELISA ile HBV antijen-antikor parametreleri ve gerçek zamanlı PCR yöntemiyle de HBV-DNA çalışılmıştır. DNA izolasyonu “QIAamp MinElute Kit” (Qiagen) ve amplifikasyon işlemi “Flurion HBV QNP” (İontek) kitleri kullanılarak hazırlanan PCR karışımı içinde Iqcyclus cihazında gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı PCR’da 200 kopya/ml’nin altındaki sonuçlar negatif olarak kabul edilmiştir. HBsAg pozitif olarak belirlenen 226 hastanın 84’ünde (%37.1) HBV-DNA pozitifliği 200 kopya/ml’nin altında tesbit edilmiştir. Buna karşın 142 hastada (%62.8) HBV-DNA düzeyinin 200 kopya/ml’nin üstünde olduğu gözlenmiştir. 43 hastada hem anti-HBs pozitifliği hem de HBV-DNA pozitifliği belirlenirken, bunların 30’unda (%69.7) HBV-DNA pozitifliği 200 kopya/ml’nin altında bulunmuştur. Sonuç olarak, HBsAg negatif olarak tesbit edilen 58 (%20.4) ve anti-HBs pozitif olarak belirlenen 43 (%15.1) hastada aynı zamanda HBV-DNA’nın tespit edilmiş olması, HBV’nin tanı ve tedavisinin belirlenmesinde tek başına ELISA sonuçlarının yetersiz olduğunu ortaya koymuştur. Bu veriler ışığında sonuçların moleküler yöntemlerle desteklenmesi gerektiği kanaatini taşımaktayız.

Anahtar Kelimeler: Hepatit B virusu, HBV-DNA, ELISA, polimeraz zincir reaksiyonu.

P32

HBV "e" ve HBV "c" Antijenine Karşı Monoklonal Antikor Geliştirme Çalışmalarında Dalak, Lenf Dügümü ve İntraperitoneal Hücrelerin Kullanılması

İbrahim Söğüt, İbrahim Hatipoğlu, Çiğdem Saatçılar, Esin Akçael, Fatıma Yücel, Aynur Başalp
TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Kocaeli.

Hepatit B virusu (HBV) küçük ve zarflı bir DNA virusudur ve insanlarda akut ve kronik hepatit, karaciğer sirozu ve karaciğer kanseri etkeni olarak kabul edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre dünyada iki milyardan fazla insanda HBV enfeksiyonuna rastlanmaktadır. Yine tüm dünyada 300–500 milyon kişi HBV taşıyıcısıdır ve her yıl yaklaşık iki milyon kişi hepatit B enfeksiyonundan ölmektedir. Sağlık Bakanlığı verilerine göre de ülkemizde yaklaşık dört milyon HBV taşıyıcısı bulunmaktadır. Hepatit B enfeksiyonu geçiren hastalarda, hastalığın farklı dönemlerinde HBs, HBe antijeni- antikor ve HBe antikorunu takip edilerek hastalığın seyri belirlenmektedir. Örneğin hastalığın orta dönemlerinde HBe antijeni azalırken, HBe antikor düzeyi artmaktadır. HBe antijeni yüksek olan hastaların enfeksiyonu çevrelerine bulaştırma riski yüksektir. Akut ya da yakın bir zamanda bulaşmış HBV enfeksiyonunun saptanmasında ise serumda HBe antikorları takip edilir. Bu çalışmada hibridoma teknolojisi kullanılarak HBe ve HBe antijenine karşı monoklonal antikor geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla BALB/c fareleri HBe ve HBe antijeni ile birlikte 3 kez immunize edilmiştir. Füzyonda her iki antijene özgü antikor titresi yüksek farelerle füzyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan ilk füzyon çalışmasında farenin dalak ve lenf düğümlerinden elde edilen lenfositlerle, diğer iki füzyon çalışmasında ise dalak, lenf düğümleri ve intraperitoneal sıvıdan elde edilen lenfositlerle füzyon yapılmıştır. Dalak, lenf düğümleri ve intraperitoneal sıvıdan elde edilen lenfositlerle yapılan ikinci füzyon çalışmasında 825 hibrid hücre elde edilmiştir. Hücrelerin antikor aktivitesinin belirlenmesi için yapılan ön taramalarda 124 aktif hücre bulunmuş, çapraz reaksiyon testleri sonucunda ise HBV e ve HBV c antijenine özgü monoklonal antikor üreten iki farklı hibrid hücre elde edilmiştir. Antikor izotiplendirme çalışmaları sonucunda bu antikorların IgM ve IgA antikorları olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hepatit B virusu, HBcAg, HBeAg, hibridoma teknolojisi, monoklonal antikor.

P33**Yarışımlı Kit Sistemlerinde Kullanmak Üzere Hepatit B Kor Antijenine Karşı Monoklonal Antikor Geliştirilmesi**

Çiğdem Saatçılar, Esin Akçael, İbrahim Söğüt, Aynur Başalp, Fatıma Yücel
TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Gebze/Kocaeli.

Hepatit B virusu (HBV), akut ve kronik hepatit, karaciğer kanseri ve sarılık gibi önemli hastalıkların etkenidir. HBV oldukça yaygın ve günümüzde halen dünyaca önemli sağlık sorunları arasında kabul edilmektedir. Tüm dünyada yaklaşık 350 – 500 milyon kronik HBV taşıyıcısı vardır ve her yıl yaklaşık iki milyon insan HBV ile ilişkili hastalıklar dolayısıyla ölmektedir. Türkiye’de ise yaklaşık olarak 3–4 milyon hepatit B taşıyıcısı vardır. Bu hastalığın serolojik yöntemlerle erken tanısında ve seyrinde HBV’nin farklı antijenik bölgelerine karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Hepatit B kor antikor, hepatit B enfeksiyonunun tanısında duyarlı ve özgül serum belirleyicisi olarak bilinmektedir. Ayrıca bazı hastalarda hepatit B kor antikor, HBV yüzey antijeninin ya da yüzey antikorunun yokluğunda tek serum belirleyicisi olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, hibridoma teknolojisi kullanılarak HBV’nin kor antijenine (HBcAg) özgül monoklonal antikor üreten hibrit hücrelerin elde edilmesi amaçlanmıştır. HBcAg ile bağışıklanmış farelerin dalak ve lenf düğümlerinden elde edilen lenfositler ile FO fare myeloma hücreleri PEG mevcudiyetinde birleştirilmiştir. Toplam beş füzyon deneyi yapılmıştır. Son füzyon çalışmasında, toplam 693 hibrit klon gözlenmiştir. Bu çalışmada füzyona alınan farenin intraperitoneal hücreleri, füzyon plaklarında besleyici hücre olarak kullanılmıştır. Bu klonlar içerisinde MAM 12C9 isimli hibridoma hücresinin ürettiği antikorun kor antijen ile özgül reaksiyon verdiği alt klonlama yöntemi ve indirekt-ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Monoklonal antikorların saflaştırılması ve immünooglobulin izotip belirleme çalışmaları tamamlanmıştır. Elde edilen monoklonal antikorun diğer HBV antijenleri ve serum proteinleri ile çapraz reaksiyon vermediği gözlenmiştir. Karakterize edilmiş olan bu monoklonal antikor, yarışımlı ELISA sistemine dayalı tanı kitlerinin geliştirilmesinde kullanılacaktır.

Anahtar Kelimeler: Hepatit B virusu, HBcAg, ELISA, hibridoma teknolojisi, monoklonal antikor.

P34

Hepatit B ve Hepatit C Tanısında İmmünolojik ve Nükleik Asit Testlerinin Etkinliği

Yeşim Gürol, Zuhâl Tekkanat Tazegün, Meral Sönmezoğlu, Burcu Öksüz,
Raziye Demiralay Celep, Sesin Kocagöz, Tanıl Kocagöz
Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, İstanbul.

Hepatit B ve Hepatit C virusları (HBV ve HCV) karaciğerde akut ve kronik enfeksiyon yapabilen viruslardır. Bu çalışmada, HBV ve HCV'nin tanısı ve izleminde önem taşıyan immünolojik yöntemler ve nükleik asit testleri arasındaki uyumun araştırılması amaçlanmıştır. Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinin klinik mikrobiyoloji laboratuvarına başvuran HBsAg pozitif hastaların kanında izlenebilir polimeraz zincirleme tepkimesi (PZT; Real Time PCR) kullanılarak HBV-DNA varlığı araştırılmıştır. Aralık 2005 – Ocak 2008 tarihleri arasında toplam 136 hasta incelenmiş ve sonuçlar Tablo I'de gösterilmiştir. ELISA yöntemiyle anti-HCV pozitifliği saptanan hastalarda da HCV-RNA varlığı izlenebilir PZT ile araştırılmış ve aynı tarihler arasında incelenen toplam 88 hastanın sonuçları Tablo II'de belirtilmiştir. HBsAg pozitif hepatit B hastalarında HBV-DNA büyük oranda pozitif olmasına karşın, %12.5'inde negatiflik saptanmıştır. HBV DNA'sı negatif olan hastaların %25'inde HBsAg pozitifdir. Bu iki test arasında yüksek oranda uyumluluk saptanmasına karşın, uyumun tüm hastalarda saptanmaması nedeniyle, her iki yöntemin bir arada kullanılmasının tanı konulan hasta sayısını artıracağı açıktır. Anti-HCV pozitif olan hastaların %20.5'inin HCV RNA'sı negatif bulunmuştur. Bu hastalar HCV enfeksiyonu kronikleşmeyen, iyileşmiş hastalar olabilir. Buna karşın hastaların %11.4'ünde HCV-RNA pozitif iken, anti-HCV negatif bulunmuştur. Bu durum, enfeksiyonun yeni olması nedeniyle henüz antikorların oluşmamasına ya da bu hastaların HCV'ye karşı antikor oluşturmamasına bağlı olabilir. Kan bankalarında sadece anti-HCV yönünden yapılan taramaların yeterli olmadığı ve taramalarda HCV-RNA araştırılmasının gerekliliği tartışılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Hepatit B, hepatit C, immünolojik tanı, nükleik asit çoğaltma, PZT.

Tablo I. HBsAg ve HBV-DNA test sonuçlarının karşılaştırması

	HBsAg Pozitif Sayı (%)	HBsAg Negatif Sayı (%)	Toplam
HBV-DNA pozitif	42 (87.5)	6 (12.5)	48 (35.3)
HBV-DNA negatif	22 (25)	66 (75)	88 (64.7)
Toplam	64	72	136

Tablo II. Anti-HCV ve HCV-RNA test sonuçlarının karşılaştırması

	Anti-HCV Pozitif Sayı (%)	Anti-HCV Negatif Sayı (%)	Toplam
HCV-RNA pozitif	0	10 (100)	10 (11.4)
HCV-RNA negatif	16 (20.5)	62 (79.5)	78 (88.6)
Toplam	16	72	88

P35**Hepatit B ve Hepatit C Virus Enfeksiyonu Olan Hastalarda Genotiplerin Dağılımı**

Nail Özgüneş, Mustafa Fatih Küçüköztaş, Saadet Yazıcı, Hatice Şanlı
S.B. Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve
Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul.

Hepatit B (HBV) ve hepatit C virus (HCV)'ları, karaciğer sirozu ve hepatosellüler karsinoma gibi hastalıkların önemli etiyolojik ajanlarından. HBV ve HCV genetik yapılarına göre genotiplere ayrılmışlardır. Virus genotiplerinin bilinmesi, HCV için kullanılacak ilaç dozlarını, tedavi sürelerini ve yanıt oranlarını etkileyerek klinisyenin hasta takip ve tedavisinde odak noktasıdır. HBV için de tedaviye yanıt ve direnç gelişiminde önemlidir. Bu çalışmada hastanemizde saptanan HBV ve HCV genotip dağılımının ortaya konulması ve diğer çalışma sonuçlarıyla karşılaştırılması amaçlanmıştır. Şubat 2007-2008 arasında hastanemiz Enfeksiyon Hastalıkları ve Gastroenteroloji kliniklerine başvuran, anti-HCV (EIA), HBsAg (EIA), HCV-RNA (revers transkriptaz-PCR) ve HBV-DNA (kantitatif PCR) pozitifliği saptanan hastaların serum örneklerinde otomatize Auto-Lipa cihazında, revers hibridizasyon yöntemi ile genotiplendirme yapılmıştır. Hepatit C'de kriterlere uygun 53 hasta (23 erkek, 30 kadın) arasında en sık rastlanan genotip %84.9 (45/53) oranıyla genotip 1; alt grup ise %75.5 oranıyla (40/53) genotip 1b olmuştur. Genotip 3 dört hastada (%7.5), genotip 4 üç hastada (%5.7), genotip 2 bir hastada (%1.9) tespit edilmiştir. Hepatit B'de ise kriterlere uygun 52 hastanın (36 erkek, 16 kadın) tamamında genotip D (%100) saptanmıştır. Ülkemizde kronik HCV enfeksiyonlu olguların çoğunda genotip 1 hakimdir. Yapılan çalışmalarda %66.7-100 oranları ile genotip 1b'nin ilk sırayı aldığı rapor edilmektedir. Ülkemiz için genotip tayininin gerekli olmayabileceği ifade edilmekle birlikte, az sayıda genotip 1 dışı hasta, tedavide önemli maliyet düşüklüğü sağlayabilir. Hepatit B hastalarında ise, diğer araştırmalarda olduğu gibi %100 genotip D tespit edilmiştir. Hepatit B için rutin olarak genotip tayininin ülkemiz için gerekli olmadığı söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Genotiplendirme, hepatit B virusu, hepatit C virusu.

P36

Hepatit C Virus Tanısında HCV-RNA Belirlenmesinin Önemi

Yasemin Bulut¹, Selahattin Karakoç¹, Aziz Ramazan Dilek¹, Pınar Demirel Öner¹, İlhami Çelik², Zülal Aşçı Toraman¹

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

²Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD., Elazığ.

Hepatit C virusu (HCV)'nun dünyada 170 milyon, ülkemizde ise yaklaşık bir milyon kişiye bulaşmış olduğu tahmin edilmektedir. Anti-HCV antikorlarının varlığı, bireyin HCV ile karşılaşmış olduğunu göstermekteyse de, tek başına akut enfeksiyonu göstermede yetersiz kalmaktadır. Ayrıca enfeksiyonun erken dönemlerinde hastaların seronegatif olması ya da bazı olgularda serokonversiyonun geç şekillenmesi gibi sebepler, serolojik testler yanında moleküler yöntemlerle HCV-RNA saptanmasını da zorunlu kılmaktadır. HCV'nin tanısına yönelik çalışmalara katkıda bulunmak amacıyla, laboratuvarımıza gönderilen serum örnekleri ELISA ve gerçek zamanlı PCR yöntemleriyle incelenmiş ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Çalışmaya laboratuvarımıza gönderilen toplam 342 serum örneği dahil edilmiştir. Bu örneklerden, ELISA (Abbott, AxSYM HCV versiyon 3.0) ile anti-HCV ve gerçek zamanlı PCR (Iqcyler, Biorad) yöntemiyle de HCV-RNA çalışılmıştır. RNA izolasyonu "QIAamp MinElute Kit" (Qiagen) ve amplifikasyon işlemi "Flurion HCV QNP" (İontek) kitleri kullanılarak hazırlanan PCR karışımı içinde Iqcyler cihazında gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı PCR'da 50 IU/ml'nin altındaki sonuçlar negatif olarak kabul edilmiştir. Toplam 342 hastanın 78'inde (%22.8) anti-HCV ve HCV-RNA pozitif, 139'unda (%40.6) anti-HCV ve HCV-RNA negatif, 113'ünde (%33) anti-HCV pozitif ve HCV-RNA negatif, 12'sinde (%3.5) anti-HCV negatif ve HCV-RNA pozitif olarak saptanmıştır. Anti-HCV pozitif bulunan bireylerin büyük çoğunluğunda aynı zamanda HCV-RNA pozitifliği gözlenmiştir. Sonuç olarak, anti-HCV pozitif hastalarda HCV-RNA'nın araştırılması, tanı koyma, takip ve tedavi yönünden hem önemli hem de gereklidir. Anti-HCV negatif viremik hastaların tespitinde, şüpheli ve serokonversiyon gelişmeyen olguların aydınlatılmasında ya da uygulanan tedavinin etkinliğinin takibinde, HCV-RNA'nın araştırılması ve viral genom sayısının belirlenmesi rutin olarak kullanılması gereken bir yöntemdir.

Anahtar Kelimeler: Hepatit C virusu, anti-HCV, HCV-RNA, ELISA, PCR.

P37**Beyin Omurilik Sıvısı Biyokimyasal Özellikleri ile HSV-DNA PCR İstemlerinin Uygunluğunun Karşılaştırılması**Özgür Appak¹, Güneş Özçolpan¹, Ayça Arzu Sayiner¹, Ali Rıza Şişman²¹Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.²Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir.

Herpes simpleks virus (HSV)'a bağlı merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarının tanısında, beyin omurilik sıvısı (BOS)'nda viral DNA saptanması altın standarttır. BOS'da HSV-DNA isteklerinin giderek artış göstermesi, gereksiz istekler konusunu gündeme getirmiştir. Bu tür isteklerin önlenmesi için, sadece BOS protein ve/veya lökosit sayısında artış saptanan örneklerin teste kabul edilmesini öneren yayınlar vardır. Bu çalışmada, laboratuvarımıza HSV-DNA PCR isteğiyle gelen BOS örnekleri retrospektif olarak incelenmiş ve protein ve/veya lökosit sayısı ile PCR pozitifliği arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. 2004 ile 2008 Mart ayı arasında laboratuvarımızda HSV PCR çalışılan 332 BOS örneği, lökosit ve protein miktarları, HSV-DNA sonuçları, diğer viral etken PCR ve bakteri kültürü sonuçları açısından incelenmiştir. BOS protein düzeyi > 45 mg/dl ve/veya lökosit sayısı ≥ 5 /mm³ olan örnekler, HSV- DNA PCR testi için uygun kabul edilmiştir. 246 (%74) örneğin protein düzeyi ve lökosit sayısına ulaşılmış, bunlardan 118'inin (%48) HSV-DNA PCR testi ön koşuluna uygun olduğu belirlenmiştir. HSV-DNA pozitif sekiz örnekten üçünün protein düzeyi ve hücre sayısı kayıtlarda bulunamamıştır. Kalan beş örneğin üçünde her iki parametrenin de yüksek, ikisinde sadece lökosit sayısının yüksek olduğu saptanmıştır. HSV-DNA PCR testi istenen BOS örneklerinin yaklaşık yarısında protein düzeyi ve lökosit sayısı normal olarak saptanmıştır. Yukarıda belirtilen kriterler göz önüne alındığında bu örneklerde HSV-DNA PCR isteminin uygunsuz olduğu görülmüştür. BOS özellikleri bilinen ve HSV- DNA pozitifliği saptanan örneklerin hepsinde BOS protein düzeyi ve/veya lökosit sayısı yüksek bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Herpes simpleks virus, HSV-DNA, BOS, protein, lökosit, PCR.**HSV-DNA PCR yapılan BOS örneklerinin protein ve lökosit sayısı yönünden sonuçları**

Yıl	Örnek sayısı	HSV-DNA Pozitif Sayı (%)	Protein ve lökosit sayısı belirlenen örnek sayısı	Test için uygun örnek sayısı (%)
2008 (ilk 3 ay)	28	0	24	17 (70.8)
2007	98	3 (3)	82	37 (45.1)
2006	99	4 (4)	86	46 (53.5)
2005	48	1 (2)	35	11 (31.4)
2004	59	0	19	7 (36.8)

P38

Böbrek ve Mesane Kansерlerinde BK ve SV40 Virus Prevalansının Multipleks Nested PCR İle Belirlenmesi ve DNA Dizi Analizi Yöntemi İle Doğrulanması

Yasemin Bulut¹, Nusret Akpolat², Adnan Seyrek¹, Zülal Aşçı Toraman¹, Fügen Aker³, Süleyman Sırrı Kılıç⁴

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

²Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji AD, Elazığ.

³Haydarpaşa Numune Hastanesi, Patoloji AD, İstanbul.

⁴Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Elazığ.

Viruslar ile kanserler arasındaki etiyolojik ilişkiyi aydınlatma çalışmaları uzun yıllardır devam etmektedir. Birçok virusun kanserlerle ilişkisi halen tartışılırken, BK ve SV40 viruslarının onkojenik viruslar oldukları tartışmasız kabul edilmektedir. Ancak bu virusların bazı kanser türlerindeki potansiyel onkojenik rolleri tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışmada, böbrek ve mesane kanserlerinde insan polyomavirusu (BK) ve rodent polyomavirusu (SV40) prevalanslarının multipleks “nested” PCR ile belirlenmesi ve PCR sonuçlarının DNA dizi analizi ile doğrulanması amaçlanmıştır. Bu amaçla, toplam 90 tümöral (40 mesane ve 50 böbrek) ve 70 tümöral olmayan (25 mesane ve 45 böbrek) doku örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Polyomavirusların onkojenitesini belirleyen büyük T antijenini hedef alan multipleks “nested” PCR sonucunda, tümöral olmayan dokularda iki ve tümöral dokularda üç örnekte SV40 DNA pozitifliği belirlenmiştir. BK virus (BKV) için ise, tümöral olmayan dokularda beş ve tümöral dokularda 18 örnekte BKV-DNA pozitifliği tespit edilmiştir. PCR pozitif örneklerden beş örneğe (her beş pozitif örnek için rastgele seçilen bir örnek) ait PCR ürünlerinin DNA dizilerinin BLAST programında ve filojenik analizi neticesinde PCR sonuçları doğrulanmıştır. Elde edilen veriler ışığında böbrek ve mesane kanserleri ile BKV prevalansı arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Anahtar Kelimeler: BK virus, SV40 virus, böbrek, mesane, kanser, multipleks nested PCR.

P39**Kemoterapi Sonrası Febril Nötropeni İzlenen Pediatrik Olgularda Parvovirus B19 Enfeksiyonlarının Tanısında IgM ELISA ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemlerinin Etkinliği**

Koray Ergünay¹, İlker Devrim², Gülten Seçmeer², Münevver Büyükpamukçu², Aytemiz Gürgey², Mehmet Ceyhan², Burçin Şener¹, Ateş Kara², Ali Bülent Cengiz², Hasan Tezer², Şemsettin Ustaçelebi¹

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

²Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Ankara.

İmmün sistemi baskılanmış kişilerde Parvovirus B19 enfeksiyon riskinin arttığı bilinmektedir. Başta hematolojik malignansiler olmak üzere, kan ve kan ürünleri alan hastalar, Parvovirus B19 enfeksiyonları açısından daha yüksek risk altındadır. Bu çalışmada, malignansi nedeniyle kemoterapi sonrasında febril nötropeni gelişimi izlenen bir pediatrik yaş hasta grubunda, Parvovirus B19 tanısı açısından IgM saptanması ve gerçek zamanlı (real-time) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemleri karşılaştırılmıştır. Toplam 59 hastaya ait serum örnekleri çalışmaya dahil edilmiş; Parvovirus B19 IgM kalitatif olarak ticari bir ELISA sistemi ile (Parvovirus B19 IgM DxSelect™; Focus Diagnostics, ABD), viral DNA ise kantitatif olarak yine ticari bir gerçek zamanlı PZR sistemi ile (LightCycler Parvovirus B19 Quantification Kit™; Roche Diagnostics, Almanya) değerlendirilmiştir. Örneklerden nükleik asit saflaştırması “High Pure Viral Nucleic Acid Kit” (Roche Diagnostics, Almanya) sistemi kullanılarak yapılmıştır. Parvovirus B19’a özgül IgM, olguların %11.9’unda (7/59) pozitif olarak izlenmiş, buna karşın gerçek zamanlı PZR ile olguların %52.5’inde (31/59) viral DNA saptanmıştır. IgM pozitif olguların %85.7’sinde (6/7), gerçek zamanlı PZR pozitif olarak değerlendirilmiştir. IgM ve PZR pozitif olguların ikisinde viral yük düzeyinin PZR optimal üst kantitasyon sınırını aştığı ($>4.8 \times 10^8$ IU/ml), birinde ise alt kantitasyon sınırından düşük olduğu ($<4.6 \times 10^4$ IU/ml) izlenmiştir. Bu sonuçlar, özellikle immün sistemi baskılanmış olgularda Parvovirus B19 enfeksiyonlarının tanısında, yüksek duyarlılığa sahip moleküler yöntemlerin etkinliğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Parvovirus B19, febril nötropeni, gerçek zamanlı PZR.

P40

İmmün Sistemi Baskılanmış *Toxoplasma gondii* PZR Pozitif Hastalarda Western Blot Yöntemi ile Primer Toxoplasmosis ve Reaktivasyon Ayrımının Yapılması

Aysu Değirmenci¹, Ayşe Caner¹, Mert Döşkaya¹, Ayhan Dönmez², Murat Kılıç³, Murat Zeytunlu³, Murat Tombuloğlu², Seçkin Çağırğan², Zeki Karasu⁴, Nur Akad Soyer², Yüksel Gürüz¹

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir.

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, İzmir.

³Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Transplantasyon Ünitesi, İzmir.

⁴Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Anabilim Dalı, İzmir.

Toxoplasmosis, immün sistemi baskılanmış hastalarda ölümle sonuçlanabilen ciddi klinik tablolar yaratabilmektedir. Kemik iliği ve solid organ transplant alıcıları ile kanser kemoterapisi alan hastalarda toxoplasmosis sıklıkla reaktivasyon, nadiren de primer enfeksiyon sonucu oluşmaktadır. Bu çalışmada Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı ve Karaciğer Transplantasyon Ünitesinde yatan 60 hastadan transplantasyon öncesi bir, transplantasyon sonrası dokuz kez olmak üzere belirli zaman aralıklarıyla her hastadan toplam 10 kan örneği toplanmıştır. Donörlerden ise transplantasyon öncesinde bir kez kan örneği alınmıştır. Bu örneklerle eş zamanlı olarak gerçek zamanlı ve “nested” PZR ile serolojik testler uygulanmıştır. 10 hastada PZR ile *T.gondii* pozitifliği saptanmıştır. Bu hastaların üçü karaciğer, yedisi kök hücre transplantasyon (KHT) hastasıdır. PZR pozitif KHT hastalarından üçü seropozitif otolog, dördü allojenik KHT hastasıdır. PZR pozitif allojenik KHT hastasından üçü transplantasyon öncesi seropozitif iken, dördüncü hasta transplantasyon öncesi seronegatif, donörü seropozitif bulunmuştur. PZR pozitif örneklerde primer enfeksiyon ve reaktivasyon ayrımı için Western blot yöntemi uygulanmıştır. Transplantasyon öncesi seronegatif allojenik KHT hastasının kan örneğinde *T.gondii*'ye özgül protein bantlarına rastlanılmazken, transplantasyon sonrasında özgül protein bantları görüntülenmiştir. Kalan dokuz PZR pozitif hastanın transplantasyon öncesinde alınan kan örneklerinde izlenen protein bantlarının, transplantasyon sonrası alınan kan örneklerindeki bantlarla aynı paternde olduğu saptanmış ve olgular toxoplasmosis reaktivasyonu olarak kabul edilmişlerdir. Hastaların takibi sırasında, uygulanan yoğun immün süpresyonun antikor yanıtını azalttığı, bunun da bant patern yoğunluğunda azalmaya, hatta bazı bantlarda kaybolmaya yol açtığı izlenmiştir. Bu hastalarda primer enfeksiyonu veya yeni bir *T.gondii* izolatının yol açtığı enfeksiyonu gösteren farklı bir bant paterni gözlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: İmmünosüpresyon, *Toxoplasma gondii*, PZR, Western blot.

P41**Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu Uygulanan Hastalarda Leishmaniasis Sıklığı**

Ayşe Caner¹, Mert Döşkaya¹, Aysu Değirmenci¹, Ayhan Dönmez², Seray Özensoy Töz¹, Seçkin Çağırğan², Murat Tombuloğlu², Nur Akad Soyer², Yusuf Özbel¹, Yüksel Gürüz¹

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir.

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, İzmir.

İmmün sistemi baskılanmış veya immün sistem yetmezliği olan hastalarda leishmaniasis saptanma sıklığı artmaktadır. Bu tip hastalarda enfeksiyonun kliniği atipik seyretmekte ve tedaviye direnç göstermektedir. Leishmaniasis tanısında genelde NNN besiyeri ve mikroskopik bakı gibi direk ve seroloji gibi indirek yöntemlerden faydalanılmaktadır. Ancak immün sistemi baskılanmış hastalarda lökonötropenin yol açtığı antikör cevabında azalma serolojik testlerin duyarlılık ve özgüllüğünü olumsuz etkilemektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) *Leishmania* türlerinin saptanmasında yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip bir direk tanı tekniği olarak ön plana çıkmaktadır. Bu çalışmada immün sistemi ilaç tedavisi ile baskılandıktan sonra hematopoetik kök hücre transplantasyonu yapılan hastaların kök hücre örneklerinde PZR ile *Leishmania* spp. araştırılması planlanmıştır. Bu amaçla Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalında hematopoetik kök hücre transplantasyonu uygulanan 50 (32 otolog, 18 allojeneik) hastadan kök hücre örnekleri toplanmıştır. Bu örneklerle Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Moleküler Parazitoloji Laboratuvarında (MolParLab; <http://www.parasit.med.ege.edu.tr/molparlab/>) *Leishmania* spp. varlığını araştırmak üzere konvansiyonel PZR uygulanmıştır. Konvansiyonel PZR sırasında *Leishmania* kinetoplast DNA'sı hedeflenmiş, bu amaçla PZR reaksiyonunda kinetoplast DNA'sı içinde yer alan 116 bazçiftlik 5'-GTGGGGGAGGGGCGTTCT-3' (18 nt, 13A, forward primer) ve 5'-ATTTTACACCAACCCCCAGTT-3' (21 nt, 13B, revers primer) primerleri kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak *Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii* ve insan DNA örnekleri seçilmiştir. Sonuç olarak hastaların hiçbirisinde PZR ile *Leishmania* spp. pozitifliği saptanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Hematopoetik kök hücre transplantasyonu, *Leishmania* spp, PZR.

P42

Kimerik Antijen Reseptörü Ekspresyonunun Regülatör T (Treg) Hücreleri Üzerindeki Etkileri

İbrahim Akalın, Biagio De Angelis, Barbara Savoldo, Malcolm K. Brenner, Gianpietro Dotti
Center for Cell and Gene Therapy, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA.

T lenfosit aracılı kazanılmış immün yanıt mekanizmaları, bazı malign ve enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde etkili olarak kullanılabilir. T hücrelerinin kimerik antijen reseptörleri (CAR) ile transdüksiyonu, hücrel immün yanıtı, hedef yüzey antijenlerine karşı yeniden yönlendirerek potansiyel iyileşme sağlamakta; ancak CAR+T hücrelerinin fonksiyon ve devamlılığı in vivo ortamda regülatör T (Treg) hücre varlığı ile sınırlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda ayrıca Treg hücreleri, CAR transferinin gizli hedefi olmuş, buna bağlı olarak CAR eksprese eden efektör T hücrelerinin etki sahasında Treg'lerin istenmeyen artışı görülmüştür. Bu çalışmada, doğal olarak oluşan Treg hücrelerinin genetik modifikasyonu ile CAR-ekspresyonları ve CD28 kostimülatör iç-kangallı CAR transferinin, hem Treg hücrelerine hem de komşu efektör T hücrelerine ne gibi sonuçlarının olabileceği incelenmiştir. Bu amaçla, Treg hücreleri CD4+CD25 "bright immunomagnetic" ayrıştırma ile mononükleer hücrelerden (PBMC) izole edilmiştir. Treg'lerin, CD28 iç-kangalını içeren ve içermeyen CAR.CD19 kodlayan retroviral vektörler ile transdüksiyonu gerçekleştirilmiş ve CD19+ tümör hücreleri ve PBMC hücreleri ile eş zamanlı kültürleri yapılmıştır. Treg hücrelerinin inhibitör fonksiyonları CFSE (karboksi-floresan diasetat süksinidimil ester) boyaması ve FACS (fluorescence activated cell sorter) ile değerlendirilmiştir. Treg hücreleri, CD4+25- hücrelerden farklı olarak CD25-negatif PBMC proliferasyonunu durdurmuştur. Bu etki, ekzojen IL-2 (20 U/mL - 50 U/mL) varlığında bile korunmuş ve bu hücrelerin inhibitör aktiviteleri IL-2'li (50 U/mL) ex vivo kültürlerde 2-3 hafta devam etmiştir. Treg'ler OKT3, APC ve IL-2 ile aktivasyondan sonra retroviral transdüksiyona duyarlı olup transdüksiyon verimi %25 ile %70 aralığındadır. Her iki CAR.CD19TMç ve CAR.CD19-CD28ç[?] eksprese eden Treg hücreleri inhibitör etkilerini korumuşlardır. Kanser hastalarında doğal olarak oluşan ve sayıca artmış Treg hücreleri, CAR moleküllerini eksprese etmek ve inhibitör aktivitelerini sürdürmek için genetik olarak modifiye edilebilirler. Bu veriler, CAR-T hücre serileri üretimi öncesinde, Treg uzaklaştırması ile CAR-yönlendirilmiş T hücrelerinin etkinliğinin artırılabilirliğini ve CAR eksprese eden Treg hücrelerinin antijene özgül otoimmün hastalıkların modülasyonunda rol alabileceğini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Kimerik antijen reseptörü, regülatör T hücresi, transdüksiyon.

P43**Klinik Örneklerden İzole Edilen *Streptococcus pneumoniae* Serotiplerinin Belirlenmesinde Heteroduplex Yöntemi**

Didem Öztürk, Ahmet Pınar, Özgen Eser, Burçin Şener

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

Kapsül polisakkaridine bağlı serotiplendirme, *Streptococcus pneumoniae* enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde önemli bir yer tutmaktadır. Pnömonoklarda serotiplendirme, bakteri izolasyonunu takiben pahalı bir yöntem olan kapsül şişme reaksiyonu (KŞR) ile gerçekleştirilmektedir. Çalışmamızda, KŞR'nun yerine kullanılabilirliğinin araştırılması için daha önce geliştirilen heterodupleks analizi yönteminin klinik izolatlarda denenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri laboratuvarlarında klinik örneklerden izole edilen ve KŞR ile serotip 3,5,7,8,9,11,15 ve 23 olduğu belirlenen toplam 37 *S.pneumoniae* suşu dahil edilmiştir. Kültürde üretilmiş bakterilerin DNA'sı otomatize nükleik asit izolasyon sistemi ile saflaştırıldıktan sonra, kapsül sentezi ile ilişkili ve serotipler arasında heterojenitenin en sık saptandığı gen bölgeleri olan *CpsA* ve *CpsB*, seçilen uygun primer seti kullanılarak PCR ile amplifiye edilmiştir. Amplikonlar poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)'nde gösterildikten sonra, 1.8 kilobaz uzunluğundaki ürünler serotip 1 ile heterodupleks analizine alınmıştır. Bu amaçla termal döngü cihazına 95°C'de 10 dk ısıtmadan sonra, 5°C/dk hızda "oda sıcaklığına soğutma" programı yüklenmiştir. Her serotipe ait izolatların amplifikasyon ürünleri serotip 1 amplifikasyon ürünü ile 10'ar µl olacak şekilde aynı tüpte karıştırılmıştır. Enzim aktivitesini engellemek amacıyla 0.5µl 0.5M EDTA eklenen bu tüpler, termal döngü cihazına yerleştirilerek program çalıştırılmıştır. Heterodupleks analizi ile elde edilen heterodupleks paternleri ve homodupleks ürünler %8'lik PAGE ile gösterilmiştir. Çalışılan pnömokok serotipleri, daha önce tanımlanmış olan heterodupleks paternleri ile uyumlu paternler göstermişlerdir. Klinik izolatlardan alınan bu sonuçlar, yöntemin, moleküler serotiplendirme amacıyla -en azından çalışılan serotipler için kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak bilinmeyen izolatların serotiplendirilmesinde, yöntemin geçerliliğinin gösterilebilmesi için daha fazla sayıda izolatla denenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Streptococcus pneumoniae*, moleküler serotiplendirme, PCR, heterodupleks.

Kongreye Destek Veren Kurum Ve Kuruluşlar

Teşekkürü borç biliriz..

- TUBİTAK

Firma isimleri alfabetik sırayla verilmiştir.

- Abbott-Ata Diagnostik
- ATQ Biyoteknoloji İç ve Dış Tic Ltd. Şti.
- Ayka Ltd. Şti.
- Becton Dickinson İth İhr. Ltd. Şti
- Betamed Tıbbi Malzeme Ltd. Şti
- Biobak Lab Malz. San. ve Tic. A.Ş.
- BioDPC Teşhis Sistemleri A.Ş.
- BioMerieux Diagnostik Malz. ve Hiz. Tic. A.Ş.
- Bio-Tek 987 Medikal Cihazlar Sistem Ltd. Şti
- Diagno Grup Tıbbi Cihaz Malz. San. ve Tic. Ltd. Şti.
- Engin Tıbbi Ürünler ve Lab. Malz. Tic. Ltd. Şti
- Hemakim Tıbbi Ürünler San. ve Tic. A.Ş
- Makro Sağlık Ürünleri İth. İhr. San. ve Tic. A.Ş
- Medtek Elektronik Tıbbi Cih. Tic. San. A.Ş.
- Metis Diagnostik ve Sağlık Hizmetleri Ltd. Şti.
- NanoGen Teknolojileri Sağlık Hizmetleri
- Özmen Tıbbi Lab. Teşhisleri A.Ş.
- Roche Diagnostics
- Tenay Elektronik Medikal Özel Sağlık, İnşaat, İlaç San. ve Tic. Ltd. Şti.





Yazar Dizini

A

Abacıoğlu, Hakan 63
 Acar, Selda 131, 133
 Acartürk, Gürsel 146
 Acuner, İ. Çağatay 28
 Açıkgöz, Tülin 127
 Açıkgöz, Ziya Cibali 127
 Akalın, İbrahim 171
 Akbulut, Nagihan 155
 Akcan, Yusuf 159
 Akçael, Esin 161, 162
 Akçalı, Alper 109
 Aker, Fügen 167
 Akgün, Yurdanur 154
 Akpolat, Nusret 167
 Aksöz, Nilüfer 134
 Aksu, Burak 121
 Aktaş, Elif 120
 Aktepe, Orhan Cem 145, 159
 Alp, Alpaslan 124, 158
 Altındış, Mustafa 159
 Altınkanat, Gülşen 151
 Altıntaş, Engin 126
 Altun, Zafer 140
 Angelis, Biagio De 171
 Appak, Özgür 166
 Ardıçoğlu, N. Yasemin 157
 Arıkan Akan, Özay 148
 Arıkan, Soykan 144
 Arslan, Önder 127
 Arslan, Uğur 137
 Aslan, Gönül 126
 Aşık, Gülşah 145, 146
 Aydın, Ali 136
 Aydın, Faruk 149
 Aytekin, Nihan 156

B

Badur, Selim 2
 Barkar, Saeid 139
 Başalp, Aynur 161, 162
 Başustaoğlu, Ahmet Celal 153
 Bayramoğlu, Gülçin 149, 150
 Beğendik Cömert, Füsün 120
 Bekiroğlu, Fatma Ebru 126
 Berkem, Rukiye 127
 Beşirbellioğlu, Bulent 153
 Beşli, Yeşim 149
 Bolat, Sezen 125
 Bozdoğan, Bülent 132, 137
 Bozkurt, Taner 140

Bölek, Bora Kazım 144
 Brenner, Malcolm K. 171
 Bulut, A. Şafak 157
 Bulut, Yasemin 160, 165, 167
 Buruk, Celal Kurtuluş 149, 150
 Büyükpamukçu, Münevver 168
 Büyükünbal Bal, Emel Banu 135

C - Ç

Caner, Ayşe 169, 170
 Cebeci Güler, Necla 150
 Cengiz, Ali Bülent 152, 168
 Ceyhan, Mehmet 152, 168
 Çağırman, Seçkin 169, 170
 Çalgın, Kerem M. 138, 139
 Çatakoğlu, Necati 133
 Çavuşlu, Şaban 132
 Çekin, Engin 143
 Çelebi, Güven 120
 Çelik, İlhami 165
 Çiftci, İhsan Hakkı 145, 146
 Çolak, Dilek 130
 Çolakoğlu, Salih 141, 142
 Çöloğlu, Derya 147

D

Dağcı, Hande 128
 Değirmenci, Aysu 169, 170
 Demiralay Celep, Raziye 163
 Demirdağ, Kutbettin 160
 Demirdal, Tuna 159
 Demiröz, Ali Pekcan 127
 Demirtürk, Neşe 159
 Deniz, Umut 121
 Devrim, İlker 152, 168
 Dilek, Aziz Ramazan 160, 165
 Dilek, Fatma Hüsnüye 146
 Dinç, Uğur 149, 150
 Dolapçı, İştah 147, 148
 Dotti, Gianpietro 171
 Dönmez, Ayhan 169, 170
 Döşkaya, Mert 169, 170
 Durmaz, Gül 154
 Durmaz, Rıza 24

E

Elyürek, Emel 139
 Emekdaş, Gürol 126
 Engin, Doruk 123
 Ergünay, Koray 143, 152, 168
 Erkul, Evren 143

Ertabaklar, Hatice 82
 Ertuğrul, Nigar 127
 Ertürk, Murat 150
 Eser, Özgen 172
 Eyigün, Can Polat 153

F

Fındık, Duygu 137
 Fidan, Işıl 125

G

Gerçekler, Devran 138, 139
 Gülamber, Cihangir 159
 Gültekin, Meral 130
 Gümüsel, Füsün 155
 Güngör, Atilla 143
 Gür, Deniz 152
 Gürgey, Aytemiz 168
 Gürol, Yeşim 156, 163
 Gürüz, Yüksel 169, 170
 Gürüz, Yüksel 77

H

Hasçelik, Gülşen 158
 Hatipoğlu, İbrahim 161
 Haznedaroğlu, Tunçer 132, 143
 Hızıl, Kenan 125
 Hoşbul, Tuğrul 132

I-İ

Irmak, Hasan 127
 İşsever Öztürk, Saliha 155

K

Kaklıkkaya, Neşe 149
 Kalaycı, Raike 159
 Kalkancı, Ayşe 46, 125
 Kantarçeken, Bülent 122, 140
 Kara, Abdurrahman 127
 Kara, Ateş 152, 168
 Karahan, Zeynep Ceren 147, 148
 Karakoç, Ayşe Esra 127
 Karakoç, Selahattin 160, 165
 Karaltı, İskender 156
 Karasartova, Djursun 138
 Karasu, Zeki 169
 Kayman, Ş. Serda 155
 Kemahlı, Sabri 127
 Kılıç, Abdullah 85
 Kılıç Pelit, Banu 69
 Kılıç, Murat 169

Kılıç, Selçuk 157
 Kılıç, Süleyman Sırrı 167
 Kırdar, Sevin 137
 Kıryan, Mehmet 139
 Kipalev, Arzu 140
 Kiremitçi, Abdurrahman 154
 Kizirgil, Ahmet 160
 Kılıç, Abdullah 153
 Kocagöz, Sesin 163
 Kocagöz, Tanıl 7, 21, 123, 156, 163
 Koç, Nedret 49
 Köksalan, Kaya 156
 Kuştımur, Semra 125
 Küçüköztas, Mustafa Fatih 164
 Külâh, Canan 120

L

Levent, Belkis 113
 Lisby, Gorm 11

M

Moosj, Marlies 120
 Mozioglu, Erkan 123
 Mumcuoglu, İpek 147

N

Nağıyev, Toğrul 141, 142
 Nas, Tuncay 125

O - Ö

Oral Zeytinli, Ülkü 141
 Öğünç, Dilara 130
 Öksüz, Burcu 163
 Öktem, Hüseyin Avni 13
 Öktem, Sinem 123
 Öncül, Oral 132
 Öner Demirel, Pınar 160, 165
 Öngüt, Gözde 130
 Özaydın, Çiğdem 131, 133
 Özbek, Özgen Alpay 66
 Özbel, Yusuf 170
 Özcebe, Osman 127
 Özçolpan, Güneş 166
 Özensoy Töz, Seray 78
 Özet, Gülsüm 127
 Özgüneş, Nail 164
 Özkan, Seçil 125
 Özlü, Nagihan 120
 Özsan, Murat T. 138, 139
 Öztürk, Didem 172
 Özyurt, Mustafa 132, 143

P

Pekmezci, Deniz 122
 Pınar, Ahmet 172
 Polat, Serpil 126

R

Ruh, Emrah 124

S - Ş

Saatçılar, Çiğdem 161, 162
 Salih, Barık 144
 Saraçlı, Mehmet Ali 91
 Sarıbaş, Zeynep 124
 Savelkoul, Paul 120
 Savoldo, Barbara 171
 Saygan Karamürsel, Burcu 157
 Sayıner, Ayça Arzu 64, 166
 Seçmeer, Gülten 152, 168
 Sepin Özen, Nevğün 130
 Serin, Mehmet Sami 126
 Seyis Bilkay, Işıl 134
 Seyrek, Adnan 167
 Sezen, Yavuz 123
 Sezgin, Orhan 126
 Snounou, Georges 128
 Soyer, Nur Akad 169, 170
 Söğüt, İbrahim 161, 162
 Sönmezoğlu, Meral 163
 Söyletir, Güner 121, 151
 Sudağıdan, Mert 136
 Şafak, Birol 145, 146
 Şahin, Fikret 138, 139, 148
 Şahin, İdris 131, 133
 Şanlı, Hatice 164
 Şener, Burçin 168, 172
 Şener, Kenan 96
 Şınık, Gülçe 156
 Şişman, Ali Rıza 166

T

Tanyüksel, Mehmet 104
 Taylan Özkan, Ayşegül 128
 Tearle, Rick 12
 Tekeli, Alper 147, 148
 Tekkanat Tazegün, Zuhul 163
 Tezcan, Seda 126
 Tezer, Hasan 152, 168
 Tombuloğlu, Murat 169, 170
 Toraman Aşçı, Zülal 160, 165, 167
 Tosun, Ilknur 150
 Töz Özensoy, Seray 170

Tuncer, İnci 137
 Tuzlakoglu Öztürk, Merve 155
 Tüney, İnci 156

U - Ü

Ulger, Nurver 121
 Ulusoy, Mehtap 147
 Us, Dürdal 15
 Us, Ebru 147, 148
 Us, Tercan 154
 Uslan, İhsan 145
 Ustaçelebi, Şemsettin 152, 168
 Ülger, Mahmut 126
 Üslü, Esra Deniz 134

Y

Yavuz, Tevfik 131, 133
 Yayla, Buket 154
 Yazıcı, Saadet 164
 Yazısız, Hatice 130
 Yenicesu, İdil 71, 127
 Yerhan, Harun 122, 140
 Yıldız Zeyrek, Fadile 128
 Yılmaz, Ercan 125
 Yılmaz, Sevinç 127
 Yiğitkanlı, İnci 152
 Yorbakan, Sultan 125
 Yousefi, Rad Abbas 157
 Yula, Erkan 122, 140, 142
 Yücel, Fatıma 161, 162
 Yücesoy, Mine 55
 Yüksel, Mehmet Fehmi 128

Z

Zeytinlu, Murat 169

