



ANKARA MİKROBİYOLOJİ
DERNEĞİ



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

7 ULUSAL MOLEKÜLER VE TANISAL MİKROBİYOLOJİ • KONGRESİ

5 - 8 Haziran 2012
Swissôtel, Ankara



Editör
Prof. Dr. Dürdal Us

PROGRAM VE BİLDİRİ ÖZET KİTABI

**7. ULUSAL
TANISAL VE MOLEKÜLER
MİKROBİYOLOJİ
KONGRESİ**

5-8 Haziran 2012

Swissôtel, Ankara

PROGRAM VE BİLDİRİ ÖZET KİTABI

Editör

Prof. Dr. Dürdal US



1881 - ∞

“Bilim, gerçeği bilmektir.”

K. Atatürk

Kurullar	4
Genel Bilgiler	5
Kurs Programı	7
Kongre Programı.....	9

KONFERANS

1. Bilim kültürü.....	17
2. Hücreden moleküle mikroskobun tarihsel gelişimi	18
3. Renklerin dansı.....	20
4. Innovative technologies: Designer antigens and recombinant cell-based immunofluorescence assay	22
5. Ribotyping: Basics and applications	24

MİNİ KONFERANSLAR

1. Tanısal antijenlerin protein microarray'lerle keşfi	25
2. Mikrobiyoloji uygulamaları için biyosensörler ve BioMEMS	28
3. Yeni bir isim neler getiriyor? Tıbbi önem taşıyan mantarların taksonomik sınıflandırmalarındaki değişiklikler.....	34
4. Moleküler yöntemlerde kalite kontrol	38

PANELLER

1. 27. yılında moleküler tanı testleri: Ne kadar etkin kullanıldı?	43
2. Anaerop bakterilerin tanımlanmasında geleneksel ve diğer yöntemler	58
3. İnvazif mikoz etkenlerinde azol direnci nasıl gelişiyor? Kanıtlanmış moleküler mekanizmalar, önceki tedavilerin etkileri.....	84
4. Viral gastroenteritlerde tanısal yaklaşım	98
5. Antimikrobiyallere genomik yaklaşım	107
6. Moleküler mikrobiyolojide manuel ve otomatize sistemler.....	122
7. Gen bankası uygulamaları	134
8. Kan bankacılığı ve transfüzyon tıbbi uygulamalarında moleküler yöntemler	141
9. Mikrobiyolojide dizi analizi uygulamaları	150
10. Laboratuvar hatalarının hukuksal yönleri.....	162

PROF.DR.ŞEMSETTİN USTAÇELEBİ ANMA TOPLANTISI

• Enfeksiyon hastalıklarına genetik yatkınlık	171
• Henrietta Lacks'ın öyküsü	175
• Viral hepatitlerde antiviral hedefler ve direncin laboratuvara yansması.....	176
• HPV virolojisi ve tanısı	181
• Ülkemizde influenza virus tip B enfeksiyonları	186

SÖZEL BİLDİRİLER..... 193

POSTER BİLDİRİLER

YAZAR DİZİNİ

KONGREYE DESTEK VEREN KURULUŞLAR

DÜZENLEME KURULU**Onursal Başkan**

Ayfer GÜNALP

Başkan

Gülşen HASÇELİK

Başkan Yardımcısı

Dürdal US

Kongre Sekreterleri

Ahmet PINAR

Özgen ESER

Üyeler

Cumhur ÖZKUYUMCU

Burçin ŞENER

Banu SANCAK

Alpaslan ALP

Zeynep SARIBAŞ

Aslı ÇAKAR

BİLİMSEL KURUL*

Hakan ABACIOĞLU

Sevtap Arıkan AKDAĞLI

Yurdanur AKGÜN

Faruk AYDIN

Selim BADUR

Rıza DURMAZ

Birsel ERDEM

Selda ERENŞOY

Koray ERGÜNAY

Sibel ERGÜVEN

Berrin ESEN

Meral GÜLTEKİN

Z.Ceren KARAHAN

Dolunay Gülmez KIVANÇ

Tanıl KOCAGÖZ

Metin KORKMAZ

Ayhan KUBAR

Seyyal ROTA

Mehmet Ali SARAÇLI

Arzu SAYINER

Güner SÖYLETİR

Mehmet TANYÜKSEL

Alper TEKELİ

Ferda TUNÇKANAT

Yakut Akyön YILMAZ

**Alfabetik sırayla*

Kurs ve Tarihi

“Real-time PCR Uygulamaları” Kursu : 4-5 Haziran 2012

Kurs Merkezi

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Morfoloji Binası, Sıhhiye, Ankara.

Kongre Tarihi

5-8 Haziran 2012

Kongre Merkezi

Swissôtel Ankara

Yıldızevler Mah. Jose Marti Cad.No: 2 Yıldız, Çankaya

Tel : 0312 409 3000

Faks: 0312 409 3399

Kongre Dili

Kongre resmi dili Türkçe'dir.

Kongrenin Web Adresi

www.molekulermikro2012.org

Kredilendirme

7. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Türk Tabipler Birliği “Sürekli Tıp Eğitimi (STE)” Kredilendirme Kurulu tarafından “23” TTB-STE kredi puanı ile kredilendirilmiştir. Bu krediler ile ilgili TTB-STE formları kongre çantası içinde yer almaktadır. Formların, doldurulduktan sonra kongre kayıt ve danışma masasında bulunan TTB-STE Kredilendirme kutusuna bırakılması rica olunur.

Not: Kurul tarafından kredilendirilen kongremiz tıp doktorlarını kapsamaktadır.

Kongre Danışma ve Kayıt Masası Çalışma Saatleri

Kayıt ve Danışma Masası, 5 Haziran 2012 gününden itibaren saat 08:30-18:00 arası hizmet verecektir. Kayıt yaptırmamış olan katılımcılar Swissôtel Ankara’da kurulacak kongre kayıt masasında kayıtlarını yaptırabilirler.

Sergi Alanları

Sergi alanı, 5 Haziran 2012 tarihinden, 8 Haziran 2012 tarihine kadar, 08:00-19:00 saatleri arasında, toplantı salonu ana fuayesinde 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 olmayacaktır. Yaka kartlarının kongre boyunca tüm bilimsel ve sosyal aktivitelerde takılması rica edilmektedir.

Katılım Sertifikası

Tüm katılımcılar kongre katılım sertifikalarını 7 Haziran 2012 tarihinden itibaren kongre kayıt masası'ndan alabileceklerdir.

Teknik Destek

Kongredeki tüm sunum sahiplerinin, sunumlarını taşınabilir bellek ya da CD'ye "Microsoft Office" altında çalışan programlarda kaydedilmiş olarak kongre merkezinde bulunan "Sunum Kontrol Merkezi"ne teslim etmesi rica olunur. Herhangi bir sıkıntının yaşanmaması için konuşma sunumlarının yedeklerinin de bulundurulması önerilir. Sunumlarında kendilerine ait dizüstü bilgisayarını kullanmak isteyen konuklarımız, sunum yapacakları salonda mutlaka önceden cihazlarını kontrol ettirmelidir.

Poster Bildiri ve Tartışmaları

Posterlerin 5 Haziran 2012 Salı günü saat 18.00'e kadar asılmış olması ve kongre süresince poster alanında asılı kalması gerekmektedir. **Poster tartışmaları aşağıdaki gün ve saatlerde, poster başında yapılacaktır.** Poster sahibi katılımcıların, poster tartışmalarına katılmak üzere, poster alanında hazır olması önemle rica edilir.

PP-001 ile PP-035 No. Arası Posterler için

Tartışma günü ve saati : 6 Haziran 2012 Çarşamba, 12.30 – 13.30
Konu : Bakteriyoloji

PP-036 ile PP-068 No. Arası Posterler ve **PP-104** için

Tartışma günü ve saati : 7 Haziran 2012 Perşembe, 12.30 – 13.30
Konu : Bakteriyoloji, Seroloji, Mikoloji, Parazitoloji, Genel Mikrobiyoloji

PP-069 ile PP-103 No. Arası Posterler için

Tartışma günü ve saati : 8 Haziran 2012 Cuma, 12.30 – 13.30
Konu : Viroloji

REAL-TIME PCR UYGULAMALARI

Yer Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı, Toplantı Salonu. Morfoloji Binası, B Kapısı Girişi,
3. Kat Sıhhiye, Ankara.

4 HAZİRAN 2012 • PAZARTESİ

- 08.30 – 09.00** Açılış
Gülşen HASÇELİK
- 09.00 – 09.30** **Teorik:** PCR ve RT-PCR yöntemleri konusunda genel bilgi
Alpaslan ALP
- 09.30 – 10.00** **Teorik:** Klinik örnek toplama, işleme, hücre parçalama
venükleik asit saflaştırma yöntemleri
Özgen ESER
- 10.00 – 10.30** **Teorik:** RT-PCR problemleri ve floresan kimyası
Alpaslan ALP

10.30 – 11.00 *Kahve arası*

- 11.00 – 11.30** **Teorik:** Kantitatif RT-PCR
Ahmet PINAR
- 11.30 – 12.00** **Teorik:** İç ve dış kalite kontrolleri
Koray ERGÜNAY

12.00 – 13.00 *Yemek arası*

- 13.00 – 14.30** **Pratik:** Klinik örnek işleme, hücre parçalama ve saflaştırma
Özgen ESER

14.30 – 15.00 *Kahve arası*

- 15.00 – 16.30** **Pratik:** RT-PCR için reaksiyon karışımı hazırlama
Koray ERGÜNAY
- 16.30 – 18.00** **Pratik:** Amplifikasyon programlama ve izleme
Alpaslan ALP

5 HAZİRAN 2012 • SALI

08.30 – 09.00 Teorik: RT- PCR ile mutasyon saptanması
Zeynep SARIBAŞ

09.00 – 09.30 Teorik: Klinik laboratuvarında RT-PCR deneyimi
Alpaslan ALP

09.30 – 10.00 Kahve arası

10.00 – 11.00 Pratik: RT-PCR ile kantitasyon
Ahmet PINAR

11.00 – 12.00 Pratik: RT-PCR ile mutasyon saptanması
Zeynep SARIBAŞ

12.00 – 12.30 Pratik: Farklı RT-PCR format ve cihazları
Alpaslan ALP

12.30 – 13.00 Kursun kapanışı ve sertifika dağıtımı

13:00 Swiss Otele Transfer

5 HAZİRAN 2012 • SALI

- 15.00 – 15.30** Açılış
- 15.30 – 16.30** **Konferans :** Bilim kültürü
Oturum Başkanı: Yurdanur AKGÜN
Konuşmacı: Turgay DALKARA
- 16.30 – 17.30** **Konferans 2:** Hücreden moleküle mikroskobun tarihsel gelişimi
Oturum Başkanı: Cumhur ÖZKUYUMCU
Konuşmacı: Tanıl KOCAGÖZ
- 18.00 – 20:00** Açılış kokteyli (*Roche Diagnostik katkılarıyla*)

6 HAZİRAN 2012 • ÇARŞAMBA

- 08.30 – 09.00** Sözlü sunumlar
Oturum Başkanı: Nezahat GÜRLER
- 08.30 – 08.37**
 OP-01 Ekizoğlu M, Sultan N, Koike S, Krapac IG, Roderick I Mackie RI:
 Toprak ve gübreden izole edilen bakterilerde tetrasiklin eflusu genlerinin araştırılması.
- 08.40 – 08.47**
 OP-02 Erdal Yıldırım B, Yalınay Çırak M, Elmas Ç: Piperasilin/ tazobaktamın subminimal inhibitör konsantrasyonlarının *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının biyofilm yapımı üzerine etkilerinin araştırılması.
- 08.50 – 08.57**
 OP-03 Koydemir HC, Külah H, Özgen C, Alp A, Haşçelik G: MEMS tabanlı mikro- elektrokimyasal sensör ile metisilin-dirençli *Staphylococcus aureus* tanısı
- 09.00 – 10.30** **Panel 1:** 27. yılında moleküler tanı testleri: Ne kadar etkin kullanıldı?
Oturum Başkanı: Rıza DURMAZ
Konuşmacılar:
- Rıza DURMAZ - 1983'den günümüze moleküler tanı testlerinin gelişimi

- Hakan ABACIOĞLU - Moleküler tanı testlerinin virolojideki uygulamaları
- Mehmet TANYÜKSEL - Moleküler tanı testlerinin parazitolojideki uygulamaları
- Alpaslan ALP - Moleküler tanı testlerinin bakteriyolojideki uygulamaları

10.30 – 11.00 Kahve arası

11.00 – 12.00 Panel 2: Anaerop bakterilerin tanımlanmasında geleneksel ve diğer yöntemler

Oturum Başkanı: Ferda TUNÇKANAT

Konuşmacılar:

- Nezahat GÜRLER – Geleneksel yöntemler
- Güven KÜLEKÇİ – Moleküler ve diğer yöntemler

12.00 – 12.30 Mini Konferans 1: Tanısal antijenlerin protein “microarray”lerle keşfi

Oturum Başkanı: Sibel ERGÜVEN

Konuşmacı: Yüksel GÜRÜZ

12.30 – 13.30 Yemek arası

13.30 – 15.00 Panel 3: İnvazif mikoz etkenlerinde azol direnci nasıl geliyor? Kanıtlanmış moleküler mekanizmalar, önceki tedavilerin etkileri

Oturum Başkanı: Sevtap ARIKAN AKDAĞLI

Konuşmacılar:

- Nilgün ÇERİKÇİOĞLU – Azol ile daha önce karşılaşmış olmak direnç gelişimini etkiliyor mu?
- Mine DOLUCA – Candida ve azol direnci mekanizmaları
- Dilara ÖĞÜNÇ – Aspergillus ve azol direnci mekanizmaları

15.00 – 15.30 Kahve arası

15.30 – 16.30 Panel 4: Viral gastroenteritlerde tanısal yaklaşım

Oturum Başkanı: Gülendam BOZDAYI

Konuşmacılar:

- Gülendam BOZDAYI - Rotavirus ve rotavirus aşısı sonrasında diğer viral gastroenterit etkenlerinin durumu
- Gülay KORUKLUOĞLU - Viral gastroenteritlere bağlı salgınlar ve Hıfızsıhha deneyimleri

16.30 – 17.00 Mini Konferans 2: Mikrobiyoloji uygulamaları için biyosensörler ve BioMEMS

Oturum Başkanı: Meral GÜLTEKİN

Konuşmacı: Haluk KÜLAH

17.00 - 18.30 Konferans 3: Renklerin dansı

Oturum Başkanı: Gülşen HASÇELİK

Konuşmacı: Ali DEMİR SOY

7 HAZİRAN 2012 • PERŞEMBE

08.30 – 09.00 Sözlü sunumlar

Oturum Başkanı: Burçin ŞENER

08.30 – 08.37

OP-04

Ünalı Ö, Yalınay Çirak M: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *Escherichia coli* suşlarında TEM, SHV ve CTX-M enzimlerinin genomik değerlendirilmesi ve CTX-M geninin plazmid transformasyonu yoluyla aktarımının incelenmesi.

08.40 – 08.47

OP-05

Arı FE, Durmaz R, Güldemir D, Ötgün S, Acar B, Ertek M: Tek-aşamalı multipleks PCR ile 13-valanlı pnömokok konjuge aşı kapsamındaki *Streptococcus pneumoniae* serotiplerinin hızlı tanısı.

08.50 – 08.57

OP-06

Ülger Toprak N, Bekdemir P, Söyletir G, Korten V: Bağışık ödüllü bir hastanın servikal lenf bezinden izole edilen ve yeni isimlendirilen bakteri; *Nocardia marmarensis* sp. nov

09.00 – 10.30

Panel 5: Antimikrobiyallere genomik yaklaşım

Oturum Başkanı: Meltem YALINAY ÇIRAK

Konuşmacılar:

- Meltem YALINAY ÇIRAK – Antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesinde genomikler
- Bülent BOZDOĞAN - Antimikrobiyallere direncin mobil genetik elemanları ve karakterizasyonları
- Barış OTLU – Antimikrobiyal direnç genlerinin tespiti

10.30 – 11.00 Kahve arası

11.00 – 12.00 Konferans 4: Innovative technologies: Designer antigens and recombinant cell-based immunofluorescence assay
Oturum Başkanı: Burçin ŞENER
Konuşmacı: Wolfgang SCHLUMBEGER (Euroimmun katkılarıyla)

12.00 – 12.30 Mini Konferans 3: Yeni bir isim neler getiriyor? Tıbbi önem taşıyan mantarların taksonomik sınıflandırmalarındaki değişiklikler
Oturum Başkanı: Semra KUŞTİMUR
Konuşmacı: Çağrı ERGİN

12.30 – 13.30 Yemek arası

Uydu Sempozyum: Microbial identification for the 21st century- and beyond

Oturum Başkanı: Berrin ESEN

Konuşmacı: Guido MIX (Terra Analiz katkılarıyla)

13.30 – 15.00 Panel 6: Moleküler mikrobiyolojide manuel ve otomatize sistemler

Oturum Başkanı: Ayhan KUBAR

Konuşmacılar:

- Özgen ESER – Nükleik asit izolasyonunda manuel ve otomatize sistemlerin kıyaslanması
- Ayhan KUBAR – “In house” PCR uygulamalarında karşılaşılan sorunlar ve çözüm önerileri
- Tijen ÖZACAR – PCR uygulamalarında otomatize sistemlerin avantaj ve dezavantajları

15.00 – 15.30 Kahve arası

15.30 – 16.30 Panel 7: Gen bankası uygulamaları

Oturum Başkanı: Alpaslan ALP

Konuşmacılar:

- Mehmet Ali ÖKTEM – Gen bankası verilerinin incelenmesi
- Cengiz ÇAVUŞOĞLU – Saptanan dizilerin veri bankasına girilmesi

16.30 – 17.30 Panel 8: Kan bankacılığı ve transfüzyon tıbbi uygulamalarında moleküler yöntemler

Oturum Başkanı: Ramazan ULUHAN

Konuşmacılar:

- Esra ALP KARAKOÇ – Mikrobiyolojik tarama testlerinde moleküler yöntemler
- İdil YENİCESU – İmmünohematolojide moleküler yöntemler

17.30 – 18.30 Konferans 5: Ribotyping: Basics and Applications
Oturum Başkanı: Serdar DİKER
Konuşmacı: Keshav KRISHNAMANI

8 HAZİRAN 2012 • CUMA

08.30 – 09.00 Sözlü sunumlar
Oturum Başkanı: Tijen ÖZACAR

08.30 – 08.37

OP-07 Özensoy Töz S, Tetik Vardarlı A, Çulha G, Zeyrek FY, Ertabaklar H, Özbel Y, Alkan MZ, Gündüz C: *Leishmania* parazitinin tür ve tür içi genotipik farklılıklarının real-time PCR yöntemi ile saptanması.

08.40 – 08.47

OP-08 Kalaycıoğlu AT, Baykal A, Güldemir D, Coşkun A, Bakkaloğlu Z, Korukluoğlu G, Torunoğlu MA, Ertek M, Durmaz R: Türkiye’de 2011 yılında tespit edilen kızamık viruslarının genetik analizi: Genotip D9 viruslarının ülkemizde ilk kez görülmesi.

08.50 – 08.57

OP-09 Bozdayı G, Dinç B, Meral M, Altay A, Çalış U, Dallar Bilge Y, Dalgıç B, Ahmed K: Ankara’da 0-5 yaş arası çocuklarda nested RT-PCR yöntemi ile rotavirus genotiplerinin belirlenmesi.

09.00 – 10.30 Panel 9: Mikrobiyolojide dizi analizi uygulamaları

Oturum Başkanı: Tanıl KOCAGÖZ

Konuşmacılar:

- Onur KARATUNA – Klasik dizi analizi yöntemleri
- Burak AKSU – Yeni nesil dizi analizi yöntemleri
- Tanıl KOCAGÖZ – Dizi analizi ve gelecekteki uygulamalar

10.30 – 11.00 *Kahve arası*

11.00 – 11.30 Mini konferans 4: Moleküler yöntemlerde kalite kontrol
Oturum Başkanı: Hakan ABACIOĞLU
Konuşmacı: Arzu SAYINER

11.30 – 12.30 Panel 10: Laboratuvar hatalarının hukuksal yönleri

Oturum Başkanı: Güner SÖYLETİR

Konuşmacılar:

- Serdar ÖZERSİN
- Erdem İlker MUTLU

12.30 – 13.30 Yemek arası

13.30 – 17.00 Prof.Dr.Şemsettin Ustaçelebi Anma Toplantısı

13.30 – 15.00 Oturum-I Başkanı: Dürdal US

13.30 – 13.40 Anılar...

13.40 – 14.20 Selim BADUR - Enfeksiyon hastalıklarına genetik yatkınlık

14.20 – 15.00 Hakan ABACIOĞLU - Henrietta Lacks'in öyküsü

15.00 – 15.30 Kahve arası

15.30 – 17.00 Oturum-II Başkanı: Selim BADUR

15.30 – 16.00 Selda ERENŞOY - Viral hepatitlerde antiviral hedefler ve dirençin laboratuvara yansımaları

16.00 – 16.30 Ayhan KUBAR - HPV virolojisi ve tanısı

16.30 – 17.00 Meral AKÇAY CİBLAK - Ülkemizde influenza virus tip B enfeksiyonları

17.00 – 17.30 Kapanış

KONFERANSLAR
ve
MİNİ KONFERANSLAR

KONFERANS 1

BİLİM KÜLTÜRÜ

Prof. Dr. Turgay DALKARA

HÜCRENEN MOLEKÜLE MİKROSKOBUN TARİHSEL GELİŞİMİ

Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ

Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Herşey, insanların, yağmur damlalarının üzerinde bulundukları cisimleri büyük gösterdiğini gözlemlemesi ile başlamış olmalı. Cam eşyalar yapılmaya başlandığında da bombe camların aynı şekilde davrandığını görmüşlerdi herhalde. Bu tür bombe camlarla güneş ışığının odaklandığı ve bir bez ya da parşömenin yakılabildiğini bildiren yazılar var Roma kayıtlarında. Gözlük kullanılmasına başlanması ise 13. yüzyıl sonlarına doğru gerçekleşmiş. En eski mikroskop bir ucunda mercek bulunan bir tüpten ibaret idi ve 10 katlık bir büyütme sağlıyordu. Bu bile pire gibi küçük canlıları incelemede önemli ilerlemeler sağladı. 1590'lı yıllarda gözlük yapımcısı Hollandalı Zaccharias Janssen ve oğlu Hans bir tüp içerisine koydukları çeşitli mercekleri denerken yakındaki cisimlerin çok büyütülebildiğini farkettiler. Galileo 1609 yılında tüpe konan mercekleri kullanarak odak uzaklığı ayarlanabilen teleskobu geliştirdi ve astronomide devrim niteliğinde, o güne dek bilinen evren kavramını tamamen değiştiren buluşlar yaptı. 1632-1723 yılları arasında yaşamış olan Anton Von Leuwenhoek, daha bombe mercekler yapma tekniği geliştirdi ve cisimleri 270 kez büyütöbilen ve hücreleri görmeyi sağlayan ilk mikroskobu yaptı. Kan hücreleri, maya ve bakterileri gören, tanımlayan ilk kişi oldu. Robert Hooke mikroskobu daha da geliştirdi, iki lensli hale getirdi ve Leewenhoek'un tanımladığı hücreleri doğruladı. Ondokuzuncu yüzyılda mikroskop daha da geliştirildi, aydınlatma düzenekleri iyileştirildi; merceklerin kalitesi ve büyütme gücü yükseldi. Gün ışığı ile 1250 kez, mavi ışık ile 5000 kez büyütme olanağına kavuşuldu. Bu devirde Charles A. Spencer, önemli bir mikroskop üreticisi olarak tarihte yerini aldı. Bundan sonra günümüze dek ışık mikroskobunda çok önemli değişiklikler yaşanmamasına karşın mikrobiyologların en önemli tanı araçlarından birisi olarak kullanılmaya devam etti. Işık mikroskobundaki gelişme hücreleri canlı olarak daha iyi gözlemeyi sağlayan faz kontrast, karanlık saha gibi mikroskop tekniklerin geliştirilmesi alanında yaşandı.

Işık mikroskobunun ayırım gücü ışığın dalga boyunun yarısı kadardır. Beyaz ışığın ortalama dalga boyunun 0,55 mikron olduğu düşünölürse, beyaz ışık kullanan bir mikroskop ile 0,275 mikrondan daha küçük bir cismi görmek olanaksızdır. Başka bir deyiş ile birbirine 0,275 mikrondan daha yakın cisimler tek cisim gibi görünürler. Ayırım gücünün arttırılabilmesi için dalga boyu daha kısa ışınların kullanılması ge-

rekmiştir. Bu amaçla 1930 yılında Alman araştırmacılar Max Knoll ve Ernst Ruska tarafından transmisyon elektron mikroskobu geliştirilmiştir. Elektron mikroskopta elektronlar vakum içerisinde hızlandırılarak dalga boyları ışığın dalga boyunun binde biri olacak hızlara ulaştırılır ve incelenecek cisim içerisinde geçirilir ve elektrona duyarlı bir ekrana çarptırılarak görüntü oluşturulur. Elektron mikroskop sınırlarına dek zorlandığında bir atom boyuna dek görme ve bir milyon kez büyütme sağlanabilir. Tarama elektron mikroskopisinde yüzeyden yansıyan elektronlar algılanarak yüzeyin üç boyutlu görüntüsü oluşturulur.

Atomik güç mikroskobisi (AGM) ya da taramalı güç mikroskobu çok yüksek çözünürlüklü bir aygıttır. Ulaşılmış çözünürlük birkaç nanometre ölçeğinde olup optik tekniklerden en az 1000 kat fazladır. AGM'nin öncülü olan taramalı tünelleme mikroskobu 1980'lerin başında Gerd Binnig ve Heinrich Rohrer tarafından (IBM Research) Zürih'te geliştirilmiş, araştırmacılara 1986 Nobel Ödülü'nü kazandırmıştır. AGM'de silikon veya silikon nitrürden yapılmış esnek bir kol, bu kolun ucunda tek atom kalınlığına dek inen sivri bir uç bulunur. Bu kolun üst yüzeyine lazer ışını düşürülür. Buradan yansıyan lazer bir dizi fotodiyottan oluşun algılayıcı yüzeye çarpar. Yüzeyde gezdirilen iğne ucu, yüzeyin şekline göre yukarı aşağı hareket eder. Bu sırada kolun üzerinden yansıyan lazer ışınının açısı değişerek algılayıcı üzerinde farklı noktalara düşer. Bu değişim bilgisayar tarafından yüzey şekillerine dönüştürülerek yüzeyin görüntüsü oluşturulur.

Işık mikroskobu ile hücrelerin gözlenmesi ve mikrobiyolojinin temelini atılması ile başlayan küçükleri görüntüleme serüveni artık AGM ile moleküllerin, atomların görüntülenmesi düzeyine ulaşmıştır.

Kaynaklar

1. Bellis M. History of the microscope: <http://inventors.about.com/od/mstartinventions/a/microscope.htm>
2. Electron microscope: http://en.wikipedia.org/wiki/Electron_microscope
3. Microscope: <http://en.wikipedia.org/wiki/Microscope>
4. Scanning Electron Microscope: http://en.wikipedia.org/wiki/Scanning_electron_microscope

RENKLERİN DANSI

Prof. Dr. Ali DEMİRSOY

Şu anda insanların ve diğer canlıların algılamış ve kullanmış oldukları renklerin ve desenlerin ortaya çıkışı, evrimsel bir mantık ve dizi içerisinde incelenmiştir.

Renklerin algılanmasında, güneşten çıkan ışınların süzülmesine etki eden güçler, güneş ışınlarının niteliği, ayın oluşturduğu manyetik alanların seçiciliği, başlangıçta ortaya çıkan ozon tabakasının belirleyici etkisi verilmiştir.

İlk ortaya çıkan canlı moleküllerinin koerservat evresinde özellikleri, evrimleşmesi ve organize olmuş bir hücreye dönüşümü, eşeysiz ve eşeyli üremenin bulunuşu açıklanmıştır. Tüm bu gelişmelerin biyolojik çeşitlenmedeki rolü “rekombinasyon” anlatılmıştır.

İlkin okyanuslardaki canlıların durumu, renklenmeleri ve beslenme zinciri yorumlanmıştır. Jeolojik değişikliklerin canlı yapısı ve davranışındaki önemi vurgulanmıştır.

Besin krizi, buna bağlı olarak ototrof canlıların ortaya çıkışı, alglerin yaygınlaşması verilmiştir. Prekambriyen’de mayozun bulunuşuna bağlı olarak “Kambriyen Patlaması”nın nasıl oluştuğu açıklanmış ve biyolojik çeşitlenmeye bağlı olarak renklerdeki değişiklikler anlatılmıştır.

Evrimsel basamaklara bağlı olarak, algler, yosunlar, kara yosunları, at kuyrukları, kiptir otları, eğriltirler, iğne yapraklı ağaçlar, Ginko biloba üzerinden geniş yapraklı ağaçlara geçişin renkler açısından kısa öyküsü verilmiş; kıta kaymaları, yer hareketleri ve iklimsel değişiklikler ile birlikte çiçekli bitkilerin ve holometabol (tam başkalaşım) böceklerin bitkiler ile ilişkileri (simbiyozisi) yine renklerin çeşitlenmesi ve kullanımı açısından anlatılmıştır. Renklerin ortaya çıktığı ve güçlendiği “İkinci Zaman”daki jeolojik yapıya ve iklimsel koşullara kısaca değinilmiştir.

Organizasyon düzeyi düşük hayvansal canlılardan organizasyon yeteneği yüksek canlılara doğru evrimleşmede, renklerin çeşitli amaçlarla kullanımı (korunma, saklanma, uyarı, kominikasyon, kimlik belirtme, seçilime güç verme, kandırma, gücün simgesi olarak kullanma, taklit vd) çoğu orijinal olarak çekilmiş slaytlarla anlatılmıştır.

Başlangıçta sadece renk olarak başlayan mekanizmanın sonunda anlamlı desenlere ve simgelere dönüşümünün nedeni verilmiş ve çeşitleri ile ilgili görsel sunum yapılmıştır.

Renkleri oluşturan mekanizmalar ve evrimleşmesindeki kimyasal ve fiziksel nedenler, basit moleküler düzeyde verilmiştir (yapısal ve pigmental renkler).

Son kısımda, evrimsel olarak oluşan renk ve desenlerin insan topluluklarında kullanımına ilişkin, dünyanın değişik yörelerindeki ırk ve törelerden slaytlarla örnekler verilmiştir.

Biyolojik çeşitliliğin önemine ve renkler açısından dikkat edilmesi gereken hususlara yer verilmiştir.

Sunum şu bölümlerden oluşmaktadır:

1. Evrenin, galaksilerin ve dünyanın oluşumu. İlk ozon tabakasının oluşumu ve ışın süzgecinin devreye girmesi
2. İlk canlı moleküllerinin oluşumu, ilkin hücre oluşumu ve fotosentez yapabilen ilk bir hücreli canlıların oluşumu
3. Karaya çıkış, ikinci jeolojik dönemde tanıdığımız renklerin oluşumunun ortaya çıkışı
4. Renklerle ilgili yarışmanın başlaması, çiçekli bitkilerin evrimleşmesi, canlıların renklenme için her yolu denemesi
5. Döllenme için renklerin aracı olarak kullanılmaya başlanması
6. Tohumlarını yayabilmek için renkli meyve oluşumunun başlanması
7. Renklerin cezbetme, korkutma, taklit ve gizlenme için kullanılmaya başlanması
8. Renklerle taklit mekanizması, kimlik tanıtımı yapılmaya başlanması
9. Geleneklerimizin göreneklerimizin renklere yansıtılması
10. Dünyada ırklara ve bölgelere göre farklı renk kullanımının kısa bir tanıtımı.

Anahtar kelimeler: Rengin evrimi, ozon tabakası, ilk canlılar, fotosentez, eşeyli üreme, karaya çıkış, renklerin oluşumu, renklerin kullanımı, taklit, korkutma, bitki-böcek simbiyozisi

INNOVATIVE TECHNOLOGIES: DESIGNER ANTIGENS AND RECOMBINANT CELL-BASED IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY

Dr. rer. nat. Wolfgang SCHLUMBERGER

EUROIMMUN AG, Luebeck, Germany

Recombinant antigens have become a key resource for the determination of antibodies in autoimmune diseases. In order to enhance the diagnostic performance of antigens for improved sensitivity and/or specificity of the related test system, irrelevant or disease-unspecific epitopes can be removed, while relevant epitopes may be optimized with regard to number, accessibility, and reactivity. Recent examples for such designed antigens are:

- Proteinase 3 (PR3) for the diagnosis of Wegener's granulomatosis. Human cell-expressed PR3, exhibiting modified N- and C-terminal signal sequences, an inactivated enzymatic core as well as a purification tag, increases ELISA sensitivity for ANCA-associated vasculitis to 95% at a specificity of 99%.
- "Gliadin analogous fusion protein" (GAF-3X) for determination of coeliac disease specific antibodies against deamidated gliadin fragments. The trimeric antigen contains the amino acid sequence of an immunodominant transglutaminase-deamidated nonapeptide (derived from digested wheat γ -gliadin) fused to the sequence of an empirically adapted immunocompetent gliadin-analogue octapeptide. The use of GAF-3X as antigenic target significantly increases the diagnostic accuracy of immunoassays in coeliac disease.
- BP180 for diagnosing patients with bullous pemphigoid. Tetramerization of the collagen type XVII epitope NC16A multiplied the number of antibody binding sites per molecule, improving the ELISA sensitivity for bullous pemphigoid to 90% at a specificity of 98%.
- AMA-M2 for the diagnosis of primary biliary liver cirrhosis (PBC). The M2 antigen is a complex of several enzymes, of which the following units are important as autoantigens: pyruvate-dehydrogenase, branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase, and oxoglutarate dehydrogenase. A fusion protein was created containing the immunogenic domains of all 3 relevant enzyme com-

plexes (3E) of the M2 antigen in a defined stoichiometric relationship. The sensitivity of the corresponding ELISA with respect to PBC increased from 79% to 93% compared to conventional ELISA at a comparable high specificity of 98%.

Antigens containing conformational epitopes and requiring synthesis and presentation in a largely authentic environment (e.g. membrane-bound proteins) can be expressed in human cell lines serving as substrates in indirect immunofluorescence (IIF) assays. Recombinant cell-based immunofluorescence assays minimize epitope alteration, ensure highly authentic post-translational processing and supersede biochemical purification. The recombinant cell substrates can be applied in IIF either as monospecific targets or combined with appropriate tissue substrates in multiparametric test systems. Recently, the following antigenic targets were identified and applied in recombinant cell-based assays:

- Phospholipase A2 receptor (PLA2R) autoantibodies are triggers of the immune reaction in primary/idiopathic membranous nephropathy (MN), the leading cause of a nephritic syndrome in adults. These autoantibodies are highly specific for the primary form of MN and are found in the serum of up to 70% of patients. Suggested indications for anti-PLA2R testing are the differential diagnosis of nephritic syndrome, assessment of disease activity and severity, and monitoring the response to treatment.
- Aquaporin-4 (AQP4), the most abundant water channel within the central nervous system, is the target antigen in neuromyelitis optica (NMO). Autoantibodies against AQP4 are found in up to 80% of patients. NMO is a severely disabling inflammatory disorder which predominantly affects the spinal cord and optic nerves resulting in longitudinally extensive transverse myelitis (LETM) and optic neuritis (ON). In clinical practice, myelitis and ON occurring in NMO can be difficult to distinguish from that occurring in multiple sclerosis.
- Anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis is a severe and considerably underdiagnosed disorder that frequently affects young women with teratomas of the ovary, but is also observed in females without tumors as well as in men and children. Early diagnosis is crucial since patients often improve with immunotherapy and removal of the tumor. Final diagnosis is based on the determination of glutamate receptor (type NMDA) antibodies in serum or cerebrospinal fluid. The main epitope targeted by the antibodies against NMDAR is in the extracellular N-terminal domain of the NR1 subunit.

RIBOTYPING: BASICS AND APPLICATIONS

Keshav KRISHNAMANI

DuPont Qualicon, Switzerland

rRNA operon which composed of 5S, 16S and 23S units is the most conserved region of bacterial genome, and ribotyping is the most reliable method for taxonomic and phylogenetic analysis. Ribotyping process begins by lysing bacterial cells of pure culture and cutting the released DNA into fragments via a restriction enzyme. These fragments are separated by size through gel electrophoresis and then transferred to a membrane, where they are hybridized with a DNA probe and mixed with a chemiluminescent agent. A digitizing camera captures the light emission as image data, from which the system extract a ribosomal pattern. This pattern is compared to others in the database for characterization and identification. The main advantage of automatized ribotyping system (RiboPrint) is its reproducibility. It is also an open system which allows operator to use different enzyme and generate custom database. RiboPrint system and database can identify more than 8500 bacterial species and subtypes. This wide spectrum of bacterial typing can be used for routine identification and source tracking in epidemiological investigation.

References

1. Bouchet V, Huot H, Goldstein R. Molecular genetic basis of ribotyping. Clin Microbiol Rev 2008; 21(2): 262-73.
2. Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin Microbiol Rev 2004; 17(4): 840-62.
3. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. J Clin Microbiol 2007; 45(9): 2761-4.
4. Severino P, Brisse S. Ribotyping in Clinical Microbiology, pp: 573-81. In: Walker JM, Rapley R (eds), Medical Biomethods Handbook. 2005. Humana Press Inc., NJ.

TANISAL ANTİJENLERİN PROTEİN “MİKROARRAY”LERLE KEŞFİ

Prof. Dr. A. Yüksel GÜRÜZ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Bilim Dalı, İzmir

Enfeksiyöz hastalıkların serolojik tanısında genellikle patojenin tamamını kapsayan antijen karışımları kullanılmaktadır. Bu antijenlerin otoantikorlarla veya başka bir patojene ait antikorlarla çapraz reaksiyon vermesi olasıdır. Böyle bir aldanmanın, hekimi yanlış pozitif sonuçlara yönlendirmesi ile gereksiz tedavi ve girişimler uygulanabilmektedir. Bu sorunları aşmak için tek bir patojenin tanısında birden çok test kullanılmakta; bu durum da zaman ve maliyet açısından başka sorunları doğurmaktadır. Bazı hastalıkların tanı ve tedavi protokolü hastalığın akut veya kronik aşamasına göre belirlendiğinden, zaman zaman bu yöntemlerle bile kesin cevap elde edilememektedir. Örneğin toksoplazmozis tanısında akut ve kronik enfeksiyon ayırımında birden çok test eş zamanlı olarak değerlendirilmekte, fakat akut dönemde yükselen IgM değeri, kullanılan testin duyarlılığına bağlı olarak bir yıl veya daha uzun süre saptanabilmekte, düşük aviditeli IgG antikorları enfeksiyon sonrası uzun süre kanda bulunabilmekte ve akut toksoplazmozis tanısında uzmanların kararını zorlaştırmaktadır. Serolojik tanı testlerinde parazitin bütününe içeren antijenlerin kullanımı yerine sadece akut dönemde beliren ve sonrasında azalıp kaybolan antijen(ler)in keşfi, soruna bir çözüm olarak görülmektedir.

Genomların protein mikroarray’ler ile taranması ile hedeflenen antijenlerin keşfi yapılabilmektedir. Enfeksiyöz mikroorganizmanın neden olduğu hastalıklara karşı gelişen hümmoral bağışık yanıtın araştırılarak antijen keşfi protein mikroarray tarama ile gerçekleştirilebilmektedir¹. İşlemin uygulanmasında mikroorganizmanın genomunda bulunan tüm ekzonlar seçilip klonlanmakta, *in vitro* ortamda protein ekspresyonu ile elde edilen rekombinant proteinler mikroarray lamblara yazdırılmakta ve hasta serumları ile karşılaştırılarak hastalığın seyri sırasında oluşan antikorlar saptanmaktadır. Bu yöntem ile çiçek virusu, *Francisella tularensis*, *Plasmodium falciparum*, *Burkholderia pseudomallei*, insan papilloma virusu, *Coxiella burnetii*, *Brucella melitensis*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*, HSV ve *Mycobacterium tuberculosis*’e ait antijenik bölgeler saptanmıştır²⁻¹⁴.

Genomik bilgiler, veri bankalarından (*Toxoplasma gondii* için: ToxoDB; <http://toxodb.org/toxo/>) elde edilmektedir. Daha sonra protein eksprese eden bölgeler (ekzon) biyoinformatik yöntemlerle analiz edilip, antijenik yapıda olabilecek, sinyal peptidi içeren proteinler, membran proteinleri, hücre dışına salgılanan proteinler, yüzey proteinleri, ısı şok proteinleri, şaperonlar ve lipoproteinler seçilmektedir. Her ekzon uygun primerlerle organizmanın genomundan izole edildikten sonra, *in vitro* transkripsiyon/translasyon sistemi ile *in vitro* ortamda rekombinant protein üretimi yapılmaktadır. Elde edilen rekombinant proteinler mikroarray lamlara yazdırıldıktan sonra da şüpheli serum örnekleri ile karşılaştırılmaktadır. Mikroarray lamlarda rekombinant proteinlerin oluşturduğu immün komplekslerdeki floresan parlamalar mikroarray lam okuyucular ile sayısal değerlere dönüştürülmekte ve sonrasında bilgisayar programında ısı haritaları oluşturulmaktadır¹⁻¹⁵.

Bu yöntemde en önemli nokta, rekombinant proteinlerle kaplı mikroarray lamlarla karşılaştırılacak hasta serumlarının iyi gruplandırılmasıdır. Ayrıca, hayvan modelinde hastalığın tüm evrelerini kapsayacak bir döngü oluşturularak, hastalığın her dönemine ait serum örneklerinin toplanmasında fayda vardır. Bu sayede insan ve hayvan modellerinde benzer parlamalar veren antijenik proteinler seçilebilir.

T. gondii genomunda ToxoDB’de 8155 gen bölgesi ve bunların içinde 43010 ekzon tarif edilmiştir. Genlerde ekzon sayısı 1 (n: 2135 gen) ile 63 (n: 3 gen) arasında; genlerin büyüklükleri ise 71 ile 35589 baz çifti (bp) arasında değişmektedir. Beklenildiği gibi daha büyük genler, daha çok ekzon içermektedir. Biyoinformatik yöntemlerle 1059 gen (6829 ekzon) seçilmiştir. *Plasmodium falciparum* ve diğer patojenlerle ilgili taramalarda, 8 kDa’dan düşük proteinlerin antijenik özelliği zayıf olduğundan, büyüklüğü 200 bp’den küçük genler değerlendirme dışı bırakılmıştır. Sonuçta 2705 ekzon (952 gene ait) ile protein mikroarray yapımı gerçekleştirilmiştir. Ayrıca 10 adet protein (RON5, ROP13, PP2C-hn, PP2C2, 002200, RON4, Toxolysin-1, roptri metalloprotease, ISP1 ve ISP2) lamlara eklenmiştir. Protein mikroarray tarama için öncelikle 1357 gen bölgesi (67-158 aminoasit büyüklüğünde proteinleri içerir) ile TG1 protein mikroarray lamları hazırlanmıştır¹⁵.

Toksoplazmozisli hastalara ve kontrollere ait serum örnekleri 4 gruba ayrılmıştır; 1) *T. gondii* ile enfekte olmamış seronegatif bireyler; 2) Düşük avidite ve IgM pozitif akut enfeksiyonu olan hastalar; 3) Yüksek avidite ve IgM pozitif kronik enfeksiyonu olan hastalar; 4) Yüksek avidite ve IgM negatif gerçek kronik enfeksiyonu olan hastalar. Hayvan modelinde ise fare modeli hem bradizoit içeren doku kistleri hem de sporozoit içeren ookistlerle ağız yolu ile enfekte edilmiştir. Daha sonra 0., 1., 2., 3., 6., 15., 40., ve 120. günlerde serum örneği toplanmıştır. Bu hayvan modeli ile insanda meydana gelen doğal enfeksiyon oluşturulmuştur. TG1 mikroarray lamlarla hastalara ait serum örneklerinin karşılaştırılması sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel olarak analizi sonucunda, seronegatif kontrol hastalarını akut hastalardan

ayırt edebilecek 38 IgG ve 108 IgM pozitif hedef antijen keşfi yapılmıştır¹⁵. Geriye kalan 1358 geni içeren TG2 mikroarray lamaları hastalara ve hayvanlara ait serum örneklerinin taraması henüz tamamlanmış ve istatistiksel analizi gerçekleştirilmektedir.

Kaynaklar

1. Davies DH, Liang X, Hernandez JE, et al. Profiling the humoral immune response to infection by using proteome microarrays: high-throughput vaccine and diagnostic antigen discovery. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(3): 547-52.
2. Barbour AG, Jasinskas A, Kayala MA, et al. A genome-wide proteome array reveals a limited set of immunogens in natural infections of humans and white-footed mice with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 2008; 76(8): 3374-89.
3. Beare PA, Chen C, Bouman T, et al. Candidate antigens for Q fever serodiagnosis revealed by immunoscreening of a *Coxiella burnetii* protein microarray. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15(12): 1771-9.
4. Davies DH, Molina DM, Wrammert J, et al. Proteome-wide analysis of the serological response to vaccinia and smallpox. *Proteomics* 2007; 7(10): 1678-86.
5. Doolan DL, Mu Y, Unal B, et al. Profiling humoral immune responses to *P.falciparum* infection with protein microarrays. *Proteomics* 2008; 8(22): 4680-94.
6. Eyles JE, Unal B, Hartley MG, et al. Immunodominant *Francisella tularensis* antigens identified using proteome microarray. *Proteomics* 2007; 7(13): 2172-83.
7. Felgner PL, Kayala MA, Vigil A, et al. A *Burkholderia pseudomallei* protein microarray reveals serodiagnostic and cross-reactive antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(32): 13499-504.
8. Molina DM, Pal S, Kayala MA, et al. Identification of immunodominant antigens of *Chlamydia trachomatis* using proteome microarrays. *Vaccine* 2010; 28(17): 3014-24.
9. Kalantari-Dehaghi M, Chun S, Chentoufi A, et al. Discovery of potential diagnostic and vaccine antigens in herpes simplex virus-1 and -2 by proteome-wide antibody profiling. *J Virol* 2012; 86(8): 4328-39.
10. Dasgupta G, Chentoufi AA, Kalantari M, et al. Immunodominant "asymptomatic" herpes simplex virus type 1 and type 2 protein antigens identified by probing whole-ORFeome microarrays by serum antibodies from seropositive asymptomatic versus symptomatic individuals. *J Virol* 2012; 86(8):4358-69.
11. Cannella AP, Lin JC, Liang L, et al. Serial kinetics of the antibody response against the complete *Brucella melitensis* ORFeome in focal vertebral brucellosis. *J Clin Microbiol* 2012; 50(3): 922-6.
12. Kunnath-Velayudhan S, Salamon H, Wang HY, et al. Dynamic antibody responses to the *Mycobacterium tuberculosis* proteome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(33): 14703-8.
13. Luevano M, Bernard HU, Barrera-Saldaña HA, et al. High-throughput profiling of the humoral immune responses against thirteen human papillomavirus types by proteome microarrays. *Virology* 2010; 405(1): 31-40.
14. Mochon AB, Jin Y, Kayala MA, et al. Serological profiling of a *Candida albicans* protein microarray reveals permanent host-pathogen interplay and stage-specific responses during candidemia. *PLoS Pathog* 2010; 6(3): e1000827.
15. Liang L, Döşkaya M, Juarez S, et al. Identification of potential serodiagnostic and subunit vaccine antigens by antibody profiling of toxoplasmosis cases in Turkey. *Mol Cell Proteomics* 2011; 10(7): M110.006916 2011.

MİKROBİYOLOJİ UYGULAMALARI İÇİN BİYOSENSÖRLER VE BİYOMEMS

Doç. Dr. Haluk KÜLAH^{1,2}, Yekbun Adıgüzel¹

¹METU-MEMS Araştırma ve Uygulama Merkezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ), Ankara

²ODTÜ Elektrik ve Elektronik Mühendisliği Bölümü, Ankara

Özet

Mikro-Elektro-Mekanik Sistemler (MEMS) teknolojisi ile üretilebilen yapıların minimum boyutlarının mikrometrenin altına inmesiyle; bakteri, virus, DNA ve bunlar gibi biyolojik örneklerle etkileşim halinde çalışabilen mikroçipler geliştirilmeye başlanmıştır. Bu teknoloji sayesinde üretilen çiplerin fiyat, boyut, ağırlık ve elektronik devreler ile aynı anda üretilebilmeleri gibi avantajları dikkate alındığında kendilerine has yeni yaygın uygulama alanları oluşmaktadır. BiyoMEMS olarak adlandırılan bu yeni teknoloji sayesinde damar içine yerleştirilebilen basınçölçerler, kablosuz çalışabilen vücuda monte edilmiş kan analiz çipleri, kanın analiz sonuçlarına göre belirli miktarda ilaç salgılayabilen akıllı ilaç rezervuarları ve çeşitli protezlerin gerçekleştirilmesi mümkün olabilmektedir. Ayrıca, kimyasal, tıbbi ve biyolojik analizlerin de uzman gücüne ihtiyaç duymadan, yüksek hızda, hassasiyette ve güvenilirlikte gerçekleştiriliyor olunması, BiyoMEMS teknolojisinin ve biyosensör çalışmalarının yaygınlaşmasında büyük bir itici güç işlevi görmektedir. Mevcut uygulama alanlarını geliştirerek ve daha kapsamlı hale getirerek ilerleyen bu teknoloji sayesinde mikrobiyoloji alanındaki uygulamalar da hız kazanacaktır. Bu bölümde, ODTÜ-MEMS Merkezi bünyesinde BiyoMEMS ve mikroakışkan sistemler üzerine yapılan çalışmalar ve uygulamalar, mikrobiyoloji alanının perspektifinden sunulacaktır.

Anahtar kelimeler: MEMS, BiyoMEMS, mikrobiyoloji, biyosensör

Giriş

Mikro-Elektro-Mekanik Sistemler (MEMS) teknolojisi ile, fazla maliyeti ve enerji sarfiyatı olmayan, entegre devre teknolojisi ile uyumlu çipler üretilebilmektedir.

Bu çipler kullanılarak, portatif, kompakt, sonuçları hızlı, güvenilir, hassas bir biçimde verebilen cihazların üretimi mümkün kılınmıştır. Biyolojik uygulamalar özelinde BiyoMEMS olarak isimlendirilen bu teknoloji ile, vücut-içi uygulamalar amacı ile üretilen çiplerin haricinde, bir çok farklı biyolojik analit tanısı (örneğin, kan hücreleri, mikroorganizmalar, virus, DNA ve proteinler) ve çeşitli biyomoleküller içeren uygulamalar hayata geçirilebilir. Klinik tanıları için, çip-üstü-lab (*lab-on-a-chip*) sistemler olarak isimlendirilen yapılarla, geniş donanımlı bir laboratuvarıda gerçekleştirilebilecek analizlerin tek bir biyosensör çip üzerinde başlanması hedeflenmektedir.

Sağlık ve çevre güvenliği gibi ulusal öneme sahip konular bağlamında bakteri ve patojenlerin tayini, sadece tıp kapsamında değil, ortam ve gıda analizlerinde de ön plana çıkmaktadır. Bu sayede, mikrobiyolojik tanı için örnek aralığı; su, toprak ve gıdalardan, kan, idrar ve dışkı gibi vücut atıklarına ve doku örneklerine varana kadar çok geniş ve farklı bir spektruma sahiptir. Mikrobiyolojik tanı için geliştirilmiş ve optimize edilmiş geleneksel yaklaşımlar, yeni tayin yöntemlerinin de hizmetindeki kimyasal ya da biyolojik sinyal elde etme şekilleridir. Bununla beraber, klasik yöntemleri kullanabilecek alanlar optik ve spektroskopik araçlar da içeren, hücre kültürü imkanlarına sahip moleküler biyoloji laboratuvarları iken, yukarıda bahsettiğimiz biyosensör uygulamaları ile adeta tam bir laboratuvar gerektiren işlemler, ufak, taşınabilir, az enerji gerektiren, düşük maliyetli bir çip üzerinde gerçekleştirilebilmektedir. Mikrobiyolojik çalışmaların ve mikrobiyolojik tanının yaygınlaştırılabilmesi için kilit öneme sahip bu avantajlar yanında, hız, hassasiyet ve güvenilirlik de mikrobiyolojik tanı için belirleyicidir. Hızlı, yüksek hassasiyette, ve güvenilir bir biçimde mikroorganizma saptama işlemi için BiyoMEMS kapsamındaki biyosensör uygulamalarında iki farklı yaklaşım ön plana çıkmaktadır. Bu yaklaşımlardan biri, hedef organizmanın seçici olarak ortamdaki diğer gürültü kaynaklarından ayrıştırılması sonrasında etraftaki az sayıda organizmayı bile hissedebilecek bir sistem elde etmektir. Diğer yaklaşım ise, hedef organizmayı ayrıştırmadan mevcut ortamında tespit edebilecek denli hassas sistemleri oluşturarak, diğer unsurları iyileştirmeye yönelik çalışmalara yoğunlaşmaktır. Biyosensör çalışmaları kapsamında her iki yaklaşım da yer bulabilmektedir. Bu alanlarda, hedef organizmanın bağlandığı ve sistemin tanıyabildiği mekanik (örn. kütle), elektriksel (örn. iletkenlik, kapasitans), optik ve manyetik gibi çeşitli fiziksel değişim sinyallerini üretebilecek sensör yüzeyleri araştırılmakta, tasarlanmakta ve üretilmektedir. Bu bağlamda, çeşitli özelliklerle zenginleştirilmiş ve hedef analit tayini yapabilen birimler olarak bakterileri kullanan biyosensörler de BiyoMEMS uygulamaları kapsamındadır.

BiyoMEMS ve Biyosensör Uygulamaları

Biy MEMS'in biyomedikal alandaki uygulamaları geniştir. Bu alan için üretilen cihazlar; mikrosensörler (örn. ivmeölçerler, gaz sensörleri, basınç sensörleri, kimyasal sensörler), mikroelektroikiler (örn. cerrahi mikro aletler, mikro pompalar, mikro iğneler, mikro filtreler) ve mikrosistemler (örn. mikroakışkan sistemler, μ TAS, gen çipleri) olmak üzere üç ana başlık altında toplanabilir. Bunların her bir elemanının içeriği ve konusu burada ele alabileceğimizden çok daha kapsamlıdır. Örneğin, akışkan sistemde sıvı örneklerin içeri alınmalarını ve kontrollü bir şekilde aktarımlarını, farklı biçimlerde akmalarını, dağıtımlarını ve geri toplanmalarını ya da dışarı atılmalarını, ventilasyonlarını, pompalanmalarını, kapakçıklarla denetimli bir şekilde karışmalarını ve istenen hacimlere ayrılma larını, içeriklerinin nitel ve nicel tayinini, konsantrasyonlarının ayarlanmasını bütünleşik olarak ya da parça parça hedefleyen tüm mikron ölçekli yapılar MEMS tabanlı üretim içeren mikroakışkan çalışmalarının konusudur¹.

Biy MEMS'in biyosensör uygulamaları ise yukarıda saydığımız bir çok avantajı bünyesinde barındırması sayesinde tıp, eczacılık, gıda ve çevre güvenliği gibi geniş kapsamlı konuları içermektedir. En genel kullanımları arasında; DNA analizi, ender hücre saptama, vücut sıvısı analizi ve protein, enzim, virus ve bakteri gibi biyomoleküllerin tanısı yer alır. Biy MEMS teknolojisi ile geliştirilecek çipler sayesinde, hastaya ve hastaneye fazla külfeti olan, ölüm riski yüksek hastalıkların erken teşhisi ve dolayısıyla da daha etkin tedavisi mümkün olabilir. Bu tip cihazlar ile, kuş gribi, HIV, hepatit gibi virus, ender hücre ya da bakteri taraması yapabilen mikrosistemler geliştirilerek, sınırlı imkanlara sahip bölgelere sağlık hizmeti ulaştırılabilir veya hastalık zamanlarında insan yoğunluklu bölgelerde hızlı tarama ve teşhis imkanı sağlanabilir.

DNA, enzim ve protein tanısında kullanılan Biy MEMS tanı yöntemleri; elektriksel, mekanik, optik ve manyetik olarak sayılabilir². Elektriksel tanı potansiyometri, amperometri ve kondüktometriyi kapsar. Elektrokimyasal tanıda, redoks işaretli enzimler ile hedef analitin sinyali artırılarak elektriksel tanı yapılmış olur. Elektriksel özellikleri olan nanopartiküller de alternatif olarak kullanılabilir. Mekanik tanı ise, sıklıkla bir sundurma yüzeyindeki bağlama molekülünün hedef analite bağlanması sonucunda oluşan stres veya kütle değişiminin algılanması ile gerçekleşir. Çevresel koşullara karşı son derece hassas bir yöntemdir. Optik tanıda ise, yoğun olarak hedef analitin floresan boyalarla işaretlenmesi ya da hedef analiti tanıyan bir işaretçinin optik sistemler kullanılarak saptanması söz konusudur. Optik teçhizat ve çoğu zaman uzman personele de ihtiyaç duyulan bir teknik olmasına rağmen, çokça kullanılan ve alışılmış bir teknik olması nedeni ile yaygındır. Manyetik tanı, örnek içerisindeki

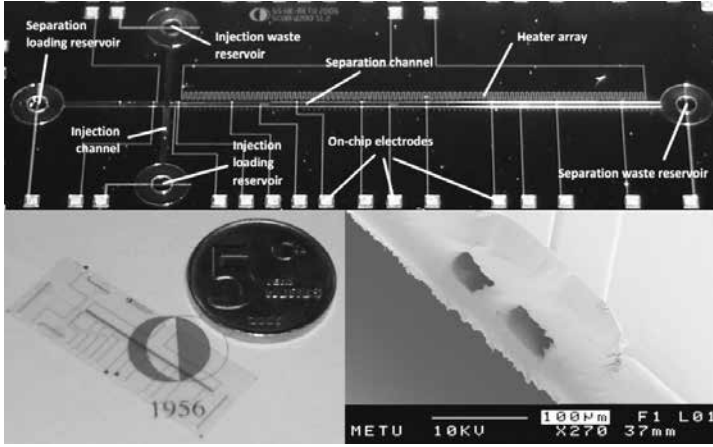
hedef analitin manyetik partiküllerin yüzeyine bağlandıktan sonra diğer unsurların yıkanarak ortamdaki uzaklaştırılması prensibine dayanan bir yöntemdir.

ODTÜ-MEMS Merkezindeki Çalışmalar

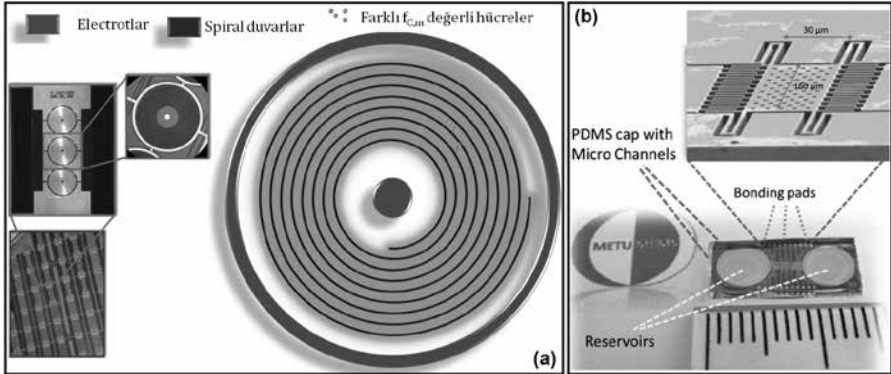
2004 yılından bu yana ODTÜ-MEMS Merkezi'nde BiyoMEMS uygulamaları hedef alınarak geliştirilen cihazlar arasında; DNA mutasyon analizi yapabilecek elektroforez çipleri; hücre sitometrisi alanında kullanılabilecek ender hücre tarama çipleri ve hücre ayırtırmaya yönelik dielektroforez çipleri; çip-üstü bakteri, virus ve toksin tanısı yapabilecek sistemler; DNA tanısı için elektrokimyasal çip; ve çeşitli amaçlar için mikro-kapak, vb. yapılar bulunmaktadır. ODTÜ-MEMS bünyesinde üretilen biyosensörlerin, dış görünüm, kullanılan materyal, üretim şekli, çalışma prensibi, ölçüm tekniği ve hedefi doğrultusunda çok farklı yapıları ve tasarımları mevcuttur. Bu bağlamda, mikroakışkan kanal yapıları bir çok farklı MEMS tabanlı cihaz bünyesinde üretilmiş, geliştirilmiş ve kullanılmışlardır. Mikroakışkan sistemlerinin mikrokanal yapıları, mikroakışkan çiplerinin en önemli unsurlarıdır. Mikrokanal kullanımının en karakteristik örnekleri mikro-elektroforez ve hücre ayırtırma çipleridir^{3,4}. BiyoMEMS uygulamaları için geliştirilmiş bir elektroforez yongası ile, bu elektroforez yongasının kanal kesitinin taramalı elektron mikroskopunda elde edilmiş görüntüsü Şekil 1'te verilmiştir. DNA mutasyon analizi ve çip ölçekli elektroforez amacı ile üretilen yapılar kullanılarak heterodupleks DNA analizi gerçekleştirilmiştir³.

Sitometri uygulamaları kapsamında dielektroforez (Şekil 2a) ile hücre ayırtırma⁴ ve mekanik rezonant yapılarla (Şekil 2b) ender hücre saptama çalışmalarımız halen devam etmektedir. Elektroforez çalışmasındaki yüklü taneciklerin yerini dielektroforezde dielektrik parçacıklar almaktadır. Değişken elektrik alan içinde dielektrik taneciklerin hareket ettirilmesi prensibine dayanan dielektroforezde, taneciklerin farklı dielektrik özellikleri sayesinde farklı yönde veya farklı büyüklükte hareketleri gözlenmektedir. Taneciklerin yüklü olması gerekmediği gibi, hücrelerin dielektrik özellikleri, dielektroforez ile hücre çalışmalarına sıklıkla vesile olmuştur.

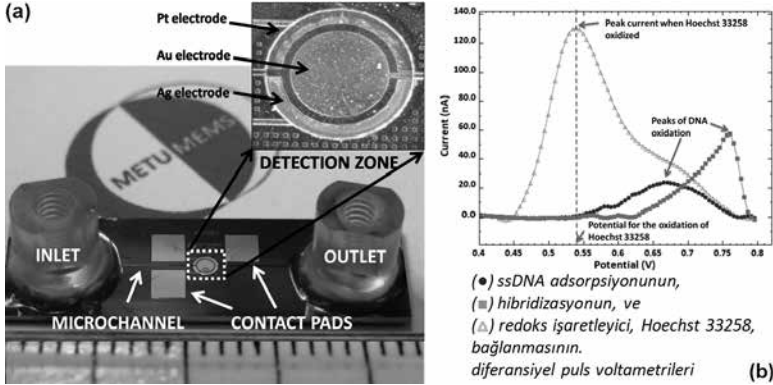
Çip ölçekli bakteri, virus, ve toksin saptama çalışmaları kapsamında, *Staphylococcus aureus* suşlarında antibiyotik direnç geni olan *mecA* tanısı için elektrokimyasal MEMS DNA biyosensörü tasarlanmıştır (Şekil 3) ve bu çalışma da yine devam etmekte olan çalışmalarımız arasındadır. Bu çalışmada, *mecA* geninin tespiti için hedef DNA'yı yakalayacak eşlenik DNA oligomerleri altın elektrod üzerine tutundurulduktan sonra, hedef DNA'ya bağlanan oligomerler Hoescht 33258 redoks işaretçi ile sinyal artırımı da sağlanarak elektrokimyasal yöntemle tespit edileceklerdir². Çip-üstü-lab sistemleri için mikro kapaklar, pompalar⁶ ve ilaç etkisi analiz sistemleri de, üretim ve çalışmaları devam eden projeler kapsamındadır.



Şekil 1. BiyoMEMS uygulamaları için geliştirilen bir elektroforez yongası (üstte ve altta, solda) ve bu yonganın kanal kesitinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (altta, sağda)³.



Şekil 2. ODTÜ-MEMS bünyesinde üretilen (a) spiral dielektroforez çipi ve şematigi; (b) mekanik rezonatör çipi ve şematigi^{4,5}. [Dielektroforez çipinin merkezindeki elektrod bölgesi aynı zamanda örnek giriş rezervuarı olup, voltaj uygulanması ile merkez elektrottan çevredeki elektroda doğru oluşan elektrik alanının etkisi altındaki dielektrik yapılar, bu dielektrik özelliklerine göre, spiral kanal boyunca akarken aynı zamanda da ayrışır. Mekanik rezonatör çipinin merkezindeki deneme kütleli bölgesi (üst resimdeki delikli görünümlü bölge), biyomoleküller tarafından aktiveleştirilecek ve hedef analitin bağlanacağı yer olup; bağlanma öncesi ve sonrasında deneme kütlelerinin rezonans frekansındaki sapma üzerinden hedef analitin kütlelerinin belirlenmesi sağlanmaktadır. Bu cihazlar için patente başvurulmuştur.]



Şekil 3. ODTÜ-MEMS bünyesinde üretilen (a) elektrokimyasal MEMS DNA biyosensörü ve (b) *mecA* geni tanısı için elektrokimyasal reaksiyonun diferansiyel puls voltametri². [Şeklin sağ üst köşesinde büyütülmüş bir fotoğrafı bulunan DNA saptama alanı (detection zone) bir referans, bir yardımcı ve bir de çalışan elektrottan oluşmaktadır. Bu saptama alanına, soldaki giriş rezervuarından (inlet) ince bir mikrokanal (microchannel) yardımı ile hedef analiti içeren örnek ulaştırılmaktadır.]

Sonuç

BiyoMEMS konusu yeni ve gelişmeye açık bir konu olup, günlük uygulamalardaki etkileri önümüzdeki dönemde yoğun olarak hissedilecektir. Bu konu doğası gereği disiplinler arası olup elektronik, makina ve kimya mühendislikleri ile tıp ve biyoloji alanında çalışan bilim adamlarının birlikte çalışmalarını zorunlu kılmaktadır. Ülkemizde bu alanda yapılan çalışmalar disiplinler bazında uluslararası düzeyde olmakla birlikte, önümüzdeki döneme damgasını vuracak bu teknolojide disiplinler arası iletişimin artırılması ve çalışmaların teşvik edilmesi önemlidir.

Kaynaklar

1. Koltay P, Ducr  e J, Zengerle R. Micro-Fluidic Platforms, p: 139. In: Urban GA (ed), BioMEMS. 2006. Springer, Netherlands.
2. Ceylan H, Kulah H, Alp A, Ozgen C, Hascelik G. A disposable MEMS DNA biosensor for antibiotic resistant gene detection in *Staphylococcus aureus*. 15. Biyomedikal M  hendisliği Ulusal Toplantısı (BIYOMUT). 21-24 Nisan 2010, Antalya.
3. Sukas S, Erson AE, Sert C, Kulah H. A parylene-based dual channel micro-electrophoresis system for rapid mutation detection via heteroduplex analysis, Electrophoresis 2008; 29(18): 3752-8.
4. Yilmaz G, Ciftlik AT, Kulah H. A MEMS-based spiral channel dielectrophoretic chromatography system for cytometry applications. Biotechnol J 2011; 6(2): 185-94.
5. Bayraktar E, Eroglu D, Ciftlik AT, Kulah H. A MEMS based gravimetric resonator for mass sensing applications. IEEE 24th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2011). January 23-27, 2011, Cancun, Mexico.
6. Yildirim E, Kulah H. Analysis and characterization of an electrostatically actuated in-plane parylene microvalve. J Micromech Microeng 2011; 21(10): 105009.

YENİ BİR İSİM NELER GETİRİYOR? TIBBİ ÖNEM TAŞIYAN MANTARLARIN TAKSONOMİK SINIFLANDIRMALARINDAKİ DEĞİŞİKLİKLER

Doç. Dr. Çağrı ERGİN

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli

Mikoloji ile ilgilen çok sayıda araştırmacı, özellikle son 10 yıl içindeki ilerlemelere paralel olarak mantarların isimlendirmelerinde yeni teknik imkanları kullanmış ve farklı isimlendirmeler ile mantarları farklı bilimsel platformlarda sunmaya başlamışlardır. Fungal nomenklatür, 1867 yılından itibaren ICBN (International Code of Botanical Nomenclature) olarak sınıflandırılmakta ve her altı yılda bir yapılan Uluslararası Botanik Kongresi'nde gözden geçirilerek yenilenmektedir. ICBN 2005 yılında Viyana-Avusturya (Viyana kodu) ve 2011 Melbourne-Avustralya'daki (Melbörn kodu) kongrelerinde önemli değişikliklere uğramış; sistematik kavramlar, güncel test ve yöntemlere göre yeniden uyarlanmıştır. Bu sınıflamada kullanılan yöntemler ve uyulan kurallar internet üzerinden (<http://ibot.sav.sk/icbn/main.htm>) duyurulmaktadır. Ancak ICBN tüm mantarları kapsamayı hedeflemekle birlikte, özellikle son yıllarda, tıbbi önemi olan mantarların büyük bir kısmının da içinde olduğu, isimlendirme düzensizliklerine (nomenclature instability) yol açmıştır. Önerilen kurallara uyum sağlamayan ekiplerin, kendi isimlendirmelerini uluslararası yayınlarda kullanmaları, bu düzensizliklerin nedeni olarak gösterilmektedir. 2011 yılındaki Melbörn kodu içerisinde ICBN yerine ICN (The International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants) ön plana alınmıştır. ICBN içinde yer alan (Viyana kodu-Makale 59) liken olmayan askomiçet ve bazidiyomiçet mantarların pleomorfik yaşam dönemleri içindeki farklı karmaşık isimlendirmelerine ICN içinde izin verilmeyeceği bildirilmiştir. 2012 yılı sonuna kadar yayınlananlar hariç, 2013 yılı ile birlikte, uluslararası literatürde yeni isimlendirmelerin kabul edilmeyeceği duyurulmuştur. Yeni isimlendirme önerilerinin NCF (Nomenclature Committee for Fungi) komitesi yolu ile yapılabileceği, bugün için yaygın olarak kabul edilen görüştür. Sadece taksonomiye yönelik olarak ana toplantıların dışında son yıllarda CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) tarafından organize edilen 1F1N (One Fungus = One Name) ve 1F?N (One Fungus = Which Name) toplantıları da 2013 yılı öncesinde yapılabilecek değişimleri ele almıştır. MycoBank ve Index Fungorum kaynakları, konu ile ilgilenenlere hızlı bilgi aktarımı sağlayabilmektedir.

Bununla birlikte, “tek mantara tek isim” yaklaşımının ancak “teorik mikolog”lara uygun olabileceğini savunan çeşitli araştırmacılar da bulunmaktadır. Burada öne sürülen konu, özellikle tıbbi mikoloji alanında, hangi “bir eşeyli” cinsin hangi “birkaç eşeysiz” formu içerdiğinin bilinmemesidir. Aynı zamanda askosporlar bulunmadan sadece eşeyli formlar ile tanımlama yapmanın sadece bilgi kaybı olacağı da öne sürülmektedir. Bir diğer karşı çıkılan konu da, nomenklatürdeki bu değişimin karışıklığa yol açacağı, yeni tür isimlerinin kabullenilmesinin kaçınılmaz olduğudur. Bazı sorunların çözümlenmesinde epitiplenmenin de kullanılabileceği öne sürülmüştür. Ancak bu durum da “Botanik Kod” ile uyuşmamaktadır. Benzer durum “geneolojik uyumlu filogenetik tür tanınması”nda da karşımıza çıkmaktadır.

Tıbbi önemi olan mantarların, 1990’lı yıllarının başından itibaren genel olarak eşeyli formlarının “Eumycota”, diğer tüm formların ise “Deuteromycota” grubunda yer aldığı kabul edilmektedir. Anamorf-eşeysiz, teleomorf-eşeyli ve holomorf yapıların birlikte ele alınacağı “Botanik Kod” sistemi ile karmaşıklığın giderilmesi planlanmıştır. Tıbbi mantarların zaman içinde farklı isimde anılmaları, sağlık bilimleri alanında karşılaşılan sorunları artırmaktadır. Bu isim karmaşasının zaman içinde meydana getirmiş olduğu en önemli sorunlar şu şekilde sıralanabilir:

1. Yeni tanımlanan türlere göre tanı konulan aynı hastalıklar farklı isimler ile anılmaktadır. Örneğin “allescheriasis”, “monosporiosis”, “petriellidiosis”, “pseudallescherioma”, “pseudallescheriosis”, “pseudallescheriasis” ve “scedosporiosis” hepsi aynı fungal patojen tarafından oluşturulan hastalık tablosudur. Genellikle genetik heterojenlik bu soruna yol açmaktadır.
2. Fungal kökenlerdeki polimorfizm ve sinanamorfların farklı isimlerde bulunması, literatürde farklı hastalık etkeni olarak izole edilen aynı mantarın farklı isimler ile tanınmasına neden olmaktadır. Bu durum özellikle nadir rastlanan patojenlere ait bilgi birikiminin gecikmesine ve etkenin tanınmasına neden olmaktadır.
3. Mantarların çoğunluğunun fırsatçı patojen olması, konağın immün sistemine göre farklı klinik tabloların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bağışıklığı baskılanmış konaktan izole edilen fungal patojenin literatür ile karşılaştırılması sonucunda bulunamaması, aynı etkene ait aynı klinik tablonun, çok farklı tanımlamalar ile ifade edilmesine yol açmaktadır. Bu durum, hastalığın tedavisinin planlanmasında ampirik veya preemptif tedavi seçeneklerinin etkinliğine engel olabilecektir.

Tıbbi mikolojide sık gözlenen filamentöz mantarlar taksonomik isimlendirmeden etkilenirken, maya formundaki mantarlar kısmen stabil kalmaktadır. Maya formu mantarlardaki sorun ise, klinik mikolojide sık karşılaşılmayan ancak bilimsel

platformlarda gündeme gelen eşeyli formlarının taksonomik sınıflamasıdır. Klinik olarak sık izole edilen *Aspergillus* ve dermatofit kökenleri, klinik mikoloji alanında uluslararası bilimsel platformlarda en sık sorun oluşturan mantarlardır. Klinik olarak sık karşılaşılan bir tür olan *Aspergillus* taksonomisi ve türlerin sınırlandırılmaları için DNA (ITS, β -tübülin, kalmodülin, aktin, TEF α), morfoloji (koloni ve mikroskopik yapı), fizyoloji (ısı ve pH etkisi, farklı karbon kaynağı kullanımı, vb), ortama salgıladığı maddeler (Ekstrolit analizi; HPLC-Diod array analizi, Erlich testi), ekoloji (konak, coğrafi dağılım), genetik (eşeylenme testi, vegetatif uygunluk grubu) ve karşılaştırmalı genomiks çalışmalar kullanılabilir. *Aspergillus* alanında, son “Uluslararası *Aspergillus* Çalıştay”nda aynı tür için hem eşeyli hem de eşeysiz formlarının tek isim altında olması görüşü hakim ise de, “Botanik Kod” tarafından bu durum kabul edilmemektedir. Çoğu araştırmacı *Aspergillus* terimini rutin kullanılan tek isim, eşeyli formunu da ikinci isim olarak almaktadır, ancak ICBN de buna izin vermemektedir.

Benzer durum, klinik olarak sık karşılaşılan diğer mantarların taksonomisinde de karşımıza çıkmaktadır. Zaman içinde yukarıda bahsedilen birikimlerin oluştuğu, klinik olarak sık izole edilen türlerde sorun daha belirgindir. Sık izole edilen *Trichophyton* cinsinin isimlendirmesi, klinik mikolojinin rutin uygulamasında sorun oluşturmamaktadır. Ancak taksonomi olarak sorun ortaya çıkmaktadır. Örneğin; *T.mentagrophytes complex* sekans çalışmalarında çok sayıda hedef içermektedir ve birçok izolat *T.mentagrophytes sensu stricto*, *T.erinacei*, *Arthroderma benhamiae*’nın *Trichophyton* formu ile *T.interdigitale* varyetelerine ayrılır. Ayrıca *T.rubrum sensu lato* ise taksonomik olarak iki ayrı anamorfik sınıflamayı kapsar: *T.rubrum* ve *T.vialoceanum*. *T.soudanense* ve *T.yaoundei* kökenleri CBS tarafından 2001 yılından itibaren *T.violaceum* olarak adlandırılmaktadır. Genetik olarak uniform olan *T.rubrum* kökenleri ise *T.raubitschekii*, *T.megninii* ve *T.gourvilii* gibi farklı morfolojiye göre adlandırılabilir. Mikolojik olarak tek tür gibi görünse de, nadir olarak izole edilen zoofilik kökenler, klinik mikologlar ve dermatologlar için karışıklığa neden olmaktadır.

Taksonomik değişimler son üç yıl içinde konu ile ilgili araştırmacıların sürekli önerileri ile çok hızlı bir şekilde tartışılmakta ve değişimlere uğramaktadır. Konu, 7.Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi’nde tıbbi mikoloji alanı ile sınırlandırılarak, güncel literatür bilgileri dahilinde tartışılacaktır.

Kaynaklar

1. Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, et al. Infections caused by *Scedosporium* spp. Clin Microbiol Rev 2008; 21: 157-97.
2. Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, et al. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. Stud Mycol 2007; 59: 1-10.

3. Gräfenhan T, Schroers HJ, Nirenberg HI, Seifert KA. An overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of nectriaceous fungi in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella*, and *Volutella*. *Stud Mycol* 2011; 68: 79-113.
4. Gräser Y, Kuijpers AF, Presber W, de Hoog GS. Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. *Med Mycol* 1999; 37: 315-30.
5. Gräser Y, Kuijpers AF, Presber W, de Hoog GS. Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3329-36.
6. Hawksworth DL. Limitation of dual nomenclature for pleomorphic fungi. *Taxon* 2005; 53: 596-8.
7. Hyde KD, Zhang Y. Epitypification: should we epitypify? *J Zhejiang Univ Sci B* 2008; 9: 842-6.
8. International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code). <http://ibot.sav.sk/icbn/main.htm>
9. Samson RA, Varga J. What is a species in *Aspergillus*? *Med Mycol* 2009; 47 Suppl 1: S13-20.
10. Taylor JW. One fungus = One name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. *IMA Fungus* 2011; 2(2): 113-20.

MOLEKÜLER YÖNTEMLERDE KALİTE KONTROL

Prof. Dr. Arzu SAYINER

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Mikrobiyoloji ve enfeksiyon hastalıkları alanında devrim yaratan nükleik asit testleri (NAT), yüksek duyarlılık ve özgüllüklerinin yanı sıra hızlı sonuç vermeleri ve otomasyona uygulanabilirlikleri ile de son yıllarda rutin klinik tanı laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadırlar. NAT ile mikrobiyal etkenlerin hızlı ve özgül tanısı, kantitasyonu, yeni etkenlerin belirlenmesi, genotipleme, ilaç direnci analizleri ve birden çok etkenin eş zamanlı taranması gibi analizler yapılabilmektedir. Bu olanaklar, uygun tedavinin seçimi, hastalık prognozunun öngörülebilmesi ve enfeksiyonlar ile bireysel ve toplumsal mücadelede büyük avantajlar sağlamaktadır. Bu beklentilerin karşılanmasında NAT'nin doğru ve tekrarlanabilir sonuç vermesi ve bunu klinik açıdan anlamlı olacak kadar kısa sürede yapması son derece önemlidir. Dolayısıyla kullanılan test ve yöntemlerin standardizasyonu ve kalite kontrolü ön plana çıkmaktadır.

Nükleik asit testlerinin tanı amaçlı uygulandığı laboratuvarlarda yerine getirilmesi gereken bazı kuralları vardır. Bunlardan en önemlisi kullanılan test yönteminin onaylanması aşamasıdır. Bu amaçla aşağıdaki konular göz önünde tutulmalıdır:

- Yeni bir laboratuvar tasarımı (*in-house*) test kullanılacaksa, testin özellikleri belirlenmelidir (**validasyon**). Bu özellikler; duyarlılık, özgüllük, doğruluk, tekrarlanabilirlik ve kantitatif testler için doğrusallıktır.
- Ticari bir test, üretici önerileri doğrultusunda kullanılacaksa, üreticinin belirttiği performans özelliklerinin laboratuvar da geçerli olduğu gösterilmelidir (**verifikasyon**). Bunun için doğruluk, tekrarlanabilirlik ve kantitatif testler için doğrusallık 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 ve düşük düzeyde hedef nükleik asit içeren en az iki pozitif kontrolün izlenmesi ve elde edilen kantitatif sonuçların değerlendirilmesi gerekir.

- Dış kalite kontrolü (Yeterlilik testleri): Laboratuvarın genel performansının değerlendirilmesini, laboratuvarın ve kullanılan yöntemin diğer katılımcılarla karşılaştırılabilmesini sağlar.

İzlem sırasında sorun saptanırsa, düzeltici eylem(ler) yapılmalıdır. Bu şekilde, sorunun kaynağı tespit edilerek bir daha tekrarlanmaması için önlem alınabilir. Düzeltici eylemlerin sonuçlar üzerindeki etkileri de 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 teste 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

1. 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)
2. Burd EM. **Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases.** Clin Microbiol Rev 2010; 23(3):550-76
3. Health Protection Agency. UK Standards for Microbiology Investigations. Good laboratory practice when performing molecular amplification assays. 2011; http://www.hpa.org.uk/webc/hpawebfile/hpaweb_c/1317131675624
4. Ozacar T. Moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında kalite kontrolü: Programlar ve akreditasyon. Moleküler Tanı Derg 2007; 3: 18-21.
5. Rabenau HF, Kessler HH, Kortenbusch M, et al. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. 2007; 40: 93-8.
6. Sayiner AA. Kantitatif viral nükleik asit testleri: Değerlendirme parametreleri ve yöntemleri. Moleküler Tanı Derg 2007; 3: 59-65.
7. Tibbets MW, Gomez R, Kannangai R, Sridharan G. Total quality management in clinical virology laboratories. Indian J Med Microbiol 2006; 24: 258-62.
8. Halling KC, Schrijver I, Persons DL. Test verification and validation for molecular diagnostic assays. Arch Pathol Lab Med 2012; 136(1): 11-3.
9. Emmadi R, Boonyaratnakornkit JB, Selvarangan R, et al. Molecular methods and platforms for infectious diseases testing a review of FDA-approved and cleared assays. J Mol Diagn 2011; 13(6): 583-604.

10. Holden MJ, Madej RM, Minor P, Kalman LV. Molecular diagnostics: harmonization through reference materials, documentary standards and proficiency testing. *Expert Rev Mol Diagn* 2011; 11(7): 741-55.
11. Madej RM, Davis J, Holden MJ, et al. International standards and reference materials for quantitative molecular infectious disease testing. *J Mol Diagn* 2010; 12(2): 133-43.
12. Rundell CA. Quality Control in Molecular Diagnostics. *IVD Technology* 2011; <http://www.ivdtechnology.com/article/quality-control-molecular-diagnostics>

PANELLER

PANEL 1: 27. YILINDA MOLEKÜLER TANI TESTLERİ: NE KADAR ETKİN KULLANILDI?

1983'TEN GÜNÜMÜZE MOLEKÜLER TANI TESTLERİNDE GELİŞMELER

Prof Dr. Rıza DURMAZ

*Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Moleküler
Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Sıhhiye/Ankara.*

Kary Mullis, 1983 yılında DNA üzerindeki hedef bölgelerin hızla çoğalmasını sağlayan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemini tasarlayıp geliştirdi. Bu başarıyla kendisine 1993 yılında Kimya dalında Nobel ödülü verildi. Bundan iki yıl sonra, 1985'te Saiki ve arkadaşları bu yeni metodu ilk defa orak hücreli anemi (sickle cell anaemia) hastalığının tanısında kullandı. 1987 yılında Kwok ve arkadaşları, PCR yöntemini kullanarak insan immün yetmezlik virusunu (human immunodeficiency virus, HIV) tanımladı ve bu, enfeksiyon hastalıklarının tanısında PCR uygulamasının ilk raporu oldu¹.

Geçen süre içinde nükleik asit amplifikasyon (NAA) yöntemleri çeşitlendi ve oldukça değişik alanlarda, hızla uygulama alanları buldu. Özellikle PCR bazlı moleküler teknikler mikrobiyoloji laboratuvarlarında daha da önemli tanı metodları haline geldi. PCR yönteminin "nested/semi-nested", multipleks, "broad range", revers-transkriptaz ve gerçek zamanlı PCR gibi değişik formatları geliştirildi. NAA yöntemlerinin nükleik asit dizilim bazlı amplifikasyon (nucleic acid sequence-based amplification), transkripsiyon bazlı amplifikasyon (transcription mediated amplification), zincir ayrıştırma çoğaltma (strand displacement amplification) gibi diğer versiyonları da uygulamaya girdi. Hedef olarak DNA yanında, genomik RNA, 16S-23S rRNA, mRNA gibi moleküller de kullanılmaya başlandı^{2,3}.

NAA yöntemleriyle enfeksiyon hastalıklarının tanısında yeni ufuklar açıldı. Proteomiks, genomiks ve "microarray" teknikleri, kan ve değişik vücut sıvılarında analitik incelemeler yapma olanağı sundu. Konvensiyonel yöntemlerle tanısı yavaş, pahalı ve hatta imkansız olan enfeksiyonların tanısı konulabilir hale geldi. Antibiyotik almış olan hastalardaki akut bakteriyel menenjitler, HACEK (Hemophilus, Actinobacillus, Cardiobacterium, Eikenella ve Kingella) grubu bakterilere bağlı endokarditler, *Chlamydia* spp. ve *Coxiella burnetii* gibi hücre kültürüne gereksinim duyan ve *Mycobacterium tuberculosis* gibi yavaş üreyen bakteriyel etkenlerin oluşturduğu

enfeksiyonların; hepatitler, HIV, sitomegalovirus (CMV) ve influenza gibi birçok viral enfeksiyonların; parazitler ve mikozların hızlı, duyarlı ve özgül tanıları konulabilirdi^{1,4-6}. Moleküler tanı testlerinin sağladığı en önemli avantajlardan birisi *kantitatif sonuç* verebilmeleridir. Kantitasyon özellikle HBV, HCV, HIV ve CMV enfeksiyonlarında, enfeksiyonun prognozu ve tedaviye yanıtın izlenmesi açısından önemlidir^{3,4}.

Moleküler yöntemlerle, birçok etkenin *antibiyotiklere direncinin* belirlenmesinde önemli ve yeni gelişmeler oldu. Başta hepatit B, HIV ve influenza A virusu olmak üzere birçok virus, çok ilaca dirençli *M.tuberculosis*, vankomisine dirençli enterokoklar (VRE), metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) ve metallo-beta-laktamaz (MBL) üreten gram-negatif bakteriler gibi birçok etkenin antibiyotik direnci, moleküler yöntemlerle saatler içerisinde saptanabilir duruma geldi^{4,7}.

Moleküler yöntemlerdeki gelişmeler, enfeksiyonların *epidemiolojisi* hakkındaki bilgilerde dramatik değişikliklere sebep oldu. Birçok yeni etken tanımlandı. Önceden bilinenlerden çoğunun sınıflamadaki yeri değişti. Herhangi bir bölge, ülke veya dünya genelinde enfeksiyon hastalıklarının insidans verilerinde güncellemeler oldu. Klinik önemi olan ve olmayan alt türlerin ayrımı yapılabildi. Dört alt türe ayrılan *Francisella tularensis*'in *F.tularensis* subsp *tularensis* alt türünün insanlarda daha virülen olduğu ve Kuzey Amerika'da bulunduğu, daha az virülen olan *F.tularensis* subsp *holarctica* alt türünün ise Kuzey Amerika yanında Avrupa ve Asya'da da dağılım gösterdiği saptanabildi⁸. 16S rRNA gen diziliminin amplifikasyonu ve dizi analizi çalışmalarının sonucunda *Ehrlichia equi*, *Anaplasma phagocytophilum* olarak yeniden sınıflandırıldı; *Bartonella* cinsi içinde 22'den fazla tür veya alt tür belirlendi⁹. Moleküler tiplendirme yöntemleriyle enfeksiyonların kaynağı, bulaş yolları ve bulaşın derecesi anlaşılabilir. Salgınların sporadik vakalardan ayrımı yapılabildi. Dış kaynaklı etkenin yeniden alınmasıyla oluşan tekrarlayan enfeksiyonlar, endojen kaynaklı reaktivasyonlardan ayırt edilebilir hale geldi.

Moleküler tekniklerdeki gelişmeler *parazit-konak ilişkisi*, *virülsans ve patogeneze* hakkındaki bilgilerimizi artırdı. Özgül bir etkenin farklı konaklarda oluşturduğu değişik klinik tabloların sebebinin anlaşılmasına yardımcı olabilecek veriler alındı. Mikroorganizmalar arasındaki cins, tür, alt tür veya genotip düzeyinde gözlenen virülsans farklılıklarının anlaşılmasına olanak sağlandı⁹. Bunun yanı sıra moleküler yöntemler, yüksek özgüllük ve duyarlılıkları nedeniyle enfeksiyonlara tanı konulamama riskini azalttı. Salgın ve biyoterörizm atakları başta olmak üzere toplumsal ve hastane kaynaklı enfeksiyonların erken tanısı, kontrolü ve etkin tedavisi mümkün hale geldi. Uygunsuz tedavi, antibiyotiklerin aşırı kullanımı ve direnç gelişiminin önüne geçilmesine önemli oranda katkı sağlandı^{1,2}.

Teknolojik gelişmelere paralel olarak, başlangıçta bu yöntemlerde ortaya çıkan çapraz kontaminasyon kaynaklı hatalı pozitif sonuçlar, düşük duyarlılıklar ve sonuç gözlemede yaşanan problemler büyük ölçüde elimine edildi. Amplifikasyon sonucunu gözlemede kullanılan agaroz jel elektroforezi, yerini, tüpün kapağını açmadan reaksiyona eş zamanlı olarak gelişen sinyallerin değerlendirmesine bıraktı. Örneklerdeki inhibitörlere bağlı hatalı negatif sonuçların belirlenmesi için iç (internal) kontroller kullanıldı. Manuel olarak yapılan nükleik asit ekstraksiyon işlemleri ve buna bağlı olarak gerekli olan fiziki bölümlere ayrılmış laboratuvar mekânları yerine, ekstraksiyon, amplifikasyon ve sonucun tamamen kapalı tek bir cihazla yapılabildiği otomatize uygulamalar geliştirildi. Böylece yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri arttı; geniş ve bölmeli fiziki mekân gereksinimi azaldı ve testlerin sonuç verme süresi daha da kısaldı. Moleküler testlerle alınan sonuçların klinik yararlılığı değerlendirilmeye başlandı. Yöntemlerde yalnızca iç kalite kontrolleri değil, aynı zamanda dış kalite kontrol programlarından yararlanılır hale geldi^{7,10}.

Amplifikasyon sonrası analiz yöntemlerinde de önemli yenilikler oldu. Klasik Sanger dizileme yöntemi yanında, yeni nesil dizileme yöntemleri (örn. pirosekanslama) geliştirildi. Ters hibridizasyon ve lumineks yöntemleri daha yaygın kullanılmaya başlandı. Etken mikroorganizmanın tüm genom sekansının çıkarılması, “matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry” (MALDI-TOF MS) ve “microarray” bazlı analizlerin sağladığı bilgilerle enfeksiyon hastalıklarında yeni ufuklar açıldı. Aynı anda bir mikroçip üzerinde dirençten sorumlu yüzlerce farklı mutasyonların saptanabilmesi mümkün hale geldi. Son yıllarda, mikro-akışkanlar ve nano teknolojiye muazzam ilerlemeler, bu teknolojileri yakın gelecekte klinik tanıda köşe taşı olmaya aday durumuna getirdi. İnert silika, metal veya kristallerden yapılmış yuvarlak, *DNA ve protein fonksiyonel nanopartiküller* (functional nanoparticles; FNP) hibridizasyon problemleri gibi kullanılmaya başlandı. Bu problemler, “single-nucleotide polymorphism (SNP)” taramaları yanında, kanser, enfeksiyonlar ve kardiyovasküler hastalıkların biyolojik göstergelerini araştırmada büyük potansiyel oluşturdu. Bu gelişmeler, enfeksiyon hastalıklarının daha kesin ve etkili tedavisine olanak sağladı^{3,4}.

Bütün bu gelişmeler sonucunda tanıya, direncin tespitine ve alt tiplendirmeye yönelik çok sayıda ticari kit geliştirildi. Başlangıçta tek etkene yönelik olarak tasarlanan sistemler yanında, bir tüp içerisinde birden fazla hedef genin çoğaltılmasına olanak veren multipleks amplifikasyon kitleri hazırlandı. Bunlardan en çarpıcı olanlarından birisi, Roche firması tarafından geliştirilen 40 farklı bakteri ve fungal patojeni kandan doğrudan tanımlayabilen çok parametrelili PC,R uygulaması oldu⁴. Geliştirilmiş olan ticari kitler etkenlere göre gruplandırıldı: HBV ve HCV enfeksiyonları moleküler tanı kitleri, HIV enfeksiyonları moleküler tanı kitleri, HPV enfeksiyonları moleküler

tanı kitleri, influenza virus enfeksiyonları moleküler tanı kitleri, tüberküloz moleküler tanı kitleri, cinsel temasla bulaşan hastalıklar moleküler tanı kitleri, *Chlamydia* ve gonore enfeksiyonları moleküler tanı kitleri, MRSA tanı kitleri, VRE tanı kitleri ve diğer enfeksiyon hastalıkları moleküler tanı kitleri gibi.

Moleküler tanı testleri, laboratuvarların birçoğunda yaygın olarak kullanılmaya başlandı. Bu gelişmeler, moleküler mikrobiyoloji tanı laboratuvarında hangi alanda, hangi durumlarda, hangi testlere öncelik verileceği gibi önemli bir problemi gündeme getirdi. Bu panelde, kit formatındaki moleküler tanı testlerinin viroloji, bakterioloji ve parazitolojideki kullanımları, “nerede”, “ne zaman” ve “nasıl” soruları kapsamında tartışılacak; yaygın kullanılan patojenler açısından tanı algoritmasındaki yerleri belirlenecek ve maliyet-etkinlikleri konusunda bilgiler sunulacaktır.

Kaynaklar

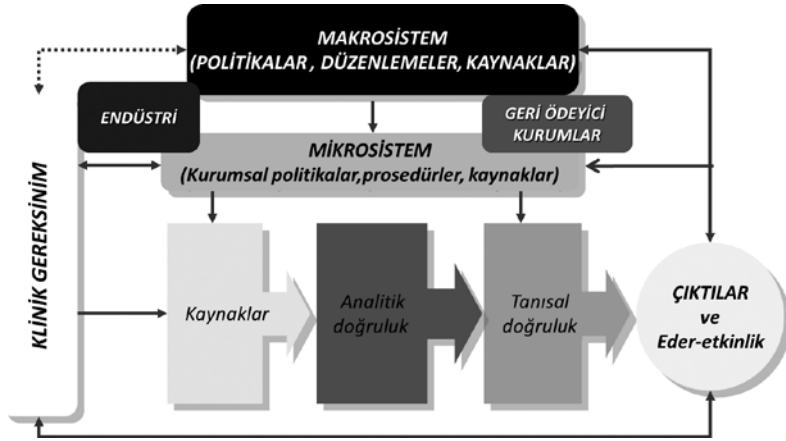
1. Millar BC, Xu J, Moore JE. Molecular diagnostics of medically important bacterial infections . Curr Issues Mol Biol 2007; 9: 21-40.
2. Bustin SA, Kessler HH. Amplification and detection methods, pp: 53-66. In: Kessler HH (ed), Molecular Diagnostics of Infectious Diseases. 2010, Druckhaus Thomas Müntzer, Germany.
3. Muldrew KL. Molecular diagnostics of infectious diseases. Curr Opin Pediatr 2009; 21(1): 102-11.
4. Weile J, Knabbe C. Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. Anal Bioanal Chem 2009; 394: 731-42.
5. Procop GW. Molecular diagnostics for the detection and characterization of microbial pathogens. Clin Infect Dis 2007; 45 Suppl 2: S99-S111.
6. Kemp M, Jensen KH, Dargis R, Christensen JJ. Routine ribosomal PCR and DNA sequencing for detection and identification of bacteria. Future Microbiol 2010; 5(7): 1101-7.
7. Forbes BA. Introducing a molecular test into the clinical microbiology laboratory: development, evaluation, and validation. Arch Pathol Lab Med 2003; 127(9): 1106-11.
8. Fey PD, Dempsey MM, Olson ME, et al. Molecular analysis of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* and *holarctica*. Am J Clin Pathol 2007; 128(6): 926-35.
9. Breitschwerdt EB. Molecular diagnosis of infectious diseases: The good, the bad and the ugly. <http://www.galaxydx.com/web/pdfs/MolecularDiagnosis.pdf>
10. Hayden RT. In vitro nucleic acid amplification techniques, pp: 43-69. In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds), Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice. 2004, ASM Press, Washington, DC.

MOLEKÜLER TANI TESTLERİNİN VİROLOJİDEKİ UYGULAMALARI

Prof. Dr. Hakan ABACIOĞLU

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Bu bölümde, geçtiğimiz 27 yıl içinde moleküler testlerin virolojideki ne oranda etkin kullanıldığı sorusu, bir tanısal testin kullanıma girme sürecine etkili parametreler açısından ele alınmaktadır. Süreç klinik gereksinimin ortaya çıkması/tanımlanması ile başlar (Şekil 1).



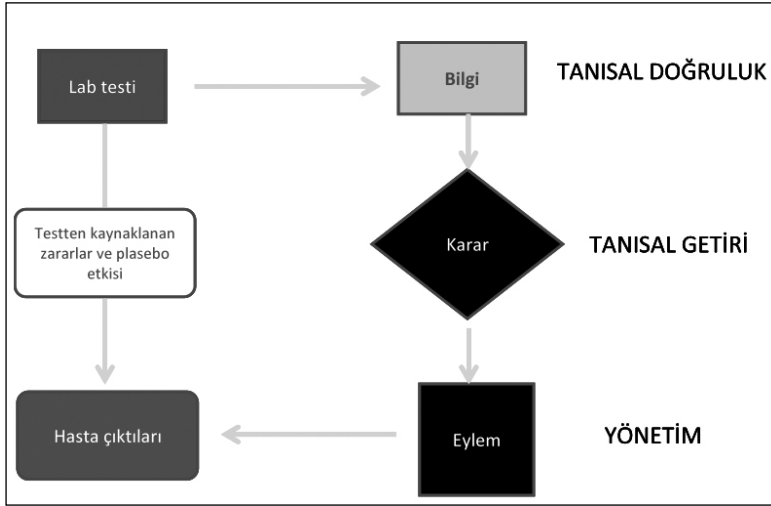
Şekil 1. Bir testin kullanıma girme sürecinde etkili unsurlar

Kaynakların kullanılabilirliği ve uygunluğu belirlendikten sonra testin analitik (teknik) ve tanısal (klinik) doğruluğu incelenir. Bir sonraki aşama testin çıktıları ile maliyetinin irdelenmesidir. Çıktılar, tıbbi girişimlerin sağlık ve maliyet yönünden sonuçları olarak tanımlanmaktadır¹. Bir laboratuvar testi temel olarak 3 çıktı açısından irdelenebilir: (i) Tanısal getirisi (diagnostic yield), (ii) hasta yönetimindeki etkileri ve (iii) hasta çıktıları (Şekil 2). Test önceden kullanılan test(ler)in yerine geçecek ise, yeni testin bu 3 unsurda ne tür değişikliklere neden olduğu irdelenmelidir.

Tanısal getiri, testin analitik ve tanısal doğruluğu, diğer bir deyişle testin performans göstergeleri ile ilişkilidir. Bunlar arasında analitik duyarlılıkta, yinelenebilirlikte, niceliksel testler için doğrusalılıkta iyileşme ve sonuç verme süresinde kısalma sayılabilir.

Hasta yönetimi açısından mortalite ve morbiditede azalma, hastanede kalış süresinde kısalma, komplikasyon hızında azalma, gereksiz girişimleri önleme gibi çıktılar ele alınabilir¹⁻³. Hasta çıktıları açısından ise yaşam kalitesi, stigmatizasyon, anksiyete, doyum, vb unsurlardaki değişimler incelenebilir¹.

Moleküler testlerin tanısal getirisine yönelik çalışmaların literatürde görece sık olmasına karşın, hasta yönetimine ve hasta çıktılarına olan etkilerine yönelik veri yok denecek kadar azdır. Panelin bu kısmında, moleküler testlerin en yaygın kullanıldığı üç klinik alandan, hepatitler, cinsel yolla bulaşan hastalıklar ve solunum yolları enfeksiyonları, seçilen örnekler üzerinden çıktılar değerlendirilecektir. Bu bağlamda, antijen testlerinin (örneğin, HCV *core* antijen testi, hızlı influenza A testleri, vb) nükleik asit tabanlı testlerin (NAT) yerine kullanılıp kullanılmayacağı tartışılacaktır.



Şekil 2. Bir testten beklenen temel çıktılar

Kaynaklar

1. Bruns DE. Laboratory-related outcomes in healthcare. Clin Chem 2001; 47(8): 1547-52.
2. Deeks J. Studying the impact of tests. Diagnostic Workshop, 2006. <http://www.cebm.net/?o=1083> (Erişim tarihi: 10.05.2012)
3. O’Kane DJ, Ebert TA, Hallaway BJ, et al. A laboratorian’s perspective on evaluation and implementation of new laboratory tests. Clin Chem 1997; 43(9): 1771-80.

MOLEKÜLER TANI TESTLERİNİN PARAZİTOLOJİDEKİ UYGULAMALARI

Prof. Dr. Mehmet TANYÜKSEL

Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanında son iki dekatta kaydedilen gelişmeler, diğer bilim dallarında olduğu gibi tıbbi parazitolojide de moleküler tekniklerin kullanımında önemli uygulama alanları bulmuştur. Paraziter hastalıkların tanısında tüm dünyada klâsik yöntemlerin yanı sıra moleküler yöntemler de kullanılmaktadır. Paraziter etkenlerin tanısında basit, yüksek duyarlılıkta, ekonomik ve hızlı yöntemlerin kullanılması önemlidir. Tablo 1’de de özetlendiği gibi, ülkemizde sık görülen ve tanısında sorunlar yaşanan parazitler için geleneksel ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır; her yöntemin kendine göre de avantaj ya da dezavantajları vardır. *Entamoeba histolytica*/*E.dispar*, *Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* spp., *Cryptosporidium* spp., *Pneumocystis jirovecii* gibi protozoonların tanısında kullanılan yöntemlerle ilgili tartışmalar, diğer parazitlerin bir adım önüne geçmiştir.

Tanıda moleküler yöntemlerin etkin kullanılması için bazı soruların göz önünde tutulması önemlidir:

1. Ülkemizde paraziter hastalıkların sıklığı nedir?
2. Paraziter hastalıkların tanısındaki zorluklar nelerdir? Kullanılan klâsik yöntemlerin yeterliliği nedir, ilâve yöntemler gerekli midir?
3. Moleküler yöntemler için maliyet etkin midir, ekonomik boyutu nedir? Biz moleküler yöntemler konusunda kaynak israfında bulunuyor muyuz?
4. Paraziter hastalıklar için kullanılan moleküler yöntemlerin SUT’ta ödenme durumu nedir?
5. Moleküler testlerde yeterlilik ve yapılabirlik (deneyim, ekip, ekipman, idame vb.) gerçekçi boyutta nedir?
6. Moleküler testlerin duyarlılık/özgüllük/güvenilirliği/yaygınlığı nasıldır?
7. Standardizasyon/optimizasyon (in-house, farklı primer, farklı gen bölgeleri, farklı protokoller vb.) konusunda ne durumdayız?
8. Kalite kontrol (iç/dış) uygulanabiliyor mu?
9. Her laboratuvar her moleküler yöntemi yapmalı mıdır? Referans laboratuvar ihtiyacı nasıl karşılanmalıdır?

Tablo 1. Türkiye’de paraziter hastalıkların tanısında kullanılan geleneksel ve moleküler yöntemler

ETKEN	Geleneksel Yöntemler	Moleküler Yöntemler	Düşünceler
<i>Toxoplasma gondii</i>	Seroloji	PCR, real-time PCR	Seroloji aslında tek başına yeterlidir, ancak kritik olgularda yorumlamalarda hatalı ve yanlış yaklaşımlar görülmektedir. Özellikle immün yetersiz bireyler ve gebelerde akut toksoplazmoz tanısının doğrulanması için real-time PCR hızlı ve güvenilir yöntemdir.
<i>Leishmania</i> spp.	Mikroskopi, kültür, seroloji, rK39 dipstick	PCR, real-time PCR	Parazitin görülmesi için mikroskopi, epidemiyolojik ve taksonomi çalışmalarında tür ayrımı için izoenzim analizleri altın standart olsa da, <i>Leishmania</i> tür ayrımında moleküler yöntemler, hızlı ve pratik olmaları nedeniyle tercih edilebilir.
<i>Entamoeba histolytica/ E. dispar</i>	Mikroskopi, antijen saptama, seroloji	PCR, real-time PCR	<i>Entamoeba histolytica</i> / <i>E. dispar</i> ayrımında antijene azgöl EIA yanında hızlı ve güvenilir yöntemler PCR ve real-time PCR’dir.
<i>Acanthamoeba</i> spp., <i>Balamuthia mandrillaris</i> , <i>Naegleria fowleri</i>	Mikroskopi, kültür	Multipleks real-time PCR	Mikroskopide tanı oldukça zordur. Üç farklı türün aynı anda tanımlanmasına imkan tanıyan multipleks real-time PCR hızlı ve güveniliridir.
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Mikroskopi	Real-time PCR	Mikroskopide tanı oldukça zordur. Real-time PCR hızlı ve güvenilir yöntemdir.
<i>Microsporidia</i> spp.	Mikroskopi, IFA	PCR, real-time PCR	Mikroskopide tanı oldukça zordur. IFA oldukça güvenilir yöntemdir. Tanının doğrulanması ve tür ayrımını sadece moleküler yöntemler belirleyebilir.
<i>Plasmodium</i> spp.	Mikroskopi, antijen saptama, seroloji	Nested PCR, real-time PCR	Mikroskopi altın standarttır. Düşük parazitemilerde ve tür ayrımında moleküler yöntemler çok önemlidir.
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Mikroskopi, antijen saptama	PCR-RFLP, real-time PCR, multipleks PCR	Aslında asit-fast boyama ve antijen saptama yöntemleri (DFA) yeterlidir. Tür ayrımını sadece moleküler yöntemler belirleyebilir; epidemiyolojik çalışmalarda ve salgınlarda moleküler yöntemler hızlı ve güveniliridir.
<i>Giardia duodenalis</i>	Mikroskopi, antijen saptama, seroloji	Real-time PCR, multipleks PCR	Geleneksel olarak tanısı mikroskopi ile yapılır. Genotiplendirmede, salgınlarda ve mikroskopi sonuç yetersizliklerinde moleküler yöntemler önerilir.
<i>Babesia</i> spp.	Mikroskopi, antijen saptama, seroloji	Multipleks PCR real-time PCR	Düşük parazitemilerde ve tür ayrımında moleküler yöntemler çok önemlidir.

<i>Trichomonas vaginalis</i>	Mikroskopi, kültür	Real-time PCR	Aslında mikroskopi ile tanıya gitmek pekâlâ mümkündür. Tanının doğrulanmasında ve kültüre nispeten zaman kazanılmasında moleküler yöntemler önerilir.
<i>Blastocystis hominis</i>	Mikroskopi	PCR	Dışkı örneklerinin kalıcı boya preparatlarında tanısını koymak mümkündür. Tür ayrımını sadece moleküler yöntemler belirleyebilir; epidemiyolojik çalışmalarda ve salgınlarda bulaş kaynağının araştırılmasında moleküler yöntemler hızlı ve güvenilirdir.

Kan ve doku yerleşimli protozoonlar

Her ne kadar sıklığı azalmış olsa da yaptığı klinik tahribat nedeniyle *Babesia* spp. ve *Plasmodium* spp. gibi eritrosit içi yerleşim gösteren etkenlerin periferik yayma preparatlarında düşük derecede parazitemi ve subklinik semptomlar nedeniyle mikroskop ile morfolojik ayrımı bazen mümkün değildir. Türkiye’de iç organ leşmanyaz (VL) ve deri leşmanyaz (KL) tanıları klâsik olarak kemik iliği ve deri lezyonundan hazırlanan Giemsa boyalı yayma preparatların mikroskobik bakışı ile yapılmaktadır. NNN besiyeri ve mikrokültür yöntemleriyle de parazit tanımlanabilir. Ayrıca IFA, ELISA ile rK39 hızlı tanı testlerinden yararlanılmaktadır. PCR, ülkemizde *Leishmania* parazitini birçok değişik klinik örnekte ve tüm leşmanyaz klinik şekillerinde saptayabilecek kapasitededir (PCR-RFLP, QT-NASBA, vd).

Bir diğer önemli nokta da; özellikle moleküler yöntemlerin toksoplazmoz şüpheli hastalardaki tanı değerinin oldukça yüksek olmasıdır. Vücut sıvılarında ve dokularında *T.gondii* DNA saptanması için PCR amplifikasyonu yapılabilmektedir. Moleküler yöntemler; kan, idrar, BOS, vitreus ve aköz sıvı, BAL, plasenta ve fetal doku örneklerinde de başarıyla uygulanabilmektedir.

Keza kornea kazıntı örneklerinde *Acanthamoeba* spp. tanısını her ne kadar mikroskop ile koymak mümkün iken, deneyimli mikroskopi yapılamadığı durumlarda oldukça zordur. Moleküler yöntemler tür ayrımı için hızlı ve güvenilirdir. Özellikle immün yetmezliği olan bireylerde genellikle akla dahi gelmeyen bazı protozoonların (*P.jirovecii* ve *Microsporidia* spp. vb) tanısında zaman çok önemlidir. Bu durumlarda, mutlaka bu örneklerin doğru işlenmesi ve doğru tanının konulmasında moleküler yöntemlerden yararlanılması gereklidir.

İntestinal yerleşimli protozoonlar

En çok bilinen ancak tanısında en çok hata yapılan mikroorganizmalar olan intestinal yerleşimli parazitlerin tanısı, genellikle konsantre ve/veya boyanmış preparatların ışık mikroskopuyla incelenmesi temeline dayanmaktadır. Mikroskopinin amacı patojenleri, patojen olmayan türlerden ayırt etmek ve örnekte bulunan çeşitli artefaktların arasından etkenleri tanımlamaktır. İntestinal yerleşimli *Giardia intestinalis* ve *E.histolytica*, patojeniteleri ve görülme sıklıklarına bağlı olarak ciddi sorunlara neden olan ve dünya çapında en sık görülen protozoan enfeksiyonlarıdır. Ayrıca, *E.histolytica*, *G.intestinalis* ve *Cryptosporidium* spp. gibi patojenleri saptamaya yarayan antijen saptama testleri, enzim immünoassay (EIA), direkt floresan antikor yöntemleri (DFA) ve immüno-kromatografik yöntemler gibi diğer yöntemler de bulunmaktadır. Kültür, sınırlı durumlarda kullanılabilir. Özellikle dışkı örneklerinde antijen saptamaya yönelik kitlerde (ELISA gibi) tanı yönüyle sıkıntılar olduğu yeni ve eski enfeksiyonların ayırımında sorunlar olduğu ülkemizde yaygın olarak bulunan bazı *E.dispar* enfeksiyonlarında yalancı pozitifliklerin yaşandığı görülmekte; duyarlılığı ve özgüllüğü konusunda ciddi endişeler bulunmaktadır. Hızlı tanı testlerinde istenilen düzeye henüz ulaşamamıştır. Postgenomik çağ gelişiminde moleküler tanı teknolojisinin kullanılması ile büyük değişim sağlanması umulmaktadır. Şimdilerde real-time PCR yöntemi, patojenleri saptamak için kullanılan hızlı, duyarlı ve yeni gelişen bir teknolojidir. Klinik laboratuvarlarda rutin kullanım için PCR yöntemi, basit örnek hazırlama prosedürü ve fiksatifli materyallerin (formol hariç) kullanımına olanak sağlamasıyla ideal şartlara ulaşmıştır. Klâsik PCR uygulamalarının ise zahmetli olmaları, zaman almaları, pratik uygulama zorlukları, daha fazla kontaminasyon riski ve farklı yorumlanmaları gibi faktörler real-time PCR uygulamalarına gereksinimi arttırmıştır. Dışkı örneklerinde özgül *E.histolytica* antijenini saptayan ELISA ya da DNA'sını saptayan PCR testleri (real-time PCR çok daha duyarlıdır) kesin tanı için şimdilik en bilimsel seçeneklerimizdir. Ülkemizde sağlıklı, doğru ve standart biçimde yapılamayan ve çoğunlukla da mikroskopik bakıya dayalı olduğundan yanlış tanımlanan, doğruluğundan kuşkulu amibiya bildirimleri mevcuttur ve bu konuda yapılmış daha bilimsel çalışmalara gereksinim vardır. Günümüzde *E.histolytica*'nın yanı sıra *G.intestinalis* ve *Cryptosporidium* türlerini saptayabilen multipleks real-time PCR yöntemleri de tanımlanmıştır.

Türkiye'de parazitler hastalıklarının tanısında moleküler testlerin performansı

Ülkemizde 21 üniversite/kurumdaki Parazitoloji AD/BD/Laboratuvarından elde edilen anket sonuçlarına göre; ortalama 2.6 öğretim üyesi ile 2.4 laboratuvar teknisyeninin çalıştığı ve moleküler testler için çoğunlukla 10-20 saat/ay ayrıldığı sonuçlarına ulaşılmıştır. Söz konusu laboratuvarlarda rutin yöntem/testler içinde en sık dışkıda

nativ / lugol / kalıcı boya incelemesi yapıldığı; serolojik olarak da en sık ELISA, IFA ve IHA testlerinin toksoplazmoz, kist hidatik ve amibiyaz hastalıklarında kullanıldığı görülmüştür. Bu ankette ayrıca 21 laboratuvarın 13'ünde moleküler testlerin uygulandığı, bunun da rutin (7 laboratuvar) ve araştırma (9 laboratuvar) amaçlı olarak yapıldığı izlenmiştir. Rutin çalışmalarda in-house olarak en sık toksoplazmoz ve leishmanioz enfeksiyonlarında ortalama 25-30 test/ay; ticari olarak toksoplazmoz, amibiyaz ve leishmanioz enfeksiyonlarında ortalama 25 test/ay yapıldığı saptanmıştır. Yine araştırma amaçlı olarak 21 laboratuvar içinde 9 laboratuvarın moleküler testlerden yararlandığı ve en sık olarak amibiyaz, kriptosporidyo ve *Acanthamoeba* spp. enfeksiyonları tanısında çalışıldığı bildirilmiştir. Ankete katılan 21 kurumdan 9'unda konvansiyonel PCR, 8'inde RT-PCR, 5'inde ise her iki yöntemin kullanıldığı; sadece 3'ünde sekans analizi yapılabildiği, 7 kurumda iç kalite kontrol, 5 kurumda dış kalite kontrolü uygulanabildiği sonucuna ulaşılmıştır. Yine 21 kurumdan 8'inde moleküler testler yapılamamaktadır. Moleküler testlere en çok sırasıyla toksoplazmoz, amibiyaz, leishmanioz, *Acanthamoeba* spp. enfeksiyonları, kriptosporidyo hastalık/etkenlerinde ihtiyaç duyulduğu gözlenmiştir. Ayrıca, 21 laboratuvarın 11'inde referans laboratuvar olma isteği olduğu ve bunlar içinde de moleküler testler için en sık toksoplazmoz, leishmanioz, amibiyaz ve kriptosporidyo tanısında isteğin olması dikkat çekicidir.

Sonuç

Aslında hep tekrar edildiği gibi laboratuvar-klinisyen işbirliği ve ortak hareket tarzı önemlidir. Bu sinerji her zaman omuzlarımızdaki yükü hafifletecek, zaman ve maliyet konusundaki israfı önleyecektir. Ülkemizdeki laboratuvarların %60'ında parazit hastalıkların tanısı için moleküler testler yapılırken oldukça geniş kapsamlı ve güvenilir sonuçlara ulaştıkları gözlemlenmiştir. Önemli olan moleküler yöntemlerin nasıl, nerede, ne zaman ve kimlerin yapması gerektiği enine boyuna tartışılmalı; gerekirse bu konuda ilgili dernekler öncü rol oynayarak kullanılmaları yönünde eğitim ve çalıştaylar düzenlenmeli, algoritmalar hazırlanmalıdır. Aksi halde her koşulda bu popüler yöntemlerle bilimsel yarar ve gelişmeden ziyade dünyada bir pazar olacağımız açıktır.

Kaynaklar

1. Aydın AF, Besirbellioğlu BA, Avcı İY, et al. Classification of *Giardia duodenalis* parasites in Turkey into groups A and B using restriction fragment length polymorphism. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 50: 147-51.
2. Bişkin Z, Yıldırım A, İnci A, Düzlü Ö. Parazitolojide teşhis amaçlı kullanılan moleküler biyolojik teknikler. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2011; 8(1): 43-51.

3. Caner A, Döşkaya M, Karasu Z, et al. The molecular diagnosis of cryptosporidiosis in fresh and formalin preserved fecal samples. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2009; 33(2): 120-4.
4. Dogruman-Al F, Kustimur S, Yoshikawa H, et al. Blastocystis subtypes in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(5): 724-7.
5. Döşkaya M, Caner A, Degirmenci A, et al. Degree and frequency of inhibition in a routine real-time PCR detecting *Pneumocystis jirovecii* for the diagnosis of pneumocystis pneumonia in Turkey. *J Med Microbiol* 2011; 60(Pt 7): 937-44.
6. Ertabaklar H, Türk M, Dayanir V, Ertuğ S, Walochnik J. *Acanthamoeba* keratitis due to *Acanthamoeba* genotype T4 in a non-contact-lens wearer in Turkey. *Parasitol Res* 2007; 100(2): 241-6.
7. Gürüz Y. Incidence and diagnosis of active toxoplasma infection among liver transplant recipients in Western Turkey. *Liver Transpl* 2008; 14(10): 1526-32.
8. Kilic A, Tanyuksel M, Sissons J, Jayasekera S, Khan NA. Isolation of *Acanthamoeba* isolates belonging to T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental samples in Ankara, Turkey. *Acta Parasitologica* 2004; 49 (3): 246-52.
9. Ozerdem D, Eroglu F, Genc A, Demirkazik M, Koltas IS. Comparison of microscopic examination, rK39, and PCR for visceral leishmaniasis diagnosis in Turkey. *Parasitol Res* 2009; 106(1): 197-200.
10. Özcel MA, Tanyüksel M, Eren H (ed). *Moleküler Parazitoloji*. 2009. Meta Basım Matbaacılık, İzmir.
11. Sakarya Y, Kar S, Tanyüksel M, et al. Detection of *Cryptosporidium* spp. in humans and calves through nested PCR and carbol fuchsin staining methods in Ankara, Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2010; 16(6): 977-80.
12. 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 minixon region. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53(3): 209-14.
13. Tanyuksel M, Ulukanligil M, Guclu Z, Araz E, Kuru O, Petri WA, Jr. Two Cases of Rarely Recognized Infection with *Entamoeba moshkovskii* Am J Trop Med Hyg 76(4):723-724, 2007.
14. Tanyuksel MA, Petri WA, Jr. Amebiasis. *Conn's Current Therapy*, edited by (eds.), Robert E. Rakel and Edward T. Bope, Saunders Elsevier, Philadelphia, 66-71, 2006.
15. Tanyüksel M, Kuru Ö. İntestinal ve ürogenital yerleşimli amipler, kamçılılar ve sıyalılar, s: 2092-130. Başustaoğlu A, Kubar A, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M (çeviri ed), *Klinik Mikrobiyoloji*. 2009, 9.baskı. Atlas Kitapçılık, Ankara.
16. Tanyuksel M, Petri WA Jr. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(4): 713-29.
17. Toz SO, Nasereddin A, Ozbel Y, et al. Leishmaniasis in Turkey: molecular characterization of *Leishmania* from human and canine clinical samples. *Trop Med Int Health* 2009; 14(11): 1401-6.

MOLEKÜLER TANI TESTLERİNİN BAKTERİYOLOJİDEKİ UYGULAMALARI

Doç. Dr. Alpaslan ALP

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Moleküler yöntemlerin keşfinden günümüze kadar geçen süreçte, enfeksiyon hastalıklarının tanısında önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Moleküler testler, hastalıkların tanısında ve takibinde rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarının en önemli tanı araçlarından biri haline gelmeye başlamıştır. Ancak moleküler testlerin hastalıkların tanısına sağladığı katkı, patojen mikroorganizmaların cinsine göre değişkenlik göstermektedir.

Hedef dizilerin hastada genellikle düşük konsantrasyonlarda bulunması nedeniyle, nükleik asit ve hedef sinyal çoğaltma yöntemleri viral hastalıkların tanısında çok değerli testler haline gelmiştir. Birçok çalışmadan elde edilen sonuçlara dayanarak yapılan yorumlar, PCR yöntemlerinin hücre kültürlerinde virus izolasyon yöntemlerinden daha duyarlı ve daha özgül olduğu konusunda birleşmektedir. Bugün gelinen noktada, hasta örneklerinden bilinen birçok insan virusu saptanabilmekte ve tiplendirilebilmektedir. Böylece elde edilen bilgiler profilaktik tedavi, tedavinin şekillendirilmesi ve hastanın takibi konusunda belirleyici olmaktadır.

Moleküler tanı testlerinin bakteriyolojide kullanımı ise, viral patojenlerle kıyaslandığında daha sınırlı kalmaktadır. Bunun en önemli nedeni, bakteriyolojik tanıda altın standart olan kültür yöntemlerinin, moleküler testlerin varlığına rağmen, vazgeçilmez olmasıdır. Bir başka deyişle moleküler tanı testleri rutin bakteriyoloji laboratuvarına ümit edilen katkıyı verememektedir.

Moleküler tanı testlerinin bakteriyolojik uygulamalarını dört gruba ayırmak mümkündür. Bunlar, bakteriyel patojenlerin tanısı, ilaç dirençlerinin saptanması, patojenlerin tür düzeyinde tanımlanması ve genotiplendirilmeleridir. Moleküler testlerin tanı amacıyla kullanımlarına bakıldığında; özellikle *M.tuberculosis*, *H.pylori*, vankomisine dirençli enterokoklar (VRE) ve metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) gibi patojenlerin tanısında kullanım alanları bulunduğu görülmektedir. Dikkat çekici nokta, moleküler testlerin hız avantajının, ancak tanı ve ilaç direnci saptanmasının birlikte yapıldığı durumlarda ortaya çıkabildiğidir. Moleküler testler bakteriyoloji laboratuvarında sadece tanı amaçlı kullanıldığında, ortalama bir günlük üreme süreleri ve düşük maliyet nedeniyle kültür ile yarışmamaktadır. Ancak moleküler testler tanı ile birlikte direnç tayini için de kullanıldığında, kültür yöntemlerine önemli bir alternatif haline

gelebilmektedir. Bunun en güncel örnekleri *M.tuberculosis* tanısı ile rifampisin veya izoniazid direnç tayininin birlikte yapılması, *H.pylori* tanısı ile klaritromisin direnç tayinin birlikte yapılması ve VRE tanısında moleküler testlerin kullanımıdır.

Moleküler testlerin tanı amaçlı kullanımlarında avantajlı olabilecekleri diğer bir alan, multipleks PCR uygulamalarıdır. Özellikle solunum yolu patojenlerinin tanısı veya sepsis etkeni olabilecek patojenlerin tanısında multipleks PCR uygulamaları mevcuttur. Ancak bu tür multipleks PCR uygulamaları kültür yöntemlerine göre çok daha pahalı oldukları için rutin kullanımları yaygınlık kazanamamıştır.

Moleküler testlerin en büyük avantajlarından birisi, hızlı bir şekilde sonucun alınabilmesidir. Teorik olarak, klinik örneklerin laboratuvara ulaştırılmasından sonra bir veya iki gün içinde PCR sonucunun verilmesi mümkündür. Bakterioloji laboratuvarında moleküler testlerin hız avantajının en belirgin olarak kullanılabileceği alan, tüberküloz tanısıdır. Tüberkülozun laboratuvar tanısında altın standart olarak kabul edilen yöntem kültür yöntemidir. Özellikle sıvı bazlı yarı otomatize veya tam otomatize kültür sistemleri, konvansiyonel kültür yöntemlerine göre daha kısa sürede sonuç verebildikleri için yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Ancak tüberküloz tanısının 1-2 gün gibi kısa bir sürede konabilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle güvenilir ve hızlı tanı yöntemlerine ihtiyaç vardır. Moleküler yöntemler bu ihtiyacı karşılamak için potansiyel adaylar olarak ortaya çıkmışlardır. Tüberküloz tanısında kullanılan moleküler yöntemlerin özgüllükleri, yapılan birçok çalışmada yüksek bulunmuştur. Duyarlılık konusunda ise, uygulanan teste göre, oldukça değişik sonuçlar elde edilebilmektedir. Farklı duyarlılık sonuçları elde edilmesinde, kullanılan PCR yönteminin yanı sıra, örnek türü ve örnek içindeki basil miktarı da önemli rol oynamaktadır. Teorik açıdan bakıldığında, örnek içinde birkaç basilin bulunması durumunda bile PCR sonucunun pozitif bulunabileceği söylenmektedir. Ancak pratik uygulamada, birçok çalışmada tüberküloz PCR duyarlılığının bu kadar yüksek olmadığı gösterilmiştir. Bunun nedenleri arasında *M.tuberculosis* DNA'sının iyi bir şekilde açığa çıkarılamaması, örneğin işlenmesi sırasında basillerin kaybedilmesi veya örnek içinde inhibitör maddelerin bulunması sayılabilir.

Yayma-pozitif örneklerle yayma-negatif örneklerden elde edilen PCR duyarlılıkları farklılık göstermektedir. Yayma-pozitif örneklerde PCR duyarlılığı kabul edilebilir düzeylerdeyken, yayma-negatif örneklerde duyarlılık oranı çok düşmektedir. Yayma-pozitif bir örneğin PCR sonucu da pozitif bulunduğunda, kültür sonucu beklenmeden kesin tanı konmuş olmaktadır. Bir başka ifadeyle, yayma sonucunda elde edilen "olası tüberküloz" tanısı, PCR sonucuyla doğrulanarak "kesin tüberküloz" tanısı konabilmektedir. Bu durumda, tüberküloz tanısı amacıyla kullanılan moleküler

yöntem, tanıyı tamamlayıcı veya doğrulayıcı bir rol üstlenmektedir. Ancak bu rol, “olmazsa olmaz” bir rol değildir. Birkaç hafta içerisinde kültür yöntemi zaten altın standart yöntem olarak bu rolü üstlenecektir. Bu süreçte de tedavi başlanmış olacağı için bir zaman kaybı söz konusu olmayacaktır. Tüberkülozlu bir hastaya ait ve yayma sonucu negatif olan örnekte ise PCR sonucunun pozitif bulunma olasılığı %50’nin altındadır. Bir başka deyişle yayma-negatif tüberküloz örneklerinde PCR sonucunun kesin tanıya katkısı çok düşüktür. Bu tip örneklerde kesin tanı, kültür sonucunun alınmasıyla konmaktadır.

Bugün gelinen noktada, bakteriyel patojenlerin tanısında moleküler yöntemlerin kültür yöntemlerine kuvvetli bir alternatif olmadığını görmekteyiz. Ancak uygun imkanları olan laboratuvarlarda moleküler yöntemler destekleyici testler olarak kullanılabilir. Belirli bakteriyel patojenler için tanı ve direnç tayininin birlikte yapılmasının, moleküler testlerin bakteriyolojideki en uygun uygulama alanı olduğu görülmektedir.

Kaynaklar

1. Chudy M, Hewlett I, Saldanha J, et al. Technical considerations for the performance of nucleic acid amplification technology (NAT). *Biologicals* 2003; 31: 153-9.
2. Dinnes J, Deeks J, Kunst H, et al. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol Assess* 2007; 11: 1-196.
3. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 165-256.
4. Forbes BA. Introducing a molecular test into the clinical microbiology laboratory. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 1106-11.
5. Fortina P, Surrey S, Kricka LJ. Molecular diagnostics: hurdles for clinical implementation. *Trends Mol Med* 2002; 8: 264-5.
6. Greco S, Girardi E, Navarra A, et al. Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax* 2006; 61: 783-90.
7. Greco S, Rulli M, Girardi E, et al. Diagnostic accuracy of in-house PCR for pulmonary tuberculosis in smear-positive patients: meta-analysis and metaregression. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 569-76.
8. Lange C, Mori T. Advances in the diagnosis of tuberculosis. *Respirology* 2010; 15: 220-40.
9. Mackay IM. Real time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 190-212.
10. Pai M, O’Brien R. New diagnostics for latent and active tuberculosis: state of the art and future prospects. *Semin Respir Crit Care Med* 2008; 29: 560-8.
11. Pfaller MA. Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 312-8.
12. Sotgiu G, Ferrara G, Matteelli A, et al. Epidemiology and clinical management of XDR-TB: a systematic review by TBNET. *Eur Respir J* 2009; 33: 871-81.
13. Wallis RS, Pai M, Menzies D, et al. Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice. *Lancet* 2010; 375: 1920-37.

PANEL 2: ANAEROP BAKTERİLERİN TANIMLANMASINDA GELENEKSEL VE DİĞER YÖNTEMLER

ANAEROP BAKTERİLERİN GELENEKSEL YÖNTEMLERLE TANISI

Prof. Dr. Nezahat GÜRLER

*İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Bilim Dalı,
İstanbul*

Anaerop bakteriler insan vücut florasının en önemli bakterilerinden olup, laboratuvar da klasik yöntemlerle tanılarının yapılmasında günümüzde hala sorunlar yaşanmaktadır. Anaerop bakterilerin bir çoğunun diğer bakterilere oranla daha geç ve güç üremeleri, laboratuvar da anaerop bakterilerle uğraşacak deneyimli bir elemana ve bazı ekipmanlara ihtiyaç duyulması en önemli sorunlardır.

Laboratuvar da anaerop bakterilerin tanılarının yapılabilmesi için dikkat edilmesi gereken temel kurallar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Klinik örneklerin uygun bölgelerden alınması gereklidir.
- Örnekler, en kısa zamanda (klinik önemi olan anaerop bakteriler için en fazla 20 dakika içinde), mümkünse anaerop bakterilerin transportu için uygun olan besiyerinde gönderilmelidir. Bu amaçla Carry-Blair transport besiyeri veya indirgen madde içeren anaerop koşulların sağlandığı PRAS besiyerleri kullanılabilir. Abse içerikler için havası boşaltılarak içinde N_2 , CO_2 gibi gaz karışımları bulunan boş tüpler kullanılabilir.
- Vücudun farklı bölgelerinde çok çeşitli enfeksiyonlara neden olan anaerop bakterilerin kültürü yapılacağında, alınan örneklerin kültür için uygunluğu çok önemlidir. Genel kural olarak flora içeren bölgelerden alınan örneklerin anaerop kültürünün yapılması uygun değildir. Kültür için uygun olan ve olmayan örnekler Tablo 1’de görülmektedir.

Anaerop bakterilerin laboratuvar tanısında, makroskopik ve mikroskopik inceleme ve kültür, en önemli yöntemlerdir. Anaerop kültür için çeşitli yöntemlerle anaerop koşulların sağlanması ise olmazsa olmazlar arasındadır. Kültür için alınan örnekler için besiyeri seçimi önemlidir. Ekim yapılan besiyerlerinin değerlendirilmesi ve izole edilen anaerop bakterilerin ön tanı ve biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi, tanımlamanın en önemli basamaklarıdır.

Tablo 1. Anaerop kültür için uygun olan ve olmayan klinik örnekler

Anaerop kültür için uygun örnekler	Özel durumlarda kullanılabilen örnekler	Anaerop kültür için uygun olmayan örnekler
Normalde steril olan vücut sıvıları (Kan, safra, sinovyal sıvı, eklem sıvısı, periton, perikard, plevra sıvıları, beyin omurilik sıvısı)	Dekübitus ülserleri	Bronkoscopi ile alınan materyal
Abseler	Yara drenajları	Mide yıkantı suyu
Derin yaralar	Endometrial aspirasyon materyali	Balgam
Transtrakeal materyal	İdrar (Suprapubik aspirasyonla alınan)	İdrar (Hastanın çıkardığı veya sondayla alınan)
Kuldoskopi materyali		Vaginal sürüntü materyali
Cerahat (Derin yaralar, abselerden elde edilen, sülfür granülleri olan materyaller)		İleostomi ve kolostomi materyalleri
Normal olarak steril bölgelerden elde edilen cerrahi örnekler (Safra yolları, doku parçaları ve lenf nodülleri)		Episiyotomi materyalleri (sürüntü örnekleri anaerop kültür için uygun olmamasına karşın abse aspire edilmişse uygundur)
		Toraks materyali
		Burun, deri ve ağızdan alınan materyaller
		Üretradan alınan materyal
		Dışkı

Makroskopik inceleme

Öncelikle muayene maddesinin görünümü, rengi, kokusu, gaz içerip içermediği ve floresans verme özelliği araştırılır. Siyah renkteki nekrotik dokuların 365 nm'lik UV ışığında kırmızı renkte floresans vermesi, örnekte siyah pigmentli anaerop bakterilerin olduğunu gösteren en önemli bulgudur. Bir organ veya dokuda anaerop bakterilerin bulunduğunu gösteren ipuçları detaylı bir şekilde aşağıda belirtilmiştir:

- Lezyon ve akıntıda kötü koku,
- Enfeksiyon bölgesinin, normal flora üyesi olarak anaerop bakterilerin bulunduğu mukoza yüzeyine yakınlığı,
- Abse oluşumu ve doku nekrozu ile ilişkili enfeksiyonlar,

- Gaz oluşumu,
- Enfekte bölgeden hazırlanan ve Gram ile boyanan preparatta polimikrobiyal görüntünün olması veya morfolojik olarak bazı anaerob bakterilerin görülmesi,
- Enfekte bölgeden gelen kanlı cerahatin siyah renk alması, ultraviyole ışığında kırmızımsı floresans vermesi,
- Enfekte bölgeden alınan örneklerin aerob kültürlerinde üreme olmaması,
- Daha önceden aminoglikozidler, trimetoprim-sülfametoksazol, birinci jenerasyon kinolonlar, monobaktamlar ve anaerob bakterilere etkisi yeterli olmayan seftazidim gibi antibiyotiklerle tedavi ile enfeksiyonun gerilemeyip daha da artması,
- Sülfür granüllerinin mevcudiyeti,
- Malignite ilgili enfeksiyonlar (Kolon, akciğer, uterus),
- İnsan ve hayvan ısırıklarından sonra gelişen enfeksiyonlar,
- Histotoksik *Clostridium*'ların oluşturdukları toksinlerle gelişen tipik hastalık tabloları (botulismus, gazlı gangren, tetanoz, psödomembranöz kolit, nekrotizan enterit).

Mikroskopik inceleme

Anaerob enfeksiyonların laboratuvar tanısında direkt mikroskopik inceleme son derece önemlidir. Anaerob kültür yapılacak tüm klinik örneklerden Gram yöntemi ile boyanmak üzere preparasyon mutlaka hazırlanmalıdır. Gram yöntemi ile boyamada tipik morfolojideki anaerob bakteriler araştırılır. Bu şekilde muhtemel enfeksiyon etkeni bakteri hakkında ön bilgi elde edilebilir. Aynı zamanda mikroskopta incelenen bakterinin morfolojisine göre selektif besiyerleri seçilir. Muayene maddesinden hazırlanan Gram yöntemi ile boyanmış preparasyon, alınan örneğin kalitesi hakkında da bilgi verir.

Özellikle *Clostridium*'larla oluşan enfeksiyonlarda mikroskopik inceleme son derece önemli hatta hayat kurtarıcıdır. Klinik olarak gazlı gangren kuşkusu olan bir hastanın yara yerinden alınan örnek Gram yöntemiyle boyandığında kalın, gram-pozitif çomaklar görülmesi, bazen sporlu şekillerinin de saptanması, hatta inflamasyonun da bulunması çok önemli bir bulgudur; kültür kadar değerlidir. Bazen *Clostridium*'ların etken olmadığı "non-clostridial" selülitte fakültatif anaerob koklar, *Bacterioides* spp, *Fusobacterium* spp ve/veya diğer mikroorganizmalar da etken olabilir. Böyle bir durumda Gram yöntemi ile hazırlanmış preparasyon çok önemlidir. Direkt mikroskopik incelemede filamansı yapıda mekik şeklinde gram-negatif çomakların görülmesi *Fusobacterium* cinsi bakterilerin etken olduğu enfeksiyonu düşündürür.

Gram yöntemi ile boyanmak üzere preparasyon hazırlandığında, preparatın 30 saniye metanolle tespit edilmesi, bakterinin hücre morfolojisinin bozulmaması ve daha iyi görülmesi için tavsiye edilmektedir. Gram yöntemi yapıldığında zıt boya olarak %0.5'lik bazik fuksin yerine safranin kullanılması önerilmektedir. Eksüda ve kanlı sıvılarından hazırlanmış kalın tabakalı preparatlar akridin oranla boyandığında mikroorganizmalar daha iyi görülebilir.

Clostridium cinsinden gram-pozitif çomakların bir kısmı sporlu görüldüğü gibi, bazıları ise sporsuz görülebilir. *C.perfringens* ve *C.ramosom* enfekte dokuda, cerahatte spor oluşturmaz. Gram yöntemiyle hazırlanan preparatta kısa, küt kalın, sporsuz çomak olarak görünür. Diğer gram-pozitif çomaklardan farklı olarak kapsül kolaylıkla fark edilebilir. *C.perfringens*'de özel spor boyası yapmanın da hiçbir yararı yoktur.

Anaerob bakterilerin direkt mikroskopik incelenmesi, Gram yöntemi dışında karanlık saha ve faz kontrast mikroskopları ile de yapılabilir. Karanlık saha veya faz kontrast mikroskopla inceleme, küçük ve iyi boyanmayan anaerob bakterilerin (*Dialister pneumosintes* gibi) görülmesinde yardımcıdır. *Campylobacter* cinsinin hareketinin incelenmesi *Clostridium* cinsinin sporlarının yeri ve morfolojisinin incelenmesi, kültürü yapılamayan anaerob spiroketlerin morfolojilerinin gözlenmesi için de karanlık saha ve faz kontrast mikroskoplarından yararlanılır.

Direkt olarak, kan dışındaki örneklerden likit gaz kromotografisi kullanılarak etkenin saptanması mümkündür.

Fluoresan antikor yönetimi ile de bazı anaerob bakteriler direkt muayene maddesinde saptanabilir.

Kültür

Anaerob bakterilerinin izolasyon ve tanımlanmaları için en önemli konu, ekim için kullanılacak besiyerlerinin taze hazırlanmış olmasıdır. Buzdolabında bekletilen besiyerlerinde anaerob bakterilerin izole edilmesi mümkün değildir. Bazı laboratuvarlarda ise önceden redükte edilmiş, anaerob koşulların sağlandığı besiyerleri kullanılmaktadır.

Anaerob bakterilerin izolasyonunda; Schaedler agar ve buyyon, Brucella agar ve buyyon, triptik soy agar ve buyyon, Colombia agar, beyin-kalp infüzyon agar ve buyyon tiyoglikolatlı buyyon, karbonhidratlı veya karbonhidratsız kıymalı buyyon gibi

selektif olmayan besiyerleri kullanılır. Schaedler besiyerleri dışındaki besiyerlerine hemin, vitamin K, maya özütü ve sistein monohidroklörür ilave edilmesi gereklidir. Anaerop I/v bakterilerin kültürünün yapılacağı tüm besiyerlerine koyun kanı ve at kanı mutlaka ilave edilmelidir. Laboratuvarıda ticari olarak alınmış besiyeri bulunmadığında kanlı agar besiyerine yukarıdaki maddelerin ilavesi ile de uygun anaerop besiyeri elde edilir. *Eubacterium* ve *Actinomyces* cinsleri kalp infüzyon agarda, triptik soy agara oranla daha iyi üremektedir. Buna karşılık triptik soy agar besiyeri, subgingival bölgeden alınan örneklerden siyah pigmentli anaerop bakterilerin izolasyonu için çok fazla tercih edilmemektedir.

Selektif olmayan besiyerlerinin yanı sıra, anaerop bakterilerin izolasyonunda selektif besiyerlerinin kullanılması bakterilerin izolasyonunu kolaylaştırır. Diğer bakterilerin bulunabileceği örnekler veya flora içeren örneklerden anaerop bakterilerin izolasyonu için selektif besiyerleri özellikle kullanılmalıdır. *Bacteroides* ve *Prevotella* cinsi bakterilerin izolasyonunda kanamisin-vankomisinli kanlı agar (özellikle kanın dondurulup çözölmüş olması tercih edilir) kullanılır. Ancak 7.5 µg/ml vankomisin içeren besiyerlerinde *Porphyromonas* cinsi bakteriler üremez. *Porphyromonas* türlerinin izolasyonu için 2 µg/ml vankomisin içeren kanamisinli kanlı besiyeri tercih edilir.

Diyaframın altında gelişen enfeksiyonlarda ilk akla gelen etken *Bacteroides fragilis*'dir. Bu nedenle diyafram altından alınan örneklerden de *B. fragilis* ve *Bilophila wadsworthia*'nın selektif izolasyonu için safralı eskülinli besiyerinin kullanılması ön tanı için önemlidir. Kanamisin-vankomisinli besiyeri ile birlikte, aynı petride veya ayrı ayrı safralı eskülinli besiyerinin kullanılması uygun olur.

Fenil-etil-alkollü kanlı besiyerleri, çok fazla üreyen aerob gram-negatif çomakların varlığında, özellikle de besiyeri üzerine yayılarak üreyen *Proteus* cinsi bakteriler ve yaygın koloni oluşturan bazı *Clostridium* cinsi bakteriler mevcut olduğunda, gram-negatif anaerop bakterilerin daha kolay izole edilmesini sağlar. Klinik olarak *Fusobacterium* cinsi ile enfeksiyon düşünüldüğünde ise, özellikle diyaframın üstünde kalan dokuların enfeksiyonunda, neomisin-vankomisin selektif agar veya *Fusobacterium* selektif agar tercih edilir.

Clostridium cinsi bakterilerin kültürü ve izolasyonu için taze hazırlanmış kanlı besiyeri kullanılabileceği gibi, CDC anaerop agar, fenil-etil-alkollü kanlı agar, maya özütü, vitamin K ve hemin ilave edilmiş %5'lik koyun kanlı Brucella agar, Columbia agar veya beyin-kalp infüzyon agar da kullanılabilir. Bu besiyerlerinde koloni özellikleri çok karakteristiktir. *C. perfringens* gibi birçok *Clostridium* türü bir gecelik inkubasyondan sonra bile üreyebilir. *C. perfringens*, kanlı besiyerinde çift zonlu hemoliz oluşturur ve bu özelliği ile kolayca tanımlanabilir.

Eğer yara veya absede *Clostridium* cinsi bakterinin mevcudiyeti kuşkusu varsa (özellikle gazlı gangren kuşkusunda), modifiye McClung besiyeri veya yumurta sarılı agar besiyeri kullanılması uygun olur. Yumurta sarılı besiyerinde veya yumurta sarısı içeren modifiye McClung besiyerinde bakteri lesitinaz oluşturduğunda koloninin altında beyaz opak, çözünmeyen, besiyerinin içerisinde bir presipitat gözlenebilir. Lipaz oluşturan bakterilerin kolonilerinin üzeri madeni parlaklık gösterir; yağ, hatta su ilave edildiğinde bu tabaka yüzerek koloniden ayrılır. Yumurta sarılı besiyerinde proteoliz de saptanabilir. Koloninin çevresinde şeffaf bir tabaka gözlenmesi proteolizi gösterir. Kıymalı buyyon besiyeri subkültür veya toksin oluşumu için tercih edilir. Karbonhidratlı kıymalı buyyon ise likid-gaz kromatografisi için kullanılır.

Clostridium cinsi bakterilerin, diğer mikroorganizmaların da bulunduğu özellikle besin maddeleri ve dışkıdan saf halde izolasyonu için spor teknikleri uygulanır.

- a) Alkolle muamele: 1-2 ml örnek steril bir tübe konur. Eşit miktarda absölü (%95) etanol ilave edilir. Tüp iyice karıştırılır ve oda ısısında 22-25°C'de 1 saat bekletilir. Alkolle muamele edilen ve edilmeyen örnekten glikozlu kıymalı buyyon veya glikozlu-niştastalı kıymalı buyyon besiyerine, anaerop kanlı agar veya yumurta sarılı agar besiyerine ikişer adet ekilerek aerop veya anaerop koşullarda inkübe edilir.
- b) Isıyla muamele: Tercihen önceden 80°C'ye ısıtılmış glikozlu kıymalı buyyon (veya glikozlu-niştastalı kıymalı buyyon) besiyerine, süspansiyon halindeki 1 ml örnek ilave edilerek 10 dakika ısıtılır ve soğuk suda soğutulur. Isıtılan ve ısıtılmamış örneklerden glikozlu veya glikozlu-niştastalı buyyon besiyerine ve 2'şer adet anaerop kanlı besiyeri ve yumurta sarılı besiyerlerine ekilerek aerop ve anaerop koşullarda inkübe edilir.

Genellikle tüm *Clostridium* cinsi bakteriler selektif olmayan besiyerlerinde, özellikle spor deneyi yapılarak kolaylıkla izole edilebilirse de, *C.difficile* gibi bazı türlerin izolasyonu için selektif besiyerlerinin kullanılması uygun olur. *C.difficile*, üreme özellikleri bakımından diğer *Clostridium* türlerinden daha seçicidir. Bu amaçla sefoksitin-sikloserinli fruktoz agar veya sefoksitin-sikloserinli yumurta sarılı agar besiyerleri kullanılır.

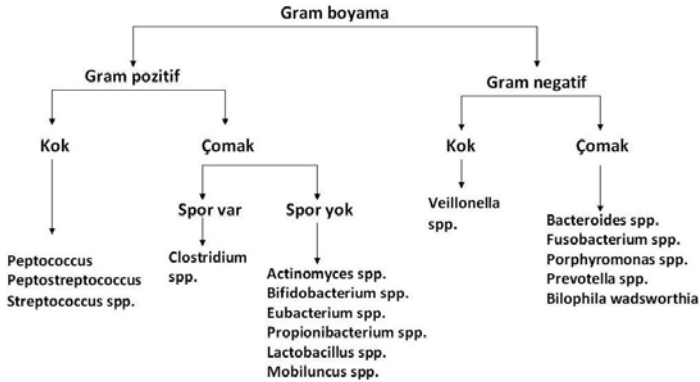
Anaerop bakterilerin izolasyonu için gerekli anaerop ortam; anaerop kavanozlar, GasPak kavanoz, iki petri alacak anaerop plastik poşetler ve anaerop kabinler ile sağlanabilir. Anaerop bakteriyoloji ile uğraşan laboratuvarlarda en çok tercih edilen GasPak kavanozlardır. GasPak kavanozlarında H_2+CO_2 oluşturan kitler kullanılır. Bu kitlerin palladyum aluminat gibi katalizör gerektirmeyen, susuz olanları pratik olduğundan tercih edilmektedir. Anaerop kavanoz ve kabinlerde ise, %80-85 N_2 , %10

CO₂ ve % 5-10 H₂ içeren gaz karışımları kullanılır. Ayrıca kimyasal yöntem ile (Burri-Wright yöntemi) deney tüpünde anaerop koşullar sağlanabilir. Bu amaçla %20 pirogallik asit ve %20 NaHCO₃ çözeltisi kullanılır. Tüpe ekim yapıldıktan sonra tüpün pamuğu içeri doğru itilir, üzerine hidrofil pamuk konur; 0.5 cc pirogallik asit, 0.5 cc NaHCO₃ çözeltisi ilave edilerek vakit kaybetmeden lastik tıpa ile kapatılır.

Anaerop bakterilerin izolasyonu için ekim yapılan besiyerleri, anaerop koşullarda 35-37°C'de inkübe edilir (bazı *Clostridium* türleri için *C.perfringens* dışında 30°C de önerilmektedir). *Clostridium* enfeksiyonu kuşkusu yoksa inkübasyon süresi en az 48 saat olmalıdır. Ancak 48 saatlik inkübasyon çoğu zaman yeterli olmadığından, kültürler 48 saatteki ilk incelemeden sonra anaerop koşullarda 7 gün daha inkübe edilir. Özellikle *Porphyromonas* ve *Actinomyces* cinsi bakteriler için 48 saatlik inkübasyon yeterli değildir.

Tanımlama

Anaerop bakteriler Gram yöntemi ile boyanma ve morfolojik özelliklerine göre kabaca sınıflandırılabilir. Buna göre bakterilerin gram-negatif veya pozitif, kok-çomak şeklinde oldukları, spor oluşturup oluşturmadıkları saptanır (Şekil 1). Gram yöntemiyle boyama ile anaerop bakterilerin bir kısmının belirli bir düzeyde tanımlanması mümkün olsa da cins düzeyinde tanı için belirli konsantrasyonda antibiyotik içeren disklerin kullanılması gerekir (Tablo 2).



Şekil 1. Klinik önemi olan anaerop bakterilerin boyanma özelliğine göre sınıflandırılması

Tablo 2. Antibiyotik içeren disklerle anaerop bakterilerin ön tanısı

Organizma	Kanamisin 1000 µg	Vankomisin 5 µg	Kolistin 1 µg
Gram-pozitif organizmalar	V	S ^a	R
<i>Bacterioides fragilis</i> grubu	R	R	R
<i>Bacterioides ureolyticus</i> grubu	S	R	S
<i>Fusobacterium</i> spp.	S	R	R
<i>Porphyromonas</i> spp	R	S ^b	R
<i>Prevotella</i> spp.	R	R	V
Gram-negatif koklar	S	R	S

^aBazı *Clostridium* ve *Lactobacillus* cinsleri dirençli olabilir. ^b*Porphyromonas* cinsi vankomisine duyarlıdır, ancak kolonileri UV ışığında floresans verir ve pigmentlidir (V: Değişken; R: Dirençli; S: Duyarlı)

Anaerop bakteriler besiyerlerinde ürediklerinde, koloni morfolojileri muhtemel etkenler açısından bir bilgi verebilir. Bu şekilde tanıların daha kolay yapılabilmesi mümkündür (Tablo 3).

Tablo 3. Anaerop bakterilerin koloni özelliklerine göre olası tanıları

Özellik	Olası etken
Kahverengi-siyah koloni	Gram negatif çomak ise; <i>Porphyromonas</i> spp., <i>Prevotella</i> spp. Gram pozitif kok ise; <i>Peptococcus niger</i>
Kırmızı, pembe, ten, sarı pigment	Gram pozitif çomak ise; <i>Actinomyces</i>
Yüzeyel koloni (Şeffaf koloni)	<i>Bacterioides ureolyticus</i> grubu
UV ışığında tuğla kırmızısı floresans	Gram negatif çomak ise; <i>Porphyromonas</i> spp., <i>Prevotella</i> spp.
UV ışığında kırmızı floresans	Gram negatif kok ise; <i>Veillonella</i> spp.
UV ışığında açık yeşil floresans	Gram negatif çomak ise; <i>Fusobacterium nucleatum</i> Gram pozitif çomak ise; <i>Clostridium difficile</i>
Ağarı çukurlaştırma	<i>B. ureolyticus</i> , <i>B. gracilis</i> ya da <i>Wolinella</i> spp.
Çift zonlu hemoliz	<i>Clostridium perfringens</i>
Çok fazla yayılan koloni	Terminal sporlu ise <i>C. tetani</i> Subterminal sporlu ise <i>C. septicum</i>
At ahır kokusu	<i>Clostridium difficile</i>
Hoş olmayan tatlı kokusu	Gram pozitif kok ise; <i>P. anaerobius</i>
Örümcek ağı benzeri koloni	Gram pozitif çomak ise; <i>A. israelii</i> 'nin genç kolonileri, veya <i>Propionibacterium propionicus</i>
Azı dişi görünümlü koloni	Gram pozitif çomak ise; <i>A. israelii</i> 'nin yaşlı kolonileri, veya <i>P. propionicus</i>
Beyaz, ekmek kıvrıntısı görünümü	Gram negatif çomak ise; <i>F. nucleatum</i>
Sahanda yumurta görünümü	Gram negatif çomak ise; <i>F. mortiferum</i> , <i>F. varium</i>
Buzlu cam görüntüsü	Gram negatif çomak ise; <i>F. nucleatum</i>

Anaerop bakterilerin kesin tanıların yapılabilmesi için biyokimyasal özelliklerinin ve oluşturdıkları bazı enzimlerin gösterilmesi gerekir. Laboratuvar da klasik yöntemlerle hazırlanan besiyerleri kullanılabileceği gibi, ticari kitler kullanılarak da (API 20 A, ATB 32 A, BBL Crystal vb) tür düzeyinde tanıları yapılabilir.

Anaerop gram-negatif çomaklar, anaerop bakteri enfeksiyonlarından en sık izole edilen gruptur. *Bacteroides* spp, *Prevotella* spp, *Porphyromonas* spp, *Fusobacterium* spp. ve *Bilophila wadsworthia* klinik önemi olan cinslerdir. Bu grup içinde de en önemlisi *B.fragilis* grubudur. Bu gruptaki bakteriler, klinik örneklerden (özellikle karın içi enfeksiyonlarından) en sık izole edilmelerinin yanı sıra, antimikrobiyal maddelere de en dirençli olan gruptur. Çoğunlukla kapsüllü olmaları virülanslarını artırmaktadır. Saffraya dirençli olmaları ile birçok anaerop gram-negatif çomaktan kolaylıkla ayırdedilirler. *Bacteroides* cinsinde bulunan bakteriler Gram yöntemi ile soluk, düzensiz boyanırlar; pleomorfizm gösterirler (Tablo 4). Özellikle sıvı besiyerinden (karbonhidratlı besiyerinden) hazırlanan preparatlarda uzun filamentöz şekilde ve heterojen boyanmış görünürler.

Anaerop gram-negatif çomaklardan saffraya duyarlı, birçok türü bejden-siyaha yakın pigment oluşturan iki cins *Prevotella* ve *Porphyromonas* cinsleri olup, bu bakteriler homojen boyanan, kokobasil görünümündedirler. *Fusobacterium* cinsindeki bakteriler ise uzun, filamansı, mekik şeklinde çoğu kez heterojen boyanan bakterilerdir. Anaerop gram-negatif çomakların ayırdedici özellikleri Tablo 4 ve 5’de görülmektedir.

Tablo 4. Klinik örneklerden sık izole edilen *Bacteroides fragilis* grubu bakterilerin ayırdedici özellikleri

	İndol	Katalaz	DNaz	Eskülin hidrolizi	Ara	Selo	Ram	Sal	Sak	Tre
<i>B.fragilis</i>	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
<i>B.distasonis</i>	-	+/-	-	+	-	+	V	+	+	+
<i>B.ovatus</i>	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B.thetaiotaomicron</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>B.vulgatus</i>	-	-/+	-	-	+	-	+	-	+	-
<i>B.caccae</i>	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>B.merdae</i>	-	-/+	-	+	V/-	V	+	+	+	+
<i>B.stercoris</i>	+	-	+	+/-	-/+	-/+	+	-/+	+	-
<i>B.uniformis</i>	+	-/+	+	+	+	+	-/+	+/-	+	-

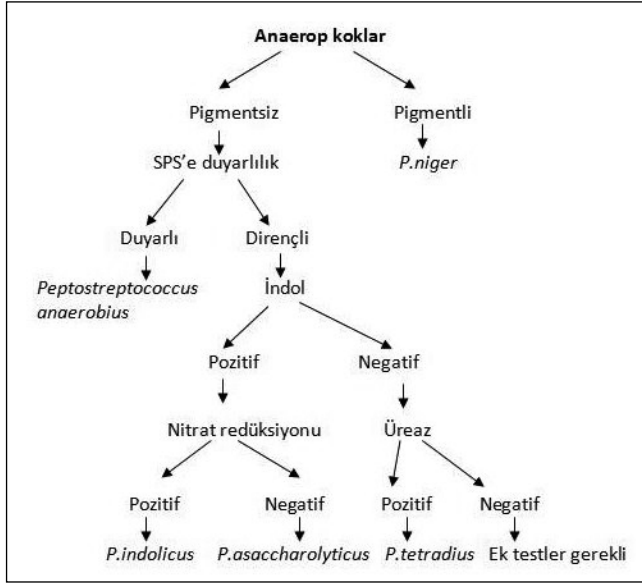
Ara: Arabinoz; Selo: Selobiyoz; Ram: Ramnoz; Sal: Salisin; Sak: Sakkaroz; Tre: Trehaloz; V: Değişken (variable)

Tablo 5. Klinik örneklerden izole edilen diğer anaerop gram-negatif çomakların ayırdedici tanısı

	Kh/sy pigm	Kırm flor	Kat	Oks	İnd	Safra inh	Esk hidr	Lip	DNaz	Gli	Lak	Jel hidr	Ürz	Rif (15µg)
<i>Bacteroides spp.</i>														
<i>B.gracilis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	S
<i>B.ureolyticus</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	S
<i>Fusobacterium spp.</i>														
<i>F.mortiferum</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	R
<i>F.necrophorum</i>	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	S
<i>F.nucleatum</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	S
<i>F.varium</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	R
<i>Porphyromonas spp.</i>														
<i>P.asaccharo-lytica</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	S
<i>P.endodontalis</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	S
<i>P.gingivalis</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	S
<i>Prevotella spp.</i>														
<i>P.intermedia</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	S
<i>P.melanino-genica</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	S

Kh/sy pigm: Kahverengi-siyah pigment; Kırm flor: Kırmızı floresans; Kat: Katalaz; Oks: Oksidaz; İnd: İndol; Safra inh: Safrayla inhibisyon; Esk hidr: Eskülin hidrolizi; Lip: Lipaz; Gli: Glikoz; Lak: Laktöz; Jel hidr: Jelatin hidrolizi; Ürz: Üreaz; Rif: Rifampin; S: Duyarlı; R: Dirençli.

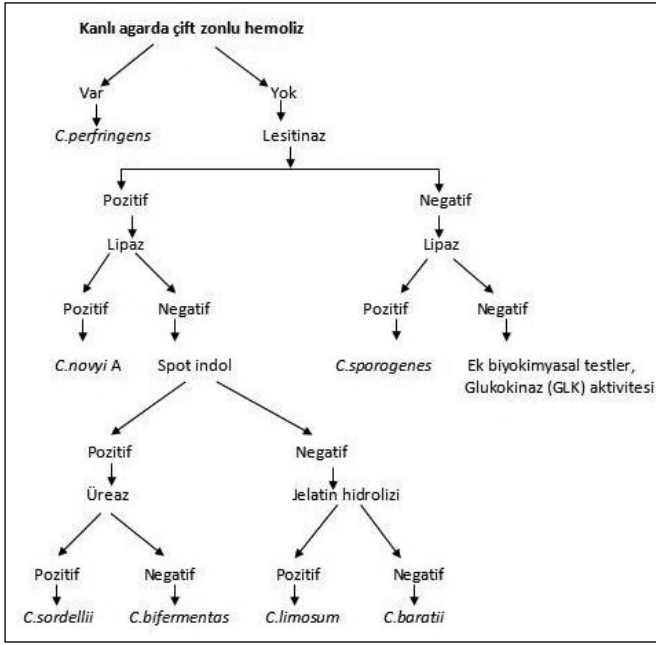
Klinik önemi olan anaerop kokların büyük bir bölümü *Peptostreptococcus* cinsinde yer alır. *Peptococcus* cinsinde tek bir tür *Peptococcus niger* bulunur. *P.niger* klinik örneklerden seyrek izole edilen bir bakteridir. *Peptostreptococcus* cinsinde çeşitli türler bulunsun da klinik bir örnekten izole edildiğinde tür düzeyinde tanısının yapılması çok önemli değildir. Klinik önemi olan anaerop koklar ve türlerin bazı biyokimyasal özelliklerine göre birbirinden ayırt edilmeleri Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2 . Anaerop kokların tanısı (SPS: Sodyum polyanetol sulfonat)

Clostridium türlerinin tanımlanmasında kanlı agarda çift zonlu hemoliz oluşturma önemli bir özelliktir. Çift zonlu hemoliz oluşturan tek tür *Clostridium perfringens*'tir. Diğer türlerin ayırt edilmesinde lesitinaz ve lipaz oluşturma özellikleri önemlidir. *Clostridium* cinsi bakterilerin biyokimyasal özellikleri Şekil 3'te gösterilmiştir.

Clostridium türlerinin tanısında, ayrıca oluşturdıkları ekzotoksin tipinin belirlenmesi de önemlidir. Tetanoz, botulismus ve gazlı gangrenin tanısında deney hayvanlarından da yararlanılır. *C.perfringens*'in etken olduğu besin zehirlenmelerinde dışkı örneğinde hastalıktan sorumlu enterotoksinin saptanabileceği hazır ticari kitler bulunmaktadır. *Clostridium* cinsi bakterilerden günümüzde *C.difficile*'nin ayrı bir önemi vardır; bunlar antibiyotik kullanımı sonrası gelişen diyarelerin büyük bir çoğunluğundan sorumludurlar. Bu nedenle de bakterilerinin etken olduğu psödomembranöz kolitin hızlı tanısı için çeşitli ticari kitler geliştirilmiştir. *C.difficile*'nin laboratuvar tanısı, tanıda kullanılan yöntemler ve yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla Tablo 6, 7 ve 8'de belirtilmiştir.



Şekil 3. *Clostridium* cinsi bakterilerin tanısı

Tablo 6. *Clostridium difficile*'nin bakteriyolojik incelenmesi

İlk testler		Ek testler	Sonuç
Kültür	Fekal toksin		
-	-		<i>C.difficile</i> ile ilişkili hastalık yok
+	+		<i>C.difficile</i> ile ilişkili hastalık var
+	-	İn vitro toksijenite testi	Pozitif: <i>C.difficile</i> ile ilişkili hastalık olabilir Negatif: Toksin oluşturmeyan <i>C.difficile</i> taşıyıcılığı
-	+	CCFA (sikloserin sefoksitin fruktoz agar)'da kültür tekrarı	Pozitif: <i>C.difficile</i> ile ilişkili hastalık olabilir

Tablo 7. *C. difficile* ve toksinlerinin saptanması için kullanılan test ve yöntemler

Yöntem	Saptanan özellik	Avantajları
Toksijenik kültür	Bakteri	Çok duyarlı ve özgül
Lateks aglütinasyonu	Glutamat dehidrogenaz	Hızlı, basit
Membran ELISA	Glutamat dehidrogenaz	Hızlı, basit
Doku kültürleri	Toksin B	Duyarlı, özgül
ELISA	Toksin A	Hızlı, basit, özgül
Membran ELISA	Toksin A	Hızlı
OIA (Optik immunoassay)	Toksin A	Hızlı, basit
ELISA	Toksin A+B	Hızlı, basit, özgül

Tablo 8. *C.difficile* enfeksiyonlarının tanısında kullanılan testlerin duyarlılık ve özgüllükleri

Test	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Klinik kullanım
Endoskopi	51	~100	Psödomembranöz kolit tanısı
Kültür	89-100	84-99	Çok duyarlı, ayrıca toksinin saptanması gerekli
Hücre kültüründe sitotoksin testi	67-100	85-100	<i>C.difficile</i> ile ilişkili diyare tanısında klinik bulgularla birlikte değerlendirilmeli
ELISA toksin testi	63-99	75-100	<i>C.difficile</i> ile ilişkili diyare tanısında klinik bulgularla birlikte değerlendirilmeli
<i>C.difficile</i> antijeni için lateks testi	58-92	80-96	Duyarlılığı ve özgüllüğü düşük, ancak çabuk sonuç verir
PCR ile toksin geni tespiti	?	?	Deneme aşamasında

Sporsuz anaerob gram-pozitif çomakların biyokimyasal özelliklerine göre tanıların yapılması çoğu kez yeterli değildir. Oluşturdukları son metabolik ürünlerin likit gaz kromatografisi ile saptanması gerekebilir. Sporsuz anaerob gram-pozitif çomakların biyokimyasal özellikleri Tablo 9'da belirtilmiştir. Ancak *Eubacterium* veya *Bifidobacterium* cinsleri ve bunların türlerinin ayırımını yapmak çoğu kez güç olmaktadır.

Tablo 9. Anaerop sporsuz gram-pozitif çomakların tanısı

	Katalaz	İndol	Jelatin hidrolizi	Filamanı yapı	Eskülin hidrolizi	Glukoz fermentasyonu
<i>Actinomyces spp.</i>	-	-	-	+	-(+)	+
<i>A.israelii</i>	-	-	-	+	+	+
<i>Eubacterium spp.</i>	-	-	-	-	-	-/+
<i>Bifidobacterium spp.</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Propionibacterium acnes</i>	+	+	+	-	-	+
<i>P.propionicus</i>	-	-	-	+	-	+

Kaynaklar

1. Allen SD, Emery CL, Lysterly DM. Clostridium, p: 835. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2003, 8th ed. ASM Press, Washington, DC.
2. Baron EJ, Tenover FC. Anaerobic identification flowchart using minimal laboratory resources. Clin Infect Dis 1997; 25(S2): 5143.
3. Bartlett JG. Anaerobic bacteria, p: 1768. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (eds), Infectious Diseases. 2004, 3rd ed. Lippincott Williams-Wilkins, Philadelphia.
4. Bleck TP. Clostridium tetani, Clostridium botulinum, p: 2817. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. 2005, 6th ed. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia.
5. Brook I. Anaerobic bacteria, p: 2265. In: Cohen J, Powderly WG (eds), Infectious Diseases. 2004, 2nd ed. Mosby Co., London.
6. Brown R, Collee JG, Poxton IR. Bacteroides, Fusobacterium and other Gram-negative anaerobic rods; anaerobic cocci identification of anaerobes, p: 501. In: Collee JG, Fraser AG, Marmion BP, Simmons A (eds), Practical Medical Microbiology. 1996, 14th ed. Churchill Livingstone, New York.
7. Collee JG, Brown R, Poxton IR. Clostridia of wound infection, p: 521. In: Collee JG, Fraser AG, Marmion BP, Simmons A (eds), Practical Medical Microbiology. 1996, 14th ed. Churchill Livingstone, New York.
8. Engelkirk PG, Engelkirk-Duben J. Anaerobes of clinical importance, p: 587. In: Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G (eds), Textbook of Diagnostic Microbiology. 2007, 3rd ed. Saunders Elsevier, St Louis.
9. Finegold SM. Anaerobic bacteria general concepts, p: 2519. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. 2000, 5th ed. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia.
10. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS (eds): Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology. 2002, 11th ed. Mosby Inc., London.

11. Gürler N. Anaerop infeksiyonlara genel bakış ve antimikrobiyallere direnç durumu. *Ankem Derg* 2001; 15(3): 593.
12. Gürler N. Anaerop bakteri infeksiyonlarının laboratuvar tanısı. X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 15-19 Ekim 2001, Adana. Kongre Kitabı, s: 127.
13. Jousimies-Somer HR, Summaenen PH, Wexler H, et al. *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, and other anaerobic gram-negative bacteria, p: 880. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen SH, Tenover FC, Tenover FC (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 2003, 8th ed. ASM Press, Washington, DC.
14. Koneman EW, Allen SD, Janda MW, Schreckenberger PC, Winn WC (eds). *Diagnostic Microbiology*. 1997, 5th ed. Lippincott Co., Philadelphia.
15. Lorber B: Gas gangrene and other *Clostridium*-associated diseases, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* and *Fusobacterium* species, and other medically important anaerobic gram negative bacilli, p: 2828. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2005, 6th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
16. Macsini EM, Verhoef J. Anaerobic coccus, anaerobic gram positive nonsporulating bacilli, p: 2847. In: In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2005, 6th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
17. Mangels JI. Anaerobic bacteriology, p: 401. In: Isenberg HD (ed), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2004, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
18. Moncla BJ, Hillier SL. *Peptococcus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, and other non-spore forming anaerobic gram positive bacteria, p: 857. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 2003, 8th ed. ASM Press, Washington, DC.
19. Onderdonk AB, Garrett WS. Gas gangrene and other *Clostridium* associated diseases, p: 3103. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2010, 7th ed. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia.
20. Poradosu-Cohen R, Kasper DL. Anaerobic infections: General concepts, p: 3083. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2010, 7th ed. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia.
21. Rodloff AC, Hillier SL, Moncla BJ. *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, and other non-spore forming anaerobic gram-positive bacteria, p: 672. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 1999, 7th ed. ASM Press, Washington, DC.
22. Shah HN, Olsen I, Bernard K, et al. Approaches to the study of the systematics of anaerobic, gram negative, non-sporeforming rods: current status and perspectives. *Anaerobe* 2009; 15: 179-94.
23. Tindall BJ, Euzéby JP. Proposal of *Parvimonas* gen. nov. and *Quatronicoccus* gen. nov. as replacements for the illegitimate, prokaryotic, generic names *Micromonas* Murdoch and Shah 2000 and *Quadracoccus* Maszenan et al. 2002, respectively. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006; 56(Pt 11): 2711-3.

ANAEROP BAKTERİLERİN TANIMLANMASINDA MOLEKÜLER VE DİĞER YÖNTEMLER

Prof. Dr. Güven KÜLEKÇİ

İstanbul Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi, Mikrobiyoloji Bilim Dalı, İstanbul

Nedenler

Anaerop bakteriler insan ve hayvan normal mikrofloralarının ve vücut dışındaki çeşitli ekolojik bölgelerin yerleşikleri olarak çok sayıda endojen enfeksiyonun ve görece az sayıda ekzojen enfeksiyonun önemli etkenleridir. Ağız dışı, solunum, gastrointestinal, kadın genital sistemi, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında önemli rol oynarlar. Anaerop enfeksiyonlar, sıklıkla çeşitli anaerop, fakültatif anaerop ve aerop bakteri türlerinin birlikte bulunduğu karışık/polimikrobiyal enfeksiyonlardır. Geleneksel olarak kültüre dayalı izolasyon, tanımlama ve duyarlılık testleri, özel laboratuvar donanımı, bilgi ve fazla ilgi gerektiren zahmetli ve zaman alıcı işlemlerdir. Anaeroplara, fakültatif anaerop ve aerop bakterilerden daha yavaş ürer; 48 saat sonra bile koloniler ufaktır; bazı anaeroplara hiç kültür edilemez. Saf kültürün eldesi, deneyler ya da saklama gibi her aşamada oksijene duyarlılık nedeniyle kolaylıkla ölebilirler. Klinik olarak önemli birçok anaerop bakterinin biyokimyasal test sonuçları negatiftir. Ticari otomatize fenotipik tanı kitleriyle sonuç alınabilmesi için gerekli olan fazla miktarda inokulumu sağlamak kolay değildir. Bu ticari sistemler sık rastlanmayan anaerop türler için güvenilir değildir. Son yıllarda taksonomik değişikliklere bağlı olarak anaerop bakteri adlarının sürekli değişmesi, tanımlama ve yorumlamayı daha da zorlaştırmıştır. Kronik biyofilm enfeksiyonları ile ilgili mikrofloralar kültür teknikleri ile saptanamamaktadır. 1980'lerde 16S rRNA molekülü ve PCR'in kullanıma girmesiyle moleküler biyolojik teknikler sayesinde hem kültür edilebilen hem kültür edilemeyen anaeroplara taksonomik pozisyonu, tanımlanması, tiplendirilmesi, virülans ve direnç genleri hızla aydınlığa kavuşmaktadır. Kültür teknikleri hem araştırma hem rutinde yerini moleküler tekniklere bırakmaktadır. Moleküler tekniklerdeki bolluk da en uygunu karar verilmesini gerektirmektedir.

Yöntemler

Anaerop bakterilerin tanımlanması için kullanılan moleküler biyolojik yöntemler genomik ya da oligonükleotid DNA problemların kullanıldığı hibridizasyon ve oligonükleotid primerlerle PCR, gen çipleri (mikroarray), pirosekanslama ve MALDI-TOF-MS'dir.

Hibridizasyon teknikleri

Genomik ya da sentetik olarak yapılabilen ve otomatik sisteme sokulabilen oligonükleotid problemler hedef sekansın tamamlayıcısı olan genellikle 15-30 baz gibi kısa tek iplikli DNA sekanslarıdır. Doğrudan prob yöntemleri, örnekte hedef bakteri az miktarda bulunduğundan DNA amplifikasyonu yapılmadan kullanıldığında duyarlılığı 10^2 - 10^3 bakteridir^{1,2}. Aynı teknikle çalışan toplam 11 periodontal patojenin 16S rRNA geninin amplifikasyonundan sonra amplikondan bakterilerin semikuantitatif olarak saptanmasının tür/cinsine özel DNA problemlerle revers hibridizasyonla sağlandığı iki ticari test (HAIN Lifescience GmbH, Nehren, Germany) geliştirilmiştir. Bu testler, beş anahtar periodontal patojen olan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* ve *Treponema denticola* tanısı için "Micro-IDent" ve diğer periodontal patojenlerden *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Eikenella corrodens* ve *Capnocytophaga* türleri için "Micro-IDent Plus" testleridir. Bu yöntem, özellikle anaerob kültürle sağlanamayan yakın ilişkili taksonların (*Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens*) ayırt edilmesi; *Treponema denticola* gibi rutin anaerob laboratuvarında kültür edilemeyen patojenlerin ve karmaşık mikrop toplulukları incelenmek isteniyorsa yararlıdır³. Sağlıklı ve periodontitli kişilerden alınan subgingival plak örneklerinde *Micro-IDent* test ile checkerboard DNA-DNA hibridizasyon testi, 10/13 test türü saptama profili ile benzer bulunmuştur⁴.

Tam genom dama tahtası (checkerboard) DNA-DNA hibridizasyon testi, periodontitiste ya da peri-implantitiste subgingival/submukozal diş/implant plak biyofilminde 40 bakteri türünün tam genom DNA'larından DIG ile işaretlenmiş problemlerinin bir naylon membran üzerinde 28 örneğe karşı aynı anda kantitatif analizini sağlar. Bu teknik kültür edilebilir anahtar bakterilere dayalı oldukça karışık mikrofloraların ekolojik parmak izinin ve tür birlikteliklerinin saptanmasında çok yararlıdır⁵. Checkerboard DNA-DNA hibridizasyon tekniğinde saptama limiti belli bir türün yaklaşık 10^4 bakteri hücresidir. Bu yöntemin çok az bakteri hücresi içeren endodontik örneklerde uygulanması, hibridizasyon öncesi DNA hedeflerinin tüm genomunun uniform amplifikasyonuna olanak veren PCR'a dayanmayan DNA amplifikasyon tekniği olan multiple-displacement amplifikasyonu (MDA) ile birlikte gerçekleştirilebilir. MDA ve checkerboard DNA-DNA hibridizasyon analizinde 77 bakteri probunun 70'inin endodontik örneklerin bir ya da daha çoğu ile hibridize olduğu; en yaygın olan türlerin *Prevotella tannerae*, *Prevotella oris* ve *Acinetobacter baumannii* olduğu saptanmıştır⁶. **Fluoresan in-situ hibridizasyon (FISH)**, bakterilerin filogenetik gruplarına özel sekanslarını hedef alarak dizayn edilmiş ve her bir proba farklı floresan boya eklenmiş oligonükleotid problemlerle klinik örneklerde ya da doğal yaşam yerlerinde görülmesi, tanımlanması ve sayılması yöntemidir. Son yıllarda diş plak biyofilmlerinin konfokal lazer tarama mikroskop incelemesinde kullanılmaktadır⁵.

PCR'a dayalı analizler:

Bu yöntemler; 1) Geniş kapsamlı PCR, 2) Özel PCR ve 3) PCR'a dayalı parmak izi olmak üzere üçe ayrılabilir.

1. **Geniş kapsamlı (Broad-range) PCR: 16SrRNA sekans analizi:** Kültür yapmaksızın nükleik asitler örneklerden doğrudan ekstrakte edilir ve 16SrRNA geninin tüm bakterilerde ortak dizisinden hazırlanmış universal primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltılır. Elde edilen ürünler *E.coli*'de klonlanır ve sekanslanır. Bakterilerin tanımlanması, ribosomal gen veritabanındaki sekans bilgileriyle benzerliğine dayanır. Nükleik ait sekans değişiklik oranı organizmalar arasındaki evrimsel uzaklığa bağlı olduğundan, sekans benzerliği filogenetik yaklaşımla belirlenebilir. Karmaşık bir bakteri florasını içeren bir bölgeden alınan örnekte 16SrRNA gen hedeflerinin geniş çapta klonlanması ve sekanslanması ile bakteri florasının ayrıntılı bir kataloğu çıkartılabilir. Ribosomal veritabanı projesi (*Ribosomal Database Project=RDPII*) bilgilerine, <http://rdp.cme.msu.edu> adresinden ulaşılabilir. Bu sitede 12 Ocak 2012 tarihi itibarıyla (10.açıklama 28.güncelleme) 2.110.258 adet sıralanmış ve dip not eklenmiş bakteri ve arkaelere ilişkin 16S rRNA gen sekans bilgisi bulunmaktadır. rRNA sekansları aylık olarak eklenmektedir. Veritabanlarında araştırma yapabilmek için birçok bilgisayar programı vardır; örneğin RDP II SEQUENCE_MATCH, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programları gibi. 16S rRNA analizi kültür yönteminden daha duyarlıdır ve tür düzeyinde doğruluk oranı % 84'dür⁷. Bu teknik anaerop izolatların rutin tanımı için klinik laboratuvarlarda uygulanmaktadır. 16S rDNA PCR sonuçlarının doğru yorumlanması için daha eşdeğer bilgi gerekmektedir⁸. Materyal maliyeti görece yüksek olmasına karşın, kan kültürlerinden anaerop bakterileri ve diğer steril vücut bölgeleri için plevra sıvısı, kemikler ve eklemler gibi *Propionibacterium acnes* kuşkusu olan yerler dışında da uygulanır⁹. Rutin analizde kan kültürlerinden anaerop bakterilerin tür tanısı enfeksiyonun birincil yerini açıklayıcı bilgi sağlaması yönünden çok önemlidir. 16S rRNA sekans analizinin yaygın kullanımı, tıbbi yönden önemli yeni anaerop türlerin tanımlanmasında anlamlı bir artış sağlamıştır¹⁰. *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Laboratory*'de Ülger-Toprak ve arkadaşları insan yara örneklerinden karşılaştırmalı 16SrRNA sekans analizi yanında fenotipik yöntemlerle yeni üç anaerop bakteri ve bir kapnofil bakteri türü tanımlamışlar ve tip suşlarına gen bankasından numara verilmiştir¹¹⁻¹³. Polifazik taksonomi çalışması süren bu bakteriler; *Peptoniphilus duerdenii* sp. nov., *Peptoniphilus koenoenieniae* sp. nov., *Murdochella asaccharolytica* gen. nov., sp. nov. ve *Gemella asaccharolytica* sp. nov.'dur. Geniş kapsamlı PCR'ın en büyük sorunu kontaminasyon riskidir. Reaktiflerin ekzonükleaz III (ExoIII) ile muamele edildiği modifiye geniş kapsamlı PCR testi, normalde steril olan vücut

bölgelerinden bakteri tanımlaması için geliştirilmiştir¹⁴. **Ibis T5000**, özellikle mikrobiyal topluluklarda anaeroplara dahil tüm mikroorganizmaların tanımlanmasında, geniş kapsamlı PCR ile yüksek performanslı *mass spektrometreye* dayanan yeni bir yaklaşımdır. Patojen tanımlanması ve tiplendirme için universal bir biyosensördür; örnek analiz işlemi T-Track olarak bilinen bir yazılım sistemi ile yönetilir; alet kullanımı uzmanlık gerektirmez¹⁵.

- 2. Özel PCR yöntemleri:** Bu yöntemler; klasik PCR, multipleks PCR, nested PCR ve real time PCR olarak uygulanabilir.

Standard/Klasik PCR: Anaerop bakterilerin, klinik örneklerden ya da koloniden 16SrRNA geninden türe özel ya da türe özgü virülans genlerini hedefleyen primerlerle aranarak türün örnekte var olup olmadığını saptamak ya da tür tanısı amacıyla kullanılır. Elde edilen PCR ürününden dizi analizi yapılabilir. Basit ve duyarlı bir yöntem olarak anaeroplara için yaygın olarak kullanılmaktadır¹⁶.

Multipleks PCR: Klasik PCR'da bir primer çiftiyle tek bir genetik lokus çoğaltılırken aynı anda çeşitli primer çiftleriyle çeşitli genetik lokuslar çoğaltılır. Zamandan ve emekten tasarruf sağlar; bakteriler daha doğru tanımlanır. Multipleks PCR'ın klinik yönden önemli *Bacteroides fragilis* grubu türlerin ve gram-pozitif anaerop kokların hızlı tanısı için laboratuvarında geliştirilmiş olanları da vardır^{17,18}. Türkiye'de de *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella* ve *Propionibacteria* cinslerinin saptandığı **ANAEROB1 Multipleks PCR Kiti** (FC-Biotek, Ankara) piyasadadır.

Nested PCR: Duyarlılığı artırmak amacıyla klinik örneklerden ekstrakte edilen DNA'dan patojenin 16SrRNA genini amplifiye edecek önce universal primerlerin kullanılması; sonra ikinci tur amplifikasyonda hedef patojenin özel bir 16SrDNA fragmentini saptamak için ilk PCR ürününün kullanılmasıdır. Bu strateji, klinik örneklerden anaerop endodontik patojenlerin saptanması için yaygın olarak kullanılmıştır¹⁶.

Real-time PCR (qRT-PCR): PCR tanı kapasitesini genişletmiş ve klinik laboratuvarında kullanımı artırmış bir yöntemdir. Çeşitli floroforlar, etiketli probalar ya da her ikisini birlikte kullanarak kapalı tüp formatında hedef sekansı tanımlamak ve doğrulamak, jelde yürütmeye gerek olmaksızın mümkündür. Geleneksel jel görüntülemeye göre daha duyarlıdır; kantitatif, semikantitatif ve multipleks olabilir. Genellikle geleneksel PCR tekniklerine göre daha güçlü, daha az emek yoğun ve kontaminasyon riski daha azdır¹⁹. Tüm çalışmalar, real-time PCR'ın periodontal hastalık, diş çürüğü, bakteriyel vajinoz, *Clostridium difficile* toksinlerinin hızlı mikrobiyolojik incelemeinde güçlü bir araç olduğunu göstermiştir¹⁶. Türkiye'den bildirilen bir çalışmada, tükürük anaerop periodontal patojen sayılarının periodontal hastalık durumunda ayırt edici olup olmadığı TaqMan real-time PCR ile araştırılmış; *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* ve *Prevotella intermedia*'nin tükürük kopya sayıları

nın periodontitis tanısı için kullanılabilme potansiyeli taşıdığı sonunca varılmıştır²⁰. 2003'de dışkı örneklerinden *C.difficile* toksin genlerini (*tcdA* ve *tcdB*) hızlı saptamak için klasik PCR'dan 100 kat daha duyarlı olan real-time PCR geliştirilmiştir²¹. Günümüzde *C.difficile* virülansının toksin B varlığına bağlı olmasına dayanarak, toksin B geni (*tcdB*) korunmuş bölgelerinin real-time PCR ile saptandığı FDA onaylı üç farklı test bulunmaktadır. *Xpert®C.difficile* (Cepheid Diagnostics) küçük hastane/laboratuvara uygun, hızlı (~45 dak) ve en pahalı olanıdır. Diğeri Prodesse®*ProGastroCd™ assay* Roche MagnaPure'da ekstraksiyon ve saflaştırma yapılır ve ~3 saat sürer. Sonuncusu *BD-GeneOhm™ Cdiff assay*'dir; cam boncuk lizisi kullanılır; amplifikasyon, saptama ve deneyin yorumu SmartCycler® cihazında (Cepheid Diagnostics) yapılır; örnekten sonuç raporu çıkması ~1 saat 45 dakika sürer²².

3. **PCR'a dayalı parmak izi analizleri:** Anaerob bakterilerin sınıflandırılması, tanımlanması ve tiplendirilmesi, hastane epidemiyolojisi, tıbbi mikrobiyoloji ve mikrobiyal ekoloji çalışmalarında can alıcı önemdedir. PCR'ın keşfi DNA parmak izi yöntemlerinde devrim yaratmıştır. Bu yöntemler; rDNA PCR'a dayalı parmak izi ve genomik PCR'a dayalı parmak izi olmak üzere ikiye ayrılır.

1) rDNA PCR'a dayalı parmak izi analizleri: Bu yöntem aşağıdaki şekillerde uygulanabilir.

ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis): Klinik olarak önemli anaerob bakteri türlerinin ayırt edilmesinde yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Yavaş üreyen *Actinomyces* türlerinin ayırt edilmesinde kullanılmış; klasik fenotipik yöntemlerle tanımlanamayan *A.meyeri* tanımlanmıştır²³. Farklı klinik *Bacteroides* izolatlarının PCR ile çoğaltılan 16S rRNA'nın *TaqI* and *HpaII endonuclease digestion* profilleri, 5-7 günlük inkübasyon sonrası geleneksel biyokimyasal ayırt etme yöntemleri ile elde edilen bulgularla %70 uyum göstermiştir. Suşların sekizi zayıf biyokimyasal reaksiyon verdiğinden fenotipik olarak tanımlanamamış; altısı *B.ovatus*, biri *B.thetaiotaomicron* ve biri *B.distasonis* olarak tanımlanmıştır².

T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism): ARDRA'nın bir çeşididir. Bu yöntem bir bakteri topluluğunun zamanla değişikliklerini izlemek ya da bilinen çevresel değişikliklerden sonrasında izlemek için kullanılabilir. Örneğin bu yöntemle, periodontal tedavi sonrası ağız mikrobiyal profili ve vejeteryanların dışkı mikrobiyal çeşitliliğinin araştırıldığı çalışmalar yapılmıştır^{24,25}. T-RFLP'da, DGGG'deki gibi düşük sayıdaki bakteriler PCR ürününde var olamayacağından, örnekteki mikrop çeşitliliğinin altında bir değerlendirme yapılabilir.

DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis): Bu yöntemle PCR ile çoğaltılan aynı uzunlukta ama farklı baz çifti sekansları olan DNA fragmanları ayırt edilebilir. Geniş bir skalada aynı anda çok tür saptama avantajına sahiptir; polimikrobiyal

enfeksiyon ve mikrofloraların ekolojik analizi için yaygın olarak kullanılır. Örneğin periodontal ve endodontal örneklerde mikroorganizmaların tanısı ve izlenmesi için kullanılmaktadır²⁶. *Atopobium vaginae*'nin bakteriyel vaginozdan sorumlu ve metronidazole dirençli bir anaerob bakteri olduğu bu yöntemle tanımlanmıştır²⁷.

ITS PCR (PCR ribotipleme; 16S-23S rRNA intergenic spacer region PCR polymorphism analysis): 16S-23S rRNA genleri arasındaki bölgede bulunan farklılıkları esas alan bir moleküler tanımlama yöntemidir ve primer çifti bu korunmuş bölgeler kullanılarak tasarlanır. Örneğin *Clostridium difficile* salgınlarında tiplendirme ve birçok anaerob bakterinin tanımlanması amacıyla kullanılmaktadır²⁸. Peptostreptokokların heterojen yapıda olduğu bu yöntemle ortaya konmuştur²⁹.

II) Genomik DNA PCR'a dayalı parmak izi analizleri: Bu yöntemler; enfeksiyon salgınlarını tanımlamada, hastane patojenlerinin çapraz bulaşmasını saptamada, enfeksiyonun kaynağını saptamada ve organizmaların özellikle virülen suşlarını tanımlamada epidemiyolojik olarak önemlidir. İki şekilde uygulanabilir.

AP-PCR (Arbitrarily primed PCR) ya da RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA): Dizilimi rastgele seçilmiş (random) kısa primerler kullanılarak düşük bağlanma derecelerinde gerçekleştirilen PCR'dır. Rastgele seçilen primer setlerinin sayısı ve lokasyonu bir bakteri türünün farklı suşları için değişiktir. Amplikonların agaroz gel elektroforezde band profilleri karşılaştırılarak suşlar arasındaki benzerlikler değerlendirilir. Aynı türden iki izolatin epidemiyolojik olarak ilişkili olup olmadığını ayırt etmede yararlıdır. İngiltere ve İrlanda'da damarici ilaç kullanlarda *Clostridium histolyticum* enfeksiyon salgınlarını değerlendirmek için kullanılmıştır³⁰. Akut otitis media tanısı konan bebeklerde tükürük ve nazofarenkste *Fusobacterium nucleatum* bakterilerinin klonal benzerliği de bu yöntemle araştırılmıştır³¹.

Rep-PCR (Tekrarlayan DNA sekansına dayalı PCR): Farklı bakteri genomlarında özel konserve repetitif [örneğin; *repetitive extragenic palindromic* (REP) sekansları, *enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC) ve BOX elementleri gibi] sekans primerlerinin kullanımı *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium* ve *Actinomyces* suşlarını ayırt etmede başarıyla kullanılmaktadır¹⁶.

DNA mikroçip (mikroarray) analizi:

PCR ile elde edilen floresan işaretli amplikonların çok fazla sayıda farklı oligonükleotid prob içeren katı yüzeylerde kendisine uyan proba hibridizasyonun aynı anda tek bir deneyde gerçekleştirildiği ve değerlendirmenin ileri bilgisayar donanımına dayalı olduğu bir testtir. Problar farklı özellikler olarak sentezlenen ve immobilize edilen noktalardır; her bir nokta milyonlarca eş prob içerir. "İnsan Mikrobiyom Projesi"nde 300 ya da daha fazla bakterinin tek bir hibridizasyonla aynı anda saptandığı DNA çipleri ge-

liştirilmiştir⁵. İnsan mikrofloralarının çoğunluğu anaerop bakterilerden oluştuğundan, çoğu kültür edilmemiş, adlandırılmamış ve birincil olarak 16S rRNA sekanslarına göre tanımlanmış veri tabanları oluşturulmaktadır. Bu yöntem direnç ve virülans genlerinin araştırması için de geliştirilmektedir. *ParoCheck*® mikroarray testleri (Greiner Bio-One BVBA/SPRL, Belgium) periodontal patojenlerden 10 ve 20'sinin aynı anda semikantitatif olarak saptanabildiği ticari DNA çipleridir⁵. Klinik olarak önemli 28 anaerop bakteri türü ve *Veillonella* suşlarını tanımlamak için ITS sekanslarına dayalı bir oligonükleotid array geliştirilmiştir. Bu array hibridizasyonun, saf kültürlerin tanısı için yaklaşık sekiz saatte yüksek duyarlılık ve özgüllükle sonuçlandığı, ayrıca klinik örneklerde anaerop bakteri saptama potansiyeli olduğu bildirilmiştir³². Mikroarray platformu, üç boyutlu çipler ya da süspansiyon boncuk çiplere genişlemiştir. Son yıllarda sayısı çok artan mikroarray çalışmaları ile klinik mikrobiyolojide mikroarray teknolojisine dayanan yeni bir moleküler tanımlama çağına girilmiştir³³.

Pirosekanslama analizi:

Son 30 yıldır Sanger sekanslamanın (birinci jenerasyon DNA sekanslama) bilimsel gelişmelere olağanüstü katkısı olmuştur. Günümüzde yüksek kapasiteli yeni jenerasyon sekanslama (NGS) tekniklerinden pirosekanslama, tıbbi mikrobiyolojide yaygın olarak kullanılmaktadır³⁴. En yaygın kullanılan "İnsan Mikrobiyom Projesi"nde de kullanılan 454 pirosekanslama (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) teknolojisidir. Bu teknoloji ile tek bir çalışmada çok büyük örnekleme derinliği ile çok sayıda sekans okuması sağlanarak mikrop topluluklarının salt üstün üyeleri değil, aynı zamanda az sayıdaki taksonları da saptanabilir. Ribosomal veritabanı projesi de (<http://rdp.cme.msu.edu>) çok yüksek verimlilikteki pirosekanslama bilgilerini desteklemektedir. Farklı çevrelerden 16S rRNA geninden pirosekanslama çalışmaları, mikrop çeşitliliğinin önceki teknolojilerle elde edilenden çok daha yüksek olduğunu göstermiştir³⁵. Bu analizlerin polimikrobiyal etiyolojili hastalıkları aydınlatacağı umulmaktadır³⁶. Yeni bir çalışmada kolorektal karsinoma patogeneğinde *Fusobacterium*'ların rol oynayabileceği, kantitatif PCR ve 16S rRNA sekans analiz çalışmalarında fazla sayıda sekans olması ve kolorektal tümörlerde FISH ile görülmesine dayanarak ileri sürülmüştür.

MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation-Time- Of-Flight-Mass Spectrometry): İncelenecek örnek, matriks adı verilen genellikle zayıf asit bir maddede çözündürülür; örnek tepsisine konur ve kurutulur. Kurutulmuş örneklerin hemen işleme sokulma zorunluluğu olmadığından oda sıcaklığında günlerce de kalabilir. Cihaza yerleştirildiğinde mor ötesi lazer ışını ile örneği oluşturan moleküllerin yüzeyden buharlaşarak havalanması (desorpsiyon) sağlanır. O sırada buharlaşan matriks maddesi proton vererek moleküllerin bütünlüğü bozulmadan iyonize ol-

malarını sağlar. Cihazın uzun tüpü içindeki güçlü elektrik alanı sayesinde iyonize olan moleküller algılayıcıya karşı uçuşa geçer. Tüp içindeki hava, uçuşa geçen moleküllerin hava molekülleriyle çarpışmaması için boşaltılır. Moleküllerin algılayıcıya dek uçuş süreleri ağırlıklarına bağlıdır. Ayrım gücü yüksek cihazlarda iyon aynası ile buraya ulaşan moleküller yansıtıcının elektrik alanı ile geri gönderilir ve yeniden algılayıcıya ulaşması beklenir. Moleküllerin algılayıcıya çarpmasıyla oluşan sinyaller bilgisayar ekranında tepeler oluşturan bir grafiğe dönüştürülür. Tepelerin geliş sırası ve süresi moleküllerin ağırlığına göre küçükten büyüğe doğru sıralanır ve yükseklikleri moleküllerin miktarını gösterir³⁸. Cihaz başlangıçta pahalı olsa da sarf malzemeleri ve kimyasalların maliyetleri çok düşüktür. Bu yöntemin yakın gelecekte Gram boyama ve biyokimyasal tanımlamanın yerini alabileceği öne sürülmektedir. Bu yeni proteomik yaklaşım rutin laboratuvarlarında bakteriler ve mantarların, bir koloniden doğrudan ve çok hızlı tanımlanmasına olanak verir. Bunun için çok sayıda türün MALDI-TOF ile molekül profilleri çıkartılmış ve cihazın bilgi bankasına eklenmiş olması gerekir^{39,40}. 2009'da *Bruker Daltonics Biotyper* yazılımı ile 277 *Bacteroides* izolatının %97.5'i tür düzeyinde doğru olarak tanımlanmış; MALDI-TOF MS'nin ayırt edici gücü ve tanımlama doğruluğunun, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides ovatus* ve *Bacteroides uniformis* için biyokimyasal testlerinkine göre çok yüksek olduğu kanıtlanmıştır⁴². 2011'de Bruker ve Axima sistemlerinin karşılaştırıldığı klinik önemi olan anaeroplara tanımlamasında, Axima'nın gram-pozitif anaerop kokların tanımlanmasında daha doğru sonuç verdiği; Bruker sisteminin ise *B.fragilis* grubu için daha iyi olduğu saptanmıştır⁴³. 2011 yılına ilişkin bir başka çalışmada Bruker sistemi ile 332 anaerop izolatın 202'si tür düzeyinde tanımlanmış; en sık rastlananlar *Propionibacterium* spp. (%12), *Finnegoldia magna* (%4), *Fusobacterium* spp. (%6) ve *Bacteroides* spp. (%6) olmuştur⁴³. 2012'de piyasadaki üç sistem olan *Microflex™LT* (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), *Vitek MS RUO* (Axima Assurance-Saramis database; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) ve *Vitek MS IVD* (bioMérieux) ile yapılan karşılaştırmalı rutin bakteri tanımlamasında; 73'ü anaerop bakteri ile ilgili olarak Bruker Biotyper veritabanının *Fusobacterium* izolatlarını salt cins düzeyinde tanımladığı, Vitek MS'in ise *Bacteroides*'lerin %20'sini tanımlayamadığı ya da yanlış tanımladığı bildirilmiştir⁴⁴. MALDI-TOF-MS, anaerop bakterilerin rutin tanımlamasında büyük umut yaratmıştır. Bu nedenle yakın gelecekte klinik mikrobiyolojide anaerop tanımlarında büyük artış beklenmektedir; ancak doğru tanımlama için sistemin veritabanı içeriği ve kalitesi çok önemlidir.

Sonuç

Mikrobiyoloji laboratuvarında yakın gelecekte moleküler yöntemler (MALDI-TOF-MS, 16S rRNA sekanslama, kültürden bağımsız yöntemler ve pirosekanslama) ve anaeroplara daha çok konuşulacaktır.

Kaynaklar

1. Conrads, G. DNA probes and primers in dental practice. Clin Infect Dis 2002; 35: S72-7.
2. Nagy E, Urbán E, Sók J, Terhes G, Nagy K. The place of molecular genetic methods in the diagnostic of human pathogenic anaerobic bacteria. Acta Microbiol Immunol Hung 2006; 53(2): 183-94.
3. Urban E, Terhes G, Radnai M, Gorzo I, Nagy E. Detection of periodontopathogenic bacteria in pregnant women by traditional anaerobic culture method and by a commercial molecular genetic method. Anaerobe 2010; 16(3): 283-8.
4. Haffajee Ad, Yaskell T, Torresyap G, Teles R, Socransky SS. Comparison between polymerase chain reaction-based and checkerboard DNA hybridization techniques for microbial assessment of subgingival plaque samples. J Clin Periodontol 2009; 36(8): 642-9.
5. K le ci G. Periodontal mikrobiyoloji, s: 41-82.  a layan G (ed), Periodontoloji. 2010. Hacettepe  niversitesi Yayınları, Ankara.
6. Brito LC, Teles FR, Teles RP, et al. Use of multiple-displacement amplification and checkerboard DNA-DNA hybridization to examine the microbiota of endodontic infections. J Clin Microbiol 2007; 45(9): 3039-49.
7. Song Y, Liu C, McTeague M, Finegold SM. 16S ribosomal DNA sequence-based analysis of clinically significant Gram positive anaerobic cocci. J Clin Microbiol 2003; 41: 1363-9.
8. Sontakke S, Cadenas MB, Maggi RG, Diniz PP, Breitschwerdt EB. Use of broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology. J Microbiol Methods 2009; 76(3): 217-25.
9. Justesen US, Skov Mn, Knudsen E et al. 16S rRNA gene sequencing in routine identification of anaerobic bacteria isolated from blood cultures. J Clin Microbiol 2010; 48(3): 946-8.
10. Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, Yuen KY. Then ve now: use of 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. Clin Microbiol Infect 2008; 14(10): 908-34.
11. Ulger-Toprak N, Lawson PA, Summanen P, O'Neal L, Finegold SM. Peptoniphilus duerdenii sp.nov. and Peptoniphilus koenoeneniae sp.nov. isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol 2011 [Epub ahead of print]
12. Ulger-Toprak N, Summanen P, Liu C, Rowlinson MC, Finegold SM. Gemella asaccharolytica sp. nov., isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol 2010; 60(Pt5): 1023-6.
13. Ulger-Toprak N, Liu C, Summanen PH, Finegold SM. Murdochiella asaccharolytica gen.nov.,sp.nov. a Gram-stain-positive, anaerobic coccus isolated from human wound specimens. Int J Syst Evol Microbiol 2010; 60(Pt5): 1013-6.
14. Cherkaoui A, Emonet S, Ceroni D, et al. Development and validation of a modified broad-range 16S rDNA PCR for diagnostic purposes in clinical microbiology. J Microbiol Method 2009; 79: 227-31.
15. Ecker DJ, Drader JJ, Gutierrez J, et al. The Ibis T5000 universal biosensor: an automated platform for pathogen identification and strain typing. J Assoc Lab Auto 2006; 11: 341-51.
16. Song Y. PCR-based diagnostics for anaerobic infections. Anaerobe 2005; 11: 79-91.
17. Urban E, Terhes G, Radnai M, Gorzo I, Nagy E. Detection of periodontopathogenic bacteria in pregnant women by traditional anaerobic culture method and by a commercial molecular genetic method. Anaerobe 2010; 16(3): 283-8.
18. Song Y, Liu C, McTeague M, et al. Rapid identification of Gram-positive anaerobic coccal species originally classified in the genus Peptostreptococcus by multiplex PCR assays using genus-and species-specific primers. Microbiology 2003; 149: 1719-27.
19. Mancini N, Carletti S, Ghidoli N, et al. The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. Clin Microbiol Rev 2010; 23(1): 235-51.
20. Saygun I, Nizam N, Keskiner I, et al. Salivary infectious agents and periodontal disease status. J Periodontal Res 2011; 46(2): 235-9.

21. Belanger SD, Boissinot M, Clairoux N, Picard FJ, Bergeron MG. Rapid detection of *Clostridium difficile* in feces by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 730-4.
22. Deshpande A, Pasupuleti V. Diagnostic accuracy of real-time polymerase chain reaction in detection of *Clostridium difficile* in the stool samples of patients with suspected *Clostridium difficile* infection: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2011; 53(7): e81-90.
23. Hall V, Talbot RP, Stubbs SL, Duerden BI. Identification of clinical isolates of *Actinomyces* species by amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3555-62.
24. Sakamoto M, Huang Y, Ohnishi M, et al. Changes in oral microbial profiles after periodontal treatment as determined by molecular analysis of 16S rRNA genes. *J Med Microbiol* 2004; 53: 563-71.
25. Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. Fecal microbial diversity in a strict vegetarian as determined by molecular analysis and cultivation. *Microbiol Immunol* 2002; 46: 819-31.
26. Zijpe V, Welling GW, Degener JE, et al. Denaturing gradient gel electrophoresis as a diagnostic tool in periodontal microbiology. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3628-33.
27. Ferris MJ, Maszta A, Aldridge KE, et al. Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis. *BMC Infect Dis* 2004; 4: 5.
28. Bidet P, Barbut F, Lalonde V, Burghoffer B, Petit JC. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 175: 261-6.
29. Hill KE, Davies CE, Wilson MJ, et al. Heterogeneity within the Gram-positive anaerobic cocci demonstrated by analysis of 16S-23S intergenic ribosomal RNA polymorphisms. *J Med Microbiol* 2002; 51: 949-57.
30. Brazier JS, Gal M, Hall V, Morris T. Outbreak of *Clostridium histolyticum* infections in injecting drug users in England and Scotland. *Euro Surveill* 2004; 9(9): 15-6.
31. Haraldsson G, Holbrook WP, Könönen E. Clonal similarity of salivary and nasopharyngeal *Fusobacterium nucleatum* in infants with acute otitis media experience. *J Med Microbiol* 2004; 53: 161-5.
32. Lin YT, Vanechoutte M, Huang AH, et al. Identification of clinically important anaerobic bacteria by an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol* 2010; 48(4): 1283-90.
33. Miller MB, Tang Y-W. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(4): 611-33.
34. Siqueira JF, Fouad AF, Roças IN. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *J Oral Microbiol* 2012; 4. doi: 10.3402/jom.v4i0.10743.
35. Stephenson MF, Mfuna L, Dowd SE, et al. Molecular characterization of the polymicrobial flora in chronic rhinosinusitis. *J Otolaryngology Head Neck Surg* 2010; 39(2): 182-7.
36. Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, et al. Pyrosequencing study of fecal microbiology of autistic and control children. *Anaerobe* 2010; 16(4): 444-53.
37. Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012; 22: 292-8.
38. Kocagöz T. MALDI-TOF ile mikroorganizmaların tanımlanması. 1.Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 12-16 Kasım 2011, Antalya. Kongre Kitabı, s: 95-6.
39. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 543-51.
40. Carbonnelle E, Mesquita C, Bile E, et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin Biochem* 2011; 44: 104-9.
41. Nagy E, Maier T, Urban E, Terhes G, Kostrzewa M; ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted

- laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Microbiol Infect 2009; 15(8): 796-802.
42. Veloo AC, Knoester M, Degener JE, Kuijper EJ. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry methods for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria. Clin Microbiol Infect 2011; 17(10): 1501-6.
 43. La Scola B, Fournier PE, Raoult D. Burden of emerging anaerobes in the MALDI-TOF and 16S rRNA gene sequencing era. Anaerobe 2011; 17(3): 106-12.
 44. Martiny D, Busson L, Wybo I, et al. Comparison of the Microflex LT and Vitek MS Systems for routine identification of bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol 2012; 50(4): 1313-25.

PANEL 3: İNVAZİF MİKOZ ETKENLERİNDE AZOL DİRENCİ NASIL GELİŞİYOR? KANITLANMIŞ MOLEKÜLER MEKANİZMALAR, ÖNCEKİ TEDAVİLERİN ETKİLERİ

AZOL İLE DAHA ÖNCE KARŞILAŞMIŞ OLMAK DİRENÇ GELİŞİMİNİ ETKİLİYOR MU?

Prof. Dr. Nilgün ÇERİKÇİOĞLU

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

AIDS epidemisi ile birlikte, son 30 yıl içinde azollere direnç gelişimi ile paralel olarak *Candida* türlerine bağlı mukozal enfeksiyonlarda çarpıcı bir artış söz konusudur. 1990'lı yılların başında oro-özofarengeal kandidiyazlara karşı profilakside flukonazolün sıklıkla uygulanmaya başlaması ile birlikte, takip eden yıllarda bu hastaların %40'ından fazlasında flukonazol direnci tanımlanmaya başlanmıştır¹.

1997 yılındaki bir çalışmada önceden azol profilaksisinin, flukonazole karşı dirençli kandidiyaz gelişimini belirleyici bir faktör olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla 25 dirençli, 25 duyarlı olgu seçilmiş ve önceden uygulanan azol dozları irdelenmiştir. Dirençli olgularda 17 hastadan *C. albicans*, 8 hastadan ise *C. glabrata* ya da bununla birlikte diğer albicans dışı türler izole edilmiştir. Sonuçta bu grupta yer alan hastalarda, uygulanan günlük azol (itrakonazol, ketokonazol, flukonazol) tedavisinin, dozundan çok, hastaların maruz kaldığı toplam süre ile bağlantılı kümülatif azol miktarının, direnç gelişmeyen gruba oranla daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu fark, direnç ortaya çıkan grubun içinde de kendini göstermiş ve *C. albicans* kökenlerinde flukonazol direnci gelişmesi için, albicans dışı kökenlere oranla daha uzun süreyle ve daha yüksek kümülatif dozda azol ile karşılaşmış olması gerektiği belirlenmiştir. Dahası, dirençli kökenlerin ortaya çıkmasında 50-100 mg/gün gibi küçük flukonazol dozları ile uzun süreli tedavi yeterli olurken; ketokonazol veya itrakonazol ile profilaksinin yüksek dozda verilmesinin gerekliliği saptanmıştır².

Antiretroviral HAART tedavisi ile birlikte AIDS'li hastalarda, kandidalara bağlı orofarengeal enfeksiyonlarda ve kolonizasyonda olduğu kadar, daha az kullanıma paralel olarak flukonazole dirençte de düşüş ortaya çıkmıştır. 1990'larda aynı zamanda

başta kemik iliği transplantasyonu yapılan ve hematolojik maligniteli hastalarda olmak üzere flukonazole karşı düşük duyarlılık gösteren ya da dirençli *C.glabrata*, *C.krusei* gibi albicans dışı *Candida* türlerine bağlı sistemik enfeksiyonlarda da artış olmuştur. Flukonazole dirençli *C.krusei* fungemilerinde mortalite %49'lara ve hatta nötropenik hastalarda %90'lara yükselmişken, bu oran *C.albicans* için %28'dir. Bu da enfeksiyonların gelişiminde önceden flukonazol profilaksisinin önemli bir bağımsız risk faktörü olduğunu göstermiştir¹.

Son 10 yıl içinde, immünokompromize hastalarda *C.glabrata*'ya bağlı kandidemilerde artış vardır. Ancak, bu hastaların çoğunda önceden yüksek miktarda azol grubu ilaçlarla karşılaşma söz konusudur. İzole edilen etkenlerde flukonazole in vitro doza bağlı duyarlılık ya da direnç gösteren kökenlerde, vorikonazole karşı da çapraz direnç bildirilmiştir. Bu hasta gruplarındaki kolonizan kökenlerle yapılan çalışmalarda da, flukonazol veya vorikonazol ya da itraconazole maruz kalındığında her üç ilaç karşı MİK değerlerinde artış gözlenmiştir; yani bir çapraz direnç söz konusudur. Dikkati çeken bir başka özellik de, flukonazole karşı dirençli kökenlerde itraconazol ve vorikonazole karşı progresif olarak artan bir direnç gelişiminin söz konusu olmasıdır. Bunun altında yatan mekanizmanın bilinen diğer direnç mekanizmalarından farklı olup olmadığı araştırma konusudur³.

Son yıllarda, yoğun bakım ünitelerinde yatan fungemili hastalardan izole edilen bazı *C.albicans*, *C.tropicalis* ve *C.parapsilosis* kökenlerinde de flukonazol ve vorikonazole karşı duyarlılıkta azalma veya direnç saptanmaktadır; ancak bunların sayısı çok azdır. Özellikle immün sisteminde ağır çöküş gelişen hastalarda flukonazol profilaksisini takiben daha yüksek etkinlikli vorikonazole karşı da çapraz direnç göz önünde bulundurulmalıdır⁴.

CLSI'a dayalı duyarlılık testlerinde flukonazole duyarlı olan kökenlerin vorikonazole de duyarlı oldukları; ancak flukonazol MİK değeri ≥ 64 ise vorikonazole de dirençli oldukları belirlenmiştir. Bundan yola çıkarak özellikle *C.glabrata* için başlangıçta saptanan flukonazol direncinin vorikonazol direnci için bir belirteç olabileceği ileri sürülmüştür⁵.

İnvazif enfeksiyonlara yol açan *Aspergillus fumigatus*'un klinik izolatlarında da 1999'dan bu yana azol direnci bildirilmektedir. Danimarka'da yapılan bir çalışmada, hastaların %6-12.8'inin in vitro koşullarda itraconazole dirençli ve vorikonazol ve flukonazole düşük duyarlılık gösteren *Aspergillus* kökenleri ile enfekte oldukları bildirilmiştir. Önceden azol ile tedavi edilen *A.fumigatus*'a bağlı aspergilloma olgularında azol baskısına bağlı olarak direnç geliştiği belirtilmiştir. Bu olgularda etkenin,

akciğer kavitesinde eşeysiz sporlanma ile çoğalarak selektif azol baskısına çabuk uyum sağladığı öne sürülmüştür. Oysa akut invazif enfeksiyonlarda dokuda hifal gelişme tarzında çoğalma söz konusudur⁶.

Bir başka çalışmada, *A.fumigatus*'un klinik kökenlerinde itrakonazol ve posakonazole karşı çapraz direnç bildirilmiştir. Bu çapraz direnç gelişiminin temelinde, CYP 51 genindeki mutasyonlarla ilişkili olarak farklı noktalardaki aminoasit profilindeki değişiklikler yatmaktadır⁷. Tedavi verilmesi gereken *A.fumigatus*'a bağlı enfeksiyonlarda kültür negatif olan olguların klinik materyallerinde PCR ile azol direnci saptamanın mümkün olduğu gösterilmiştir⁸. Danimarka hastanelerinden yapılan bazı bildirilerde ek olarak genin promoter bölgesindeki "Tandem Repeat (TR)" denilen tekrarların varlığının da, çoklu dirençten sorumlu olduğu belirtilmiştir. *A.fumigatus* doğada bir bitki patojeni olarak da yer almaktadır. Bu açıdan azol grubu ilaçlarla yapılan zirai mücadelenin de klinik kullanımdaki triazollere karşı direnç gelişimine yol açtığı görüşü ileri sürülmüştür. Nitekim çevresel ve klinik izolatlardaki direnç çalışmalarında, her iki gruptaki azol direncinin TR dahil aynı mekanizmaya bağlı olarak ortaya çıktığı saptanmıştır. Dahası hastane içi ortamda olduğu gibi, hastane dışındaki ortamlarda özellikle toprakta medikal triazollere dirençli *A.fumigatus* varlığı bildirilmiştir. Bazı araştırmacılar bu verilerden yola çıkarak triazollere karşı direnç gelişiminde, önceden, çevresel azol fungusitleri ile karşılaşmanın da rolü olabileceğini ileri sürmektedirler⁶.

Kaynaklar

1. Canuto MM, Rodero FG. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. Lancet Infect Dis 2002; 2: 550-63.
2. Cartledge JD, Midgley J, Gazzard BG. Prior fluconazole exposure as an independent risk factor for fluconazole resistant candidosis in HIV positive patients: a case –control study. Genitourin Med 1997; 73: 471-4.
3. Panackal AA, Gribskov JL, Staab JF, et al. Clinical significance of azole antifungal drug cross-resistance in *Candida glabrata*. J Clin Microbiol 2006; 44: 1740-3.
4. Magill SS, Shields C, Sears CL, Choti M, Merz WG. Triazole cross-resistance among *Candida* spp.: case report, occurrence among bloodstream isolates, and implications for antifungal therapy. J Clin Microbiol 2006; 44(2): 529-35.
5. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, et al. Use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to voriconazole among 13.338 clinical isolates of *Candida* spp. tested by Clinical and Laboratory Standards Institute recommended broth microdilution methods. J Clin Microbiol 2007; 45: 70-5.
6. Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, Melchers WJ. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? Lancet Infect Dis 2009; 9(12):789-95.
7. Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. A point mutation in the 14-alpha-sterol-demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1120-4.
8. Denning DW. Multi-azole resistance in *Aspergillus*-only a Northern European problem? Eur Infect Dis 2011; 5(2): 71.

CANDIDA VE AZOL DİRENCİ MEKANİZMALARI

Prof. Dr. Mine DOLUCA

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Son yıllarda yeni antifungal ilaçların kullanıma girmesine karşın, organ nakli, immün sistemi etkileyen hastalıklar ve kemoterapi gibi nedenlere bağlı olarak hem invazif fungal enfeksiyonların hem de antifungal direncin artmaya devam ettiği bildirilmiştir. Azol grubu antifungal ilaçlar, güvenilir profili ve yüksek terapötik indeksi nedeniyle uzun yıllardır *Candida* enfeksiyonlarında birinci basamak terapide, profilaksi, empirik ve preemtif sağaltımda kullanılmaktadır. Uzun süre bu grup ilaçla karşılaşmanın bir sonucu olarak ortaya çıkan azol direnci, antifungal dirençler arasında en sık rastlanan olup, klinik olarak büyük önem taşır.

Azoller, lanosterolün ergosterole dönüşümünde etkili lanosterol demetilaza (14 α sterol demetilaz; LD) bağlanıp inhibe ederek etkisini gösterir. Bu bağlanma sonucunda hücre membranındaki ergosterol içeriği tükenir, membran yapısı ve fonksiyonu değişir ve sonuçta fungal üreme inhibe olur.

Azoller için söz konusu olan direncin birçok mekanizma ile ortaya çıktığı bildirilmiştir. Bunlar; 1) Hedef bölgeyi kodlayan *ERG11*'deki değişiklikler, 2) Hücre içinde ilaç birikiminde azalma, 3) Ergosterol biyosentezinin sterol $\Delta^{5,6}$ desaturaz enziminin inaktivasyonu ile değiştirilmesidir.

***ERG11*'deki değişiklikler**

C.albicans suşlarında izlenen azol direnci *ERG11* genindeki birçok değişiklik ile ilişkilendirilmiştir. Bunlar; a) kodlayan bölgelerdeki nokta mutasyonları b) *ERG11*'in fazla ekspresyonu c) fazla ekspresyona yol açan gen amplifikasyonu ve d) gen konversiyonu veya mitotik rekombinasyondur.

a) Nokta Mutasyonları: *ERG11*'de ilaç bağlanmasını bozan yapısal değişikliklere yol açan, *Erg11p*'nin afinitesini azaltan nokta mutasyonları direnç gelişimi açısından önemlidir. Mutasyonların azollere olan afiniteyi etkilemesi iki şekilde olabilmektedir: 1) Mutasyondan etkilenen aminoasit, azol molekülünün bir kısmı ile direkt temastadır ve bu değişim, azolün mutasyona uğramış protein ile daha az etkili bağlanmasına neden olur. 2) Aminoasit değişimi azol molekülü ile optimal bağlanma için önemli olan α -heliks zincirlerinin üç boyutlu yapılarını değiştirir ve sonuçta mutasyona uğramış proteinin azollere afinitesinde bir azalma meydana gelir. Yabanıl tip *C.albicans*'larda üç adet sıcak bölge (hot spot) tanımlanarak, şimdiye dek bildirilen

140'dan fazla mutasyonun bu bölgelerde kümelenmiş olduğu görülmüştür. Bu bölgeler 105-165, 266-287, 405-488 aminoasitlerini kapsar. Birinci bölge, substrat veya inhibitör giriş kanalına yakın olduğundan azollerin bağlanma afinitelerini etkilemektedir. Azollerin afinitesinde oluşan etkilenme; ya ilacın girişini doğrudan etkileyerek ya da mutasyonlara bağlı helikal yapıda oluşan değişiklikler nedeniyle ortaya çıkmaktadır. İkinci bölge G ve H heliks arasında bulunmakta olup, üçüncü bölge hem bölgesinin arkasında yer almaktadır.

Yapılan çalışmalarda özellikle F72L, F105L, F126L, **Y132H**, **D278E**, **K143R**, K143E+T229A, E266D, T315A, **S405F**, **F449L**, G450E, **G464S**, G465S, **R467K**, V488I, A107T, G448V, V509M, Y257H, **I471T**, E116E, N136Y, Y221H, L276S, Y447H ve G307S mutasyonlarının klinik *C.albicans* suşlarında flukonazol direncine yol açtığına saptandığı bildirilmiştir. Bizim yaptığımız bir çalışmada, flukonazol dirençli/doza bağımlı duyarlı *C.albicans* suşlarında, duyarlı suşlarda bulunmayan ve dirençte etkili olabilecek K143R, G464S, G465S, V488I, S412T ve R469K mutasyonları belirlenmiştir. Erg11p'nin azollere azalmış afinitesi, ilaç pompa sistemleri ile birlikte *C.krusei*'nin de azollere intrinsek direncinden sorumlu tutulmaktadır.

b) *ERG11*'in fazla ekspresyonu: Azollerin hedefi olan LD enzimini kodlayan *ERG11* geninin fazla ekspresyonu sonucu, bu enzimin sentezi aşırı miktarda artmaktadır. Bu şekilde ilaç etkin bile olsa enzimin fazlalığı ile ergosterol sentezi devam edecek, ancak ilacın etkisi kaybolacaktır. Yapılan çalışmalarda, fazla ekspresyon düzeyi genellikle beş kattan daha azdır. Bu durum özellikle flukonazole dirençli *C.glabrata*, *C.albicans*, *C.tropicalis* ve *C.dubliniensis* suşlarında gösterilmiştir. Dirençli klinik *Candida* izolatlarında başka ek değişikliklerin de bulunması nedeniyle, fazla ekspresyonun dirençte tek başına etkisi tam bilinmemekte olup, bu mekanizmanın genel olarak azol direncinin gelişmesinde ılımlı bir etkisi olduğu bildirilmiştir.

c) Fazla ekspresyona yol açan gen amplifikasyonu: Gen amplifikasyonunun, *C.albicans*'da *ERG11* geni, *MTL* "mating" lokusu ve *TAC1*'i içeren 5. kromozomun sol kolunda bir izokromozom oluşmasıyla ortaya çıktığı belirlenmiştir. Kromozom duplikasyonuna bağlı olarak oluşmuş gen amplifikasyonu azole dirençli bir *C.glabrata* suşunda izlenmiştir.

d) Gen konversiyonu veya mitotik rekombinasyon: Yapılan çalışmalarda, direnç geliştiren suşlarda *ERG11*'in allelik sekanslarında değişikliklerin saptandığı bildirilmiştir. Bu çalışmalarda, mutasyonun önce *ERG11*'in bir allelinde olduğu ve bunun *ERG11*'de heterozigot olan bir suşa yol açtığı izlenmiştir. Daha sonra rastgele gen konversiyonu veya mitotik rekombinasyonun, mutasyonu ikinci allele de kopyaladığı ve sonuçta *ERG11* geninin iki allelinde de mutasyon olarak, heterozigotluğun kaybolduğu bildirilmiştir. Bu homozigot suşlar, hücreler sadece dirençli Erg11p eksprese etmesi nedeniyle daha sonra ilaç basıncı altında seçilmektedir.

Hücre içinde ilaç birikiminde azalma

Teorik olarak hücre içinde ilaç birikiminde azalma, ilacın alımında bozukluk ya da ilacın pompa sistemleri ile atılımının artması sonucu ortaya çıkmaktadır. Membran steroller ve/veya fosfolipidlerindeki değişim nedeniyle membran permeabilitesinde ve dolayısıyla hücre içine ilaç alımında azalma söz konusu olmaktadır. White ve arkadaşları plazma membranında ergosterol yok olduğunda ya da diğer steroller lehine azaldığında, membranda permeabilite değişikliği ve akıcılığın yok olmasının söz konusu olduğunu belirtmiştir. Tüm bu değişiklikler azollerin hücreye girme kapasitesini azaltabilmektedir. *C.albicans*'da ergosterol sentezinde görev yapan *ERG* genlerinin bir regülatörü olan *UPC2* genindeki bir delesyon, flukonazol ve ketokonazole aşırı duyarlı hücrelere yol açmakta, *UPC2*'nin fazla ekspresyonu da artan azol direnci ile sonuçlanmaktadır. Bunun yanında, yüzey proteinlerinin glikozilasyonunun değişimi ile ortaya çıkan hücre duvar yapılarının modifikasyonu da azol duyarlılığını değiştirebilmektedir. Flukonazole dirençli bir *C.albicans* suşunda plazma membranında ergosterol miktarında ve fosfatidilkolin/fofatidiletonolamin oranında azalma belirlenmiş, bu durumun da flukonazolün hücreye daha az alımından ve dirençten sorumlu olabileceği bildirilmiştir. Itrakonazole dirençli bir *C.krusei* izolatında ise ergosterol içeriğindeki değişim veya ilaç atımı yerine ilacın daha az alımının dirençten sorumlu olduğu belirtilmiştir. Ancak azollerin hücre içine alınması pasif difüzyon ile olduğundan burada dominant sorumlu mekanizmanın ilaç pompa sistemlerinde artma olduğu bildirilmiştir. Bu durum aktif spesifik ilaç pompalarının fazla ekspresyonu sonucu ortaya çıkmaktadır.

Funguslarda ATP bağlayan kaset (ATP binding cassette; ABC) süper ailesi ve "major facilitator" süper ailesi (MFs) olmak üzere iki tip aktif atılım pompa sistemi söz konusudur. ABC süper ailesi ATP'ye bağlanır, enerji kaynağı olarak ATP'yi kullanır ve hücreye toksik olan küçük moleküllerin aktif atımları ile ilişkilidir. Bu küçük moleküller, azoller gibi hidrofobik veya lipofiliktir. Özellikle *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.tropicalis*, *C.dubliniensis* ve *C.albicans* suşlarında bu grup aktif pompaların önemli rolü olduğu bildirilmiştir. *C.albicans*, *C.dubliniensis* ve *C.glabrata* suşlarındaki azol direnci ile ABC taşıyıcılarını kodlayan *CDR* (*Candida* drug resistance), *PDH1* ve *SNQ₂* genlerinin ilişkili bulunduğu belirtilmiş, dirençli *C.albicans* suşlarında *CDR1*, *CDR2*, *PDR16* ve *C.glabrata*'da ek olarak *PDH1* ve *CgSNQ2'nin* fazla eksprese edildiği gösterilmiştir. *C.dubliniensis* suşlarında *Cdr1p*'nin itrakonazol ve ketokonazole azalmış duyarlılıkta rolü olduğu ancak flukonazol direncinde önemli olmadığı belirtilmiştir.

Azol direncinde çoklu ilaç pompa sistemleri ile ilgili önemli bir nokta, diğer antifungallere ve metabolik inhibitörlere de çapraz direncin görülebilmesidir. *CDR* genlerinin azollere (flukonazol, itrakonazol ve ketokonazol), terbinafin, amorolfen ve birçok metabolite dirençten (çoklu ilaç direnci) sorumlu olduğu saptanmıştır.

MFs pompaları enerji kaynağı olarak membran potansiyelini kullanır ve çeşitli yapısal bileşiklerin transportu ile ilişkilidir. Bu pompalar molekülleri antiport ile taşır yani proton hücreye girer, küçük moleküller hücreden atılır. MFs'ler arasında ise *MDR1* geninin fazla ekspresyonunun azol direnci ile korele olduğu ve bunun flukonazol için özgün olduğu saptanmıştır. *C.dubliniensis*'de flukonazol direncinin dominant olarak *CdMDR1* genlerinin artması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Laboratuvar çalışmalarında *C.tropicalis* suşlarında flukonazol direnç gelişimi ile *MDR1* ve *CDR1*'in artmış transkripsiyonunun korele olduğunun saptandığı ileri sürülmüştür. Bizim yaptığımız bir çalışmada, flukonazole dirençli *C.albicans* suşlarında, *ERG11* mutasyonları ile birlikte *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genlerinin fazla eksprese edildiği saptanmıştır.

Yapılan çalışmalarda atılım pompa genlerinin transkripsiyonunda regülatör bölge olan ve özgün DNA sekansları ile yanıt (response) elemanları içeren "promoter" bölgeleri ve bu bölgeleri tanıyarak bağlanan transkripsiyon faktörlerinin önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Bu "promoter" bölgelerindeki veya özgün transkripsiyon faktörlerindeki mutasyonların, atılım pompalarının fazla ekspresyonuna ve sonuç olarak azol direncine neden olduğu saptanmıştır.

CDR1, *CDR2*, *PDR16* ve *MDR1* gibi direnç genlerinin artmış mRNA düzeyleri, artmış ekspresyonun bir sonucu olup, çoğunlukla değişen transkripsiyonel regülasyonun sonucunda ortaya çıkar. Atılım genleri olan *CDR1* ve *CDR2* genellikle birlikte regüle edilmektedir. *CDR1* ve *CDR2*'nin regülasyonu için önemli "promoter" bölgeleri tanımlanmıştır. Bunlardan biri "drug response element (DRE)" olup, klinik izolatlarda pompaların fazla ekspresyonu için önemlidir. Diğer iki eleman, "steroid response element1 (SRE1)" ve "steroid response element2", pompa genlerinin steroid indüksiyonundan sorumlu olup, diğer ilaçlar ile indüksiyondan sorumlu değildir. Bunun yanında "basal expression element (BEE)" ve "negative regulatory element (NRE)" tanımlanmıştır. BEE ve DRE'deki delesyonlar bazal *CDR1* ekspresyonunu etkilerken, NRE'deki delesyonlar *CDR1*'in bazal ekspresyonunda artışa neden olur. *CDR2* "promoter"ının sadece DRE içerdiği bildirilmiştir. Bu "cis-acting" elemanları arasında sadece DER'nin azol dirençli suşlarda *CDR1* ve *CDR2* fazla ekspresyonu ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Azol dirençli *C.albicans* izolatları ile yapılan bir çalışmada, *CaCDR1* geninin "promoter" bölgesindeki nokta mutasyonlarının dirençli suşlardaki *CDR1*'in fazla ekspresyonundan sorumlu olabileceği belirtilmiştir.

CDR1 ve *CDR2* ekspresyonunu regüle eden birçok transkripsiyon faktörü belirlenmiştir. "Drug response element"i tanıyan faktör *TAC1* olarak bilinmekte olup, bu radaki fonksiyon kazandıran (gain of function-GOF) mutasyonları, *CDR1* ve *CDR2* ve/veya *PDR16*'nın fazla eksprese edildiği birçok klinik suшта izlenmiştir. Coste ve arkadaşlarının *C.albicans* suşlarında yaptıkları bir çalışmada, *TAC1*'deki N977D mutasyonunun 5. kromozomda heterozigotluk kaybına yol açarak azol direncine neden olduğu belirlenmiştir. *CDR1* ve *CDR2*'nin ekspresyonunu regüle eden *NDT80*, *FCR1*

ve *FCR3* transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler de tanımlanmış olup, bugüne dek bu genlerdeki bir mutasyonun direnç ile net ilişkisi henüz gösterilmemiştir. *C.albicans* klinik izolatlarında azol direncinin temel belirleyicisinin Tac1p olduğu, *C.glabrata* suşlarında ise *CDR1*, *PDH1* ve *SNQ2* genlerinin promoter bölgelerinin (örn *PDR1* ve *PDR3*) azol direncini doğrudan etkilediği belirlenmiştir.

MDR1 “promoter”ının “cis-acting” bölgelerinin, azollere yanıtta artmaya neden olduğu bulunmuştur. *MDR1* promoter bölgesinin içinde iki “cis-acting” regülatör eleman saptanmıştır. Bunlardan biri “benomyl response element (BRE)”, diğeri ise “H₂O₂ response element (HRE)” olup, her ikisinin de *MDR* regülasyonu ve fazla ekspresyonu için gerekli olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, flukonazole dirençli izolatlarda *MDR1*’in fazla ekspresyonundan BRE bölgesinin sorumlu olduğu, ancak HRE için aynı şeyin geçerli olmadığı saptanmıştır. Öte yandan *C.albicans* *MDR1* geni, *MRR1*, *CAP1* ve *MCM1* olmak üzere üç transkripsiyon faktörünü kodlayan genler tarafından regüle edilir. Son yıllarda transkripsiyon faktör geni *MRR1*’in klinik izolatlardaki mutasyonlarının *MDR1*’in fazla ekspresyonu ile sonuçlandığı saptanmıştır. Morschhauser ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, azole dirençli *C.albicans* izolatlarında tek nükleotid mutasyonları (P683S, G997V) olan *MRR1* allellerinin homozigot hale geldiği ve bu mutasyonların duyarlı bir *C.albicans* suşuna uygulandığında *MDR1* fazla ekspresyonuna ve azol direncine yol açtığı belirlenmiştir. *C.dubliniensis* suşlarındaki *MDR1* fazla regülasyonu ve bununla ilişkili olan flukonazol direncinin CdMrr1p’deki mutasyonlara bağlı olduğu saptanmıştır. *CAP1* ve *MCM1*, fungal hücrelerin oksidatif stres ve diğer stres ortamlarına yanıtını, MF pompa genlerini indükleyerek regüle eder; ancak bunlar klinik izolatlarda azol direnci ile ilişkilendirilmemiştir. Son bir çalışmada transkripsiyon faktör ailesine ait olan “regulator efflux pump” (REP1)’in *MDR1*’in negatif regülatörü olarak görev yaptığı bulunmuştur. *C.albicans* suşlarında REP1’in delesyonunun azol duyarlılığını azalttığı ve bunun da *MDR1*’in artmış ekspresyonu ile sonuçlandığı saptanmıştır.

Bunların yanında azol duyarlılığını etkileyen diğer transkripsiyon faktörleri olarak; *CDR1* ve *CDR2* ekspresyon regülatörü CaNdt80p, *MDR1* ekspresyon regülatörü CaMcm1p, CaRep1p, CAda2p ve ayrıca CaCrm1p, CaCrz1p, CaFcr3p, CaFcr1p, Pd-r1p/Pdr3p ve Gal11p bildirilmiştir.

C.albicans suşlarında *TAC1* ve *MRR1* ile yapılan çalışmalarda, fonksiyon kazandıran mutasyonların tam fenotiplerini ancak homozigot durumda olduklarında eksprese ettikleri saptanmıştır. Bu duruma **kodominans etkisi** adı verilmektedir. “Response” regülatörü Ssk1 veya Chk1p histidin kinaz proteinleri içermeyen *C.albicans* izolatlarının, hem flukonazol hem de vorikonazole 16-500 kez daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Sonuçta mutant suşlarda bu azollerin özellikle flukonazolün hücrede birikimi artmaktadır. Araştırmacılar, bu iki proteini hedef alan bileşiklerin triazolollerle birlikte sinerjistik sağaltımda kullanılabileceğini belirtmişlerdir. *C.albicans* küçük mutantla-

rında flukonazol ve vorikonazol aktivitesi yabani tip'e göre sekiz kat daha azdır. Bu mutantın *MDR1*'i fazla eksprese ettiği, bunun da azalmış duyarlılığa yol açtığı ileri sürülmüştür.

Ergosterol biyosentezinde değişiklik

Azollere dirençli *Candida* suşlarının sterol yapılarının incelenmesi sonucu, *ERG3* ile kodlanan $\Delta^{5,6}$ desaturaz enziminin inaktivasyonu ile biyosentez yolunun değiştirilmesinin söz konusu olduğu izlenmiştir. *ERG3* genindeki mutasyonlar membran sterolünün yapısında değişikliğe yani ergosterol yerine, 14 alfa metillenmiş sterollerin birikimine yol açarak azol direncine neden olmaktadır. Bu genin mutasyonlarının, *C.albicans* suşlarında azol, *C.dubliniensis* izolatlarında ise itrakonazol direncine neden olduğu gösterilmiştir. Yüksek düzey azol direncinde, *ERG3* genindeki mutasyonların sıkça bildirilen bir mekanizma olmadığı, ancak bunun azoller ve amfoterisin B arasındaki çapraz dirençten sorumlu olduğu ileri sürülmüştür. Öte yandan *ERG1* mutasyonlarının hif oluşumunu etkilediği, hayvan modelinde *C.albicans*'ın virülansını azalttığı ve de *erg1*'in bu türde azol direncinde *ERG3* ekspresyonunu negatif yönde regüle ederek etki gösterdiği saptanmıştır.

Flukonazol ve ketokonazole dirençli *C.glabrata* küçük koloni oluşturan suşlarında solunumsal bir hasar saptanmış ve bunun dirence yol açtığı ileri sürülmüştür. Yapılan çalışmalarda, azol direncinden birden fazla mekanizmanın sorumlu olduğu, bu mekanizmaların basamak tarzı bir direnç gelişimine yol açtığı ve çapraz dirence de neden olabileceği belirlenmiştir.

Kaynaklar

1. Balkis MM, Leidich SD, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Mechanisms of fungal resistance. *Drugs* 2002; 62: 1025-40.
2. Brun S, Berges T, Poupard P, et al. Mechanisms of azole resistance in petite mutants of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1788-96.
3. Coste A, Turner V, Ischer F, et al. A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating *CDR1* and *CDR2*, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics* 2006; 172: 2139-56.
4. Espinel-Ingroff A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25: 101-6.
5. Fera MT, La Camera E, De Sarro A. New triazoles and echinocandins: mode of action, in vitro activity and mechanisms of resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7: 981-98.
6. Franz R, Kelly SL, Lamb DC, et al. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 3065-72.
7. Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 501-17.

8. Gulat S, Irmak O, Doluca Yucesoy M. Investigation of efflux pumps and *ERG11* gene expression levels in fluconazole resistant *Candida albicans* isolates. 22nd ECCMID, March 31-April 3, 2012, London, UK. Congress and Abstract Book, P813.
9. Henry KW, Nickels JT, Edlind TD. Upregulation of *ERG* genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2693-700.
10. Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, et al. Resistance to fluconazole and cross resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol Delta (5,6) desaturation. *FEBS Lett* 1997; 400: 80-2.
11. Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* 2002; 359: 1135-44.
12. Kothavade RJ, Kura MM, Valand AG, Panthaki MH. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *J Med Microbiol* 2010; 59: 873-80.
13. Loeffler J, Stevens DA. Antifungal drug resistance. *Clin Infect Dis* 2003; 36: S31-41.
14. Looi CY, D'Silva EC, Seow HF, et al. Increased expression and hotspot mutations of the multidrug efflux transporter, CDR1 in azole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginitis patients. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 249: 283-9.
15. Lupetti A, Danesi R, Campa M, Tacca MD, Kelly S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends in Mol Med* 2002; 8: 76-81.
16. Manastrir L, Ergon MC, Yucesoy M. Investigation of mutations in *ERG11* gene of fluconazole resistant *Candida albicans* isolates from Turkish hospitals. *Mycoses* 2011; 54: 99-104.
17. Martinez M, Lopez-Riboz JL, Kirkpatrick WR, et al. Heterogeneous mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from an HIV-infected patient on continuous fluconazole therapy for oropharyngeal candidosis. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 515-24.
18. Morio F, Loge C, Besse B, Hennequin C, Le Pape P. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diag Microbiol Infect Dis* 2012; 66: 373-84.
19. Morschhauser J, Barker KS, Liu TT, et al. The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLoS Pathogens* 2007; 3: 1603-16.
20. Morschhauser M. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1587: 240-8.
21. Nascimento AM, Goldman GH, Park S, et al. Multiple resistance mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1719-26.
22. Nolte FS, Parkinson T, Falconer DJ, et al. Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 44: 196-9.
23. Park S, Perlin DS. Establishing surrogate markers for fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Microb Drug Resist* 2005; 11: 232-8.
24. Peman J, Canton E, Espinel-Ingroff A. Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7: 453-60.
25. Perea S, Lopez-Ribot JL, Wickes BL, et al. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1695-703.
26. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med* 2012; 125: S3-S13.
27. Pinjon E, Jackson CJ, Kelly SL, et al. Reduced azole susceptibility in genotype 3 *Candida dubliniensis*

- isolates associated with increased *CdCDR1* and *CdCDR2* expression. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1312-8.
28. Pinjon E, Moran GP, Jackson CJ, et al. Molecular mechanisms of itraconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2424-37.
 29. Rogers PD, Barker KS. Multidrug resistance transcriptional regulatory networks in *Candida*, pp: 403-16. In: Calderone RA, Clancy CJ (eds), *Candida and Candidiasis*. 2012, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
 30. Sanglard D, Coste A, Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res* 2009; 9: 1029-50.
 31. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 73-85.
 32. Sanglard D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr Opin Microbiol* 2002; 5: 379-85.
 33. Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, et al. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 668-79.
 34. Vandeputte P, Larcher G, Bergés T, et al. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4608-15.
 35. Vermitsky JP, Earhart KD, Smith WL, et al. Pdr1 regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: gene disruption and genome-wide expression studies. *Mol Microbiol* 2006; 61: 704-22.
 36. White TC, Hoot SJ. Mechanisms of resistance to antifungal agents, pp: 2008-19. In: Versalovic J, Carrell KC, Funke G, et al (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 2011, 10th ed. ASM Press, Washington, DC.
 37. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 382-402.
 38. Yücesoy M. *Candida* Türlerinde Antifungal Direnç Mekanizmaları. 4.Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, 3-6 Mayıs 2005, Konya. Kongre Kitabı, s: 46-58.

ASPERGILLUS VE AZOL DİRENÇ MEKANİZMALARI

Prof. Dr. Dilara ÖĞÜNÇ

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya

Aspergilloziste tedavi seçenekleri, özellikle oral preparatlar göz önüne alındığında kısıtlıdır. İnvazif *Aspergillus* enfeksiyonlarının tedavisinde temel olarak polienler, azoller ve ekinokandinler olmak üzere üç grup antifungal ilaç kullanılmaktadır. Bu ajanlar arasında azol grubu antifungaller tedavinin temelini oluşturmaktadır. *Aspergillus* türleri ile oluşan enfeksiyonların tedavisinde azol bileşiklerinin kullanılabileceği 1984 yılında in vivo ve in vitro çalışmalarla gösterilmiştir. İnvazif aspergillozis tedavisinde kullanılan ilk oral bileşik itraconazoldür. 1996 yılında, yeni antifungal ajan olan vorikonazolün *Aspergillus* türlerine etkisinin olduğu belirlenmiştir. 2006 yılında posakonazol, aspergillozis tedavisi için kullanım lisansı almıştır. İn vitro, in vivo ve klinik çalışmalar ile FDA onayı ve invazif aspergillozis tedavisi için kullanım lisansı almış azol grubu antifungal ilaçlar itraconazol, vorikonazol ve posakonazoldür. Bugün vorikonazol invazif aspergilloziste birincil tedavi seçeneği olmuştur. Itraconazol invazif aspergilloziste kurtarma tedavisinde onay almıştır. Posaconazol ise nötrope-nik lösemisi olan hastalar, myelodisplazi, Graft-versus-host hastalığı olan allojenik hemapoetik kök hücre transplant alıcılarında invazif aspergillozis profilaksisinde kullanım lisansı almıştır. Posakonazol Avrupa’da amfoterisin B veya itraconazole yanıt vermeyen invazif aspergillozis tedavisinde onay almıştır.

İn vitro direnç primer (intrensek) veya sekonder (kazanılmış) olabilir. Primer direnç bir mikroorganizma türünün genetik özelliği olan direnç türünü tanımlamaktadır. Mikroorganizmaların tür özelliği olarak; ilacın hedefi olan yapıyı taşıyamalarının ya da ilacın yapısal bir özellikten dolayı hedefe ulaşamamasının bir sonucudur. Primer dirence örnek olarak, *Aspergillus fumigatus* suşlarının flukonazol ve ketokonazole direnci verilebilir. Sekonder direnç ise bakterinin genetik özelliklerindeki değişimlere bağlı olarak eskiden duyarlı olduğu bir antimikrobiyal ajandan etkilenmemesi anlamına gelmektedir.

A.fumigatus suşlarında itraconazol direnci ilk olarak 1997 yılında Denning ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. İnvazif aspergillozisli iki hastadan izole edilen üç *A.fumigatus* suşunun itraconazol MİK değerlerinin $>16\mu\text{g/ml}$ olduğu saptanmıştır. Çalışmada her üç suştaki in vitro direncin in vivo olarak da doğrulandığı rapor edilmiştir.

Genel olarak azol direnç sıklığı ülkeden ülkeye değişim göstermektedir. 2000 yılında Manchester’da yapılan ve 900 *A.fumigatus* izolatında itraconazol direncinin araştır-

rıldığı bir çalışmada, itraconazol direnç prevalansının %2 olduğu saptanmıştır. Hollanda'da ise azol direncinin yıllar içinde dramatik olarak arttığı gözlenmiştir. Belçika, Danimarka, Fransa, İsveç, İspanya ve Norveç'ten ise vakalar bildirilmiştir.

Azollerle sık karşılaşma, ilaca direnç gelişmesinde en önemli risk faktörüdür. Azol direnci saptanan *A.fumigatus* ile enfekte olgular arasında, azol ile karşılaşan hastalar olduğu gibi karşılaşmayan hastalar da bulunmaktadır.

Azol grubu antifungal ilaçlar etkilerini, lanosterolden ergosterol sentezinde ara basamakta görevli olan *cyp51* geni ile kodlanan lanosterol 14 α -demetilaz enzimini inhibe ederek gösterirler. Enzim aktivitesinin olmayışı C-14 metil sterol ara ürünlerinin birikimine ve üremenin inhibisyonuna yol açar. Azol direncine yol açan önemli direnç mekanizmaları; (1) İlacın hedefi olan enzimin modifikasyonu, (2) İlaç efluks pompasının fazla eksprese edilmesi ve (3) İlacın hedefi olan enzimin fazla eksprese edilmesidir.

Gözlenen direnç fenotipi aminoasit değişikliğine bağlıdır, birden fazla azol etkilenebilir. Vakaların büyük bölümünde azol direnci *cyp51A*'daki nokta mutasyonlarının sonucu olarak gelişir. Hollanda ve İngiltere'de saptanan direnç mekanizmaları da birbirinden farklıdır. Hollanda'da azol direnci saptanan *A.fumigatus* klinik izolatlarının %90'ından fazlasında tek bir direnç mekanizması bulunurken (TR/L98H ile gösterilen kodon 98'de nokta mutasyonu), İngiltere'de dirençli suşlarda çeşitli *CYP51A* mutasyonları tanımlanmıştır. Bu farkın nedeni Hollanda'da direnç kaynağının çevresel olmasıdır. Tarımda kullanılan azol bileşiklerinin, dirençli suşların ortaya çıkmasında rolü olduğu düşünülmektedir. İngiltere'de ise hastalarda uzun süreli azol profilaksisinin direnç gelişimine yol açtığı düşünülmektedir.

İnvazif aspergillozide tedavi seçeneklerinin kısıtlı olması nedeniyle azol bileşiklerine karşı gelişen direnç, bu olguların tedavisinde klinik olarak önemli sonuçlar doğurabilecektir.

Kaynaklar

1. Bueid A, Howard SJ, Moore CB, et al. Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(10):2116-8.
2. Dannaoui E, Borel E, Monier MF, et al. Acquired itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47(3): 333-40.
3. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(6): 1364-8.
4. Fraczek MG, Bromley M, Bowyer P. An improved model of the *Aspergillus fumigatus* CYP51A protein. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(5): 2483-6.
5. Howard SJ, Webster I, Moore CB, et al. Multi-azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28(5): 450-3.

6. Jeurissen A, Cooreman S, Van Kerckhoven W, et al. Invasive pulmonary aspergillosis due to a multi-azole resistant *Aspergillus fumigatus*. *Acta Clin Belg* 2012; 67(1):46-8.
7. Lockhart SR, Frade JP, Etienne KA, et al. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from the ARTEMIS global surveillance study is primarily due to the TR/L98H mutation in the *cyp51A* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(9): 4465-8.
8. Manavathu EK, Abraham OC, Chandrasekar PH. Isolation and in vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole and posaconazole of voriconazole-resistant laboratory isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7(3): 130-7.
9. Mortensen KL, Mellado E, Lass-Flörl C, et al. Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(11): 4545-9.
10. Mosquera J, Denning DW. Azole cross-resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(2): 556-7.
11. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med* 2012; 125(1 Suppl): S3-13.
12. Snelders E, Melchers WJ, Verweij PE. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a new challenge in the management of invasive aspergillosis? *Future Microbiol* 2011; 6(3): 335-47.
13. van der Linden JW, Snelders E, Kampinga GA, et al. Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17(10): 1846-54.
14. Verweij PE, Howard SJ, Melchers WJ, Denning DW. Azole-resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints. *Drug Resist Updat* 2009; 12(6): 141-7.
15. Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, Melchers WJ. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis* 2009; 9(12): 789-95.

ROTAVİRUS VE ROTAVİRUS AŞISI SONRASINDA DİĞER VİRAL GASTROENTERİT ETKENLERİNİN DURUMU

Doç. Dr. Gülendaml BOZDAYI

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Genel özellikler

Rotavirus, dünya genelinde 5 yaş altı çocuklarda görülen akut gastroenteritlerin en önde gelen etiyolojik ajanıdır. Rotavirus ishali nedeniyle dünya genelinde her yıl 111 milyon ishal atağı, 25 milyon poliklinik başvurusu olmakta ve 2 milyon çocuk hastaneye yatırılmaktadır¹. Şiddetli rotavirus diyareleri sebebiyle %85'i gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere dünya çapında her yıl 611.000 çocuk hayatını kaybetmektedir².

Gastroenterite sebep olan diğer ajanlardan farklı olarak rotaviruslar, sosyoekonomik koşullara ve hijyen önlemlerine bağlı olmaksızın, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde aynı sıklıkta görülmektedir. Bu nedenle rotavirus "demokratik virus" olarak da adlandırılmaktadır^{3,4}. Rotavirus gastroenteritleri tedavi olanaklarının yetersiz olduğu gelişmekte olan ülkelerde mortalite ile gelişmiş ülkelerde ise morbidite ve ekonomik kayıplarla sonuçlanmaktadır³. Beş yaş altındaki çocuklarda akut gastroenterit nedeniyle hastane yatışlarının %39 (%25-58)'undan rotaviruslar sorumludur^{5,6}.

Dünyada en sık görülen rotavirus tipleri G1-4, G9, P[8], P[4] ve P[6]'dır. Serotip G1P[8] (%64.7), G2P[4] (%12), G4P[8] (%8.5) ve G3P[8] (%3.3) çocuklardaki rotavirus diyarelerinin %88.5'inden sorumlu tutulmaktadır⁷.

Çıplak, ikozahedral simetrik ve çift kapsidli yapıya sahip olan rotavirus, 11 parçalı çift iplikli RNA içermektedir. Genom tarafından kodlanan yapısal ve yapısal olmayan proteinler ve fonksiyonları Tablo 1'de görülmektedir.

Rotavirüslerde dış kapsid VP7 ve VP4'den oluşmaktadır. Konak hücreye tutunma ve penetrasyondan VP4 sorumludur ve proteolize yatkın bir proteindir. VP4 proteininin tripsin ile proteolitik kesimi, viral enfektiviteyi arttırmakta ve hücre içine girişi kolaylaştırmaktadır. Proteoliz sırasında VP4; VP5 ve VP8 yapılarına ayrılır. Kesim ürünleri virionla ilişkili olarak kalır. Protein VP7'nin hücre ile erken etkileşimi bilin-

memektedir, ancak VP7'nin tutunma ve giriş işlemi sırasında VP4'ün fonksiyonunu değiştirebildiği ve VP4 ile ilk etkileşim başladıktan sonra hücre yüzey molekülleri ile etkileşime girebildiği düşünülmektedir^{8,9}.

Tablo 1. Rotavirüsün yapısal ve yapısal olmayan proteinlerinin özellikleri⁸

RNA segmenti	Baz çifti	Kodlanan proteinler	Proteinin moleküler ağırlığı H10 ⁻⁴	Proteinlerin özellikleri
1	3300	VP1	12.5	Yapısal protein, iç kor proteini, RNA bağımlı RNA polimeraz, ssRNA'ya bağlanma, VP3 ile kompleks oluşturma, VP2 ile etkileşim
2	2700	VP2	9.4	Yapısal protein, kor proteini, dsRNA ve ssRNA'ya bağlanma, VP1 replikaz aktivitesi için gerekli
3	2600	VP3	8.8	İç kor proteini, guanil transferaz, metil transferaz, VP1 ile kompleks oluşturma
4	2360	VP4	8.7	Dış kapsid proteini, reseptör bağlama, virülans faktörü, nötralizasyon proteini, hemagglütinasyon füzogenik protein, VP5 ve VP8 oluşturma
5	1600	NSP1	5.9	Yapısal olmayan protein, RNA'ya bağlanma, IRF'ye antagonist
6	1360	VP6	4.5	İç kapsid proteini, grup ve alt grup antijeni, transkripsiyon için gerekli
7	1100	NSP3	3.5	Yapısal olmayan protein, mRNA bağlayıcı, konak translasyonunun inhibisyonu
8	1060	NSP2	3.7	Yapısal olmayan protein, RNA ve NSP5 bağlayıcı, viroplazma oluşturma
9	1060	VP7	3.7	Dış kapsid glikoproteini, nötralizasyon proteini
10	750	NSP4	2.0	Yapısal olmayan protein, transmembran proteini, enterotoksin, hücrede Ca ²⁺ toplama
11	660	NSP5	2.2	Yapısal olmayan protein, fosforillenmiş, NSP2 bağlayıcı, VP2 ve NSP6 etkileşimi
		NSP6	1.2	Yapısal olmayan protein, NSP5 dimerizasyonu ve fosforilasyonu

Patogenez, klinik bulgular ve immün yanıt

Diyareye öncülük eden işlem, rotavirus ince barsaklarda enterositlere bağlanıp, onları enfekte ettiğinde başlamaktadır. Virusun hücre içine girişi ve dış kapsidinin soyulması ile viroplazma oluşmakta, virus ve viral proteinler salınmaktadır. Böylece hücreler luminal virus tarafından enfekte edilmektedir. Bu durum hücre içinde çok sayıda hücresel işlemi tetiklenmekte, klasik olmayan yolla NSP4 salgılanmaktadır. İntraselüler NSP4 internal depolardan, öncelikle ER'den, Ca^{+2} salınımını uyarmakta ve $[Ca^{+2}]$ 'yi artırmaktadır^{10,11}. İntraselüler Ca^{+2} 'nin artışı, mikrovillus iskelet ağ yapısının bozulmasına, epitelyumun absorptif kapasitesinin azalmasına, epitelyal yüzey üzerinde sindirimle ilgili enzim ekspresyonunun azalmasına neden olmakta ve diya-renin malabsorbsiyon bileşenini doğurmaktadır¹².

Çocuklarda rotavirus enfeksiyonlarının klinik spektrumu, asemptomatik enfeksiyondan dehidratasyon ile seyreden ciddi diyare ve ölüme kadar değişmektedir. İnkübasyon periyodu 1-4 gündür. Hastalık hafif ateş (%60-65) ve kusma (%60-70) ile başlamaktadır. Abdominal ağrı da görülebilmektedir. Genellikle 1-3 gün süren kusmayı, ani başlayan sulu diyare izlemektedir. Diyare kansız ve mukussuzdur¹³. Sulu diyare 5-8 gün sürmektedir. Ateş genellikle 38.5-39.5°C civarındadır.

Rotaviruslar esas olarak fekal-oral yolla bulaşmaktadır. Ancak rotavirus oda ısısında uzun süre stabil kaldığından, kontamine yüzeye temas ile kontamine su ve yiyeceklerle de bulaşabilir¹⁴.

Hastalıktan korunma, esas olarak bağırsak lümenindeki antikörlerle, özellikle de IgA ile sağlanmaktadır. İlk olarak bir hafta sonra duodenum sıvısı ve serumda özgül IgG yanıtı oluşmakta; 1-4 ay kadar sonra duodenum sıvısı ve serumda özgül IgG ve IgA yanıtı gelişmektedir. Bir yıl sonra serumda özgül IgG varlığı devam etmekte, ancak IgA saptanmamaktadır. Virus ile primer enfeksiyonu takiben rotavirusa özgül B ve T hücrelerinin üretimi uyarılmaktadır¹⁵.

Laboratuvar tanısı

Rotavirus ishallerinde dışkı suludur, nadir olgular dışında lökosit ve eritrosit içermez, lökositöz yoktur. Ağır ishallerde elektrolit dengesizliklerine rastlanmaktadır. İncelenmek üzere dışkı hastalığın akut devresinde, tercihen semptomların başlamasından itibaren 1-5 gün içinde alınmalıdır¹⁶.

Rotavirus enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında; elektron mikroskopi, hücre kültürü yöntemleri, serolojik testler (dışkıda antijen ve/veya antikor saptama) ve moleküler yöntemler uygulanabilir. Ancak rutin tanıda, ELISA veya immünokromatografik temele dayalı dışkıda hızlı antijen testleri tercih edilmektedir.

Tedavi ve korunma

Tedavide esas olan, ishale kaybedilen sıvı ve elektrolitleri, oral veya gerektiğinde parenteral yolla sağlamaktır. Rotavirus salgınları, kişisel hijyenin zayıf olduğu çocuk yuvaları ve yaşlıların bulunduğu bakım evlerinde sıklıkla ortaya çıkar. Dikkatli el yıkama virusun bulaşmasını azaltmada önemlidir¹⁶.

Rotavirus aşıları

Geçen yıllardaki umut kırıcı deneyimlere rağmen rotavirus aşı çalışmaları sürdürülmüştür. İki yeni rotavirus aşısı olan monovalan insan (Rotarix, GlaxoSmithKline) ve pentavalan insan-sığır reasortan (RotaTeq, Merck) rotavirus aşıları ile ilgili etkinlik ve güvenilirlik çalışmaları tamamlanmıştır. Bu iki aşı 2006 yılından itibaren ülkemizin de dahil olduğu 100'den fazla ülkede ruhsat almış ve rutin olarak 19 ülkede kullanıma girmiştir³ (Tablo 2). Her iki aşının da rotavirus diyarelerinden korunmada yüksek etkinlik ve güvenilirlik gösterdiği Dünya Sağlık Örgütü tarafından da belirtilmiştir^{3,8,14}. Çocukluk çağı rutin aşı şemalarına rotavirus aşısının eklenmesi ile, gelişmekte olan ülkelerde mortalitenin, gelişmiş ülkelerde ise hastane yatışları ve morbiditenin azalacağı umut edilmektedir³.

Tablo 2. Yeni rotavirus aşılarının özellikleri^{3,8}

	Rota Teq (PRV)	Rotarix (HRV)
Kökeni	Sığır/insan reasortan	İnsan atenüe suşu
İçeriği	Pentavalan (WC-3 bovine/insan G1-G4 tip ve WC-3/insan P tip reasortanı)	Monovalan (insan serotip G1P[8])
Doz sayısı	3 doz (2, 4 ve 6. aylarda)	2 doz (2 ve 4. aylarda)
Bağırsak invajinasyonu	70.301 bebekte yapılan çalışmada ilişki saptanmadı**	63.325 bebekte yapılan çalışmada ilişki saptanmadı**
Ağır rotavirus ishaline karşı koruyuculuk **	%98*	%85*
Avantajları	Güvenilir; immünojenitesi geniş; bağırsakta replikasyonu sınırlı	Güvenilir; tek virus suşu; 2 doz uygulama
Dezavantajları	Kompleks aşı, 3 doz uygulama	P1 dışındaki P serotiplere karşı düşük etkinlik

* Farklı skorlama sistemleri kullanılmıştır, bu nedenle karşılaştırılması uygun değildir.

** Market sonrası süreyans bu bulguyu desteklemektedir.

Rotavirus aşısı sonrasında diğer viral gastroenterit etkenlerinin durumu

Rotavirus için aşı yapılmasını takiben, rotavirusun yerini hızla diğer viral gastroenterit etkenlerinin alacağı öngörülmektedir. Bunlar; enterik adenoviruslar, insan kalısivirüsleri (Calicivirus), astrovirus, korona ve toroviruslar, Aichi virus ve pikobirnavirüslerdir. Bu bölümde, son yıllarda rotavirustan sonra en sık karşılaşılan norovirus (NoV) üzerinde durulacaktır.

Yapılan çalışmalar, norovirusun dünyada ve ülkemizde sporadik veya salgınlar şeklinde gastroenteritlere neden olduğunu göstermektedir. NoV salgınları sağlık sistemlerinde, turizm ve yemek endüstrisinde büyük ekonomik sıkıntı ortaya çıkarmakta ve ciddi iş gücü kayıplarına neden olmaktadır. Yeterli sıvı replasmanı yapılamayan hastalarda mortalite sebebi olabilmektedir. Özellikle 5 yaş altı çocuklarda ve yaşlılarda daha yaygın olarak görülmektedir. En sık karşılaşılan genogrup GII ve onun genotipi GII.4'tür. Gıda ve su kaynaklı viral gastroenteritlerin içerisinde önemli bir yeri vardır. Oldukça bulaşıcı ve birçok çevresel etkene karşı dirençli olması ve kısa sürede büyük popülasyonları etkileyebilmesi nedeniyle hızlı laboratuvar tanısı önemlidir. Hızlı tanıda daha çok ELISA ve immünokromatografi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Ancak, tanı yöntemlerinin karşılaştırıldığı bazı çalışmalarda, RT-PCR gibi moleküler yöntemler kullanıldığı zaman, ELISA'ya göre daha yüksek oranda pozitiflik saptanmaktadır. Ayrıca, laboratuvar tarafından NoV tanısı konulması hastaların gereksiz antibiyotik kullanmasını da engellemiş olacaktır.

Sonuç olarak; rotavirus halen gelişmekte olan ülkelerin önemli viral gastroenterit etkenidir. Ülkemizde de olduğu gibi, gelişmekte olan bazı ülkeler aşı konusunda önemli çalışmalar yapmakta, en azından isteyen ailelerin yaptırabilmesi amacıyla aşı bulundurmaktadırlar. Ancak gelişmiş bazı ülkelerde, aşı rutin takvime eklendiğinden yakın gelecekte daha az sorun olacak; buna karşın diğer viral gastroenterit etkenleriyle, özellikle NoV ile daha sıklıkla karşılaşacaklardır.

Kaynaklar

1. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(5): 565-72.
2. Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(2): 304-6.
3. Kurugöl Z, Salman N. Rotavirus infeksiyonları ve aşıları. *ANKEM Derg* 2008; 22(3): 160-70.
4. Bozdayı G, Dogan B, Dalgıç B, et al. Diversity of human rotavirus G9 among children in Turkey. *J Med Virol* 2008; 80(4): 733-40.
5. Şimşek Y, Bostancı İ, Bozdayı G ve ark. 0-5 yaş çocuklarda akut gastroenteritte rotavirus sıklığı ve serotip özellikleri. *Türkiye Klinikleri Pediatri Derg* 2007; 16: 165-70.
6. Kurugöl Z, Geylani S, Karaca Y, et al. Rotavirus gastroenteritis among children under five years of age in Izmir, Turkey. *Turkish J Pediatr* 2003; 45(4): 290-4.

7. Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* 2005; 15: 29-56.
8. Greenberg HB, Estes MK. Rotaviruses: from Pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology* 2009; 136: 1939-51.
9. Jayaram H, Estes MK, Prasad BV. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res* 2004; 102: 67-81.
10. Ruiz MC, Cohen J, Michelangeli F. Role of Ca^{+2} in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. *Cell Calcium* 2000; 28(3): 137-49.
11. Lundgren O, Svensson L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes Infect* 2001; 3: 1145-56.
12. Ramig RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol* 2004; 78(19): 10213-20.
13. Offit PA, Clark HF. Rotavirus, pp: 1696-703. In: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2000, 5th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
14. Yarkin F. Gastroenterit virusları, s: 245-9. Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S (ed), Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. 2004. Güneş Kitabevi, Ankara.
15. Valezquez FR, Matson DO, Guerrero ML, et al. Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. *J Infect Dis* 2000; 182(6): 1602-9.
16. Öztürk R. Reovirus Ailesi ve Diğer Gastroenterit Virusları, s: 1226-31. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (ed), Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2002, 2. baskı. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.

VİRAL GASTROENTERİTLERE BAĞLI SALGINLAR VE HIFZISSİHHA DENEYİMLERİ

Doç.Dr.Gülay KORUKLUOĞLU

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi), Ankara.

Akut gastroenteritler tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de ciddi bir halk sağlığı sorunu oluşturmakta ve özellikle çocuk yaş grubunda yaygın olarak görülen enfeksiyon hastalıkları arasında yer almaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde akut gastroenterit enfeksiyonları, solunum yolları enfeksiyonlarından sonra çocuk morbiditesinin ve sağlık harcamalarının önemli bir kısmını teşkil etmektedir. Ülkemizde ishal, çocuk ölümü nedenleri arasında beşinci sırada bulunmaktadır.

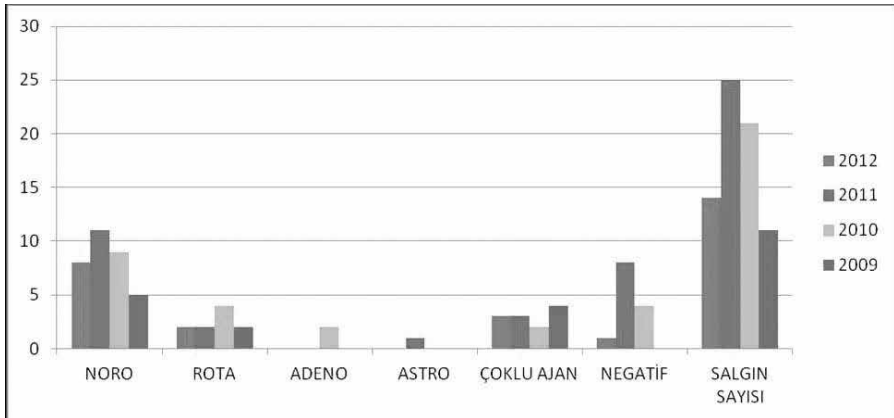
Hayatın ilk 5 yıllık döneminde karşılaşılan akut gastroenterit vakalarının %70'inde etken olarak viruslar saptanmaktadır. Yirmiden fazla viral ajan akut su kaynaklı diyare etkeni olarak bilinmektedir. Viral kaynaklı akut gastroenterit etkenleri arasında en sık karşılaşılan viruslar; norovirus, rotavirus, adenovirus ve astrovirus yer almaktadır. Akut su kaynaklı diyarelerde koenfeksiyonlara da sıklıkla rastlanılmaktadır. Dünyada en sık akut diyare etkeni olarak rotavirus görülmekte iken, akut su kaynaklı gastroenterit salgınlığının etkeni olarak da norovirus sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Norovirus, oldukça bulaşıcı ve virülen bir patojendir; dış ortama oldukça dayanıklıdır, dışkı ile atılım süresi uzundur ve düşük dozlarla (10-100 partikül) enfeksiyona neden olabilmektedir. Bu viruslar içinde rotavirus grup A, tüm dünyada 5 yaş altı çocuklarda ve bebeklerde en yaygın akut gastroenterit etkenidir. Dünyada yılda yaklaşık 527.000 çocuk ve bebek, rotavirusun etken olduğu gastroenterit nedeniyle ölmektedir ve bu ölümlerin %85'ten fazlası Afrika ve Asya kıtasındaki düşük gelirli ülkelerde gözlenmektedir. Virusun neden olduğu ciddi gastroenterit tablosunda şiddetli ishale, kusma ve ateş de eşlik etmektedir. Dolayısıyla hastaların, oral rehidratasyonunun mümkün olamaması ve konvülsiyon riskleri nedeniyle hastaneye yatırılarak tedavi edilmesi gerekmektedir. Güncel çalışmalar, tüm dünyada 5 yaş altı çocuklarda ishale bağlı hastaneye yatışların %40'ının rotavirus enfeksiyonları nedeniyle olduğunu ortaya koymaktadır.

Enterik adenovirüsler (Ad40 ve Ad41), akut gastroenterit etkeni olarak daha nadiren bildirilmektedir. Ayrıca, daha hafif ve kendi kendini sınırlayan enfeksiyona neden olmaktadırlar. Fakat bağışık yanıtı baskılanmış hastalarda persistan hale gelebilmekte ve hayati tehdit oluşturmaktadırlar. Enterik adenovirüslerin, enfeksiyon bulguları kaybolduktan sonra da viral atılımının uzun süre devam etmesi, çocuk kliniklerinde salgın yapabilmelerini kolaylaştırmaktadır. Hem ölüme neden olabilmeleri hem de günümüzde etkili tedavilerin geliştirilememiş olması nedeniyle, viral gastroenteritlerle

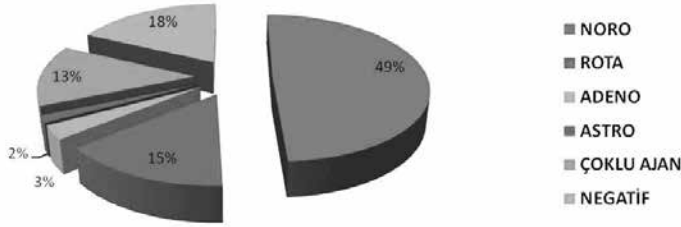
mücadele kapsamında epidemiyolojisinin mutlaka süreyans çalışmalarıyla takip edilmesi gerekmektedir.

Geniş bir coğrafyada yer alan ülkemizde gastroenterit salgınlarına neden olan eti-yolojik ajanın doğru ve hızlı şekilde tanımlanmasının, alınacak önlemler ve uygulanacak tedaviler açısından çok büyük bir önem taşıdığı tartışmasız bir gerçektir. Bu kapsamda eski adıyla Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi , yeni yapılanmada Türkiye Halk Sağlığı Kurumu’nun en önemli görevlerinden biri ülkemizdeki salgın araştırmalarını hızlı ve doğru bir yolla gerçekleştirip kısa sürede sınırlanmasını sağlamaktadır. Bu amaçla kurum bünyesinde kurulan Erken Uyarı ve Yanıt Birimi’nin önemli görevlerinden birisi, ilgili diğer birimlerle de koordineli bir şekilde çalışarak çok hızlı yayılma potansiyeli bulunan su kaynaklı salgınlara müdahale etmektir. Bu kapsamda gönderilen örnekler, aynı zamanda bakteriyel ve paraziter etkenler açısından da incelenmektedir.

Akut gastroenterit etkeni açısından araştırılmak üzere, farklı zaman dilimlerinde ve çok çeşitli coğrafik bölgelerden laboratuvarımıza gönderilen örnekler, viral etkenler açısından moleküler yöntemler kullanılarak incelenmektedir. 2009 yılından itibaren merkezimize gönderilen salgın örneklerinin ve saptanan etkenlerin dağılımı Şekil 1 ve 2’de gösterilmiştir.



Şekil 1. Viral gastroenterit etkenlerinin 2009-2012 yıllarındaki salgınlara göre dağılımı



Şekil 2. Salgınlarda izole edilen etkenlerin dağılımı (2009-2012)

Akut gastroenteritlerin mevsimsel bir dağılım göstermediği, yılın her döneminde etken olabilecekleri ve bu nedenle kişisel koruyucu ve toplumu koruyucu tedbirlerin her zaman devam ettirilmesi gerektiği unutulmamalıdır. Şebeke sularının klorlanması, filtreleme sistemlerinin gözden geçirilmesi gibi genel önlemler ve kişisel hijyen kurallarına dikkat edilmesi gibi korunma önlemlerinin etkin bir şekilde ayarlanabilmesi için, bu viral ajanlara ait ülke bazında epidemiyolojik verilere ihtiyaç olduğu ortaya çıkmaktadır. Sonuç olarak, akut gastroenteritlerin viral ajanlar ile oldukça sık olarak görülebildiği ve bu ajanların çoklu enfeksiyon etkenleri olarak karşımıza çıkabildiği hatırdan çıkarılmamalıdır. Ayrıca çalışmalarını yaptığımız norovirus, rotavirus, astrovirus ve adenovirus gibi etkenleri, yılın her zamanında ve değişik coğrafi bölgelerde akut gastroenterit patojeni olarak tespit etmenin mümkün olduğu da unutulmamalıdır. Kontrol önlemlerinin alınması ile akut gastroenterit salgınlarını önlemek, böylece hastalığa bağlı sağlık harcamalarını azaltarak ve işgücü kaybını önleyerek hastalık yükünü azaltmak da mümkün olmaktadır.

Kaynaklar

1. Albayrak N, Yağcı-Çağlayık D, Altaş AB, Korukluoğlu G, Ertek M. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarı, 2009 yılı akut viral gastroenterit verilerinin değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2011; 68(1): 9-15.
2. Altindis M, Bányai K, Kalaycı R, et al. Frequency of norovirus in stool samples from hospitalized children due to acute gastroenteritis in Anatolia, Turkey, 2006-2007. *Scand J Infect Dis* 2009; 41(9): 685-8.
3. Bayraktar B, Toksoy B, Bulut E. Akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus ve adenovirus saptanması. *Klimik Derg* 2010; 23(1): 15-7.
4. Ceyhan M, Alhan E, Salman N, et al. Multicenter prospective study on the burden of rotavirus gastroenteritis in Turkey, 2005-2006: a hospital-based study. *J Infect Dis* 2009; 200 Suppl 1: S234-8.
5. Karadag A, Acikgoz ZC, Avci Z, et al. Childhood diarrhoea in Ankara, Turkey: epidemiological and clinical features of rotavirus-positive versus rotavirus-negative cases. *Scand J Infect Dis* 2005; 37(4): 269-75.
6. Turgut M. Viral gastroenteritler. *Türkiye Klinikleri J Pediatr - Special Topics* 2004; 2(3): 260-4.
7. Uyar Y, Carhan A, Ozkaya E, Ertek M. Türkiye’de 2008 yılında ortaya çıkan ilk norovirus salgınının laboratuvar sonuçlarının değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42(4): 607-15.

ANTİMİKROBİYAL İLAÇLARIN GELİŞTİRİLMESİNDE GENOMİKLER

Prof.Dr. Meltem YALINAY ÇIRAK

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi (Klinik) Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Birçok antimikrobiyale dirençli patojenik mikroorganizmanın ortaya çıkması günümüzde çok önemli bir sorun oluşturmaktadır. Bu durum antibakteriyel ilaç keşfi ve kullanımı için çok ciddi yeni yaklaşımlara gereksinim olduğunu ortaya koymaktadır. Tüm genom sekanslama, genotiplendirme ve gen ekspresyon profillemesi gibi genomikler konusundaki güncel gelişmeler, antimikrobiyal yollarını anlamak için sahip olduğumuz temel bilgilerin gelişmesine ve yeni hedeflerin keşfedilmesine olanak sağlamaktadır^{1,2}.

Kullanımda olan birçok antibiyotik sadece DNA replikasyonu, protein translasyonu ve hücre duvar sentezi gibi çok sınırlı sayıda biyolojik yolu hedeflemektedir. Genomikler yeni mikrobiyaller için alternatif hedef oluşturacak yeni biyolojik yol belirlenmesi için hızlı bir tanımlama aracıdır.

Konakta olmayan esansiyel proteinler ve yolakların tanımlanması

Esansiyel genlerin tanımlanması, genomiklerin antibiyotik hedeflerinin belirlenmesine sağladığı en önemli katkılardandır. Kullanımda olan antibakteriyellerdeki hedef gen sayısı, bilinen esansiyel genlerle karşılaştırılınca oldukça sınırlıdır (Tablo 1). Mikroorganizma genom sekanslarına dayalı transpozon mutagenesi ve allelik değişim gibi stratejiler aday esansiyel genlerin haritalanması ve rekombinant suşların oluşturulmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Karşılaştırmalı genomikler ise ökaryotlarda olmayan veya evrimsel olarak uzak korunmuş genlerin araştırılmasını sağlar^{3,4}.

Tablo 1. Antibakteriyelerde bilinen esansiyel genler ve kullanımda olan hedefler.

Hedef	Bilinen esansiyel genler	Kullanımda olan antibakteriyellerdeki hedef sayısı
DNA replikasyonu	19	3
Bölünme	5	0
Transkripsiyon	6	1
Translasyon	54	7
Yağ asidi sentezi	7	1
Hücre duvar sentezi	11	2
Nükleotid sentezi	8	0
Ko-enzim sentezi	4	2

Virülans genlerinin tanımlanması

In vivo ifadelenen virülans faktörleri ve genler potansiyel tedavi hedefleridir. İmza etiketli mutagenез konakta yaşayan ve çoğalabilen mutantları gösterirken, in vivo ekspresyon teknolojisi (IVET) enfeksiyon sırasında indüklenen genleri tanımlar. Mikroçipler ve transkriptom sekanslama IVET duyarlılığını arttırmakta, yeni jenerasyon sekanslama da imza etiketli mutagenез kapasitesini çoğaltmaktadır⁵.

Antibiyotik etki ve direnç yollarının anlaşılması

Antibiyotiklere yanıtta transkriptom profilleme, adaptif mutasyonların haritalanması, fonksiyonel genomikler ve karışık bakteri popülasyonlarının yüksek çıktılı profillemesi ve toplumdaki yaygın direncin izlenmesi, antibiyotik etki yollarının daha iyi anlaşılmasına yol açacaktır⁶.

Teragnostik ve kişisel tedaviler

Tedavi ve tanının hasta bazında kişisel olarak ele alınmasına “teragnostik” denmektedir. Hasta ve bakterinin genotiplendirilmesi ile her iki taraflı tedavi seçenekleri daha doğru şekillenebilecektir¹.

Metagenomikler ve antibiyotikler

Antibiyotik ve mikroflora arası ilişkileri ortaya koyar. Yeni biyosentetik gen gruplarını tanımlar. Genomikler sadece yeni antimikrobiyal hedeflerin geliştirilmesini değil, aynı zamanda etkisi ve etkinliğinin anlaşılması, direnç yollarının aydınlanması, an-

tibiyotik biyosentezinin optimize edilmesi ve enfeksiyon hastalığının spesifik tedavi koşulları için kişisel tedavi stratejilerinin oluşmasına önemli katkılar sağlamaktadır⁷.

Kaynaklar

1. Amini S, Tavazoie S. Antibiotics and the post-genome revolution. *Curr Opin Microbiol* 2011; 14(5): 513-8.
2. Nagaraj NS, Singh OV. Using genomics to develop novel antibacterial therapeutics. *Crit Rev Microbiol* 2010; 36(4): 340-8.
3. Alksne LE, Dunman PM. Target-based antimicrobial drug discovery. *Methods Mol Biol* 2008; 431: 271-83.
4. Pucci MJ. Novel genetic techniques and approaches in the microbial genomics era: identification and/or validation of targets for the discovery of new antibacterial agents. *Drugs R D* 2007; 8(4): 201-12.
5. Wenzel M, Bandow JE. Proteomic signatures in antibiotic research. *Proteomics* 2011; 11(15): 3256-68.
6. Freiberg C, Brötz-Oesterhelt H. Functional genomics in antibacterial drug discovery. *Drug Discov Today* 2005; 10(13): 927-35.
7. Wecke T, Mascher T. Antibiotic research in the age of omics: from expression profiles to interspecies communication. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(12): 2689-704.

ANTİMİKROBİYALLERE DİRENCİN MOBİL GENETİK ELEMANLARI VE KARAKTERİZASYONLARI

Doç.Dr.Bülent BOZDOĞAN

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın

Antibiyotiklerin önemli bir bölümü doğal olarak bakteriler veya mantarlar tarafından sentezlenirler. Mikroorganizmaların bu molekülleri sentezlemeleri izole olarak bulunmadıkları ve diğer mikroorganizmalarla paylaştıkları mikrodünyada kendilerine bir avantaj sağlar. Çünkü antibiyotikleri sentezleyen bakteriler sentezledikleri bu moleküllerden etkilenmezler. Doğal olarak sentezledikleri bu moleküllere kendilerinin ve bunlara maruz kalan diğer mikroorganizmaların bağışık olabilmesi, ancak birtakım direnç mekanizmalarının varlığıyla mümkün olabilmektedir. Bu direnç mekanizmaları mutasyona bağlı olabildiği gibi kromozom üzerindeki genler tarafından kodlanan proteinlerle de sağlanabilmektedir. Mikroorganizmalar arası gen transferi sayesinde bu direnç genleri aynı tür veya aynı cins bakteriler arasında yayılabilmekte, hatta cinsler arası geçiş de mümkün olabilmektedir. Direnç genlerinin hücreler arasında transferini sağlayan birbirlerinden çok farklı mobil genetik elemanlar mevcuttur. Mobil genetik elemanlar arasında plazmidler, transpozonlar, integratif konjugatif elemanlar (ICE), genomik adacıklar ve integronlar sayılabilir. Türler arasındaki farklılaşmayı sağlayan en önemli faktörlerden biri de mobil genetik elemanlardır ve transfer işleminde görev alan transpozazların doğada en yaygın olan genler oldukları bildirilmiştir¹. Farklı mobil genetik elemanlar bir arada bulunarak mozaikler oluşturabilmektedir. Bir ICE üzerinde transpozon(lar) yer alabilmekte veya konjugatif bir plazmid transpozon ve/veya integron taşıyabilmektedir. Sonuçta türe veya cinsle bağlı mobil genetik elemanlardan ziyade tür veya cins bağımlılığı olmayan hareketlilikler ve bağımsız mobil genetik elemanlar ortaya çıkmıştır.

Genetik taşıyıcıların tanımlanması

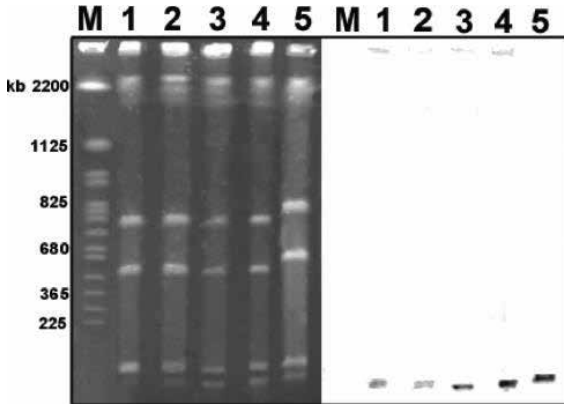
Direnç genlerinin bulunduğu genetik elemanlarının ve taşıyıcıların tanımlanması, bu direnç genlerinin yayılımının öngörülmesi açısından önemlidir. Özellikle mobil plazmidler üzerinde yer alan direnç genlerinin farklı klonlara, farklı tür ve cinslere yayılma olasılığı yüksektir.

Kromozomal ve plazmidik direnç ayrımı

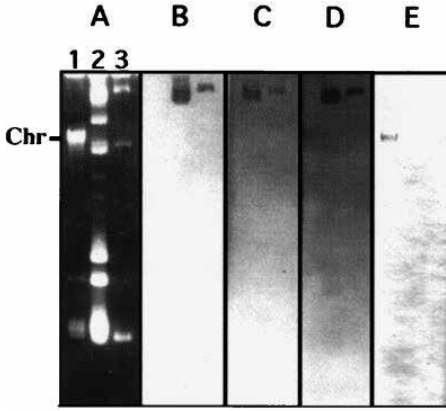
Bir direnç geninin lokalizasyonu için kullanılan en önemli yöntemlerin başında hibridizasyon gelir. Direnç geninin PCR ile çoğaltılması ve işaretlenmesi sonucunda prob olarak kullanılması mümkün olur. Bu işaretleme radioaktif moleküllerle, floresanla veya enzimlerle yapılabilir. Daha sonra restriksiyon enzimleriyle kesilen hücre total DNA'sı, oluşan fragmanların ayrımı amacıyla elektroforeze tabii tutulur ve ayrılan fragmanlar nitroselüloz membrana blotlama yoluyla aktarılır. Probla hibridizasyon sonucu hangi fragmanın direnç genini taşıdığı belirlenebilir. Kullanılabilecek enzimlerden birisi de I-CeuI enzimidir. Bu enzim 23S rRNA'da tanıdığı 19-26 bazlık bir bölgeden çeşitli bakteri cins ve türlerin kromozomlarını keser. Bu nedenle hibridizasyon sonrası eğer direnç geniyle hazırlanan prob I-CeuI fragmanlarından birisini işaretliyorsa bu direnç geninin kromozomal olduğu anlamına gelir (Şekil 1)².

Plazmidik ve kromozomal direnç geni ayırımında kullanılabilecek ikinci bir yol ise restriksiyon yapılmamış kromozomal ve plazmidik DNA elektroforezi sonrası aranan genlerle oluşturulan problemler aracılığıyla gen lokalizasyonunu belirlemektir. Toplam 4 direnç geni taşıyan bir suşta, *Enterococcus faecium* HM1032, bu genlerin lokalizasyonu arandığında, Şekil 2'de görüldüğü gibi *ermAM*, *satA* ve *vanA* genlerinin plazmidik, *vgb* geninin ise kromozomal olduğu bulunmuştur³.

Plasmid izolasyonu sonrası hassas bakteriye plazmid aktarılması ile direnç kazanılmasının gösterilmesi de, direncin üzerinde taşındığı genetik elemanın karakterizasyonu için kullanılmaktadır.



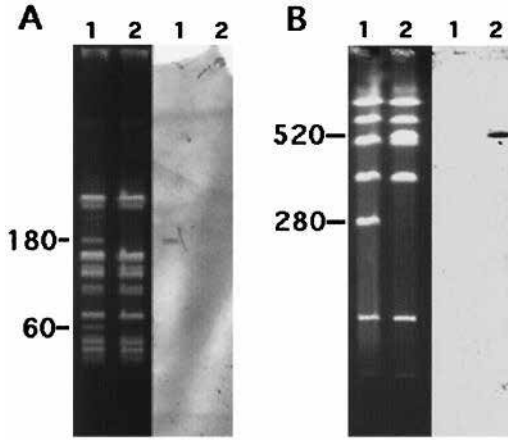
Şekil 1. I-CeuI enzimiyle kesilmiş *Bacillus clausi* suşları (solda), *erm34* geni ile hazırlanmış probun tutunduğu I-CeuI kromozomal fragmanı (Bozdoğan 2004).



Şekil 2. A paneli Hat 1: Kromozomal DNA, Hat 2: Plazmidik DNA, Hat 3: Transforman plazmidik DNA; B, C, D ve E sırasıyla *ermAM*, *satA*, *vanA* ve *vgb* problemleriyle hibridizasyon. Genlerden *vgb* kromozomal diğerleri ise plazmidiktir (Bozdogan 1999).

Direnç gen mobilitesinin araştırılması

Antibiyotik direncinin alıcı bir konjugasyon yoluyla aktarılması, direnç geninin mobil bir genetik eleman üzerinde olduğunun göstergesidir. Bunun için alıcı suşta kromozomal bir direnç olması gerekir. Aktarılan dirençle birlikte alıcının kromozomal direncini birlikte taşıyan suşların seçileceği seçici besiyerlerinin hazırlanmasıyla transkonjugantlar seçilebilir. Aktarılan genin hangi kromozomal fragmana yerleştiği de hibridizasyon yöntemiyle araştırılabilir. Genellikle genetik elemanın kromozoma yerleşmişiyse PFGE ile elde edilecek makrofragmanlardan birisinin kaybolduğu ve yeni bir fragmanın ortaya çıktığı gözlenir (Şekil 3). Direnç genini taşıyan eleman bazen plazmid olarak aktarılır, bazen de plazmid olsa dahi kromozom içerisine yerleşebilir. Şekil 3'de A panelinde alıcı suşta olmayan 2 fragmanın transkonjugantta belirdiği ve bunlardan birisinin direnç genini taşıdığı görülmektedir. Bu da iki fragmanın toplam büyüklüğü olan 240 kilobaz (kb)'lık bir plazmid geçişini göstermektedir. B panelinde ise alıcı suşta 280 kb'lık bir fragmanın kaybolduğu ve transkonjugantta aktarılan geni taşıyan 520 kb'lık bir fragman ortaya çıktığı görülmektedir. Bu da kromozomdaki 280 kb'lık fragman içerisine 240 kb'lık bir fragman eklendiğini göstermektedir⁴.



Şekil 3. Konjugasyonla aktarılmış direnç geni. A paneli Hat 2: Alıcı suş, Hat 1: Transkonjugant. Transkonjugantta 180 ve 60 kb’lik 2 fragmandan büyük olanı aranan direnç genini taşımaktadır. Kaybolan bant olmaması, direncin plazmidik olduğunu göstermektedir. B paneli Hat 1: Alıcı, Hat 2: Transkonjugant. Alıcıdaki 280 kb’lik fragman 240 bazlık aranan geni taşıyan fragmanı almış ve transkonjugantta 520 kb’lik yeni bir bant ortaya çıkmıştır. Kromozoma 240 bazlık bir fragman eklenmiştir.

Direnç geninin çevresinin sekanslanması

Direnç geninin transpozon veya plazmid gibi genetik eleman üzerinde olduğu hibridizasyon yoluyla belirlense de, bu genetik elemanın tanımlanması için sekanslanması gerekir. Genetik elemanın sekanslanması için ise iki yöntem kullanılabilir:

Klonlama

Klonlama ile gen ve çevresindeki bölgenin birlikte bir plazmid içerisine alınması sağlanır. Daha sonra bu “fragman insert” çoğaltmak için hazırlanan primerler aracılığıyla sekanslanabilir. Eğer tek bir seferde sekanslanamıyorsa her sekans analizinden sonra yeni bir primer oluşturularak ileri bölgenin sekanslanması sağlanabilir (walk in sequence).

PCR

Inverse PCR: Total DNA’nın restriksiyon enzimiyle fragmanlar haline getirilmesi ve fragmanların ligasyonla sirküle hale getirilme esasına dayanır. PCR için kullanılacak primerlerin yönü ise gen dışına doğru olur. Böylece direnç geni değil fragmanda eklenen bölge çoğaltılmış olur⁵.

Tail PCR: Bu yöntem ise, gen içinden spesifik primerlerle gen dışından *arbitrary de-generate primers* (AD primer) kullanılarak yapılan nested PCR serileri sonucu elde edilen fragmanların sekansı esasına dayanır. Genlere komşu bölgelerin sekansını kolaylaştırmak için geliştirilmiştir⁶.

Sonuç

Bir direnç geninin tanımlanması kadar bu direnç geninin üzerinde yer aldığı genetik elemanın tanımlanması da önemlidir. Bu genin nasıl yayılacağına, hangi bakterilere ulaşabileceğine ve yayılım ivmesinin öngörülmesinde genetik elemanların tanımlanması temeldir. Bu konuda farklı yöntemler geliştirilmektedir. Sekans işlemlerinin giderek daha ucuzlaması ve genom sekanslarında hız artırıcı ve maliyet düşürücü gelişmelerin gerçekleşmesiyle, bakteri kromozomlarının daha yaygın sekanslanması ve genleri taşıyan ve yayılımlarına neden olan mekanizmaların daha çabuk aydınlatılması mümkün olacaktır.

Kaynaklar

1. Aziz RK, Breitbart M, Edwards RA. Transposases are the most abundant, most ubiquitous genes in nature. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(13): 4207-17.
2. Bozdoğan B, Galopin S, Leclercq R. Characterization of a new erm-related macrolide resistance gene present in probiotic strains of *Bacillus clausii*. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(1): 280-4.
3. Bozdoğan B, Leclercq R, Lozniewski A, Weber M. Plasmid-mediated coresistance to streptogramins and vancomycin in *Enterococcus faecium* HM1032. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(8): 2097-8.
4. Bozdoğan B, Berrezouga L, Kuo MS, et al. A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylolation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(4): 925-9.
5. Sambrook J, Russell DW. Inverse PCR, pp: 8.81–8.85. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2001, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
6. Singer T, Burke E. High-throughput TAIL-PCR as a tool to identify DNA flanking insertions. *Methods Mol Biol* 2003; 236: 241-72.

ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ GENLERİNİN TESPİTİ

Doç. Dr. Barış OTLU

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

Sülfonamidlerin 1930'lu yıllarda keşfedilmesinin ardından, kısa süre içerisinde birçok farklı antibiyotik sınıfı tanımlanmış ve buna bağlı olarak enfeksiyon hastalıklarından ölüm oranları hızla azalmıştır. Öyle ki; 1966 yılında Time Dergisinde çıkan bir yazıda, bakteriyel ve viral hastalıkların 2000 yılı itibariyle büyük ihtimalle ortadan kalkacağı konusunda uzmanların hemfikir oldukları öngörüsüne yer verilmiştir. İnsanoğlunun mikroorganizmalar karşısında ilan ettiği bu erken zafer sevinci, hızla gelişen direnç sorunu ve yeni antimikrobiyallerin keşfedilmesindeki ivmenin azalması ile yarım kalmıştır. Amerikan Mikrobiyoloji Akademisi tarafından 2009 yılında yayınlanan antibiyotik direnci ile ilgili bir raporun önsözünde; “antibiyotik direnci ile mücadele bir savaştır ve biz asla kazanamayacağız” vurgusu yapılmaktadır.

Antimikrobiyal direncin tespit edilmesi, enfekte hastaların optimal tedavilerinin sağlanması ve direncin toplum içinde yayılmasının önlenmesi açısından oldukça önemlidir. Dirençli bakterilerin saptanması, enfeksiyon kontrol önlemleri ve antimikrobiyal sürveyans çalışmaları için de temel oluşturur.

Antimikrobiyal direncin genetik temelinde hücrel genlerdeki mutasyonlar yer almaktadır. Antimikrobiyallere karşı direnç mekanizmaları şu şekilde sıralanabilir:

- Antimikrobiyal ajanı inaktive edecek enzimlerin üretimi,
- Antimikrobiyal ajanın etki edeceği hedefin aşırı üretilmesi ya da alternatifinin üretilmesi,
- Antimikrobiyal ajanın bağlanacağı hedefin değiştirilmesi,
- Antimikrobiyal ajanın hedefine ulaşmasının engellenmesi,
- Antimikrobiyal ajanın aktif pompa sistemi ile dışarı atılması.

Direncin belirlenmesinde kullanılan fenotipik yöntemler, yeni gelişen moleküler tekniklerle karşılaştırıldıklarında halen “altın standart” olarak kabul edilmektedirler. Bu yöntemler, bakteri türlerine göre değerlendirme standartları önceden belirlenmiş ve kolay uygulanabilir olmalarına rağmen bazı önemli dezavantajlara sahiptir. Örneğin; bakteri popülasyonlarında direnç genlerinin varlığı/ekspresyonu heterojen olabileceğinden ya da bazen indüklenmesi gerekebildiğinden direncin varlığı her zaman tam olarak gösterilemeyebilir. Aynı zamanda, kültür şartları veya inokulum

miktarı bu testlerin performanslarını etkileyip hatalı sonuçlara yol açabilir. Fenotipik yöntemlerle antimikrobiyal duyarlılık testleri için klinik örneklerden bakterinin saf olarak izole edilmesi zorunludur. Bu işlemler sırasında subkültürler de gerekebileceğinden zaman kaybına yol açmaktadır. Zaman faktörü özellikle yavaş ve güç üreyen bakteriler için daha da önemli hale gelmektedir. Direncin tespit edilmesinde geç kalınması veya hatalı sonuçlar, dirençli suşların tedavisini ve kontrolünü zorlaştırmaktadır.

Moleküler yöntemler, özellikle fenotipik yöntemlerin yetersiz kaldığı durumlarda direnç genlerinin tespiti için giderek artan oranlarda kullanılmaktadır. Özellikle fenotipe yansımayan direnç tespitinde ya da direncin karakterizasyonu gerektiğinde moleküler yöntemler rakipsizdirler. Moleküler biyoloji alanındaki son teknolojik gelişmeler, dirence yol açabilecek çoğul gen mutasyonlarının tespit edilmesini ve eksprese olan sekansların karşılaştırmalı analizlerinin yapılmasına olanak sağlamıştır.

Antibiyotik direncinin moleküler yöntemlerle genotipik olarak saptanmasının bazı avantajları şunlardır:

- Dirence neden olan genetik faktörün bulunup bulunmadığı cevabını net bir şekilde verir.
- Duyarlılık, orta düzey duyarlılık ve direnç gibi ülkeden ülkeye değişebilen fenotipik kategorilere bağımlı değildir.
- Düşük düzeyde dirence neden olan mekanizmaları saptamak daha kolaydır.
- Klinik örneklerden direkt olarak çalışılabilmesi tespit süresini kısaltır.
- Kolay ve hızlı yorumlanabilir, etkin antimikrobiyal tedavinin başlanmasını sağlar.
- Yoğun olarak bakteri kültürüne ihtiyaç duyulmadığından biyolojik tehlike riski daha düşüktür.
- Direncin yayılmasında önemli olan genetik elemanlar (integron, plazmid ve transpozonlar) ancak moleküler yöntemlerle saptanabilir.

Moleküler yöntemler, sağladıkları tüm bu avantajların yanında bazı dezavantajlara da sahiptir:

- Bu yöntemlerle antimikrobiyal direnç genleri tespit edilmektedir. Oysa antimikrobiyal tedavi seçimi, duyarlılığın saptanmasına göre yapılır.
- Sadece bilinen direnç genleri araştırılabilir, yeni direnç mekanizmaları tespit edilemez.
- Primer bağlanma bölgelerindeki mutasyonlar PCR amplifikasyonunu engelleyerek hatalı negatif sonuçlara yol açabilir.
- Gen ekspresyonunu etkileyen mutasyonlar, genin ifadelenmesini sağlayan öz-

göl mRNA'ların tespiti hedeflenmedikçe saptanamaz. Direncin bu tipi özellikle *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* türleri gibi çoğul dirençli nonfermentatif gram-negatif bakterilerde görülmektedir.

Tüm bu nedenlerden dolayı günümüzde kullanılan moleküler testler, antimikrobiyal duyarlılık saptamada kullanılan rutin fenotipik metodların yerini henüz alamamıştır.

Direncin tespitinde genotipik ve fenotipik yöntemlerin birlikte değerlendirilmesi, yöntemlerin dezavantajlarını giderirken, sonuçların doğrulanmasına da yardımcı olur. Ayrıca fenotipte görülen bir direnç profilinin genotipik olarak tespit edilememesi, yeni direnç mekanizmalarının fark edilmesini de sağlar.

Nükleik asit amplifikasyon ve hibridizasyon tekniklerindeki son gelişmeler; antimikrobiyal direnç genlerinin tespitini ve gen ekspresyonlarının gösterilmesini kolaylaştırmıştır. Her iki yöntemde de, prob ve primer dizaynı için veri bankalarındaki sekans bilgileri temel alınır. Antimikrobiyal direnç genlerinin yer aldığı bölgenin doğru seçilmesi, uygun ve özgül primer/prob tasarımının yapılabilmesi açısından oldukça önemlidir. Seçilecek prob ve primerler, tanımlanmış bir direnç genine ya da bir mutasyonu göstermek için belirli bir baz pozisyonunda meydana gelen tek nükleotid değişikliklerine özgül olabilir.

Antimikrobiyal direnç genlerini saptamak için en sık kullanılan nükleik asit amplifikasyon yöntemi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'dur. Bu yöntem, direnç genlerini araştıran diğer birçok moleküler teknik için de temel oluşturmaktadır. Konvansiyonel PCR için çok sayıda antimikrobiyal direnç geni hedef olarak tanımlanmıştır. Örneğin; *Staphylococcus aureus*'larda metisilin direncinin tespiti için "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) tarafından önerilen birçok fenotipik yöntem olmasına rağmen, konvansiyonel PCR yöntemiyle dirençten sorumlu *mecA* geninin gösterilmesi "altın standart" yöntem olarak kabul edilmektedir. Çünkü direncin ekspresyonu çoğunlukla heterojendir ve özellikle düşük düzey metisilin direncine sahip izolatlar kültür şartlarından etkilenebilir.

Bakteriler arasında direncin hızla yayılmasının bir nedeni de, direnç genlerinin integron gibi mobil genetik elementler üzerinde taşınmasıdır. İntegronlar, integraz geni (*intI*) ve rekombinasyon bölgelerini (*attI*) içerirler. İntegronlar, integraz genlerindeki sekans farklılığına göre sınıflandırılmışlardır. Direncin yayılmasında önemli olan bu genetik faktörler moleküler yöntemler ile gösterilebilir. Konvansiyonel PCR ile yapılan çalışmalar, *Enterobacteriaceae* üyelerinde, aminoglikozid ve trimetoprim direncini kodlayan gen kasetlerinin sınıf-1,2,3 integronlarda, metallo-beta-laktamazları kodlayan (IMP, VIM, SPM-1 ve GIM-1) genlerin ise özellikle sınıf-1 integronlar üzerinde baskın olduğunu ortaya koymuştur.

Streptococcus pneumoniae'da penisilin direnci giderek artmaktadır. Penisilin G diski ile yapılan fenotipik direnç testlerinde güçlükler yaşandığından bu amaçla oksasilin diski kullanılmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda, oksasilin diski kullanılarak yapılan disk difüzyon testlerinde dirençli bulunan suşların da, mutlaka dilüsyon yöntemleriyle doğrulanması gerektiği bildirilmektedir. *S.pneumoniae*'de altı penisilin bağlayan protein (PBP) bulunmaktadır. Bunlardan; *pbp1a*, *pbp2b* ve *pbp2X*'i kodlayan genlerde oluşan "mozaik mutasyonlar" penisilin direncine neden olmaktadır. Gillespie ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; dirence neden olan mutasyonların varlığı, PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) yöntemi ile araştırılmıştır. Bu yöntemde, PCR ürünleri *Hinf*I enzimi ile kesilerek oluşan fragmanların büyüklüğüne ve sayısına göre penisilin direncine neden olan mutasyonlar belirlenmiştir. PCR-RFLP yöntemi, *H.pylori*'de klaritromisin direnci (23S rRNA genindeki nokta mutasyonlar), *Salmonella enterica* serovar *Typhi*'de florokinolon direnci (*GyrA* genindeki nokta mutasyonlar) ve *Serratia marcescens* GSBL tiplerinin tespit edilmesi gibi daha birçok farklı çalışmada kullanılmıştır.

Farklı antimikrobiyal direnç genlerini aynı anda saptamak için, tek reaksiyonda birden fazla hedefin çoğaltılmasına olanak sağlayan multipleks PCR yöntemlerinin geliştirilmesi, ikinci jenerasyon moleküler yöntemlerin doğuşu olarak nitelendirilmiştir. Bu yöntemlerin kullanımı ile hedef DNA'nın tespiti, zaman ve maliyetten kazanç sağlamaktadır. Özellikle, vankomisine dirençli enterokoklarda (VRE) olduğu gibi dirençten sorumlu birden fazla genin olduğu durumlarda bu yöntem oldukça kullanışlıdır. Vankomisine dirençli enterokokların, kültür ve duyarlılık testleri kullanılarak saptanması MRSA'ya oranla daha zordur; özellikle de düşük düzeyde direnci saptamak bu bakterilerde daha güçtür. Depardieu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; stafilokok ve enterokoklardaki vankomisin direnç genlerini araştırmak için multipleks PCR yöntemini kullanmışlardır. Geliştirdikleri yöntemde; 10 farklı primer çiftini tek bir reaksiyonda kullanarak, aynı anda hem bu bakterilerin tür düzeyinde ayırımını yapmış (*S.aureus*, *S.epidermidis*, *E.faecalis*, *E.faecium*) hem de altı farklı glikopeptid direncini (vanA-E) tespit edebilmişlerdir. Multipleks PCR yöntemleri geliştirilirken, primerlerin erime derecelerinin yakın ve birbirleriyle hibridize olma olasılıklarının düşük olmasına dikkat edilmelidir. Ayrıca amplifikasyon ürünlerinin, jel elektroforezi ile birbirlerinden açık bir şekilde ayırt edilebilir olmaları gereklidir.

Gerçek zamanlı (real-time) PCR (RtPCR) yöntemlerinin geliştirilmesi, tanısal mikrobiyolojinin her alanında olduğu gibi antimikrobiyal direnç genlerinin tespitinde de birçok avantajı beraberinde getirmiştir. Klasik nükleik asit çoğaltma yöntemlerinden daha hızlı ve daha duyarlı olan RtPCR yöntemlerinde, amplikonun analizi için reaksiyon tüpünün açılması gerekmediğinden çapraz kontaminasyon riski daha azdır. Bu yöntemlerde çoğaltılan amplikonlar; floresan işaretli problemlerin kullanıldığı *TaqMan*, *molecular beacons*, *FRET (Fluorescence resonance energy transfer)*, *Scorpions* ve

AmplifluorTM gibi yöntemler ile özgül olarak; *SYBR Green I*, *YO-PRO-1* ve etidyum bromür gibi DNA'ya bağlanabilen boyalar ile özgül olmayarak gösterilebilir. Farklı floresan moleküllerin, farklı dalga boylarında ışıma yapmaları birden fazla hedefin saptanabildiği multipleks PCR uygulamalarının yapılmasına da olanak sağlar. Fukushima ve arkadaşları, geliştirdikleri multipleks RtPCR yöntemi ile pnömokoklarda, penisilin ve makrolid direncini birlikte göstermişlerdir. Bu çalışmada; penisilin direncine neden olan *pbp1a*, *pbp2b*, *pbp2X* genleri ile makrolid direncine neden olan *ermB* (23S rRNA metilasyonu) ve *ermA* (aktif pompa sistemini kodlar) genleri, aynı reaksiyonda gerçek zamanlı olarak tespit edilmiştir. Son zamanlarda, çoğaltılan hedef nükleik asidin optik olmayan yöntemlerle monitörize edilmesine dayanan elektrokimyasal RtPCR adı verilen yeni bir metod geliştirilmiştir. Bu yöntemde, reaksiyon karışımında yer alan redoks prop, çoğalan çift iplikli DNA'ya bağlanır (intercalation) ve ortamın elektrokimyasal sinyal oranını azaltır. Hassas voltmetre cihazları ile ölçülen elektrokimyasal potansiyel fark, hedef nükleik asidin çoğaldığını gösterir. Halen geliştirilmekte olan bu sistem, diğerlerine göre çok daha ucuz ve duyarlı bir yöntemdir.

DNA dizi analizi yöntemleri rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında, bakteri tanımlanması ve direnç genlerinin araştırılmasında kullanılmaktadır. Günümüzde Sanger'ın zincir sonlandırma temeline dayanan, dideoksinükleotid yöntemi yaygındır. Ancak yeni geliştirilen ve hızlı bir baz dizi analizi yöntemi olan *pyrosequencing* sistemi, özellikle tek nokta mutasyonuna bağlı antimikrobiyal direncin saptanmasını kolaylaştırmıştır. DNA dizi analizi ile antimikrobiyal direnç belirleme çalışmaları, özellikle *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* gibi yavaş ya da güç üreyen mikroorganizmalar üzerinde yoğunlaşmıştır. Tüberküloz basiline direncin fenotipik olarak tayini, örneğin laboratuvara ulaşmasından itibaren 8-10 haftayı bulabilmektedir. Direncin hızla belirlenmesi, çok ilaca dirençli (multi-drug resistance, MDR) ve yaygın ilaç dirençli (extremely drug resistance, XDR) *M.tuberculosis* suşlarının yayılmasının önlenmesi açısından oldukça önemlidir. DNA dizi analizi, dirence neden olan mutasyonların tespit edilmesinde "altın standart" yöntem olarak kullanılmaktadır.

Son yıllarda geliştirilmiş olan DNA mikroçip teknolojisi, antimikrobiyal direnç genlerinin ve mutasyona bağlı direncin tespitinde umut verici bir yöntem olarak gösterilmektedir. Bu yöntem, PCR ile elde edilen floresanla işaretli amplikonların çok sayıda farklı oligonükleotid prob içeren katı yüzeylerde, kendisine uyan proba hibridize olması temeline dayanmaktadır. Yüzeğe bağlı problemlerle hibridize olan işaretli amplikonların yaydığı floresan sinyaller, daha sonra optik tarayıcı ile saptanarak bilgisayar ortamında değerlendirilmektedir. Otomatize olma potansiyeli taşıyan bu teknoloji, aynı anda çok sayıda direnç mekanizmasının araştırılmasını mümkün kılmıştır. Friedrich ve arkadaşlarının toplam 157 prob kullandıkları çalışmada, *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri hem tür düzeyinde tanımlanmış hem de aminoglikozid, tetrasiklin ve

β -laktam gibi önemli antimikrobiyallere karşı direnç genleri aynı anda araştırılmıştır. Diğer bir çalışmada gram-negatif bakterilerde; TEM, SHV ve CTX-M gibi GSBL tipleri araştırılmıştır. Bu çalışmada, 156 aminoasit değişikliğini tespit edebilecek 618 prob kullanılmış ve GSBL'ye neden olabilecek genler beş saatte tespit edilebilmiştir. Diğer bir çalışmada ise; gram-pozitif bakterilerde dirence neden olabilecek 90 farklı gen, hızlı ve duyarlı bir şekilde tespit edilebilmiştir.

Mikroelektronik ve moleküler biyoloji alanlarındaki gelişmenin bir ürünü olan biyosensörler; "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC) tarafından; "kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar" olarak tanımlanmaktadır. Biyosensörler ile mikroorganizmaların tespitine yönelik çalışmalar 1990'lı yıllarda başlamış, ancak çalışmalar son beş yıl içerisinde büyük ivme ve çeşitlilik kazanmıştır. Çok az örnek gerektirmesi, kısa sürede sonuç vermesi ve taşınabilir olmaları gibi avantajlarından dolayı kullanım alanları giderek genişlemektedir. Geliştirilen biyosensör uygulamalarının yaklaşık %20'si antimikrobiyal araştırmalar ile ilgilidir. Özellikle MRSA tespiti için *mecA* geninin hedef alındığı hızlı ve taşınabilir birçok farklı tipte biyosensör geliştirilmektedir.

Antimikrobiyal direncin saptanmasında, geliştirilen yeni yöntemlerle birlikte moleküler yöntemlerin kullanımı giderek artmaktadır. Özellikle bazı mikroorganizmalarda bu yöntemler öne çıkmaktadır. Ancak beklentinin aksine, bugün için rutin fenotipik yöntemlerin yerine geçebilecek ideal bir moleküler test yoktur. Her iki yöntemin birlikte kullanılması hem direncin doğru tespit edilmesini hem de direnç mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. Abdelaal A, El-Ghaffar HA, Zaghoul MH, et al. Genotypic detection of rifampicin and isoniazid resistant Mycobacterium tuberculosis strains by DNA sequencing: a randomized trial. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2009; 8: 4.
2. Arnold C. Rapid analysis of resistant mutant genotypes using pyrosequencing. Methods Mol Biol 2010; 642: 217-23.
3. Bozdoğan B. Gram pozitif bakterilerde fenotipik ve genotipik direnç saptama yöntemleri. Bakterilerde Antimikrobiyal Direncin Belirlenmesinde Moleküler Yöntemlerin Kullanımı Kursu, 9 - 13 Haziran 2008, İzmir. Kurs Kitabı, s: 38-40.
4. Ceylan Koydemir H, Kūlah H, Özgen C, Alp A, Haşcelik G. MEMS biosensors for detection of methicillin resistant Staphylococcus aureus. Biosens Bioelectron 2011; 29(1): 1-12.
5. Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. J Clin Microbiol 2004; 42(12): 5857-60.
6. Durmaz R. Direnç gelişimini önlemede moleküler mikrobiyolojinin katkısı. Ankem Derg 2009; 23(Ek2): 111-5.
7. Fluit AC, Schmitz FJ. The use of molecular techniques to detect antimicrobial resistance in clinical bacterial isolates. Microbiol Today 2001; 28: 14-5.
8. Friedrich T, Rahmann S, Weigel W, et al. High-throughput microarray technology in diagnostics of

- enterobacteria based on genome-wide probe selection and regression analysis. *BMC Genomics* 2010; 11: 591.
9. Fukushima KY, Yanagihara K, Hirakata Y, et al. Rapid identification of penicillin and macrolide resistance genes and simultaneous quantification of *Streptococcus pneumoniae* in purulent sputum samples by use of a novel real-time multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 2008; 46(7): 2384-8.
 10. Garneau P, Labrecque O, Maynard C, et al. Use of a bacterial antimicrobial resistance gene microarray for the identification of resistant *Staphylococcus aureus*. *Zoonoses Public Health* 2010; 57 Suppl 1: 94-9.
 11. Sundsfjord A, Simonsen GS, Haldorsen BC, et al. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. *APMIS*. 2004; 112(11-12): 815-37.
 12. Gillespie SH, McHugh TD, Hughes JE, et al. An outbreak of penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* investigated by a polymerase chain reaction based genotyping method. *J Clin Pathol* 1997; 50(10): 847-51.
 13. Ho SL, Tan EL, Sam CK, Goh KL. Clarithromycin resistance and point mutations in the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori* isolates from Malaysia. *J Dig Dis* 2010; 11(2): 101-5.
 14. Japoni A, Gudarzi M, Farshad S, et al. Assay for integrons and pattern of antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* strains by PCR-RFLP in Southern Iran. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61(1): 85-8.
 15. Jenison R, Haeblerli A, Yang S, Polisky B, Ostroff R. Thin film biosensor for rapid detection of *mecA* from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Chem* 2000; 46(9):1501-4.
 16. Karahan ZC, Atalay F, Uzun M, et al. Sequence analysis of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Turkey. *Microb Drug Resist* 2004; 10(4): 325-33.
 17. Leinberger DM, Grimm V, Rubtsova M, et al. Integrated detection of extended-spectrum-beta-lactam resistance by DNA microarray-based genotyping of TEM, SHV, and CTX-M genes. *J Clin Microbiol* 2010; 48(2): 460-71.
 18. Mäkinen J, Marttila HJ, Marjamäki M, Viljanen MK, Soini H. Comparison of two commercially available DNA line probe assays for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006; 44(2): 350-2.
 19. Perreten V, Vorlet-Fawer L, Slickers P, et al. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. *J Clin Microbiol* 2005; 43(5): 2291-302.
 20. Reder-Christ K, Bendas G. Biosensor applications in the field of antibiotic research--a review of recent developments. *Sensors (Basel)* 2011; 11(10): 9450-66.
 21. The American Academy of Microbiology. Antibiotic Resistance: An Ecological Perspective on an Old Problem. <http://academy.asm.org/index.php/colloquium-program/browse-all-reports/232-antibiotic-resistance-an-ecological-perspective-on-an-old-problem-september-2009>
 22. Woodford N, Sundsfjord A. Molecular detection of antibiotic resistance: when and where? *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(2): 259-61.

PANEL 6: MOLEKÜLER MİKROBİYOLOJİDE MANUEL VE OTOMATİZE SİSTEMLER

NÜKLEİK ASİT İZOLASYONUNDA MANUEL VE OTOMATİZE SİSTEMLERİN KİYASLANMASI

Doç.Dr.Özgen ESER

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Enfeksiyon hastalıklarının tanısında günümüzde rutin kullanıma girmiş olan moleküler mikrobiyolojik yöntemler, insan emeğine olan ihtiyacı azaltmaları, hızlı ve doğru tanı olanağı sağlamaları ve daha yüksek standardizasyona sahip olmaları gibi özellikleri nedeniyle konvansiyonel yöntemlere tercih edilmeye başlamıştır. Özellikle klinik örnek akışının yüksek olduğu tanısal mikrobiyoloji laboratuvarlarında, moleküler yöntemlerin kullanımında otomatize sistemler daha çok ön plana çıkmaktadır. Ancak, bu yöntemlerin duyarlı ve özgül sonuçlar verebilmesi test edilecek klinik örneğin doğru seçilmesine ve nükleik asitin izolasyon ve saflaştırma aşamasının doğru yapılmasına bağlıdır. Nükleik asit izolasyon yöntemi sırasında hedef nükleik asidin stabilize edilmesi, toksik çözeltilerin ve santrifüjasyonların önlenmesi, ortaya çıkan inhibitörlerin uzaklaştırılması gibi bazı diğer kriterler de göz önüne alınmalıdır.

Enfeksiyon hastalığının tanısında altın standart olarak kabul edilen kültür yöntemi için alınan klinik örnek tipi, genel olarak moleküler yöntemler için de en uygun örnektir. Amplifikasyona dayalı moleküler tanı yöntemlerinde klinik örnekte patojene ait hedef genin bulunduğu tek bir kopya dahi tanı için yeterli olabilmektedir. Genel olarak, klinik örneğin yüksek hacimde alınması enfeksiyon hastalığının tanı şansını artırmak açısından doğru bir yaklaşımdır. Ne var ki, moleküler yöntemlerde kullanılan örnek hacmi 100 µl'yi geçmediğinden, hedef bölgenin yoğunlaştırılması aşamasında karmaşık basamakların kullanılması ile duyarlılığın düşürülmesi arasında bir seçim yapılması gerekmektedir.

Uygun örnek hazırlama yöntemiyle büyük hacimlerdeki örneklerde hedefi çoğaltıp göstermek mümkün olabilmektedir. Bununla birlikte, bazı diğer faktörler de göz ardı edilmemelidir. Örneğin, pürülan bir balgam ml'de 14 mg DNA içerebilmektedir. Bu durum, büyük örnek hacimlerinde ekstraksiyon sırasında DNA'nın yüksek miktarda

bulunmasına bağlı olarak özgül olmayan primer bağlanmasına, dolayısıyla da duyarlılığın düşmesine neden olabilmektedir.

Örnek hacmi, enfeksiyon etkeni olan mikroorganizma sayısının test hacmi başına düşük olduğu durumlarda önem kazanmaktadır. Uygulanan moleküler yöntemin duyarlılığına bağlı olarak, bir moleküler mikrobiyoloji laboratuvarı, enfeksiyon etkenine ait tek kopya sayısını saptayabilmekteyken, diğer bir laboratuvar 20-50 kopyadan daha azını saptayamamaktadır. Bu durum, uygulanan yöntemlerin optimal koşullara sahip olmasına rağmen, farklı laboratuvarlara ait sonuçlar arasında uyumsuzluğa neden olabilmektedir.

Enfeksiyon hastalıklarının tanısında en uygun örnek hazırlama yöntemini belirlemek için gerekli koşullar; örnek, mikroorganizma ve hedef nükleik asidin özelliklerine göre geliştirilmelidir. Örnek tipi (kan, serum, plazma, balgam, beyin omurilik sıvısı, vb), örnek hacmi, örneğin fiziksel özellikleri (sıvı, doku, sürüntü, vb), örneğin viskozitesi ve amplifikasyon inhibitörlerinin varlığı, örnek hazırlama yönteminde dikkate alınması gereken özelliklerdir. Örnekte bulunan mikroorganizma yükü, yani birim örnek hacmi içinde bulunan patojen mikroorganizma sayısı, etkenin hücre duvar yapısı ve etkenin kendiliğinden hücresel lizise uğraması gibi özellikler yöntem sırasında değerlendirilmesi gereken diğer unsurlar arasında bulunmaktadır. Hedef nükleik asidin özellikleri, örneğin; RNA veya DNA olması, çift zincirli veya tek zincirli olması, DNA kontaminasyonu olmaksızın RNA izolasyonu gerekliliği uygun örnek seçiminde önem kazanmaktadır.

Klinik örneklerden bakteriyel ve viral nükleik asitlerin saflaştırılması amacıyla birçok yöntem kullanılabilir. Ancak klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında, her örnek tipi için kullanılabilecek genel otomatize bir yöntem bulunmamaktadır. Tanı amacıyla yapılacak moleküler testte kullanılan klinik örnekteki mikroorganizmanın miktarı, hücre yapısı ve uygulanan yöntemin hassasiyeti, yöntem seçiminde önemli parametrelerdir. Araştırılacak mikroorganizma türü, nükleik asit izolasyonunda seçilecek yöntemin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Hedef molekülün tipi de yöntem seçimine doğrudan etki eden bir faktördür. Molekülün RNA ya da DNA olması, DNA'nın çift ya da tek zincirli saflaştırılacak olması, RNA'nın DNA kontaminasyonu olmadan saflaştırılma gerekliliği önemli değişkenlerdir. DNA göreceli olarak daha dayanıklıyken, RNA klinik örneğin saklanması, hücre parçalama ve nükleik asit saflaştırma işlemleri ve daha sonraki saklama sırasında kaybedilebileceğinden dayanıklılığı düşüktür.

Nükleik asitlerin elde edilmesinde hedefe yönelik dört basamak yer almaktadır. Bunlardan birincisi nükleik asidin serbestleştirilmesidir. İkinci basamak nükleik asidin dayanıklılığının artırılması, bunu takip eden üçüncü basamak inhibitörlerin uzaklaştırılmasıdır. Son basamak ise nükleik asidin yoğunlaştırılarak sıvı ortama yer-

leştirilmesidir. Laboratuvar ortamında bu basamakları farklı şekillerde uygulama kolaylığı bulunan konvansiyonel yöntemler arasında kaynatma yöntemi, fenil-kloroform ve CTAB (*Cetyltrimethylammonium bromide*) bulunmaktadır. Bu yöntemler, kontaminasyona açık olmaları ve tam standardize olmamalarına rağmen, maliyetlerinin düşük olması, basamaklara müdahale edilebilme imkanı sunmaları ve kısa sürede tüketilmeyi gerektiren bir kullanma süresine sahip olmamaları nedeniyle özellikle araştırma laboratuvarlarında tercih edilen izolasyon yöntemleri arasında yer almaktadırlar.

Ticari kitler ve otomatize sistemler, konvansiyonel sistemlerde olduğu gibi, nükleik asidin organizmadan çıkartılması ve serbestleşen nükleik asitlerin stabilizasyonu ile beraber inhibitörlerin uzaklaştırılması aşamalarını gerçekleştirmektedirler. Nükleik asitlerin organizmadan çıkartılması için kitler, daha çok guanodin tiosiyanat, lizozim, proteinaz K ve SDS gibi kimyasal yöntemleri içermektedir. Nükleik asitlerin saflaştırılması ve inhibitörlerin uzaklaştırılması aşaması ise tris, proteinaz K, guanidin-HCl gibi kimyasal yöntemlerle yapılabildiği gibi vakum ya da spin-kolon ve nükleik asidin silika ya da manyetik boncuklara yapıştırılması şeklinde fiziksel yöntemlerle de yapılabilmektedir.

Ticari olarak bulunan manuel kitlerden IsoQuick nükleik asit izolasyon kiti (Orca, ABD), Puregene izolasyon kiti (Gentra, ABD) ve Mastr Pure ekstraksiyon kiti (Epicentre, ABD) tamamen kimyasal yöntemleri kullanırken; QIAmp (QIAGEN, Almanya) ve High Pure saflaştırma kitleri (Roche, Almanya) spin-kolon, Nuclisens izolasyon kiti (bioMerieux, Fransa) ise silika boncuklara yapıştırma yöntemlerini kullanmaktadırlar. Spin-kolon yönteminde nükleik asitler santrifüje bir membran filtreye tutturularak; “Boom silica” yönteminde ise nükleik asitler silika boncuklara tutturularak saflaştırılmaktadır.

Ticari kitlerin işlem süresi 1 saat 55 dakika ile 4 saat 39 dakika arasında değişmektedir. Bu kitler, konvansiyonel yöntemlere göre uygulanması daha kolay ve duyarlılığı daha yüksek sistemler olsalar da, otomatize sistemlere göre daha emek-yoğun ve kontaminasyona açık sistemlerdir. Bu açıdan konvansiyonel yöntemlere açık bir üstünlük taşımamaktadırlar. Bunun yanı sıra, konvansiyonel yöntemlere göre kitlerin belirli bir kullanım süresinin olması, test yoğunluğunun çok olmadığı laboratuvarlar için kit ömrünün dolmasına ve test maliyetinin daha da artmasına neden olmaktadır.

Piyasada bulunan otomatize cihazlardan ABI 6700 (PE Biosystems Genomics, ABD), BioRobot (QIAGEN, Almanya), Nuclisens Extractor (bioMerieux, Fransa) ve X-Tractor Gene (Sigma-Aldrich, Almanya), tüp içindeki nükleik asidin vakum altında membran ya da silika ortama bağlanması prensibi ile çalışmaktadırlar. MagNa Pure (Roche, Almanya), BioRobot (QIAGEN, Almanya) ve Nuclisens miniMag (bioMerieux, Fransa) ise nükleik asidin manyetik boncuklara bağlanması prensibi ile çalışmaktadır.

MagNa Pure LC Cihazı (Roche, Almanya) 1-32 farklı örneğin aynı anda çalışılmasına imkan veren bir sistem olup 32 örnek 50-180 dakika içinde işleme tabi tutulmaktadır. Tam kan, serum/plazma, kan-kültür hücreleri, insan ve hayvan dokusu, bakteri veya mantar örneklerinde tüm nükleik asit, DNA, RNA, mRNA izolasyonu yapılabilir. Tamamen kapalı bir sistem içerisinde otomatik olarak çalışan MagNa Pure LC cihazı, filtrasyon, santrifügasyon ve diğer tüm manuel basamaklardan arındırılmış durumdadır. Örnekler arasındaki çapraz kontaminasyon riski son derece düşüktür.

QIAGEN otomatize sistemleri içinde yer alan BioRobotM48, manyetik boncukla ayırım prensibine sahip olan ve her testte 6-48 örnek çalışma imkanı veren ve RNA hücre-doku, DNA kan-doku ve viral nükleik asit izolasyonu yapabilen otomatize bir sistemdir. Altı örneği 20 dakikada, 48 örneği 2.5-5 saatte çalışabilme imkanına sahiptir. Hepa filtrasyonu ve UV sterilizasyonu ile kapalı bir sistem olup çapraz kontaminasyona izin vermemektedir. BioRobotMDx (QIAGEN, Almanya) ise, aynı test içinde 96 örnek çalışabilmekte ve testi 2.5 saat içinde tamamlayabilmektedir.

Cobas AmpliPrep Cihazı (Roche, Almanya) da, 72 örnek çalışabilme kapasitesi, 4 farklı testi aynı anda uygulayabilme ve kalitatif-kantitatif sonuç verebilme özelliği ile yine kolay örnek hazırlayan, güvenilir, kapalı otomatize bir sistemdir.

Moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında örnek hazırlamada kullanılan otomatize sistemlerde işlem süresi 20 dakika ile 2 saat arasında değişmektedir. Otomatize örnekleme sistemleri, uygulamada emek-yoğun olmamaları ve kontaminasyon riskini en aza indiren kapalı sistemler olmaları gibi avantajlara sahiptirler. Bu nedenle, pahalı sistemler olmalarına rağmen, yoğun iş yüküne sahip tanı laboratuvarlarında kullanılmaları, güvenilirlik ve hızlı tanı açısından önem taşımaktadır. Moleküler mikrobiyoloji tanı laboratuvarlarında özellikle yoğun örnek akışının olduğu durumlarda otomatize izolasyon sistemlerinin kullanımının bu üstünlüklerine rağmen, araştırma laboratuvarlarında konvansiyonel yöntemlerin kullanımı maliyetlerinin düşük olması nedeniyle tercih edilmelidir.

Kaynaklar

1. Döring G, Unertl K, Heininger A. Validation criteria for nucleic acid amplification techniques in bacterial infections. Clin Chem Lab Med 2008; 46(7): 909-18.
2. Dundas N, Leos NK, Mitui M, Revell P, Rogers BB. Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. J Mol Diagnostics 2008; 10(4): 311-6.
3. Loens K, Bergs K, Ursi D, Goossens H, Ieven M. Evaluation of NucliSens easyMAG for automated nucleic acid extraction from various clinical specimens. J Clin Microbiol 2007; 45: 421-5.
4. Riemann K, Adamzik M, Frauenrath S, et al. Comparison of manual and automated nucleic acid extraction from whole-blood samples. J Clin Lab Anal 2007; 21: 244-8.
5. Tang YW, Sefers SE, Li H, Kohn DJ, Procop GW. Comparative evaluation of three commercial systems for nucleic acid extraction from urine specimens. J Clin Microbiol 2005; 43: 4830-3.

LABORATUVARDA TASARLANAN (IN HOUSE) NÜKLEİK ASİT TESTLERİNDE KARŞILAŞILAN SORUNLAR VE ÇÖZÜM ÖNERİLERİ *

Prof.Dr. Ayhan KUBAR

Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Viroloji Bilim Dalı, Ankara.

Mikroorganizmaların nükleik asitleri, genellikle enfekte hastaların vücut sıvılarında, basit hibridizasyona dayalı moleküler tekniklerle saptanması mümkün olmayan düşük miktarlarda bulunur. Bu nedenle nükleik asitlerin saptanması ve kantitasyonu için önce “çoğaltma = amplifikasyon” işlemine gereksinim vardır. Bunu başarmak için iki kategori altında gruplayabileceğimiz moleküler biyoloji tekniklerinden yararlanılır¹:

1. Hedef çoğaltma (target amplification)
2. Sinyal çoğaltma (signal amplification)

1. HEDEF ÇOĞALTMA TEKNİKLERİ

Bu teknikler enzimatik reaksiyon döngüleriyle mikroorganizma nükleik asit kopyalarını (amplikonlar) fazla sayıda sentezletme prensibine dayanmaktadır. Amplikonlar değişik yöntemlerle saptanabilir ve klinik örneklerdeki mikroorganizma nükleik asitlerinin miktarı kantitatif olarak ortaya konabilir.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi birkaç farklı ısı ve bir termostabil DNA polimeraz enzimi kullanılarak gerçekleştirilir. Amplikonlar çift zincirli DNA'lardır. Nükleik asidi DNA olan mikroorganizmanın nükleik asit ekstraksiyonunu müteakip doğrudan PCR uygulanabilir. Buna karşılık nükleik asidi RNA olanlar için önce ters transkripsiyon basamağıyla komplementer zincirli DNA (cDNA) sentezine gereksinim vardır. Her bir PCR döngüsü sonrasında DNA kopyaları ikiye katlanır; teorik olarak “n” sayıda döngü ile reaksiyon başlangıcında mevcut olan DNA moleküllerinin her birinin 2ⁿ sayıda kopyası sentezlenir. Gerçekte 35-40 döngü sonra reaksiyon doygunluğa ulaşır ve bir plato çizer¹.

Transkripsiyon Aracılı Çoğaltma (Transcription Mediated Amplification; TMA) izotermal bir reaksiyondur ve ters transkriptaz ve T7 RNA polimeraz isimli iki enzim kullanılır. Amplikonlar tek zincirli RNA'lardır. Mikroorganizmanın nükleik asidi oligonükleotid problemlerle yakalanır ve manyetik mikropartiküllere bağlanır. Amplifikasyon

*Moleküler Tanı Dergisi 2007; 3(1):13-17 sayısından bazı değişiklikler yapılarak hazırlanmıştır.

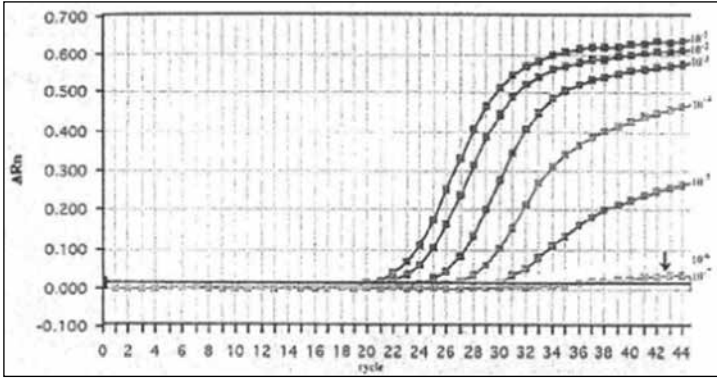
RNA transkriptlerinin otokatalitik izotermal üretimi 2 enzim yardımıyla gerçekleşir. Sentezlenen her yeni RNA, TMA işlemine yeniden girer ve bir sonraki replikasyon döngüsünde kalıp görevi görür, sonuçta hedef RNA'lar hızla çoğalır. Belli bir sayıda döngü sonrasında TMA reaksiyonları da bir platoya ulaşır¹.

PCR ve TMA amplikonlarının saptanması klasik olarak hareketsiz oligonükleotid problemlere spesifik hibridizasyon temeline dayanır. Amplikon-prob hibridleri enzimatik reaksiyon sonucu renk değişimi veya luminesan sinyal oluşumuna neden olurlar. Nükleik asit kalıbının relatif miktarları ve standart amplikonlar işlemin sonunda ölçülür ve sonuçlar oluşan standart eğriden okunur¹.

Son yıllarda birçok kolaylık sağlayan ve hedef nükleik asidin kantitasyon imkanını da veren gerçek zamanlı (real-time) PCR teknikleri geliştirilmiştir. Teknik, sentezlenen amplikonların saptanması ve PCR reaksiyonu sonrasında klinik örnekler içindeki saptanan mikroorganizma nükleik asidinin miktarının daha reaksiyon devam ederken ortaya konması esasına dayanır. Bu yöntemler teorik olarak klasik hedef çoğaltma yöntemlerinden daha duyarlıdır ve kontaminasyon riski daha azdır. Bu yöntemin dinamik olan kantitasyon aralığı giderek genişlemektedir. Bu da, bu yöntemlerin tedavi edilmiş veya edilmemiş enfeksiyonlu hastalarda gözlenen mikroorganizma yükünün ölçülmesinde fayda sağlamaktadır¹. Bu yöntemlerle ayrıca genotiplendirme, mutasyon analizleri ve multipleks uygulamaları da mümkün olduğundan klinik viroloji laboratuvarlarının bir parçası haline gelmiştir. “Real-time PCR” uygulamalarında sadece sıcaklık döngülerini sağlayan “thermal cycler”lar yerine, floresan oluşumunu sağlayan ve oluşan floresanı saptayan birimleri olan özel “thermal cycler”lar kullanılır². Günümüzde çoğaltma, saptama ve yorumlama için kullanılan birbirine benzer ancak bazı küçük farklar içeren birçok sistem mevcuttur. Bu sistemlerde birkaç yöntem kullanmak mümkündür. Fakat RNA ve/veya DNA'nın saptanması ve kantitasyonu için uygun primer/prob tasarımına gereksinim vardır¹.

“Real-time PCR” için laboratuvar da tasarlanabilecek hedef çoğaltma testleri

TaqMan (5' nuclease assay) yönteminde, “reporter” florokrom ve “quencher” florokrom ile işaretli bir prob, sens ve antisens PCR primerleri arasındaki hedef diziyi bağlanacak şekilde dizayn edilir. Prob üzerinde iki florokrom varsa da 3' uçtaki “quencher” molekülü 5' ucta yer alan “reporter” tarafından yayılan tüm floresanı durdurur. Her bir PCR reaksiyonu esnasında ise DNA polimeraz enzimi primeri uzatır ve sahip olduğu 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi ile probu parçalar ve “reporter” florokrom serbest hale geçer. Bu nedenle, çoğaltma döngüleri sırasında serbestleşen ve sistem tarafından saptanan floresanın miktarı her bir PCR döngüsünde üretilen amplikonların miktarıyla orantılıdır (Şekil 1)³.



Şekil 1. Farklı dilüsyonlardaki hedef nükleik asit düzeylerinin farklı floresan seviyelerinin “real time PCR” (TaqMan) yöntemi kullanılarak tespit edilmesi⁴

TaqMan primer-prob dizaynında dikkat edilmesi gerekenler, tecrübelerimiz

Klasik anlamda primer-prob dizaynı için temel bilgilere çeşitli kaynaklardan ulaşılabilmektedir. TaqMan primer-probları için tasarım önerileri şu şekilde sıralanabilir:

1. Primerlerin ve ampikonun seçim bölgeleri mümkün olduğu takdirde GC adacıklarından fakir olmalıdır. Eğer zorunlu olarak GC adacıklarından zengin bir bölge seçilecekse reaksiyona %5-10 oranında DMSO veya benzeri denatüran ilave edilmelidir.
2. Primerlerin erime ısıları (Tm) 53-62°C aralığında olmalıdır. Aynı primerler kullanılmasına rağmen 53°C’lik erime ısı ile 60°C’lik erime ısı (annealing) arasında reaksiyon sonuçları açısından kullanılan Hot start Taq polimeraz ve onun reaksiyon ortamı (buffer) nedeniyle ciddi farklar oluşabilmektedir. Bu durum, her primer için kullanıldığı laboratuvar tarafından tespit edilmelidir.
3. Farklı primerler aynı etken veya patojenin farklı bölgeleri için oldukça farklı “real-time PCR” reaksiyon sonuçları doğurabilmektedir. PCR etkinliği olarak adlandırılan bu durum daima göz önünde bulundurulmalıdır.
4. Primerlerin 3’ uçlarının son nükleotidlerinin G veya C olması PCR etkinliğini arttıran ancak yalancı pozitif sonuçlara da kolay yol açabilen bir durumdur. Bu nedenle primerlerin 3’ uçlarının son nükleotidlerinin T ve A’dan zengin olması, mümkün ise son üç nükleotidin TA olmasına dikkat edilmelidir.
5. “Real-time” reaksiyonu ile uygun yükseklikte pik elde edilemiyorsa, reaksiyon ürünü PCR etkinliğinin analizi için mutlaka agaroz jel ile değerlendirilmelidir.
6. “Real-time PCR” test sonucunda istenen pikler elde edilemiyorsa, öncelikle primer 2 (antisense) olmak üzere primerler 1-10 nükleotid sağa-sola kaydırılmalı ve erime ısıları artırılıp-azaltılmalıdır.

7. Reaksiyonda kullanılacak primer miktarı 3-25 pmol ve prob miktarı ise 2-6 pmol aralıklarında bir değer olarak her test için ayrı ayrı tespit edilmelidir.
8. Reaksiyonda kullanılacak $MgCl_2$ konsantrasyonu 2-6 mM aralığında test edilerek bulunmalıdır.
9. Prob dizayn ederken erime ısısının 60-68°C aralığında olmasına ve 5' ucunun TA'dan zengin olmasına dikkat edilmelidir.
10. Probu genellikle "sense" hazırlamak gerekmektedir. Ancak ihtiyaç olursa "antisense" olarak da hazırlanabileceği unutulmamalıdır.
11. Probun "quencher" boyası TAMRA yerine "BHQ-Black Hole Quencer" grubu bir boya olarak seçilmesinde yarar vardır.
12. Multipleks çalışmalar için seçilecek boya(lar)ın dalga boylarına uygun aralıklarda olmasına ve birbirinin içine geçmemesine dikkat edilmelidir.

"Scorpion" Primer/Probları: "Reporter" ve "quencher" floresan boya(lar)ın birbirine olan uzaklıklarının ve primer ile birleşik prob hibridizasyonunun temel alındığı bir yöntemdir. Klasik ve dubleks olmak üzere iki farklı primer/prob dizaynı ile kullanılabilir⁵. Literatür bilgilerine göre TaqMan yönteminden daha hassastır. Laboratuvarımızda bu yöntem üzerinde çalışma yapılmamıştır; bu nedenle henüz pratik bazı bilgiler doğrulanamadığı için burada bahsedilmemiştir.

"Molecular Beacons": "Reporter" ve "quencher" floresan boya(lar)ın birbirine olan uzaklıklarının ve prob hibridizasyonunun temel alındığı bir yöntemdir. Literatür bilgilerine göre TaqMan yönteminden daha az hassastır⁵. Laboratuvarımızda bu yöntem üzerinde henüz çalışma yapılmamaktadır.

Floresan Rezonans Enerji Transfer (FRET) Yöntemi: PCR reaktiflerine ek olarak floresan boya ile işaretlenmiş 2 spesifik oligonükleotid prob kullanılır. Bu problemlerin dizisi, çoğaltılan DNA parçalarıyla hibrid oluşturacak şekilde seçilir. Bu da, floresan yayılımının saptanmasını sağlayan problemler arasındaki oldukça etkin enerji transferine izin verir. TaqMan yönteminde olduğu gibi ölçülen floresan devam eden PCR işlemi esnasında üretilen DNA amplikonlarının miktarıyla orantılıdır¹. Laboratuvarımızda bu yöntem üzerinde henüz çalışma yapılmamaktadır.

"SYBR Green I" boyasının kullanıldığı yöntemde, floresan boya SYBR I bağlanmadığı zaman çok az floresan sinyal üretir. PCR döngüsü sırasında çift zincirli DNA amplikonlarına spesifik olmayan floresan boya "SYBR Green I" molekül bağlanır³. Laboratuvarımızda bu yöntem üzerinde, yöntemin spesifik olmaması nedeniyle çalışma yapılmamaktadır.

2. SİNYAL ÇOĞALTMA TEKNİKLERİ

Bu tekniklerde, viral genomlar öncelikle spesifik "yakalayıcı" oligonükleotid prob-

lardan oluşan bir tutucuyla hibridize olurlar. Daha sonra hibridlerden yayılan sinyal çoğalır¹.

Bu tekniğe göre çalışan bir sistem olan “*Digene Hybrid Capture System*”de RNA probu kullanılır. RNA-DNA hibridleri, yüzeyi bu hibridlere spesifik antikorlarla kaplı tüplerin yüzeyine tutunur. Hareketsiz olan bu hibridler bu antikorlarla reaksiyona girer. Ortama eklenen enzimle işaretli antikor substratları (chemiluminescent substrate) bir sinyal üretimine neden olur ve bu luminometre ile ölçülür⁶.

Dallanmış DNA (Branched DNA; bDNA) yönteminde, mikroorganizma nükleik asitleri oligonükleotid problemlerin hibridizasyonu ile mikrokuyucuklara tutunurlar. Sentezik bDNA çoğaltıcı moleküller mikrokuyucuklar içinde hareketsiz hedef hibridleriyle hibridize olurlar (birinci jenerasyon HBV DNA ve HCV RNA ve ikinci jenerasyon HCV RNA yöntemleri). Üçüncü jenerasyon HCV ve HBV yöntemlerinde sinyal çoğaltanını artırmak (yöntem duyarlılığı) için bDNA kompleksine bir ön çoğaltıcı molekül eklenir. Saptama bir substrattan alkalin fosfataz ile katalizlenen kimyasal lüminesansın yayılması esasına dayanır. Kantitasyon, bilinen standartla eş zamanlı oluşan standart eğriye göre yapılır¹.

NÜKLEİK ASİT TESTLERİ

Nükleik asit testleri (NAT)’nin, enfeksiyon hastalıkları tanısında klinik laboratuvarlarda kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Özellikle PCR temelli NAT, ya ticari olarak alınmakta ya da laboratuvar imkanları ölçüsünde tasarlanmaktadır (in house test). Doğal olarak, ticari kitler sıklıkla saptanmasına ihtiyaç duyulan enfeksiyon etkenlerine yönelik olarak hazırlanmaktadır. Daha nadir ihtiyaç duyulan testler ise daha çok laboratuvarlarca tasarlanmaktadır. Bir laboratuvarda NAT kullanımı için öncelikli gereksinim bu konuda eğitim görmüş personel, gerekli alet ve cihazlarla donatılmış özel laboratuvar şartları ve kimyasallar ile özel sarf malzemeleridir. Bu temel gereksinimleri mevcut olan bir klinik laboratuvarda artık yeni bir NAT tasarlamak teorik anlamda mümkündür. Ancak bu noktada da NAT’nin sınırları iyi bilinmeli ve karşılaşılabilecek sorunlara hazırlıklı olunmalıdır. Doğru ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek için kullanılan testin performansı değerlendirilmeli ve kalite kontrolleri yapılmalıdır.

NAT performansının değerlendirilmesi

Bir testin klinik kullanıma girmesinden evvel o testin değerlendirilmesi yapılmalıdır. Bu değerlendirme işlemi dökümanite edilmelidir. Yeni testler altın standart olan yöntemlerle (kültür veya diğer testler) karşılaştırılmak suretiyle değerlendirilebilir. Eğer bu mümkün değilse NAT sonuçları hibridizasyon, amplifikasyon ürünlerinin dizi analizi veya alternatif NAT kullanılmak suretiyle değerlendirilebilir. Ayrıca örneklerin bir bölümü ayrılarak yeterliliği tescillenmiş başka laboratuvarlara gönderilmek suretiyle

de test değerlendirmesi yapılabilir. Bunların hiçbiri mümkün değilse klinik olarak enfeksiyon tanısı konmuş olan hasta örnekleri ile NAT sonuçları değerlendirilebilir⁷.

Laboratuvar da tasarlanan testlerin değerlendirilme işlemi için oluşturulmuş yazılı bir döküman olmalıdır. Klinik amaçlar için kullanılması düşünülen test uygun bir yolla mutlaka değerlendirilmeli ve bundan sonra kullanıma sunulmalıdır. Değerlendirme parametrelerinde şunlar bulunmalıdır⁷:

- Diğer moleküler ve konvansiyonel laboratuvar testleriyle karşılaştırma
- Kontrol veya referans materyalin kullanımı
- Sınırların belirlenmesi
- Duyarlılık
- Özgüllük
- Doğruluk ve tekrarlanabilirlik
- Klinik tanıyla korelasyon

NAT Değerlendirmesi

Enfeksiyon hastalıklarının tanısına yönelik olarak laboratuvar da tasarlanan nükleik asit testlerinin değerlendirilmesinde kullanılan temel prensipler şu şekilde sıralanabilir:

1. Kullanılan yöntem ve reaktiflerle (kaynağı, hazırlanışı, saklanması ve stabilitesi) ilgili tüm detayları içeren işlemler yazılı bir döküman haline getirilmelidir.
2. Patojenin saptanmasına yönelik moleküler tanı testleri için seçilen hedef bölgenin istenen mikroorganizma ile homolojisi ve yakın ilişkili organizmalarla çapraz reaksiyonun olup olmadığı gen bankasından kontrol edilmelidir. Bu basamak için, internet bağlantılı bir bilgisayar ve bilgisayarda istenilen bu işlemlerin gerçekleştirilmesini kolaylaştıracak bir yazılıma ihtiyaç vardır. Bizim laboratuvarımızda şu anda bu iş için bölümümüz öğretim üyelerinden Doç. Dr. Mehmet YAPAR'ın yazılımını yaptığı OligoYap 5.0 isimli bir program kullanılmaktadır. Bu programın pek çok özelliğinin yanı sıra, yazılımının tamamen Türkçe olması ve ihtiyaca göre yenilenebilmesi çok önemli avantajlarımızdır. OligoYap 5.0 programı için ilgili mikroorganizmaya ait gerekli literatür bilgileri tarandıktan sonra, o mikroorganizmaya ait korunmuş gen bölgeleri veya tüm genomu ait diziler bu program yardımıyla gen bankasından alınıp programın arşivine eklenmektedir. Daha sonra bu gen dizileri içerisinden ortak bir bölge bulunup spesifik veya gerektiğinde mutasyon analizi yapılarak dejenere primer ve prob dizileri tasarlanmakta ve seçilen bu bölgelerin diğer mikroorganizmalarla çapraz reaksiyon verip vermediği yine program yardımıyla gen bankasından kontrol edilebilmektedir.
3. Sınırların belirlenmesi: Pozitif ve negatif sonuçların birbirinden ayrıldığı eşik değer yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçların en aza indirilmesi için önceden belirlenmelidir.

4. Yöntemin özgüllüğü, referans yöntem kullanılarak (tercihen 100 örnekle) ve/veya bilinen negatif örnekler kullanılarak değerlendirilmelidir.
5. Çapraz reaksiyonlar yönünden kommensal veya çapraz reaksiyon potansiyeli olan en az 10 örnek ile testin değerlendirilmesi yapılmalıdır.
6. Eğer yöntemin özgüllüğü istenen düzeyde değilse hedef bölge değiştirilmelidir.
7. Yöntemin duyarlılığı referans yöntem kullanılarak ve/veya bilinen pozitif örnekler (tercihen 100 örnekle) kullanılarak değerlendirilmelidir. Nadir veya az sıklıkla görülen hastalıklar için en az 20 örnek test edilmelidir.
8. Kantitatif yöntemlerin dinamik aralığının belirlenmesi için bilinen standart örnekler kullanılmalı ve kendi standartlarımız oluşturulmalıdır.
9. Kantitatif testlerin lineer aralığı belirlenmelidir. Bunun için her bir dilüsyonun en az 5 kez kullanıldığı testlerin istatistik değerlendirme ile sapma aralığı ortaya konmalıdır.
10. Yöntem kesinliği ve tekrarlanabilirliği test edilmelidir. Bunun için gruplar arasındaki değişkenlik, eşik değere yakın en az iki dilüsyon kullanımıyla ve 20 kez tekrarlanmak suretiyle değerlendirilmelidir⁷.

NAT değerlendirmesi sonrasında takip

Değerlendirme sonrası takipte şunlar önemlidir:

1. Klinik olgular ve literatürdeki çalışmalar takip edilmeli ve bir takip defteri tutulmalıdır. Bu alışılmadık durumların saptanması ve öğretici olması bakımından faydalıdır.
2. Gen bankasına eklenen yeni diziler olma ihtimaline karşı yıllık olarak çapraz reaksiyonlar açısından kullanılan diziler kontrol edilmelidir.
3. Yapılan işlemlerdeki değişiklikler uygun şekilde testin performansı açısından yeniden değerlendirilmeli ve bunlar yazılı hale getirilmelidir⁷.

Kaynaklar

1. Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. Gastroenterology 2002; 122: 1554-68.
2. Read SJ, Burnett D, Fink CG. Molecular techniques for clinical diagnostic virology. J Clin Pathol 2000; 53: 502-6.
3. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. Nuc Acid Res 2002; 30: 1292-305.
4. Kubar A, Yapar M, Besirbellioğlu B, Avci İY, Güney C. Rapid and quantitative detection of mumps virus RNA by one step real-time RT-PCR. Diagn Microbiol Infect Dis 2004;49:83-8.
5. <http://www.dorak.info/genetics/realtime.html>
6. Barlet V, Cohard M, Thelu MA, et al. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in serum using chemiluminescence; comparison with radioactive solution hybridization assay. J Virol Methods 1994; 49: 141-51.
7. Singapore Accreditation Council - Singapore Laboratory Accreditation Scheme (SAC-Singlas) Technical Note - Medical 002 February 2005.

PCR UYGULAMALARINDA OTOMATİZE SİSTEMLERİN AVANTAJ VE DEZAVANTAJLARI

Prof. Dr. Tijen ÖZACAR

PANEL 7: GEN BANKASI UYGULAMALARI

GEN BANKASI VERİLERİNİN İNCELENMESİ

Doç. Dr. Mehmet Ali ÖKTEM

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

1985 yılında polimeraz zincir tepkimesinin Kary Mullis tarafından bulunmasından sonraki yıllarda, genetik alanında bilginin yaygın olarak tüm dünyada biriktirilmesine başlanmıştır. Bu tarihten günümüze dek genetik bilginin logaritmik olarak artması, elde edilen verilerin düzenli ve kolay ulaşılabilir veri tabanlarında saklanması gerekliliğini doğurmuştur. Halen elde edilen genetik bilginin DNA ve aminoasit dizileri formatında saklanması sağlayan ve tüm dünyada kabul gören belli başlı üç veri tabanı bulunmaktadır. İnternet ortamında tüm dünyanın kullanımına ücretsiz olarak açık olan bu veri tabanları; GenBank®, European Nucleotide Archive (ENA) ve DNA Databank of Japan (DDBJ)'dir. Günümüzde bu veri tabanlarını dünyanın kullanımına sunan kurumlar, işbirliğine girerek veri tabanlarını en kapsamlı ve eşgüdüm içinde sunmaya yönelik olarak "International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC)" adlı ortaklık altında faaliyetlerini sürdürmektedir.

Bu sunumda yukarıda adı geçen veri tabanlarından en yaygın olarak kullanılan GenBank'da bulunan verilere doğru ve sistematik olarak nasıl ulaşılacağı, elde edilen dizilerin nasıl düzenleneceği, diziler arasındaki benzerlik ve farklılıkların nasıl karşılaştırılacağı tartışılacaktır.

GenBank ve diğer veri tabanlarında nükleotid verileri DNA formatında ve çok büyük oranda pozitif iplik olarak bulunur. Veriler ortak uluslararası formatlarda saklanabilir ve indirilebilirler. Bu formatlardan en sık kullanılanları; FASTA, NEXUS, GENBANK, PHYLIP ve MEGA formatlarıdır. Aslında temel olarak birbirlerinden küçük farklarla ayrılan formatlardır. Verilerin doğru ve kullanılabilir olabilmesi için, veri tabanından elde edilen tüm dizilerin aynı formatta indirilmeleri ya da aynı formata senkronize edilmeleri gereklidir. İnternet ortamında birçok sitede bu formatlarla ilgili ayrıntılı bilgiler bulunmaktadır (<http://www.ebi.ac.uk/help/formats.html>).

Gen bankası verileri incelenirken dikkat edilmesi gereken temel bazı basamaklar vardır. Bunlar doğru verilere ulaşılması, verilerin elde edilerek depolanması, dizilerin doğru bölgelerinin seçilerek karşılaştırılması ve seçilen dizilerin doğru olarak hizalanmasıdır. Bu veri tabanlarından GenBank'da adım adım verilerin aranması, toplanması ve hizalanmasına örnek olarak aşağıdaki basamaklar verilebilir:

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> adresi web browser'ının adres bölümüne girilerek ilgili internet alanına gidilir.
2. Sayfanın sağ tarafındaki "nucleotide" linkine tıklanarak nükleotid tarama sayfası açılır.
3. "Search" bölümündeki boşluğa taranmak istenen anahtar sözcük veya mikroorganizma adı girilir ve taratılır.
4. Bu ön tarama sonunda sağ taraftaki "top organisms" bölümünde çıkan sonuçların başlıkları içinden aranan mikroorganizma başlığına tıklanır.
5. Buradan taratılan ilgili nükleotid dizileri çıkar ve bu dizilerin içinden kullanılmak istenenlerin sol yanlarındaki kutucuklara işaret konularak gerekli diziler seçilir.
6. Bu şekilde seçilen diziler sağ alttaki "send to clipboard" sekmesi ile bir sayfada toplandıktan sonra ortak formata getirilir (örneğin FASTA).

Bu ortak formatta toplanan indirilmiş veriler hizalanarak işlenmelidir. Doğru hizalama yapılması, verilerin değerlendirilebilmesi için çok önemlidir. Bu amaçla kullanılan pek çok bilgisayar yazılımı olmakla birlikte en yaygın olarak kullanılan program CLUSTAL adı verilen bir yazılımdır. BioEdit ve MEGA gibi çok amaçlı genetik veri değerlendirme programlarında da bulunan bu yazılım kullanılarak, GenBank'dan indirilen farklı büyüklükteki, farklı başlangıç ve bitiş yerlerine sahip diziler içerdikleri genetik bilgilerin benzerlik oranları temel alınarak alt alta getirir. Bu programlarda hizalama yapılarak kullanılacak veriler önemli ölçüde standart hale getirilebilir.

Kullanılacak veriler hizalandıktan sonra yazılımın özellikleri kullanılarak dizilerdeki nükleotid farklılıklarının oranı, nükleotid farklılıklarının yerleri, dizilerin içindeki belli başlı motifler, diziler arasındaki ortak korunmuş bölgeler rahatlıkla görünebilir hale getirilmiş olur.

Bu sayede seçilen gruplar arasında o genetik bilgiyi tanımlayabilen öncüllerin (primerlerin) düzenlenebilmesi, diziler arasında mutasyon ya da genetik farklılıkların ortaya konabilmesi, aynı bölgeyi temsil eden genetik bilgilerin kullanılmasıyla bireylerin filogenetik ağaçta yerlerine doğru olarak oturtulabilmesi mümkün olmaktadır.

Diziler hizalanırken dikkat edilmesi gereken temel noktalar

1. Doğru bir analiz için doğru hizalanmış verilerle çalışılması gerekir.
2. Hizalama verilerinin yakın benzerliği olan bölgelerle çalışılırken DNA, uzak olanlar için protein düzeyinde olmasına dikkat edilmelidir. Çünkü DNA düzeyindeki her farklılık, aminoasit dizilimini etkileyebilir.

3. Diziler arasındaki uyumsuz bölgelere, GAP adı verilen boşlukların nerede ve ne oranda kullanılacağı önemlidir. Bu GAP'ler hizalanan diziler arasında bir dizideki genlerden birinde delesyon ya da insersiyon yüzünden oluşmuş olabilir. O nedenle farklı olasılıklar göz önünde bulundurulmalıdır. Hizalama programlarında aralık koymanın bir ceza puanı vardır. Aralığı uzatmanın puanı aralık koymaktan daha düşüktür. Hizalama programlarının aralıklar konusunda hata yapabildiği unutulmamalıdır.
4. Clustal programı ile hizalanan dizilerin BioEdit gibi elle hizalama yapılabilen bir programda işlenmesi bu nedenle önemli ve gerekli olabilir.

Temel ilke olarak GenBank verilerinin incelenmesinde, verilerin yeterli miktarda ya da tamamının toplanması, doğru olarak toplanması ve standardize edilmesi çok önemlidir. Ayrıca bozuk ya da eksik gen ya da nükleotid bölgelerinin saptanması, toplanan verilerin grubu temsil eden amaca yönelik bölgelerinin mümkün olduğunca çok sayıdaki veride incelenmesi gereklidir. İncelenen dizilerin amaca yönelik olarak yeterli büyüklükte olması, diziler arasındaki mutasyon ve farklılıkların oranına göre verilerin değerlendirmesinin DNA veya aminoasit dizileri düzeyinde, bazen de her iki düzeyde birden yapılması gerekebilir. Doğru hizalama yapılmadan grubu temsil eden öncüllerin tasarlanması, mutasyonlar ve genotipler gibi genetik farklılıkların değerlendirilmesi, ortak restriksiyon bölgelerinin saptanması ve daha pek çok analizin gerçekleştirilebilmesi mümkün değildir.

Kaynaklar

1. GenBank Overview. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
2. McEntyre J, Lipman DJ. GenBank - a model community resource? <http://www.nature.com/nature/debates/e-access/Articles/lipman.html>
3. Tisdall J (ed). GenBank, Chapter 10. In: Beginning Perl for Bioinformatics. 2001, O'Reilly Media. <http://oreilly.com/catalog/begperlbio/chapter/ch10.html>
4. Pannarale P, Catalano D, De Caro G, et al. GIDL: a rule based expert system for GenBank Intelligent Data Loading into the Molecular Biodiversity database. BMC Bioinformatics 2012; 13 Suppl 4: S4.

SAPTANAN DİZİLERİN VERİ BANKASINA GİRİLMESİ

Prof. Dr. Cengiz ÇAVUŞOĞLU

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

Günümüzde “European Molecular Biology Laboratory (EMBL)”, “DNA Data Bank of Japan (DDBJ)” ve “GenBank” olmak üzere üç önemli DNA dizisi veri tabanı bulunmaktadır. GenBank diğer laboratuvarlarla ve EMBL ve DDJB gibi diğer dizi veri tabanlarıyla işbirliği içinde çalışmaktadır. GenBank’ın kullanılabilir durumda tutma sorumluluğu 1992’den bu yana “National Center for Biotechnology Information (NCBI)”in sorumluluğundadır^{1,2}.

GenBank “DNA dizi veri tabanı” topluma açık nükleotid dizileri ve onların protein translasyonlarının açıklamalı olarak bulunduğu açık erişimli bir veri tabanıdır. Bu veri tabanı NCBI tarafından “International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC)”in bir parçası olarak yapılmıştır. NCBI, “National Institutes of Health (NIH)”in bir dalı olan Birleşik Devletler Ulusal Tıp Kütüphanesi (National Library of Medicine [NLM])’nin bir parçasıdır. GenBank ve ortakları dünya üzerindeki laboratuvarlarda 100.000’den fazla farklı organizmadan üretilen dizileri toplamaktadır. Kuruluşundan bu yana 20 yıldan fazla süre geçmiş olan ve verilerine tüm dünyadaki araştırmacılar tarafından ulaşılan ve kullanılan GenBank, üm biyolojik alanlardaki araştırmacılar için en önemli ve en etkili veri tabanıdır. NCBI biyoteknoloji ile ilgili diğer bilgilerin yanı sıra GenBank’da genom dizi verilerinin ve PubMed Central ve PubMed’de biyomedikal araştırma makalelerinin bir indeksini içerir. Tüm bu veri tabanları “Entrez” arama motoru ile kullanılabilir. GenBank logaritmik olarak büyümekte ve veriler her 18 ayda bir ikiye katlanmaktadır. Şubat 2012 itibarıyla GenBank sürüm 188.0’de 149,819,246 bildirilmiş diziye ait 149,819,246 lokus ve 137,384,889,783 baz bulunmaktadır. GenBank veri tabanı bireysel laboratuvarlardan doğrudan gönderimlerin yanı sıra büyük ölçekli sekans merkezlerinden yapılan toplu başvurular ile ortaya çıkmıştır^{1,2}.

Saptanan DNA dizilerinin GenBank’a girilmesi

Çeşitli mikroorganizmaların dizi analizinden elde edilen orijinal veriler uluslararası bilim dünyasıyla paylaşılması için GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>) gibi elektronik veri tabanlarına aktarılmalıdır. GenBank’a yalnız orijinal diziler bildirilebilir. GenBank’a *BankIt* kullanılarak doğrudan web-tabanlı bildirim veya bağımsız bildirim programı *Sequin* ile bildirim yapılabilir³⁻⁵.

Bildirimde tek bir dizi, basit bir grup dizi (örn. 16S rRNA, matK, ITS/rRNA, amoE, tefB, cytb veya COI setleri) veya farklı dizilerden küçük bir parça varsa, web-tabanlı bildirim aracı kullanılmak isteniyorsa, dizinin özellik açıklaması karmaşık değilse, gelişmiş analiz araçlarına ihtiyaç duyulmuyorsa dizi bildirim için BankIt kullanılır. *Off-line* bildirim aracı kullanılmak isteniyorsa, kompleks dizi veya diziler varsa, bir hizalama editörü içeren grafik görüntüleme ve düzenleme seçenekleri isteniyorsa ve ilgili analitik araçlara ağ erişimi olan seçenek isteniyorsa dizi bildirim için Sequin kullanılır³⁻⁵.

GenBank dizi bildirim politikası

GenBank veri tabanı başvuru sahibi tarafından belirlenen ve açıklanan yeni dizi verileri için tasarlanmıştır. Tam ekzon, kodlanmayan RNA'lar (ncRNAs), mikrosatellitler veya antik DNA'lar dışında 200 nükleotid uzunluğundan az diziler, yapay olarak birleştirilmiş bitişik olmayan diziler, genomik ve mRNA dizi verisi karışımı gibi farklı molekül tiplerinin karışımından oluşan tek diziler GenBank tarafından kabul edilmez. Ayrıca çok daha sık olarak büyük ölçekli sekans merkezleri tarafından yapılan "Expressed Sequence Tag (EST)", "Sequence-tagged site (STS)" ve "Genome Survey Sequence (GSS)" verileri GenBank tarafından kabul edilmez. EST dbEST sistemiyle, GSS dbGSS sistemiyle ve STS dbSTS sistemiyle sunulmalıdır³⁻⁵.

BankIt ile bildirim nasıl yapılır?

MyNCBI, NCBI veri tabanlarına ve BankIt Bildirim Aracı (*BankIt Submission Tool*) gibi bildirim araçlarına, giriş yapılması için gerekli olan bir hesap oluşturulmasını sağlar. MyNCBI bildirim yapan kişinin BankIt oturum açma adını kişinin yaptığı bildirimlerle ilişkilendirir ve gelecekteki BankIt bildirimlerini hızlandırmak için iletişim bilgilerini hatırlar. BankIt aracı ayrıca oturum açma adını kişinin en son yarım kalmış bildirimleriyle ilişkilendirir ve daha sonra BankIt'e geri dönerek yarım kalan bildirimlerin tamamlanmasına izin verir. Bildirim yapan kişi BankIt'i kullanmak için kaydolduğunda, gönderenin iletişim bilgileri kaydedilir ve bildirim yapan kişi daha sonraki bildirimlerde giriş yaptığında her zaman otomatik olarak görüntülenir³⁻⁵.

BankIt bildirim aracıyla dizi bildirim yapılabilmesi için önce sunum yapan kişi kullanıcısı adı ve şifresini girmelidir. MyNCBI yoluyla kayıt olmak için, BankIt ana sayfasının üst kısmında yer alan "BankIt kullanmak için oturum açın" (*Sign in to use BankIt*) bağlantısı izlenir ve sayfanın sol tarafındaki "hesap için kayıt olun" (*Register for an account*) bağlantısı tıklanır. Kayıt işlemi tamamlandıktan sonra giriş için, aynı sayfadaki kullanıcı adı ve şifre girilir³⁻⁵.

Kullanıcı adı ve şifre girildikten sonra “oturumu aç” seçeneği tıklanarak BankIt bildirim sayfası açılır. Yeni bildirim yapmak için sayfadaki “Yeni bildirim” seçeneği tıklanarak GenBank bildirim sayfası açılır. Sayfa dokuz alt sayfadan (*Contact, Reference, Nucleotide, Organism, Submission Category, Source modifiers, Primers, Features, Review and Correct*) oluşur ve yeni bir dizi verisi girilirken her bir sayfa sırayla doldurulup, onaylandıktan sonra bir sonraki sayfaya geçilir. Sistem sayfalar doldurulurken yapılan hataları bildirir ve gerektiğinde veri girişiyle ilgili uyarıları yapar. BankIt ile bir bildirimde tek bir dizi, basit bir grup dizi bildirilebilir. BankIt bildirim yapan kişiye başvuru giriş sayfalarının üst kısmındaki sekmeleri kullanarak gezinmek ve önceden girilen sayfaları düzenlemek için olanak sağlar³⁻⁵.

- **İletişim Bilgileri (Contact Information):** Kayıttan sonra ilk kez bildirim yapılırken “İletişim Bilgileri” sayfasından bildirim yapan kişinin adı, adresi, telefon, faks ve e-posta adresleri girilir. Daha sonraki BankIt bildirimlerinde bildirim yapan kişi bağlandığında bu bilgi kalır ekranda görünür. *İletişim Bilgileri* onaylanınca “Kaynak” sayfası açılır³⁻⁵.
- **Kaynak (Reference):** Kaynak sayfasından dizi analizini yapanların isimleri, dizinin yayın durumu, yayınlandıysa uygun atf bilgileri (yayının başlığı, yazarlar, sayısı, yılı ve sayfaları) girilir. Sayfada girilen bilgiler onaylanınca “Nükleotit” sayfası açılır³⁻⁵.
- **Nükleotid (Nucleotide):** Bu sayfada ilk girilen bilgi, bildirilen dizinin serbest bırakılma tarihidir. Bunun için iki seçenek girilebilir; incelendikten hemen sonra veya spesifik bir tarih. Daha sonra diziyle ilgili bilgiler girilir. Burada sekansı yapılan dizinin molekül tipi (genomik DNA, genomik RNA, mRNA gibi), sekans yapılan genin durumu (kısmi veya tam), genin topolojik (doğrusal veya halkasal) bilgileri girilir. Halkasal diziler, tam bir dizi (tam plazmid gibi) olmalıdır. Bu işlemlerden sonra sekansı yapılan dizi veya diziler girilir. Diziler, başka bir bilgisayar uygulamasında yazılmış dizinin kes-yapıştır uygulaması şeklinde ilgili kutucuğa eklenmesi veya FASTA dosyası şeklinde yüklenmesiyle girilebilir. *Nükleotid* sayfasından FASTA dosyasının nasıl hazırlanacağına ilişkin bilgilere ulaşılabilir. FASTA formatı tek bir bildirimde çok sayıda dizi bildirimine olanak sağlar. Çok sayıda dizi girilecekse FASTA formatında yüklenmelidir. Tam ekzon, kodlanmayan RNA’lar (ncRNAs), mikrosatellitler veya antik DNA’ları temsil edenler dışından dizinin en az 200 nükleotid uzunluğunda olması gerekir. Sayfada girişi yapılan bilgiler onaylanınca “Organizma” sayfası açılır³⁻⁵.
- **Organizma (Organism):** Organizma sayfasından dizi analizi yapılan mikroorganizmanın ismi yazılıp onaylanır ve “Bildirim Kategorisi” sayfası açılır³⁻⁵.
- **Bildirim Kategorisi (Submission Category):** Bu sayfada dizinin doğrudan sunumu yapan kişi tarafından elde edilmiş orjinal dizi mi ya da diğer primer dizi

analizi verilerinden türetilmiş bir dizi mi olduğu belirtilir ve onaylanır. “*Kaynak Bilgileri*” sayfası açılır³⁻⁵.

- *Kaynak Bilgileri (Source Modifiers)*: Bu sayfada ilk olarak bakterinin nasıl elde edildiği ile ilgili bilgiler (kültürü yapılan, kültürü yapılmadan veya zenginleştirme kültürü) bilgiler girilir. Daha sonra bakterinin nereden izole edildiğine ilişkin bilgiler, izolasyon kaynağı, izole edildiği ülke ve suşun ismi girilir ve onaylanır. “*Primerler*” sayfası açılır³⁻⁵.
- *Primerler (Primers)*: “Primerler” sayfasına dizi analizinin yapıldığı primerler girilir. Ancak bu sayfanın doldurulması zorunlu değildir. Giriş onaylanınca “*Özellikler*” sayfası açılır³⁻⁵.
- *Özellikler (Features)*: Bu sayfa, özellikler tablosu yüklenerek ya da direkt giriş yaparak doldurulur. “Özellikler” sayfasından dizisi yapılan genin ismi, kodladığı protein ve özellikleri ve aminoasit dizisi girilir ve onaylanır. Giriş onaylanınca “*Gözden geçir ve Düzelt*” sayfası açılır³⁻⁵.
- *Gözden geçir ve Düzelt (Review and Correct)*: “Gözden geçir ve Düzelt” sayfasında girilen bilgilerin GenBank sayfasında yayınlanacak son görünümü çıkar; bu görünüm gözden geçirilerek gerek duyulduğunda ilgili sayfalara geri dönülüp gerekli düzeltmeler yapılabilir. Son kontrolden sonra “*Son bildirim*” tıklanarak bildirim tamalanır. Bunun ardından GenBank’dan bildirimi yapan kişiye e-posta ile bildirimin değerlendirmeye alındığı bilgisi gelir. Bir dizi teslim alındıktan sonra, GenBank bildirim takımı tarafından veri özgünlüğü incelenir ve kalite güvence denetimleri gerçekleştirir. Gerekli düzeltme ve değerlendirme aşamalarından sonra bildirilen diziyi bir kabul numarası (*accession number*) verilerek kamuya açık GenBank veri tabanında yayınlanır³⁻⁵.

Daha önce sunulan dizilerin güncellemesi

BankIt’in güncelleme seçeneği yoktur. Mevcut nükleotid dizisi güncellenecekse FASTA biçiminde yeni bir dizi gönderilir. Güncellenen dosyalar e-posta ile doğrudan gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov adresine yollanır veya “*UpdateMacroSend*” kullanılarak yüklenir³⁻⁵.

Kaynaklar

1. The NCBI Handbook, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21105/>
2. GenBank release notes, <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/gbrel.txt>
3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank>
4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/html/requirements.html>
5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?form=feat-overview&sid=1532608&tool=genbank>

PANEL 8: KAN BANKACILIĞI VE TRANSFÜZYON TIBBİ UYGULAMALARINDA MOLEKÜLER YÖNTEMLER

MİKROBİYOLOJİK TARAMA TESTLERİNDE MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Doç. Dr. A. Esra KARAKOÇ

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

PANELLER

Transfüzyonla bulaşan çok sayıdaki etken arasında viruslar ayrı bir öneme sahiptir. Bunun sebepleri; bu etkenlerin yol açtığı enfeksiyonların uzun pencere dönemleri, inaktif taşıyıcılık özellikleri, oluşturdıkları hastalıklar ve kan bileşenlerinde uzun süre canlılıklarını koruyabilmeleridir. Günümüzde kan bankacılığında uygulanan zorunlu viral tarama testlerinin seçimi, kullanılan yöntemlerin duyarlılıklarına, donanım gereksinimlerine, maliyet farklarına, kurumsal/ülkesel deneyimlere, kamuoyu baskısına ve enfeksiyonlara ait epidemiyolojik özelliklere göre dünyada ülkeler arasında farklılıklar göstermektedir.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), transfüzyon amacıyla bağışlanmış kanın transfüzyonla bulaşan etkenler yönünden taranması gerektiğini bildirmektedir. Taramanın HCV ve HIV için yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip bir antikor testi veya antijen-antikor testi kullanılarak EIA yöntemi ile yapılması önerilmektedir. Kullanılan test, virusların alt tiplerini ve ülkeye ve bölgeye özgü genotiplerini tespit edebilmelidir. DSÖ acil koşullarda, dünyanın uzak ve sosyoekonomik koşulları yetersiz bölgelerinde kanın, tarama yapılmadan transfüze edilmesi yerine duyarlılık ve özgüllüğü yüksek bir hızlı test ile tarama yapılarak transfüze edilmesini de önermektedir; ancak ülkemizde hızlı testlerin kullanılması, organizasyonel yapı ve testlerin duyarlılık sorunlarından dolayı benimsenmemektedir.

Transfüzyon için alınan kanın viral etkenler yönünden taranmasında kullanılan yöntemler, düzeylerine göre şu şekilde sıralanabilir:

1. Serolojik tarama (*Serological screening*; SS)
2. SS + Havuzlanan örneklerde (*Mini-pool*; MP) nükleik asit amplifikasyon testleri (NAT)
3. SS + MP NAT- p24 (HIV için)
4. SS + Tek örnekte (*Individual donation*; ID) NAT-p24
5. SS + ID NAT-p24 / anti-HBc

Tarama testlerinin yapılmasına rağmen transfüzyonla viral bulaşın meydana gelme sebepleri arasında en sık kötü laboratuvar yönetimi uygulamaları ve laboratuvar hataları gelmektedir. Bunun yanında, enfeksiyonların pencere dönemleri, kullanılan yöntemlerin duyarlılıkları, mutant virusların varlığı, enfeksiyon etkenlerinin kan bağışçılarındaki görülme sıklığı, prevalans ve insidansı, kan bağışçılarının demografik ve sosyoekonomik özellikleri de bulaş sıklığını etkilemektedir.

Kan güvenliğine ve riskin sifıra yaklaştırılmasına yönelik çabalar günümüzde birçok gelişmiş ülkede bağışlanan kanın HCV, HIV ve HBV için nükleik asit amplifikasyon testleri (NAT) ile taranmasının uygulamaya konması ile sonuçlanmıştır. 1990'lı yıllarda plazma havuzlarında gönüllülükle başlayan HCV RNA tarama çalışmaları, plazma fraksiyasyon ürünlerinde zorunluluk olmuştur. 2000'li yıllarda HIV ve HCV için 16, 24 ve 96'lık havuzlarda ticari testler uygulanmıştır. Maliyet etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalarla birlikte, 2000'li yıllarda gelişmiş ülkelerde, bu testlerin bağışlanan tüm kanların taranmasında uygulanması zorunlu hale getirilmiştir. Küçük havuzlarda bile yaşanan duyarlılık sorunları, düşük viral yükte havuzlama yönteminin duyarlılığının yetersiz kalmasından dolayı HBV'de NAT uygulamasını geciktirmiştir; küçük havuzlarda HBV NAT uygulamasının HBsAg ve anti-HBc testlerinin birlikte uygulanmasına bir üstünlüğünün bulunmadığı, ancak tekli örneklerde uygulanan HBV NAT'ın üstün olduğu tespit edilmiştir. Bugün Almanya, İtalya ve Japonya'da HBV NAT testi zorunlu tarama testi iken diğer birçok ülkede uygulama ve zorunluluk bulunmamaktadır.

Günümüzde kan bankacılığında rutin uygulamada multipleks formatta, tekli ve havuzlanmış örneklerde zorunlu virusların taranmasını sağlayan ticari sistemler (Chiron-Procleix ve Roche) yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri, serolojik yöntemlerle birlikte kullanılması ve pozitiflik saptandığında izlenecek algoritmalar ile ilgili çok sayıda araştırma bulunmaktadır.

Nükleik asit amplifikasyon testlerinin kullanılması, transfüzyonla bulaşan viral etkenler için arta kalan risk oranlarını her bir virus için farklı şekilde etkilemektedir. Hedef sıfır risk olmakla birlikte buna ulaşılması mümkün görünmemektedir. Nadir de olsa hatalı negatif sonuçlar elde edilebilmekte ve virus bulaşı meydana gelebilmektedir. Tek ünite (ID) NAT yöntemi, havuzlanmış (MP) NAT yöntemine göre viral bulaşı daha iyi önlemektedir. HBV enfeksiyonu için yüksek endemisiteye sahip bölgelerde MP NAT'ın serolojik yöntemlere daha anlamlı katkı sağladığı; düşük endemisiteye sahip bölgelerde bu katkının minimum olduğu bildirilmektedir. İzole anti-HBc pozitif ve çok düşük DNA düzeylerinin bulunduğu kan bağışçıları ile ID NAT yöntemi ile kaçırılabilen, düşük veya intermitan DNA düzeylerinin bulunduğu kronik enfeksiyonlu kan bağışçılarının yakalanabilmesi için, HBV serolojik testlerinin sürdürülmesi de gerekli görünmektedir.

Bu yöntemlerin maliyet-etkin kullanılmalarının sağlanması için, ulusal algoritmaların belirlenmiş olması ve moleküler/serolojik yöntemlerin kullanıldığı tarama laboratuvarlarında, iyi laboratuvar yönetimi ilkelerinin en etkin şekilde uygulanması gereklidir. Ayrıca, enfeksiyon insidansının çok daha düşük olduğu düzenli kan bağışçıların kazanımı ile ilgili etkin çalışmaların yapılması ve gerek alıcı gerekse bağışçı hemovijilans sistemlerinin kurularak, NAT ile elde edilen sonuç (*yield*) (seroloji negatif, NAT pozitif bağışçıların tespiti ve serokonversiyonun takibi) ve arta kalan riskin izlenmesine ihtiyaç bulunmaktadır.

Kaynaklar

1. Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. Vox Sang 2004; 86: 83-91.
2. Allain JP, Candotti D. Diagnostic algorithm for HBV safe transfusion. Blood Transfus 2009; 7: 174-82.
3. Delwart EL, Kalmin ND, Jones TS, et al. First report of human immunodeficiency virus transmission via an RNA-screened blood donation. Vox Sang 2004; 86: 171-7.
4. Dwyre DM, Fernando LP, Holland PV. Hepatitis B, hepatitis C and HIV transfusion-transmitted infections in the 21st century. Vox Sang 2011; 100: 92-8.
5. Hyland C, Seed CR, Kiely P, et al. Follow-up of six blood donors highlights the complementary role and limitations of hepatitis C virus antibody and nucleic acid amplification tests. Vox Sang 2003; 85: 1-8.
6. Kretzschmar E, Chudy M, Nübling CM, et al. First case of hepatitis C virus transmission by a red blood cell concentrate after introduction of nucleic acid amplification technique screening in Germany: a comparative study with various assays. Vox Sang 2007; 92: 297-301.
7. Kuhns MC, Busch MP. New strategies for blood donor screening for hepatitis B virus: Nucleic acid testing versus immunoassay methods. Mol Diagn Ther 2006; 10: 77-91.

İMMÜNOHEMATOLOJİDE MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Prof. Dr. İdil YENİCESU

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı, 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 karşılaşır bu antijene karşı antikor yanıtı meydana gelir. Bu antikorlar transfüzyon uyumsuzluğu, mater-no-fetal uyumsuzluk ve otoimmün hemolitik anemiye neden olabilir.

Kan grubu antijenleri ve antikorlarını tespit için kullanılan klasik metod hemagglütinasyondur. Bu metod hem ucuz hem de basittir. Uygun şekilde gerçekleştirildiğinde, özgüllük ve duyarlılığı çoğu hastanın ihtiyacını karşılayacak yeterliliktedir. Ancak hemagglütinasyon yöntemi, aşağıda belirtilen bazı immünohematolojik durumlarda yeterli olmamaktadır:

1. Yenidoğanın hemolitik hastalığı açısından risk altındaki fetüslerin belirlenmesi,
2. Yakın dönemde transfüzyon almış olan hastaların eritrosit antijenlerinin tespit edilmesi,
3. Eritrositleri immünglobulin G (IgG) ile kaplı hastaların eritrosit antijenlerinin tespit edilmesi,
4. D(+) kişilerde Rh D zigositesinin tam olarak gösterilmemesi,
5. Nadir eritrosit antijeni taşıyan az sayıdaki donörün tiplendirilmesi ve bununla ilişkili dökümantasyonun hazırlanması,
6. Nadir eritrosit antijenlerine özel anti-serum hazırlanması,
7. Volüm, zayıf reaksiyon veya bulunulabilirlik açısından sınırlı olan antikorların kullanılmasını gerektiren durumlar.

Bu bölümde moleküler tekniklerin transfüzyon tıbbında özellikle yukarda bahsedilen ve hemagglütinasyon yönteminin yeterli olmadığı alanlardaki kullanımı özetlenmiştir.

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 özel allelin hedeflenip amplifiye edilmesinin aksine, transfüzyon sonrasında alınan kan örneğinden hazırlanan DNA'dan güvenilir bir biçimde kan grubu tayinine olanak sağlar.

Direkt antiglobulin testi pozitif olan eritrositlerin tiplendirilmesi

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.

Reaktanların elde edilemediği durumlarda donör ünitelerinin taranması

Bu durum için Dombrock kan grubu polimorfizimi en sık verilen örnektir. Donörlerin Do^a ve Do^b açısından tiplendirilmesinde DNA-temelli değerlendirmeler hızlı, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuç verir. Kanı nadir bulunan donörlerin DNA analizi ile minör kan grubu antijenleri ve Rh varyantları tiplendirilir.

RhD zigozitesinin test edilmesi

Eritrositlerdeki D, C/c ve E/e ekspresyonunda uygulanacak serolojik testler, örneklerin yalnızca RhD açısından homozigot (D/D) veya heterozigot (D/-) olma ihtimalini öngörebilir. 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 ve zigozitenin tam olarak saptanabilmesi için birçok tetkik uygulanmasını gerektirir. Avrupa toplumlarında, 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 dörtte birinde bir RhD psödogeni bulunur. Bu psödogen D antijenini kodlamaz. Tüm bu D varyantlarının tespiti ancak moleküler yöntemler ile mümkün olacaktır. 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 fetüsün D tipinin belirlenmesi invazif ve gereksiz testlerin yapılmasını engelleyecektir.

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 bulunur ise yenidoğanın hemolitik hastalığı veya neonatal alloimmün trombositopeni açısından risk altında değildir ve annenin agresif takibi ile gereksiz immünomodulator ilaç kullanması önlenmiş olur. Antijen durumunu belirlemek için amniosentez veya korion villus örneğinden elde edilen fetal DNA kullanılır. Alternatif olarak 5. 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 araştırma, bu testin validasyonunu sağlamaya çalışmaktadır. Teorik olarak anne plazmasının bu açıdan incelenmesi, yaklaşık %40 D(-) kadına, D(-) fetüs taşıdıkları halde gereksiz Rh immünglobulini verilmesini önleyecektir. Yeterli fetal DNA elde edildiğini gösteren pozitif kontrol kullanılması önemlidir. Böylece negatif sonuçların validasyonu sağlanır. Fetüs erkek ise Y kromozomu belirteç olarak kullanılabilir. Eğer fetüs kız ise polimorfik paternal belirteçlere 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 antijenlerinin kalıtımı genin varlığı veya yokluğundan ziyade tek nükleotid polimorfizmi ile belirlenir. Fetal DNA kaynağı olarak amniyosit tercih edilir.

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 proteinini 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 ve test yöntemindeki farklılıklar (tüp yöntemi, katı faz, jel, otomatik analizatör) 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 izohemaglütinin 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.

Zayıf D ile kısmi D ayırımının 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 ayırımın yapılması klinik önem taşır; zira kısmi D anti-D oluşumuna yol açabilir. Rutin serolojik tiplendirmede kullanılan reaktanlar bu ayırımı yapmakta yetersiz kalır. Ancak genotiplendirme sayesinde bu ayırım sağlanabilir.

Sık görülen antijenlere karşı antikor üretme riski bulunan hastaların tanımlanması

Kronik transfüzyon tedavisi gerektiren hastalıklarda alloimmünizasyon gelişme olasılığı %5 civarındadır. Ancak orak hücreli anemi (*Sickle cell anemia*; SCA) hastalarında bu oran %20'lerin üzerine çıkmaktadır. SCA hastalarında oluşan çok sayıda alloantikora uygun antijen negatif kanın bulunması problem haline gelebilir. Birçok transfüzyon programında SCA hastalarına transfüze edilecek olan eritrositler, alloantikor sıklığını ve riskini azaltmak için D, C, E ve Kell antijenleri açısından karşılaştırılır. Buna rağmen Rh allellerinin kodladığı D, C, E antijenlerine karşı sıklıkla alloantikor gelişir. Konvansiyonel Rh karşılaştırmasına rağmen alloantikor gelişmesi, SCA hastalığının sık görüldüğü ırkta aynı zamanda varyant RhD ve RHCE genlerine sık rastlanması ile ilişkilidir. Bu cins antikorlar sıklıkla karmaşık yapıda, Rh spesifitesi yüksek olan ve uygun ünitenin bulunmasının zor veya imkânsız olduğu antikorlardır. Bu tarz

problem yaşıyan hastalarda, hastanın geniş antijen profili DNA analizi ile incelenir ve homozigot varyant Rh olan hastalar tespit edilirse uygun kan transfüzyonunun yapılabilmesi olanaklı hale gelir. Böylece alloantikör gelişmez ve kişiye uygun kan transfüzyonu daha kısa sürede daha az yan etkiyle ve efektif olarak sağlanabilir.

Moleküler yöntemler, kan bankaları ve transfüzyon tıbbı alanında son 10 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 hemagglütinasyon yöntemi, özellikle yukarda bahsi geçen alanlarda yerini moleküler yöntemlere bırakmaktadır. İlk kuşak moleküler yöntemler olan “restriction fragment length polymorphism” ve “allele specific assay”, örneğin PCR işlemi ile çoğaltılmasına ve jel elektroforezinde yürütülmesine ihtiyaç duymuştur. Zaman alıcı ve yoğun emek gerektiren bu metodlar yerini artık “real-time PCR (RtPCR)” yöntemine bırakmıştır. RtPCR ile tek bir kapalı tüpte birçok kan grubu sisteminin çoğaltılması mümkün olmakta ve çoğaltılan bu gen bölgelerinin analizi de ADA (automated fluorescence discrimination of alleles) yöntemi ile yapılmaktadır. 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 ileride alloimmünizasyon dahil birçok alanda önemli gelişmeler sağlanacağı kaçınılmaz bir gerçektir.

Kaynaklar

1. Chiu RW, Murphy MF, 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 Rh D-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, Flegel WA. Applying molecular immunohematology discoveries to standards of practice in blood banks: now is the time. Transfusion 2008; 48: 2461-75.

6. Denomme GA, Van Oene MM. High-throughput multiplex single-nucleotide polymorphism analysis for red cell and platelet antigen genotypes. *Transfusion* 2005; 45: 660-6.
7. Gautier E, Benachi A, Giovangrandi Y, et al. Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two-year experience. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 666-9.
8. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485-7.
9. Petrik J. Microarray technology: the future of blood testing? *Vox Sang* 2001; 80: 1-11.
10. Reid ME, Denomme GA. DNA-based methods in the immunohematology reference laboratory. *Transfus Apher Sci* 2011; 44: 65-72.
11. 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.
12. Reid ME. Applications of DNA-based assays in blood group antigen and antibody identification. *Transfusion* 2003; 43: 1748-57.
13. Reid ME. Overview of molecular methods in immunohematology. *Transfusion* 2007; 47: 10S-16S.
14. Storry JR, Westhoff CM, Charles-Pierre D, et al. DNA analysis for donor screening of Dombrock blood group antigens. *Immunohematology* 2003; 19: 73-6.
15. Van der Schoot CE, Soussan AA, Koelewijn J, et al. Noninvasive antenatal RHD typing. *Transfus Clin Biol* 2006; 13: 53-7.
16. Veldhuisen B. Blood group genotyping: from patient to high-throughput donor screening. *Vox Sang* 2009; 97: 198-206.
17. Wagner FF, Gassner C, Muller TH, et al. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999; 93: 385-93.
18. Wenk RE, Chifari PA. DNA typing of recipient blood after massive transfusion. *Transfusion* 1997; 37: 1108-10.
19. Westhoff CM. Review: the Rh blood group D antigen..dominant, diverse and difficult. *Immunohematology* 2005; 21: 155-63.
20. Westhoff CM. Molecular testing for transfusion medicine. *Curr Opin Hematol* 2006; 13: 471-5.

KLASİK DİZİ ANALİZİ YÖNTEMLERİ

Yrd. Doç. Dr. Onur KARATUNA

Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Watson ve Crick tarafından DNA'nın çift-iplikli sarmal yapısının aydınlatılmasından sonra çalışmalar, mikroorganizmaların genetik şifresinin çözülebilmesi amacıyla DNA'nın yapıtaşları olan nükleotidlerin diziliminin belirlenmesi üzerine yoğunlaşmıştır. DNA dizi analizi ile DNA içinde gizli genetik bilginin deşifre edilmesi ve böylece genlerin yapı ve fonksiyonları hakkında bilgi edinilmesi mümkün olmuştur. Modern anlamda DNA dizi analizi iki farklı çalışma grubunun 1977 yılı içerisinde yayınladıkları çalışmaları ile başlamıştır. Cambridge Üniversitesi'nden Sanger ve Coulson enzimatik dideoksi yöntemini, Harvard Üniversitesi'nden Gilbert ve Maxam ise kimyasal yöntemi geliştirerek DNA dizi analizine büyük ivme kazandırmışlardır. DNA dizi analizi ile organizmaların genetik organizasyonu hakkında çok kapsamlı verilere ulaşılmış, rekombinant DNA tekniklerinin de gelişmesi üzerine araştırılmak istenen mikroorganizmadan saf ve çok miktarda DNA elde etmek mümkün olmuş ve yeni DNA dizileme yöntemleri de bu paralelde büyük bir hızla gelişme göstermiştir.

Dideoksi yöntemi

Bu yöntem Sanger yöntemi veya zincir sonlandırma yöntemi olarak da bilinir. Sanger ve Coulson tarafından geliştirilmiştir. Yöntemin temeli DNA'nın DNA polimeraz enzimi ile uzatılmasına dayanmaktadır. Dizi analizi yapılacak olan DNA molekülü kalıp olarak kullanılarak bir seri yeni, tamamlayıcı DNA molekülü sentezlenir. DNA dizisinin analiz edilmesine olanak veren özellik ise DNA sentezi sırasında kullanılan özel substratlardır. Normalde DNA 3'-karbon atomunda hidroksil grubu bulunan deoksiribonükleozid trifosfatlardan (dNTP) sentezlenir. Sanger'in yönteminde ortama özel bir nükleotid olan dideoksiribonükleozid trifosfat (ddNTP) da substrat olarak eklenir. Bu özel ddNTP molekülleri dNTP'ler ile benzerdir ancak 3'-OH grubu içermezler. DNA sentezi sırasında ddNTP molekülleri uzayan DNA zincirine eklendiğinde 3'-OH grubunun eksikliğine bağlı olarak ddNTP kendisinden sonra zincire eklenecek nükleotid ile fosfodiester bağı yapamaz ve DNA sentezi sonlanır.

Her ne kadar tek bir DNA molekülünün dizilenmesi teknik olarak mümkün olsa da, günümüzde kullanılan dizileme yöntemlerinin yüksek miktarda DNA kullanmalarına bağlı olarak, dizilenecek DNA önce ya polimeraz zincir reaksiyonu ile veya bakterilere klonlanarak çoğaltılır. Elde edilen DNA kopyaları 4 ayrı reaksiyon tüpüne ayrılır. Bu tüplere hedef DNA ipliğinin bir ucu için tamamlayıcı olan primer kopyaları, normal DNA sentezi için öncül moleküller olan her dört tip dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) ve her tüpte dört ddNTP'den sadece biri olacak şekilde az miktarda ddNTP ve DNA polimeraz eklenir. Her karışımda farklı bir ddNTP'den az miktarlarda bulunduğu için, kalıp DNA'dan yeni zincir sentezi sırasında ddNTP'nin zincire eklenmesi ile zincirin uzaması rastgele sonlanır ve sonuçta hep aynı bazla sonlanan fakat farklı uzunluklarda DNA parçacıkları elde edilir. Sentezlenen yeni DNA'nın saptanmasında farklı yöntemler kullanılabilir. Sanger dideoksi yöntemini ilk geliştirdiğinde uygulanan yaklaşım, ddNTP moleküllerinin radyoaktif ^{32}P ile işaretlenmesi olmuştur. Bu amaçla tüpler içinde polimerizasyon reaksiyonları sonlandıktan sonra tüplerdeki DNA denatüre edilir. Tek iplikli (ti) hale gelen DNA parçacıkları poliakrilamid jelde elektroforeze tabii tutulur, yan yana kulvarlarda yürütülerek uzunluklarına göre ayrılır. Böylece tek bir nükleotid uzunluğunda fark gösteren DNA parçacıkları bile birbirinden ayrılabilir. Otoradyografi yöntemi kullanılarak, ^{32}P ile işaretli ddNTP'lerin görünür hale getirilebilmesi amacıyla yürütülen jel röntgen filmi üzerine yerleştirilir. Film üzerinde oluşan koyu renkli bantların dizilimi değerlendirilir. Jelin alt kısmından üst kısmına doğru nükleotidlerin dizilimi okunur; alt kısımdaki nükleotidler yeni sentezlenen DNA'nın 5' ucuna, üst kısımdaki nükleotidler ise 3' ucuna karşılık gelir. Bu şekilde elde edilen nükleotid dizisi kalıp DNA'nın değil, onun tamamlayıcısı olan DNA'nın dizisidir.

Uzun yıllar boyunca tüm bu zahmetli ve pahalı işlemler manuel olarak yapılmış olsa da, günümüzde Sanger'in yöntemi otomatize edilerek çok daha kolay bir şekilde, çok daha büyük DNA parçacıklarının hızlı olarak dizi analizinin gerçekleşmesine olanak sağlanmıştır. Bu amaçla ddNTP molekülleri (veya primer 5' ucunda) floresan boya ile işaretlenir, ancak her bir ddNTP farklı renkte bir floresan boya ile boyanabildiği için dört farklı tüp yerine reaksiyonlar aynı tüp içerisinde gerçekleştirilebilir ve elektroforez sırasında aynı kuyucuğa yerleştirilebilir. Floresan boya ile işaretli DNA parçacıkları cihaz içerisinde detektör bölgesinden geçerken, lazer kaynağı yardımıyla floroforlar uyarılır, her dört ddNTP için dört farklı renkte floresans elde edilir. Renklerin detektör tarafından algılanması ile veriler bilgisayara gönderilir; bilgisayar tarafından her bir floresan emisyonu renkli bir dalga olarak grafik üzerinde çizdirilerek DNA dizisi belirlenir.

Kimyasal yöntem

Bu yöntem Maxam ve Gilbert tarafından geliştirilmiştir ve DNA'nın kimyasallarla değiştirilip, belirli bazlarda yıkılması mekanizmasına dayanır. Yöntem en etkili olarak kısa nükleotid polimerlerinde kullanılabilir. Sanger metodunda tek iplikli DNA sentezi için her okuma başlangıç bölgesinin klonlanması gerekirken, Maxam-Gilbert yönteminde doğrudan saflaştırılmış DNA kullanılması, yöntemin daha fazla tercih edilmesine neden olmuştur.

Öncelikle nükleotid dizilimi saptanacak DNA, restriksiyon enzimi ile kesilerek değişik uzunluklarda çift iplikli (çi) DNA parçacıkları elde edilir ve bu DNA parçacıklarının 5' ucu radyoaktif ^{32}P ile işaretlenir. Radyoaktif işaretli çiDNA parçacıkları denatüre edilerek tek iplikli hale getirilir ve dört ayrı reaksiyon tüpüne aktarılır. Her tüpe kimyasallar eklenerek tüp içerisindeki DNA'nın belirli bazlarda değiştirilmesi tetiklenir. Bazlar üzerine seçici etki gösteren kimyasalların kullanılması ile bazlar üzerinde özgül olarak etki yaratılabilir. Örneğin formik asit ile pürin bazlar (adenin ve guanin) deoksiriboz şekerden ayrılır (A+G), dimetil sülfat ile guaninin metilasyonu sağlanarak sadece guanin değiştirilir (G). Hidrazin ile pirimidin bazların (sitozin ve timin) metilasyonu sağlanır (C+T), hidrazin reaksiyonunda ortama sodyum klorür katılması ile timinin metilasyonu engellenip sadece sitozinde değişiklik gerçekleştirilir (C). Kimyasallar ile baza özgül değişiklik yaratıldıktan sonra, ortama eklenen piperidin bu değişikliğe uğramış nükleotidlerin bulunduğu noktalarda nükleotid zincirini koparır. Reaksiyon için kısıtlı bir süre verilerek her tüpte farklı pozisyonlardaki hedef nükleotidlerden (A+G, A, C+T, T) ayrılmış, tümü 5' pozisyonlarında işaretli, farklı uzunluklarda DNA parçacıkları elde edilir. Her dört reaksiyon karışımı da poliakrilamid jel elektroforez düzeneğinde yan yana yürütülür ve jel otoradyografi yöntemiyle incelenir. (A+G) kulvarında bant görülüp, (A) kulvarında bant görülüyorsa "G", (A+G) ve (A) kulvarlarında aynı hizada bant varsa "A", (C+T) kulvarında bant görülüp, (C) kulvarında bant görülüyorsa "T", (C+T) ve (C) kulvarlarında aynı hizada bant varsa "C" okumaları yapılır.

Sanger'in zincir sonlandırma yöntemindeki ilerlemeler üzerine, ergonomik olmayan ve oldukça fazla toksik kimyasal kullanımı gerektiren Maxam-Gilbert'in kimyasal yöntemi terk edilmiştir.

Pirodizileme (pyrosequencing) yöntemi

1996 yılında Royal Institute of Technology, Stockholm'de Nyrén ve Ronaghi tarafından geliştirilen bu yöntem, DNA sentezi sırasında DNA polimeraz tepkimeleri sonucu salınan pirofosfatın (PPi) saptanmasıyla gerçek zamanlı olarak gerçekleştirilen bir DNA dizi analizi yöntemidir. Yöntem DNA sentezine dayandığı için "sentezle dizilime" de yöntemi tanımlamak için kullanılmaktadır.

Tek iplikli kalıp DNA bir dizileme primerine hibridize edilir ve DNA polimeraz, ATP sülfürilaz, lusiferaz, apiraz enzimleri ve adenosin 5' fosfosülfat (APS) ve lusiferin substratları ile inkübe edilir. A, C, G ve T nükleotidlerini içeren çözelti ortamına sırayla eklenir. DNA polimerazın etkisi ile kalıba tamamlayıcı yeni bir dNTP molekülü eklendiğinde PPI serbestleşir. APS varlığında ATP sülfürilaz PPI'yi ATP'ye çevirir. Oluşan ATP ile lusiferaz enzimi lusiferini oksilusiferine dönüştürür ve bu dönüşüm tespit edilebilen ışıma neden olur. Zincire eklenemeyen nükleotidler ve ortamdaki ATP apiraz tarafından parçalanır, böylece reaksiyon bir başka nükleotid ile tekrar başlayabilir. Reaksiyon boyunca ortamda belirli süre aralıklarında tek bir nükleotid mevcuttur ve tek iplikli DNA kalıptan enzimatik yolla tamamlayıcı sentezlenirken, DNA polimerazın aktivitesi kemilüminesans özellikli bir diğer enzim ile takip edilir. Kalıp DNA üzerindeki ilk çifti olmayan baza, ortamdaki nükleotid çözeltisinden bir nükleotid eklendiğinde gerçekleşen ışıma ile zincirin bir nükleotid uzadığı tespit edilebilir; aynı nükleotidin dizide birden fazla sayıda yan yana bulunması ise ışımanın şiddetindeki artış ile çözümlenebilir. Kemilüminesans sinyallerin oluşumuna yol açan nükleotid çözeltisinin sıralaması ile kalıbın DNA dizisi çıkarılır.

Pirodizileme yöntemi ile 300-500 nükleotidlik dizilerin çok hızlı bir şekilde analizi mümkün olmuştur ve yöntemin prensibi günümüzde kullanılan birçok otomatize sistemde kullanılmaktadır.

Kaynaklar

1. Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. Clin Chim Acta 2006; 363: 83-94.
2. Chan EY. Advances in sequencing technology. Mutat Res 2005; 573: 13-40.
3. Hutchison CA 3rd. DNA sequencing: bench to bedside and beyond. Nucleic Acids Res 2007; 35: 6227-37.
4. Ju J, Kim DH, Bi L, et al. Four-color DNA sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 19635-40.
5. Metzker ML. Emerging technologies in DNA sequencing. Genome Res 2005; 15: 1767-76.
6. Pettersson E, Lundberg J, Ahmadian A. Generations of sequencing technologies. Genomics 2009; 93: 105-11.
7. Sanger F. Determination of nucleotide sequences in DNA. Biosci Rep 2004; 24: 237-53.

YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ YÖNTEMLERİ

Dr. Burak AKSU

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

2000’li yılların başında insan genom projesinin ilk ürünlerinin elde edilmesi, modern DNA dizileme çağıının başlangıcı olarak kabul edilebilir. Bu dönem “gelecek nesil dizileme” olarak adlandırılan ve günümüz genomik araştırmalarının büyük umut bağladığı teknolojilerinin geliştirilmesine de öncülük etmiştir. Yeni nesil dizileme teknolojileri, araştırmacılara, yüksek verimlilik ve düşük maliyetin yanı sıra keşfedilmemiş genomik veriler sunmayı vaatmektedir. Bu teknolojilerin sağlayacağı genom verileri ışığında, farklı popülasyonların genomik değişiklikleri, hastalıklara karşı genetik duyarlılık ve ilaç yanıtına yönelik farmakogenetik alanında önemli gelişmeler kaydedileceği öngörülmektedir. “Nature Methods” 2007 yılında yeni nesil dizileme yöntemlerini, tıp dünyasına sağlayacakları yeni açılımlar nedeniyle “Yılın Teknolojisi” olarak seçmiştir. A.B.D Ulusal İnsan Genomu Araştırma Enstitüsü (NHGRI), beş yıl içerisinde yakın dönem hedefi olarak, okunan baz çifti başına maliyetin 100 kat azalmasını, devrimsel hedef olarak ise, maliyetin 10.000 kat azalmasını yani 1000\$/genom olacağını bildirmektedir.

Geliştirilen yeni nesil dizileme yöntemleri, farklı kimyasal yapıli moleküllere, dizileme protokollerine, hıza, verimliliğe ve okuma uzunluğuna sahiptir. Bu yöntemler genel olarak, “sentez sırasında dizileme” ve “ligasyon aracılığı ile dizileme” olarak gruplandırılmaktadır. Bugün için pazar payı açısından dört farklı yeni nesil dizileme platformu ön planda yer almaktadır. Bu platformların özellikleri aşağıda özetlenmiştir (Tablo 1).

454 FLX Pyrosequencer Sistemi - Roche

2000 yılında Jonathan Rothberg tarafından kurulan 454 Life Sciences, ilk ticari yeni nesil dizileme sistemini 2005 yılında pazara sunmuştur. Daha sonraki dönemde Roche, 454 Life Sciences’ı bünyesine katmış ve cihazın yeni versiyonunu üretmiştir.

Bu sistemde ilk aşamada, hedef DNA 300-800 bazçifti (bp) parçalara bölünür, parçaların uçlarına eklenen adaptörlerle bir DNA kütüphanesi oluşturulur. Bu DNA parçaları, taşıdıkları adaptörler aracılığı ile 25-36 µm boyutlu mikroboncuklara bağlanır ve yağ emülsiyonu içerisine alınır. Bu ortamda PCR reaksiyonu gerçekleştirilerek, boncuk üzerindeki dizilenecek hedef DNA kopya sayısı artırılır. Mikroboncuklar, üzerinde sadece tek boncuğun sığabileceği büyüklükte kuyucuklar içeren özel pla-

kalara aktarılır ve cihaza yerleştirilir. Bu aşamada pirosekanslama işlemi gerçekleşirken, cihaz her bir kuyucuktaki ışımaları kaydeder ve kuyucuktaki hedefin dizisini belirler; elde edilen kısa diziler özel yazılım aracılığı ile birleştirilerek konsensus dizi belirlenir.

Cihazın kullandığı tek molekül emülsiyon PCR ile pirosekanslama teknolojisi, tek bir çalışmada *M.genitalium*'un 580.000 bp'lık genomunu %96 kapsam ve %99.96 doğruluk ile saptayarak geçerliliğini ortaya koymuştur.

Tablo 1. Yeni nesil dizileme sistemlerinin özellikleri

Platform	454 FLX pyrosequencer	illumina	SOLiD	Ion Torrent
Dizileme yöntemi	Pirosekanslama	Sentezleme tabanlı dizileme	Ligasyon tabanlı dizileme	İyon yarı-iletken dizileme
Amplifikasyon yaklaşımı	Emülsiyon PCR	Köprü amplifikasyon	Emülsiyon PCR	Emülsiyon PCR
Maksimum çıktı (Mb/run)*	700	6000	20.000	1000
Okuma uzunluğu (bp)*	~ 400-800	~ 100	~ 50	~ 200
Okuma süresi (saat/run)*	7 saat	9 gün	9 gün	2 saat
Uygulamalar	<i>De novo</i> dizileme; yeniden dizileme; hedef dizileme; genotiplendirme; metagenomik	Yeniden dizileme; kantitatif transkriptom dizileme; genotiplendirme; metagenomik	Yeniden dizileme; kantitatif transkriptom dizileme; genotiplendirme; metagenomik	<i>De novo</i> dizileme; yeniden dizileme hedef dizileme; transkriptom dizileme; genotiplendirme; metagenomik
Temel hatalar	Homopolimerler; komşuluk aracılı sinyal karışması; amplifikasyon	Komşuluk aracılı sinyal karışması; nükleotid işaretleme; amplifikasyon; AT zengin bölgede düşük kapsama	Komşuluk aracılı sinyal karışması; nükleotid işaretleme; sinyal kaybı; AT zengin bölgede düşük kapsama	Homopolimerler; amplifikasyon
Maliyet (\$/run)*	8500	20.000	4000	350
Cihaz maliyeti (\$)*	500.000	600.000	600.000	70.000
Web sitesi	www.454.com	www.illumina.com	www.appliedbiosystems.com	www.iontorrent.com

*Tüm platform üreticileri, verimliliği artıracak ve maliyeti düşürecek geliştirmeler yapmaktadır.

Solexa Genome Analyzer - Illumina Inc.

2007 yılının başında Illumina, Solexa GA tarafından geliştirilen Genome Analyzer'ı piyasaya sunmuştur. Bu sistemde, hedef DNA parçalara bölünür; parçaların uçlarına birer adenin nükleotidi eklenir ve uygun adaptörler bağlanır. Elde edilen parçalar "flowcell" olarak adlandırılan katı yüzeye bağlanırlar. Burada köprü amplifikasyonu olarak tanımlanan PCR işlemi gerçekleştirilir ve DNA parçaları demetler oluşturacak şekilde çoğaltılır. Dizileme primeri ortama eklenir ve her biri ayrı floresan boya ile işaretlenmiş ve bir terminatör parça taşıyan deoksinnükleotidler (reversible terminator) reaksiyona girer; özel bir polimeraz ile uygun nükleotidin hedefe bağlanmasından sonra bağlanmayan diğerleri uzaklaştırılarak floresan okuma yapılır. Daha sonra nükleotidin terminatör kısmı ve floresan boyası yıkılarak, zincir, sıradaki nükleotidin bağlanması için uygun hale getirilir. Elde edilen veriler yazılım yardımıyla birleştirilerek sonuç dizi belirlenir. Illumina Solexa günümüzde, bu alanda en yaygın kullanılan sistemdir.

ABI SOLiD Sistemi - Applied Biosystems

ABI'nin yeni nesil dizileme platformu SOLiD, 2007 yılı son çeyreğinde pazara girmiştir. Bu sistemde DNA parçalara ayrıldıktan sonra uçlarına adaptörler eklenir ve bunlar aracılığı ile $\approx 1 \mu\text{m}$ çaplı mikroboncuklara bağlanır. Her bir boncuk, üzerinde tek bir DNA parçası bağlı şekilde, yağ emülsiyonu içerisinde PCR reaksiyonuna girer ve DNA parçalarının çoğaltılması gerçekleşir. DNA denatürasyonu sonrasında boncuklar cam yüzey üzerine aktarılır. İlk aşamada, DNA'ya bağlanmış olan adaptöre yönelik bir primerin DNA'ya ligasyonu sağlanır. Daha sonra çift nükleotid içeren ve floresans işaretli uygun oktamer, DNA parçasına ligasyonla bağlanır. Floresan okuma yapılarak bağlanan nükleotidler belirlenir. Daha sonra bağlanmış olan oktamer 5. nükleotidten kırılır; böylece floresan boya ortamdaki uzaklaştırılır. Bu sistemle her seferinde yaklaşık 35 bp'lik bir fragman okunmakta ve 50 milyon boncuktaki DNA parçasına ait diziler paralel şekilde okunarak yüksek bir verimlilik sağlanmaktadır. Son gelişmelerle sistem, tek çalışmada >10 Gb veri üretebilmektedir.

Ion Torrent PGM Sistemi - Life Technologies

Şubat 2010 tarihinde lansmanı yapılan, Ion Torrent PGM sistemi, yukarıda bahsedilen platformlardan farklı bir teknoloji kullanmaktadır. Bu sistemde, doğal yapıdaki nükleotidler kullanılır; floresans, kemilüminesans veya enzimatik reaksiyonlar dizisi yoktur. Kullanılan yöntem, yarı-iletken (semi-conductor) dizileme olarak tanımlanır. Bu yöntemde, hedef DNA'ya polimerizasyon ile eklenen her bir nükleotid ile açığa çıkan hidrojen iyonları hedeflenir. Cihazda yer alan mikrokuyucuklar içerisinde gerçekleşen bu reaksiyon sırasında, ortamdaki hidrojen iyon yoğunluğundaki değişim saptanarak diziye eklenen nükleotid belirlenir.

Yeni nesil dizileme sistemlerinin uygulamaları

Yeni nesil dizileme sistemlerinin başlıca kullanım alanları aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- De novo dizileme (genomu bilinmeyen bir organizmanın genom dizisinin saptanması),
- Yeniden dizileme (genom dizisi belirlenmiş bir organizmanın farklı bireylerinin yeniden dizilenmesi),
- Amplikon dizileme (genomdaki farklı genlerin veya bir genin birden fazla örnekte aynı anda dizilenmesi),
- Detaylı (Deep) amplikon dizileme (bir popülasyonu oluşturan bireylerde hedef genlerin, aradaki farklılıkların belirlenecek şekilde dizilenmesi),
- Transkriptom dizileme (belirli bir koşulda veya popülasyonda transkripsiyona uğrayan tüm genlerin dizilenmesi),
- Tekli baz değişimlerini (SNP) saptama ve tanımlama.

Yeni nesil dizileme teknolojisinin mikrobiyoloji alanındaki uygulamaları ele alınacak olursa, bu yöntemler kültürde üretilen mikroorganizmaların biyolojisinin daha iyi çözümlenmesini, tanısal ve epidemiyolojik açıdan çok daha detaylı verilerin elde edilmesini sağlamaktadır. Bu alanda, ilaç hedeflerinin saptanması ve antibiyotik direnç mekanizmalarına yol açan mutasyonların belirlenmesine yönelik çalışmalar bulunmaktadır.

Bakterilerin genetik epidemiyolojisinde son durak, tüm genom dizilemesi olarak kabul edilmektedir. Çeşitli bakterilerle yapılan çalışmalarda, kökenler arasındaki farklılıklar tekli baz değişimleri düzeyinde saptanabilmiştir. Yüksek mutasyon hızına sahip viruslarda düşük seviyelerdeki genomik türlerin (quasispecies) belirlenmesi mümkün hale gelmiştir.

Bakterilerin kısa ve uzun dönemdeki evrimsel değişimi bu teknoloji sayesinde çok daha derinlemesine izlenebilmektedir. Yeni teknoloji, kültürden bağımsız bir mikrobiyoloji tanısını da bilim dünyasına sunmaktadır. Popülasyon profilinin ortaya konulması, klinik metagenomik ve yeni patojenlerin keşfi ile insan mikrobiyomuna ait kütüphaneler oluşturulmaya başlanmıştır.

Yeni nesil dizileme, mikrobiyolojide yapılan araştırmaları şimdiden şekillendirmeye başlamıştır. Bununla birlikte, referans ve rutin laboratuvarlarda klinik mikrobiyoloji uygulamalarına olan katkısı için sadece biraz daha zaman gerekmektedir.

Sonuç

Yeni nesil dizileme teknolojileri, kısa dizi okumaları, tekrarlayan dizilerdeki okuma hataları, hataya açık PCR amplifikasyonuna dayalı yöntemlerin kullanılması gibi bazı sorunlar taşımakla beraber yüksek verimlilikle, hızlı ve yüksek kalitede veri elde edilmesi açısından DNA dizileme alanında bir çığır açmıştır. Bu yöntemler, kanser, enfeksiyon hastalıkları, aşı ve ilaç geliştirme çalışmaları ile tanıya yönelik araçların geliştirilmesi açısından yeni umutlar doğurmuştur.

2004 yılından itibaren A.B.D Ulusal İnsan Genom Araştırma Enstitüsü yeni nesil dizileme teknolojilerine 100 milyon \$'dan daha fazla ödül vermiş, bu ödüller de bu alanda çok hızlı bir gelişmenin sağlanmasına öncülük etmiştir. Bugün artık 3. nesil dizileme platformları (tek molekül dizileme, nanopor teknolojisi gibi) gündemdedir. Bunları yeni, daha verimli ve gelişmiş teknolojilerin izleyeceği kesindir. Bu yeni teknolojilerin sağladığı bilginin, klinik tıpta kullanıma girmesi ile gelecek dönem, kişisel genomik tıp çağı olacaktır.

Kaynaklar

1. Ansorge WJ. Next-generation DNA sequencing techniques. *N Biotechnol* 2009; 25(4): 195-203.
2. Barzon L, Lavezzo E, Militello V, Toppo S, Palù G. Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology. *Int J Mol Sci* 2011; 12(11): 7861-84.
3. Delseny M, Han B, Hsing Yle. High throughput DNA sequencing: The new sequencing revolution. *Plant Sci* 2010; 179(5): 407-22.
4. MacLean D, Jones JD, Studholme DJ. Application of 'next-generation' sequencing technologies to microbial genetics. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7(4): 287-96.
5. Metzker ML. Sequencing technologies-the next generation. *Nat Rev Genet* 2010; 11(1): 31-46.
6. Moorhouse MJ, Sharma HS. Recent advances in i-Gene tools and analysis: microarrays, next generation sequencing and mass spectrometry. *Indian J Biochem Biophys* 2011; 48(4): 215-25.
7. Pallen MJ, Loman NJ, Penn CW. High-throughput sequencing and clinical microbiology: progress, opportunities and challenges. *Curr Opin Microbiol* 2010; 13(5): 625-31.
8. Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet* 2011; 52(4): 413-35.
9. van Vliet AH. Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities. *FEMS Microbiol Lett* 2010; 302(1): 1-7.

DNA DİZİ ANALİZİ VE GELECEKTEKİ UYGULAMALAR

Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ

Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Uygulamadaki DNA dizisi saptama yöntemleri, dizisi belirlenecek DNA'nın çok sayıda kopyasını gerektirmektedir ve enzimatik kimyasal tepkimelere dayanmaktadır. Teknolojinin gelişmesi ile DNA'nın tek zincirini, hiçbir kimyasal tepkimeye dayanmadan saptayabilecek yöntemler ortaya çıkmıştır. Bunlar arasında atomik güç mikroskopisi (AGM) ile ve nanopordan geçen tek molekül DNA zincirinin okunması, yakın gelecekte yaygınlaşması olası DNA dizisi saptama yöntemleri olarak karşımıza çıkmaktadır.

Nanopor dizi incelemesi, 1995 yıllarından beri DNA dizisinin saptanması için kullanılmaya çalışılmaktadır. Nanopor, iç çapı yaklaşık 1nm olan bir deliktir. Bir tabakada delik açıldıktan sonra tabakanın bir tarafına DNA molekülleri konur ve iki taraf arasına küçük bir elektrik alanı uygulanarak DNA moleküllerinin sıra ile bu delikten geçmesi sağlanır. DNA molekülü delikten geçerken elektrik akımında düşme yaratır. Akımdaki düşme o sırada delikten geçmekte olan nükleotidin büyüklüğü ile doğru orantılıdır. İnceleme için istenilen düzgünlükte ve büyüklükte bir delik açılabilirse 4 farklı nükleotidi delikten geçerken ayırt etmek olanaklı olur¹⁻⁵.

Nanopor oluşturmak için bugüne dek iki teknik kullanılmıştır. Bunlardan birincisi ince bir silikon tabakasına lazer kullanarak bir delik açmak ve daha sonra bu deliğin çevresini doldurarak deliği 1nm iç çapı olana dek küçültmek temeline dayanır. Bunu yapmak için transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) kullanılabilir. TEM delik çevresinde hidrokarbon birikmesine yol açarak deliğin küçültülmesini sağlamaktadır. Odaklanmış iyon ışını ile de delik doldurularak küçültülebilmektedir. Bir başka yaklaşım ise, tıkanmış olan deliğin argon ışını ile delinmesine dayanmaktadır. Bu yöntemlerde deliğin çapının standart bir büyüklükte oluşturulması ve düzgün yuvarlak şekilde yapılması oldukça zordur¹⁻⁵. Bu nedenle nanopor oluşturmak için, delik oluşturan biyolojik moleküller kullanılmakta, bunlar biyolojik zarlarda olduğu gibi çift yağ tabakasından oluşan zarlara yerleştirilmektedir. Biyolojik nanopor oluşturmak amacı ile en sık kullanılan moleküllerden birisi alfa- hemolizindir. Bakteriler tarafından üretilen alfa-hemolizin, eritrosit zarlarında delik açarak onların parçalanmasına yol açan toksindir. Alfa-hemolizin, zarda bir tarafı 10nm diğer ucu yaklaşık 5nm çapında bir delik oluşturur. DNA dizi incelemesi için alfa hemolizin ile bir zarda açılan delikten tek zincirli DNA geçirilir. DNA molekülünün geçişi sırasında nükleotidler büyüklüklerine göre akım düşüşüne yol açarlar. Bu akım düşüşleri bilgisayar programı tarafından yorumlanarak DNA dizisine çevrilir¹⁻³. Alfa-hemolizin ile DNA

dizi incelemesinin ayırım gücünü artırmak için delik çapının küçültülmesi gerekmiştir. Bu amaçla mutant alfa- hemolizinler elde edilmiştir. DNA zincirinin kontrollü bir şekilde, daha yavaş geçirilmesi de ayırım gücünü artırmıştır. Bu amaçla hemolizine bağlanan ekzonükleaz enzimi kullanılmıştır. Ekzonükleaz tarafından kopartılan nükleotidler sıra ile delikten geçerken hangi nükleotid oldukları belirlenmiştir. Yine iki zinciri birbirinden ayıran helikaz gibi enzimler DNA'nın bir zincirinin kontrollü olarak alfa-hemolizinden geçmesini sağlayabilmektedir. Her nükleotid alfa-hemolizinden geçerken iki bölgede elektrik akımı düşmesine neden olmaktadır. Böylece 4 nükleotidden toplam 16 farklı akım biçimi elde edildiği görülmüş, bu da yöntemin ayırım gücünü artırmıştır⁶.

Zarda delik oluşturmak için kullanılan yapılardan birisi de *Mycobacterium smegmatis* porin A (MspA) proteindir. MspA porunun bir ucu 1.2nm çapındadır ve ayırım gücünün alfa-hemolizinden 10 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur. Doğal MspA şekli ve çapı ile DNA dizi analizi için ideal olsa da por içerisinde yer alan negatif yükler, negatif yüklü DNA molekülünün deliğe girmesini engellemiştir. Por içindeki negatif yüklü üç aspartik asit, yüksüz asparajin ile değiştirilerek bu sorun çözülmüştür. Ayırım gücünün bu denli yüksek olması çift zincirli DNA'nın doğrudan okunmasının olanaklı olabileceğini düşündürmüştür. Pora bağlanan bir polimeraz ile kontrollü geçiş sağlanarak çift zincirli DNA'nın geçişi okunmaya çalışılmaktadır^{7,8}.

AGM ya da taramalı güç mikroskobu çok yüksek çözünürlüklü bir aygıttır. Ulaşılmış çözünürlük birkaç nanometre ölçeğinde olup optik tekniklerden en az 1000 kat fazladır. AGM'nin öncülü olan taramalı tünelleme mikroskobu, 1980'lerin başında Gerd Binnig ve Heinrich Rohrer tarafından (IBM Research) Zürih'te geliştirilmiş, araştırmacılara 1986 Nobel Ödülü'nü kazandırmıştır. AGM'de silikon veya silikon nitrürden yapılmış esnek bir kol, bu kolun ucunda tek atom kalınlığına dek inen sivri bir uç bulunur. Bu kolun üst yüzeyine lazer ışını düşürülür. Buradan yansıyan lazer bir dizi fotodiyottan oluşun algılayıcı bir yüzeye çarpar. Yüzeyde gezdirilen iğne ucu, yüzeyin şekline göre yukarı aşağı hareket eder. Bu sırada kolun üzerinden yansıyan lazer ışınının açısı değişerek algılayıcı üzerinde farklı noktalara düşer. Bu değişim bilgisayar tarafından yüzey şekillerine dönüştürülerek yüzeyin görüntüsü oluşturulur⁹.

AGM ile DNA zincirlerinin görüntülenmesi 1990'lara kadar gitmektedir. AGM ile doğrudan nükleotidler ayırt ederek DNA dizisini çıkartma girişimleri başarılı olmamıştır. Murray ve arkadaşları tarafından, bir ucundan biotin ile işaretlenen DNA molekülleri, streptavidin ve stafilokok protein A komplekslerine bağlanmış, bu da immünoglobülin molekülleri ile mika yüzeye tutturulmuş ve DNA molekülleri görüntülenmiştir. Ancak bu görüntüleme nükleotidler birbirinden ayıracabilecek ayırım gücünden oldukça uzaktır¹⁰.

AGM bir yüzeyin şeklini belirlemenin yanı sıra, moleküllerin arasındaki bağlantıla-

rın gücünü ölçmekte de kullanılmaktadır. Günümüzde bu çalışmalar ilaç ve hedefi, antijen ve antikor arasındaki bağlanma gücünün ölçülmesinde de önemli bir araç haline gelmiştir. Bu yöntemin AGM ile DNA dizisinin saptanmasını sağlayabileceği üzerinde durulmaktadır. Tek zincir DNA'yı bir halka gibi saran siklodekstrin molekülünün AGM iğnesine bağlanması ve DNA üzerinde sürüklenmesi ile DNA dizisi saptanmaya çalışılmıştır¹¹. Henüz DNA dizisi saptanmasında başarılı olunamasa da bu oldukça umut veren bir yöntemdir. Halen biz de yapmaya başladığımız çalışmalar ile çift zincirli sarmal DNA'ya bağlanan moleküller aracılığı ile DNA dizisini saptamayı hedeflemekteyiz.

İster nanopor, ister AGM teknolojisi ile olsun, çok yakında DNA dizi inceleme aygıtlarının, bilgisayarlarımıza USB bağlantısından takabileceğimiz, herkesin kolayca satın alabileceği denli küçük, ucuz aygıtlar haline geleceğini öngörebiliriz.

Kaynaklar

1. Kasianowicz JJ, Brandin E, Branton D, Deamer DW. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93(24): 13770-3.
2. Clarke J, Wu HC, Jayasinghe L, Patel A, Reid A, Bayley H. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nat Nanotechnol* 2009; 4(4): 265-70.
3. Stoddart D, Heron A, Mikhailova E, Maglia G, Bayley H. Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a biological nanopore. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 7702-7.
4. Purnell R, Mehta K, Schmidt J. Nucleotide identification and orientation discrimination of DNA homopolymers immobilized in a protein nanopore. *Nano Letters* 2008; 8(9): 3029-34.
5. Stoddart D, Maglia G, Mikhailova E, Heron A, Bayley H. Multiple base-recognition sites in a biological nanopore: two heads are better than one. *Angew Chem* 2010; 49: 556-9.
6. Astier Y, Braha O, Bayley H. Toward single molecule DNA sequencing: direct identification of ribonucleoside and deoxyribonucleoside 5'-monophosphates by using an engineered protein nanopore equipped with a molecular adapter. *J Am Chem Soc* 2006; 128(5): 1705-10.
7. Manrao E, Derrington I, Pavlenok M, Niederweis M, Gundlach J. Nucleotide discrimination with DNA immobilized in the MspA nanopore. *PLoS One* 2011; 6(10): e25723.
8. Butler TZ, Pavlenok M, Derrington I, Niederweis M, Gundlach J. Single-molecule DNA detection with an engineered MspA protein nanopore. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 106(9): 20647-52.
9. Murray MN, Hansma HG, Bezanilla M, et al. Atomic force microscopy of biochemically tagged DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(9): 3811-4.
10. Torun H, Sarangapani KK, Degertekin FL. Fabrication and characterization of micromachined active probes with polymer membranes for biomolecular force spectroscopy. *J Microelectromech Sys*. http://esaki.ee.boun.edu.tr/~torun/docs/torun_jmems10.pdf
11. Ashcroft BA, Spadola Q, Qamar S, et al. An AFM/rotaxane molecular reading head for sequence-dependent DNA structures. *Small* 2008; 4(9): 1468-75.

PANEL 10: LABORATUVAR HATALARININ HUKUKSAL YÖNLERİ

Av. Serdar ÖZERSİN

LABORATUVAR TANILARINDAN DOĞAN UYUŞMAZLIKLAR VE ULUSLARARASI HUKUK

Yard. Doç.Dr. Erdem İlker MUTLU

Hacettepe Üniversitesi Hukuk Fakültesi, Uluslararası Hukuk Anabilim Dalı, Ankara

Çocuğunuzu doğuran anne ile çocuğunuz arasında genetik uyumsuzluk mu var? Sakın anneyi gizli yumurta nakliyle suçlamayın.. Belki de Kimerizm örneği yaşayan bir kişi olabilir.

Hamileliğin 6. ayında ultrason ile tespit edilen bir ense kalınlaşması bulgusuna karşı amniyosentez yapılmış ve raporda “çocuğunuz bir genetik harikası(!)” şeklinde bir sonuca ulaşılmış olabilir, ya laboratuvar yanılmışsa?

Bir hastanızın HIV pozitif olduğu biliniyor, eşinin de enfekte olduğu gerçeği ile eşi bir tecavüz suçlamasıyla karşılaştığında suçlama bir anda kasten adam öldürmeye dönüşebiliyor. Suçun manevi unsuru olan kast unsurunu ispatlayabilmesi için, savcının kişinin HIV pozitif olduğunu bildiğini ispatlaması gerekir. Bunun için sizin hastanızın dosyasına erişmek istemeleri mümkün müdür?

Bu örnekler çoğaltılabilir. Bu çalışmada, devletin sağlık kamu hizmeti çerçevesinde sorumluluğunun, laboratuvarlar açısından görünümü ve uluslararası mahkeme kararlarından bu sorumluluğa ilişkin örnekler verilecektir.

Kamu Hizmeti Kavramı ve Sağlık Hizmeti

Devlet tüzel kişiliği farklı birimlerde farklı kamu hizmetleri sağlarken farklı görünüm-lerde olan tek bir tüzel kişiliktir. Bu durum idarenin bütünlüğü ilkesi çerçevesinde Anayasamızın 123. Maddesinde ifadesini bulmaktadır. Bakanlıklar ve yardımcı birimlerin kurulması ise yine Anayasamızın 113. Maddesinde belirtildiği şekilde sağladığı kamu hizmetinin özelliğine göre farklılıklar gözetmektedir. Bundan dolayıdır ki Sağlık Hizmeti ile ilgili Sağlık Bakanlığı kurulmuş ve ülke çapında sağlık kamu hizmetinin yürütülmesinden sorumlu olmuştur.

Bu sorumluluğun kapsamı, sadece hizmetin sağlanması için gerekli teşkilatı kurarak personeli sağlamakla sınırlı olmayıp, kamu veya kamudan lisanslı özel sağlık kuruluşlarının devlet tarafından yeterli denetiminin sağlanmasını da içermektedir. Bu nedenle bir sağlık kuruluşunun sağladığı sağlık hizmetinin aksaması sonucu ortaya çıkacak zarardan dolayı, sadece sağlık kuruluşu tüzel kişiliğinin değil, devletin de sorumluluğuna gidilebilmesi imkanı mevcuttur.

İç hukukta özel sağlık kuruluşu ve devlet sağlık kuruluşunun farkı, sadece kamu görevi ve sosyal güvence bağlamında hastalar ve personel rejimi açısından bir farklılık doğurur. Hatta bu farklılık öyle bir boyutta olabilir ki aynı kamu hizmeti sunulmasına rağmen, bunlardan birinin kalitesi diğerinden oldukça farklı olabilir ve bu hizmetin aksamasından dolayı çıkacak uyuşmazlıkların çözümünü iç hukuk farklı düzenlemiş olabilir. Ancak ne var ki, uluslararası hukuk karşısında bu kamu hizmetlerinin lisanslamasında devletin sorumluluğu söz konusu olduğu için, devlet kamu hizmetinin sunulması sürecinde kişinin temel hak ve özgürlüklerinin ihlaline neden oluyorsa bundan sorumludur. Avrupa İnsan Hakları mahkemesi, Avrupa İnsan Hakları Sözleşmesi ve Ek protokollerinde güvence altına alınan hak ve özgürlüklerin ihlallerinin tespitine ve adil bir tazminata hükmedebilir.

Devletin sağlık hizmetine ilişkin teşkilatlanma, lisanslama ve denetim sorumluluğu iç hukukta epey ayrıntılı mevzuatlarla düzenlenmiştir. Ancak bu düzenlemeler devletin iç hukuktaki yetkileri ile ilgilidir. Ülkesel yetki alanına giren konulara herhangi bir uluslararası mahkeme veya kurum müdahale edemez. Bundan dolayıdır ki devletler bu tür düzenlemeleri istedikleri şekillerde yapabilirler. Ancak devletlerin bu tür uluslararası sözleşmeler bağlamında sorumluluklarının kapsamı oldukça geniş olabilmektedir: (1) Sözleşme kapsamındaki hak ve özgürlükleri kendi görevlileri yoluyla ihlal etmemek, (2) Bireylerin bu hak ve özgürlüklerinin üçüncü kişiler tarafından ihlal edilmesine engel olmak için gerekli tedbirleri almak, (3) Hak ve özgürlükler bir şekilde ihlal edilirse, bu ihlallerden sonra gerekli etkin soruşturmayı yapmak.

Üç Farklı Vaka, Üç Farklı Sonuç

Burada verilen üç örnek üzerinden, bu süreçlerin nasıl işlediğini anlamaya çalışarak devletin sorumluluğunu değerlendirip, hukukun veya uluslararası mahkemenin tavrını tespit edeceğiz.

Birinci Vaka: Draon - Fransa davası¹

Karı Koca Draon ailesi hamilelikten itibaren düzenli hekim kontrolündedirler. Hamileliğin 6. ayında ultrason incelemesinde fetüste bir ense kalınlaşmasına rastlanması ile amniyosentez kararı alınmıştır. Bunun üzerine Saint Antoine Hastanesi, Paris’de Prof.T’nin yönettiği departman tarafından amniyosentez işlemi yapılmıştır. Karyotip incelemesinde 11 no’lu kromozomda bir uyumsuzluk tespit edilmesine rağmen, bir şekilde bu durum gözden kaçmış ve büyük bir ihmal sonucu çocuk serebral malformasyonla doğmuştur. Aile tıp merkezi aleyhine dava açmıştır. Fransız hukuk sistemi çerçevesinde mahkemenin verebileceği tazminat, aileyi tatmin etmediği için aile Avrupa İnsan Hakları Mahkemesi’ne başvurmuştur. Zararın tazmin edilmesine

yönelik olarak ailenin meşru beklentisinin bir mülkiyet hakkı olduğuna karar veren mahkeme Fransa'ya tazminata hükmetmiştir.

İkinci Vaka: Z – Finlandiya Davası²

Bu davada ad veya soyadı kullanılmamış ve Avrupa İnsan Hakları Mahkemesi başvuranı “Z” harfiyle temsil edilmiştir. Özellikle kişinin özel yaşamı ve aile yaşamının ayrıntıları söz konusu olduğunda, Mahkeme İçtüzüğü başvuruca davada isim kullanılmamasını talep hakkı vermiştir. Bundan dolayı anlatacağımız olayda başvuranın adı sadece Z harfi ile temsil edilmiştir.

Z, HIV virusu ile enfekte olmuş, eşi X ile daha sonra boşanmıştır. Ne var ki X bir süre sonra genç bir kadına tecavüz suçuyla soruşturmaya maruz kalmaktadır. Bu soruşturma, X'in HIV pozitif olduğunun anlaşılması sonucu tip değiştirmekte ve bir anda adam öldürme suçuna dönüşmektedir. Zira ölümcül bir hastalığın bulaştırılması yoluyla ölüme sebebiyet verme Fin Ceza Yasalarında adam öldürme suçunun bir görüntüsü olarak belirlenmiştir. Burada suçun ispatlanabilmesi için gerekli olan tek şey, X'in cinsel saldırı zamanında kontamine olduğunu bildiğinin de savcılıkça ispatlanması gerekliliğidir. X'in olaydan önceki medikal geçmişi ve ELISA prosedürü dahil enfekte olabileceğini bildiğini tespit edecek laboratuvar sonuçlarına ulaşamamıştır. Bu nedenle eski eşi Z'nin sonuçlarına ulaşmaya çalışılmaktadır. Mahkeme eski eşi Z'nin medikal geçmişini ve laboratuvar sonuçlarını alarak X'i mahkum etmiştir. X ise mahkeme kararında kendi medikal geçmişi ve laboratuvar sonuçlarının açıkça bulunduğu ve davaya taraf olmayanların erişebileceği bir pozisyonunda olduğu için Finlandiya aleyhine Avrupa İnsan Hakları Mahkemesi'ne başvurmuş ve mahkeme Sözleşme'nin 8. Maddesinde güvence altına alınan kişinin özel yaşamının ihlal edilmesine hükmetmiştir.

Üçüncü Vaka: Karen Keegan Vakası ve Lydia Fairchild'in çiğnenen onuru^{3*}

Lydia Fairchild ile ilgili haberler ABC News Amerikan televizyon ve internet haberciliği döneminde oldukça ilgi çekici vakalardan biri olmuştur⁴. Ağustos 2006'da yapılan habere göre Lydia Fairchild daha 26 yaşındayken işsiz ve maddi durumun olumsuzluğu nedeniyle çocuklarına devlet yardımı almak için başvurmuştur. Çocuklar evlilik dışında meydana geldiği için kendisi ile ilgisini ispatlaması istenmektedir. Bunun için kendisinden çocukları ile DNA örtüşmesini gösteren bir rapor talep edilir. Lydia gayet kendinden emin şekilde gidip kan örneklerini verdikten sonra aldığı sonuçlara inanmamıştır. Kesinlikle iki çocuğu ile de DNA örnekleri uyuşmamaktadır. Sosyal Hizmetler Kurulu bir anda kendisi hakkında bir soruşturma başlatılması için süreç başlatmıştır. Bir anda olağan bir görüşmeye çağrıldığını zanneden Lydia Fairchild

kendisini ceza soruşturmasının ortasında bulmuştur. Eyalet görevlilerinin kendisine sorduğu ilk soru şudur: “Sen kimsin? Gerçek kimliğin nedir?!” Soruşturma konusu ise, yasadışı taşıyıcı annelik ile sosyal güvenlik kurumuna karşı hile yapmaktır. Zira test sonuçları eski erkek arkadaşı Townsend’in baba olduğunu doğrularken kendisinin anne olmadığını söylemektedir. Sosyal Güvenlik Kurumu son derece ısrarlı bir şekilde laboratuvar sonuçlarının doğru olduğunu, genetik karşılaştırmanın yanılma-yacağını söylemektedirler.

Sosyal Güvenlik Kurumu çocuklarını Lydia’nın elinden almak için bir süreç başlatmış-larken Lydia panik halinde herkese çocukları kendisinin doğurduğunu, herhangi bir şekilde çalmadığını ya da yasadışı taşıyıcı annelik yapmadığını ispatlamaya çalışmak-tadır. Doğum fotoğrafları, hamilelik süresince yapılan işlemler, ultrason görüntüleri bunlar arasında sayılabilir. Lydia’nın anne babası ise çok halinde, mutlaka bir hata yapılmış olduğunu, laboratuvarın isimleri, örnekleri, sayıları karıştırmış olması ge-rektiğini iddia etmişlerdir. Laboratuvar herhangi bir kimseyle hiç bir örnek karışıklığı olmadığını yenilemişken, Mahkeme ise DNA testinin ebeveynlik ispatında o güne kadar yanılmamış bir altın standart sunduğunu ileri sürmektedir.

Nihayetinde Lydia’nın avukatı Alan Tyndell, bu durumu araştırıp, nasıl gerçek bir anne veya babanın DNA’ları ile çocukların uyuşmayabileceklerini tespit etmiştir:

Mayıs 2002’de Yu ve arkadaşları⁵ tarafından New England Journal of Medicine dergi-sinde yayınlanan vakaya göre; *“Karen Keegan 52 yaşında böbrek yetmezliği yaşayan bir hastadır. Kendisine donör olacak akrabaları tespit edilmeye çalışırken, iki çocuğundan alınan DNA örneklerinde şaşırtıcı bir duruma rastlanır: Bizzat kendisinin doğurdu-ğu çocukları Karen Keegan’dan herhangi bir kalıtsal özellik taşımadığı, tamamen DNA ların farklı olduğunu öğrenir. Bu duruma tıpta kimerizm denmektedir.”*

Lydia’da da aynı Karen Keegan’da olan Kimerizm vakası bulunmaktadır. Bu nedenle laboratuvar sonuçları doğrudur, ama artık bu DNA eşleşmesinin altın standardının ayarı düşmüştür. Bu durum da, özellikle Lydia ve ailesinin şüphelerinin yoğunlaştığı laboratuvarı da hukuki sorumluluktan tamamen kurtarmaktadır.

Üç Vaka İçin Üç Ayrı Durum Tespiti ve Sonuç

İlk olarak ve ne şartta olursa olsun; laboratuvar kayıtları mahkeme tarafından isten-medığı sürece kesinlikle kişiye özeldir. Herhangi bir yasal resmi işlemde kullanılsa dahi üçüncü kişilerin erişebileceği ortamdan uzak tutulmalıdır. Eğer böyle bir erişim söz konusu ise İnsan Hak ve Özgürlüklerine ilişkin Avrupa Antlaşmasının 8. Madde-sinde güvence altına alınan özel yaşam ihlal edilmiş olur ve devletin bunda sorum-luluğu söz konusudur.

İkinci olarak; laboratuvarların yapmış olduğu işlemler üzerinde devletin denetim sorumluluğu olmasına rağmen bu yeterli değildir. Devlet aynı zamanda iç hukuk düzenini de o kadar iyi kurgulamalıdır ki, zarar gören kişilerin zararlarını açabilecek davalarla tazmin etmelerinin yollarının açılması gerekir.

Üçüncü ve son olarak da; eğer bir gün laboratuvarda çıkacak sonuç bilinen tüm gerçekliğin aksine yapılan işlemi ya da uygulanan prosedürü şüpheli hale getirecek ve hukuksal yaptırım söz konusu olabilecekse, laboratuvar bu hukuksal yaptırımdan kanıta dayalı tıp standartlarında kabul edilmeyen veya bazen kanıta dayalı tıp standartlarında olsa bile istisnaları olabilen her sonucun, laboratuvarı kusurluluktan çıkarak hukuksal sorumluluğu kurtarabileceği düşünülmelidir. Zira bazı hastalar ve bünyeler üzerinde bazı durumlarda farklı sonuçlar elde edilebildiğinin ispatlanması, hukuksal olarak laboratuvarın şüpheli konumundan uzaklaşmasını sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. Avrupa İnsan Hakları Mahkemesi Dosya no 1513/03, Karar tarihi 06/10/2005.
2. Avrupa İnsan Hakları Mahkemesi Dosya no 22009/93, Karar tarihi 25/02/1997.
3. Böll H. Die Verlorene Ehre Der Katharina Blum (Alman yazar Heinrich Böll'ün "Katharina Blum'un Çiğnenen Onuru" isimli tiyatro eserinde, bir kadının namusuna iftira atan basın ve kamuoyuna karşı verdiği mücadele anlatılır)
4. abc News. She's Her Own Twin. <http://abcnews.go.com/Primetime/story?id=2315693&page=2#T6r59uhNuo0> (Erişim tarihi: 6 Mayıs 2012)
5. Yu N, Kruskall MS, Yunis JJ, et al. Disputed maternity leading to identification of tetragametic chimerism. N Engl J Med 2002; 346(20): 1545-52.

**PROF. DR.
ŞEMSETTİN USTAÇELEBİ
ANMA TOPLANTISI**

ENFEKSİYON HASTALIKLARINA GENETİK YATKINLIK

Prof. Dr. Selim BADUR

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı, İstanbul

Enfeksiyon hastalıklarının patogenezi incelendiğinde, bir yandan etken mikroorganizmanın çeşitli özelliklerinin, öte yandan konağın özellikle immün sistemine ait niteliklerinin hastalık seyrini etkilediği belirlenmiştir. Nitekim mikroorganizmaların virülans faktörleri, inokulum miktarı, vücuda giriş yolları gibi “yabancıya” ait özelliklerin yanı sıra, konağın immün sistemine ait özellikler ve etken ile savunma sisteminin etkileşimi, enfeksiyonun seyrini etkileyen faktörler olarak değerlendirilir. Son yıllarda patojenlere karşı bireylerin direnç durumlarında konağa özgü bazı genetik özelliklerin de rol oynadığı saptanmış ve insan genomiks araştırmaları ile patogeneze konusuna farklı bir yaklaşım gündeme gelmiştir.

Konu ile ilgili ilk bulgular “sıtma” modellerinde, hemoglobinlerde gözlenen değişimler kapsamında saptanmış olup, talasemi sorunu yaşayanların veya G6PD eksikliği bulunanların sıtmaya direnç göstermelerinin belirlenmesi ile somutlaşmış; bu durum, eritrositlerin yüzeyinde Duffy antijeni bulunmaması durumunda, *Plasmodium vivax*’ın hücrelere girişinin mümkün olmaması ile açıklanmıştır^{1,2}. Sonraki yıllarda tüberküloz etkeni gibi mikobakterilere ya da HIV gibi virüslerle karşı direnç durumunun gen polimorfizmi ile ilişkisi belirlenmiştir³. Bu bulguları takiben yoğunlaşan çalışmalar kapsamında, özellikle HLA gen bölgelerindeki polimorfizmin birçok viral enfeksiyonun seyrini etkilediği saptanmış; örneğin hepatit B virusuna (HBV) direnç tablosu ile HLA çeşitliliği arasındaki ilişki ortaya konmuştur⁴.

Enfeksiyon hastalıklarına genetik yatkınlık konusunda bilgi birikimi gün geçtikçe artmaktadır. Bu bağlamda atipik mikobakteriler ya da *Salmonella* cinsi bakterilere direnç ile IL-12, IL-12R ya da IFN- γ R1 genlerindeki farklılaşmaların ilişkisi ortaya konmuş⁵; HIV’in hedef hücreye bağlanmasında koreseptör rolü oynayan CCR5 molekülünde oluşacak 32 baz çiftlik bir delesyonun, bu virusa direnci beraberinde getirdiği saptanmış⁶; tüberküloz etkenine duyarlılık konusunda NRAMP1 (SLC11A1) genlerindeki polimorfizmin önemi gösterilmiştir⁷. Sonuçta “insan genom projesinin” tamamlanmasını takiben, belirli bir patojenin yol açacağı enfeksiyona yatkınlığın bazı genetik özelliklerle paralellik göstermesi konusu yoğun biçimde gündeme gelmiş; o güne dek immün yetmezlik kapsamında ele alınan bazı kalıtsal defektlerin, enfeksiyon hastalıklarına duyarlılığı beraberinde getirdiğini kanıtlayan bir dizi bulgu ortaya konmuştur. Genel anlamda *tüm mikroorganizmalara karşı* var olan bir immün yetmezlik tablosundan farklı olarak, *belirli bir etkene* ya da *etken grubuna*

karşı spesifik duyarlılığın söz konusu olduğu ve “yatkinlik” olarak tanımlanan bu durumun immün sistemdeki bazı spesifik aksaklıklardan kaynaklandığı gösterilmiştir. Çeşitli genlerde gözlenen farklılaşmalar, genel anlamda “sağlıklı” bireyleri, spesifik olarak bazı bakteri ya da virusların yol açtığı enfeksiyonlara duyarlı kılmaktadır⁸. Bu tip immünolojik defektleri farklı biçimlerde sınıflandırmak olasıdır ve henüz konu ile ilgili uluslararası bir standardizasyon sağlanmamıştır. Ancak genel olarak söz konusu “yatkinlikler” üç başlık altında toplanmaktadır⁹: (1) Mikobakteri enfeksiyonlarına “mendeliyen” yatkinlik; (2) Piyojen bakterilerin invazif enfeksiyonlarına yatkinlik; (3) Herpes ensefalitlerine genetik yatkinlik.

Mikobakteri enfeksiyonlarına “mendeliyen” yatkinlik durumu genetik açıdan heterojen bir tablodur; nitekim 400’den fazla hastada yapılan inceleme sonunda söz konusu aksaklıkların otozomal beş gen ile, X kromozomunda yer alan bir gen üzerindeki mutasyonlarla ilişkili olduğu saptanmıştır¹⁰. Bu genler, toplam 13 farklı genetik hastalığı tanımlayan; IFN- γ reseptörünün alt birimlerini kodlayan IFNGR1 ve IFNGR2; STAT-1 molekülünü kodlayan STAT1; IL-12 ve IL-23 moleküllerinin p40 alt birimlerini kodlayan IL12B; IL-12 ve IL-23 reseptörlerinin β 1 zincirini kodlayan IL12RB1 ve NEMO genlerini kapsamaktadır. Bu altı gende gözlenen mutasyonlar, IL-12 ve IFN- γ bağımlı immün yanıtlarda aksaklıklar ile karakterize tablolara neden olmaktadır ve genelde düşük virülansa sahip mikobakteri enfeksiyonlarının ortaya çıkmasından sorumludurlar. Hastaların hemen yarısında tifo etkenleri dışındaki *Salmonella* bakterileri ile sorunlar, örneğin gangliyonlarda enfeksiyonlar gözlenmektedir.

Piyojen bakterilerin invazif enfeksiyonlarına yatkinlik durumunda ise, IRAK-4 ve MyD88 molekülleri ile ilişkili mutasyonlar sonucu bakteri enfeksiyonları sıkça gözlenir. IRAK-4, TLR’lerin yanı sıra IL-1R ve IL-18R reseptörlerinin başlattığı sinyal ileti yollarında rolü olan önemli bir kinaz molekülüdür. MyD88 ise benzer yollarda rolü olan primer adaptör moleküllerden birisidir. Bu iki molekülün normal işlevlerini yerlerine getirememeleri pro-inflamatuvar sitokinlerin üretiminde aksaklıklara yol açar. IRAK-4 ya da MyD88 moleküllerinde bir farklılaşma söz konusu olduğunda, *Streptococcus pneumoniae* başta olmak üzere farklı bakterilerin etken olarak rol oynadığı ağır ve yineleyen enfeksiyonlar (sepsis, menenjit, artrit vb) ortaya çıkar. Hastaların %30’u invazif bakteri enfeksiyonları nedeniyle kaybedilir; enfeksiyonların şiddeti küçük yaşlarda daha fazladır ve adolesan çağından sonra bu tip sorunlar gözlenmez. Buna karşın söz konusu olgularda TLR3 ve TLR4 üzerinden gerçekleşen IFN- α , - β ve - γ üretimi sağlıklı bir biçimde gerçekleştiğinden, virus enfeksiyonlarına direnç durumu aksamaz.

Herpes ensefalitlerine genetik yatkınlık durumu ise, TLR3 sinyalizasyonundaki kalıtsal aksaklıklar ile karakterizedir. MyD88 ve IRAK-4 moleküllerinden bağımsız olarak işleyen TLR3 yolağı, ligand olarak dsRNA moleküllerinin rol aldığı ve anti-viral immünitede etkili olan bir savunma koludur. Bu bağlamda TLR3 ve benzer moleküller üzerinden gerçekleşen sinyal iletilerinde rol oynayan UNC-93B proteininde gözlenen farklılaşma rekürrent herpes ensefalitlerinin gelişmesinden sorumlu tutulmuştur¹¹. UNC-93B eksikliği olan hücrelerde, TLR'lerin, ligandları ile birleşmesi gerçekleşse bile, IFN sentezi ile sonlanacak sinyal ileti yolağını harekete geçiremedikleri belirlenmiştir. Daha sonra NF-kB ve IRF-3 bağımlı yoldan TLR3 üzerinden gerçekleşecek bir uyarıda NEMO molekülünün de kilit rolü oynadığı; bu molekülde gerçekleşecek bir farklılaşmanın da HSV enfeksiyonlarına duyarlılığı arttıracığı bildirilmiştir¹². Ve nihayet herpes ensefaliti riskinin TRIF bağımlı TLR4 yolağındaki farklılaşmalar sonucunda da ortaya çıkabileceği gösterilmiştir¹³.

Ayrıca IL-17 işlevinin bozulması ile *Candida* enfeksiyonlarına duyarlılığın arttığı; IL-17R'ne ait otozomal resesif aksaklığın kronik mukokütanöz *Candida* enfeksiyonlarına neden olduğu¹⁴ ve antifungal savunmada önemli bir yeri olan Th17 hücrelerindeki genetik temelli işlevsel bozuklukların *Candida* enfeksiyonlarına spesifik duyarlılığı arttırdığı savunulmuştur¹⁵.

Belirtilen mutasyonlara bağlı olarak, immün yanıtın aksaması sonunda ortaya çıkan enfeksiyon hastalıklarına yatkınlıklar dışında, özellikle viral enfeksiyonlarla ilgili olarak; reseptörlerdeki farklılaşmaların, NK ya da T hücre yanıtının mutasyonlar sonucu değişime uğramasının benzer biçimde spesifik immün yetmezliklere neden olabileceği belirlenmiştir¹⁶.

Yukarıda bazı örneklerine değinilen ve genel anlamda immün yanıtın belirli bir aşamasında kilit rolü oynayan bir molekül ile ilgili mutasyonların, yanıtın sağlıklı biçimde işlev görmesini engellediği anlaşılmaktadır. Bu yeni yaklaşım biçimi ile özellikle çocukluk çağında gözlenen bir dizi enfeksiyon hastalığının kaynağının ya da sonuçlarının genetik değişimlerle ilişkilendirilmesi ve yeni tedavi yaklaşımlarının oluşturulması olasıdır^{10,17}.

Kaynaklar

1. Hill AV. Genetic susceptibility to malaria and other infectious diseases: from the MHC to the whole genome. *Parasitology* 1996; 112: S75-84.
2. Hill AV. Immunogenetics and genomics. *Lancet* 2001; 357: 2037-41.
3. Chapman SJ, Hill AV. Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 175-88.

4. Thursz MR, Kwiatkowski D, Allsopp CE, et al. Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. *N Engl J Med* 1995;332: 1065-9.
5. Ottenhoff TH, Verreck FA, Lichtenauer-Kaligis EG, et al. Genetics, cytokines and human infectious disease: lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae. *Nature Genetics* 2002; 32: 97-105.
6. McNicholl JM, Smith DK, Qari SH, Hodge T. Host genes and HIV: the role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele. *Emerg Infect Dis* 1997; 3: 261-71.
7. Awomoyi AA, Marchant A, Howson JM, et al. Interleukin-10, polymorphism in SLC11A1 (formerly NRAMP1), and susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis* 2002;186: 1808-14.
8. Picard C, Casanova JL, Abel L. Mendelian traits that confer predisposition or resistance to specific infections in humans. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 383-90.
9. Picard C, Puel A, Zhang SY, et al. Susceptibilité génétique et infection chez l'enfant. *Arch Pediatr* 2009; 16: 934-5.
10. Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Jouanguy E, et al. Novel primary immunodeficiencies revealed by the investigation of paediatric infectious diseases. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 39-48.
11. Casrouge A, Zhang SY, Eidenschenk C, et al. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science* 2006; 314: 308-12.
12. Audry M, Ciancanelli M, Yang K, et al. NEMO is a key component of NF- κ B and IRF-3 dependent TLR3-mediated immunity to herpes simplex virus. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128: 610-7.
13. Sancho-Shimizu V, Perez de Diego R, Lorenzo L, et al. Herpes simplex encephalitis in children with autosomal recessive and dominant TRIF deficiency. *J Clin Invest* 2011; 121: 4889-902.
14. Puel A, Cypowyj S, Bustamante J, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* 2011; 332: 65-8.
15. Hanna S, Etzioni A. New host defense mechanisms against *Candida* species clarify the basis of clinical phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127: 1433.
16. Wiltshire S, Watkins DI, Skamene E, Vidal SM. Immunogenetics of virus pathogenesis, p: 491. In: Kaufmann SHE, Rouse BT, Sacks DL (eds), *The Immune Response to Infection*. 2011. ASM Press, Washington, DC.
17. Bousfiha A, Picard C, Boisson-Dupuis S et al. Primary immunodeficiencies of protective immunity to primary infections. *Clin Immunol* 2010; 135: 204-9.

HENRIETTA LACKS'İN ÖYKÜSÜ

Prof. Dr. Hakan ABACIOĞLU

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Bilindiği gibi viruslar zorunlu hücre içi paraziti olup, sadece canlı hücre sistemlerinde çoğalabilmektedirler. Virusların in vitro koşullarda üretilmesine olanak sağlayan hücre kültürleri, deneysel ve klinik çalışmalar, aşı çalışmaları ve üretimi; antiviral ajanların geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar ve tanıya yönelik virolojik çalışmaların temelini oluşturmaktadır. Günümüzde birçok viral enfeksiyonun tanısında hücre kültürlerinden virus izolasyonu halen altın standart yöntem olma özelliğini sürdürmektedir.

Hücre kültürleri, insan veya hayvan dokularından hazırlanabilmekte; kromozom nitelikleri ve pasaj (subkültür) sayılarına göre primer (2n), diploid (2n) ya da devamlı (n) özellikte olabilmektedirler. Devamlı hücre kültürleri, diploid hücre kültürlerinin spontan transformasyonu ile oluşabileceği gibi, doğrudan tümör dokularından da elde edilebilen ve sonsuza dek pasaj yapılabilen ölümsüz hücrelerdir.

İnsan serviks karsinoma hücrelerinden orijin alan *HeLa* hücre dizisi, birçok virusun üremesine olanak veren ve bu nedenle de virolojik çalışmalarda en sık kullanılan devamlı hücre kültürlerinden birisidir. Klasik bilgiler, *HeLa* hücre dizisinin, adını, *Helen Lane* isimli servikal kanserli bir kadın hastanın tümör dokusundan üretilmesi nedeniyle aldığını belirtmektedir. Oysa bugün için bu ismin bir sembol olduğu; gerçek adı *Henrietta Lacks* olan olgunun ve onun tümör dokusundan hazırlanan *HeLa* hücrelerinin ilginç bir öyküsü olduğu ortaya konmuştur. Bu sunumda *Henrietta Lacks*'in öyküsü paylaşılacaktır.

Kaynaklar

1. <http://www.npr.org/2010/02/02/123232331/henrietta-lacks-a-donors-immortal-legacy>
2. <http://www.smithsonianmag.com/science-nature/Henrietta-Lacks-Immortal-Cells.html#ixzz1vgYj4O6>
3. Skloot R. The Immortal Life of Henrietta Lacks. 2010, Crown Publishers, New York.

VİRAL HEPATİTLERDE ANTİVİRAL HEDEFLER VE DİRENCİN LABORATUVARA YANSIMASI

Prof. Dr. Selda ERENŞOY

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Hepatit virusları, farklı virolojik özelliklere sahip olmakla ve farklı virus ailelerinde yer almakla birlikte, öncelikle hepatositleri hedef alma ve karaciğerde replike olma ortak özelliğine sahiptirler. Kronikleşme potansiyeli olan hepatit B, hepatit C ve hepatit D virus (sırasıyla, HBV, HCV, HDV) enfeksiyonlarının tedavi protokolleri ve izlemleri üzerinde yoğun çalışmalar birikmektedir. HBV ve HCV replikasyon döngülerini inhibe etmek üzere viruslara özgü antiviraller geliştirilmektedir.

HBV enfeksiyonu tedavisi, interferon (IFN)- α ve HBV polimeraz/revers tanskriptaz aktivitesini özgül olarak inhibe eden ilaçlara dayanmaktadır. Kronik hepatit C tedavisi IFN- α ile ribavirin kombinasyonuna dayanır, ancak özgül olarak virusu hedef alan antiviraller geliştirilmiş (STAT-C) ve kullanılmaya başlamıştır. Kronik hepatit B tedavisinde virus replikasyonunun mümkün olan en düşük düzeye çekilerek karaciğer hastalığına gidişin durdurulması hedeflenir. Karaciğerdeki HBV cccDNA kalıcılığı nedeniyle, HBV enfeksiyonunun tamamen eradikasyonu zordur. HCV, hücrelerde kalıcı bir form oluşturmadığı için kronik hepatit C tedavisinde asıl hedef virus enfeksiyonunun tamamen eradikasyonu olmalıdır.

Özgül antivirallerle tedavinin başarı ve süresini etkileyen başlıca sorun direnç gelişimidir. Viruslar antivirallerin baskısı altında iken dirençli varyantların çoğalması sonucunda tedavi başarısı düşer. Hasta yönetiminde direncin saptanması ve tedavi değişikliklerinin yapılması önemlidir.

HBV enfeksiyonu tedavisinde ilaçların hedefleri

Kronik hepatit B tedavisinde kullanımda olan ilaçlar IFN- α , pegile IFN- α ve nükleoz(t) id analoglarıdır (lamivudin, adefovir, entekavir, telbivudin, tenofovir). Nükleoz(t)id analogları, HBV polimerazın kompetitif inhibitörleridir; virus replikasyonu sırasında, doğal nükleotidlere benzeyen yapıları sayesinde DNA'ya entegre olurlar, ancak hid-roksil grup olmadığı için DNA zinciri sonlanır ve HBV replikasyonu durur. Lamivudin sitidin analogu; adefovir ve tenofovir adenosin analogu; entekavir guanozin analogu;

telbivudin ise timidin analogudur. Geliştirilen diğer antiviraller ve HBV replikasyon döngüsündeki potansiyel hedefler üzerinde makaleler birikmektedir.

Nükleoz(t)id analoglarının temel hedefleri polimeraz olmakla birlikte, inhibisyon mekanizmalarında ve direnç gelişimi hızlarında farklılık vardır. Direnç gelişme riski entekavir ve tenofovirde düşük; adefovirde orta; lamivudinde yüksektir. Bu antiviraller arasında çapraz direnç tanımlanmıştır. Kombinasyon tedavilerinin üzerinde çalışılmaktadır.

Günümüzde çeşitli nükleoz(t)id analogları geliştirilmektedir. Primidin nükleozidi olan klevudin kullanımında miyopati bildirildiği için klinik çalışmalar durdurulmuştur. LB8030 gibi karaciğerde metabolize ve aktive olan ön-ilaçlar geliştirilmektedir. PMEO-DAPpym gibi pirimidin asiklik nükleozid fosfonatlar bulunmaktadır.

HBV enfeksiyonu tedavisinde gelecek için umut olabilecek çalışmalar

HBV replikasyon döngüsünde virusun hücreye girişi, genom çoğaltılması, protein yapımı aşamaları ve immün yanıtları etkileyen çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. Bunlar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- HBV büyük zarf proteininden elde edilen açılmış peptidlerle virus girişinin engellenmesi,
- APOBEC3 sitidin deaminazların negatif DNA sarmalının uzamasını engellemesi,
- HLA-DP genlerindeki varyantların kronik HBV enfeksiyonu riski ile ilişkisi,
- HBV cccDNA transkripsiyonunun epigenetik düzenlenmesinin modifiye edilmesi,
- Glikozidaz inhibitörleri ile HBV zarf proteininin endoplazmik retikulumda glikozilasyonunun engellenmesi,
- Heteroaril-dihidropirimidinlerin (HAP) etkisiyle HBV kapsid proteinlerinin yanlış düzenlenmesi (Bay 41-4109),
- Fenilpropenamidlerin (AT-130, AT-61) virus enkapsidasyonunu bozması,
- Helioksanin analogları ve nitazoksanid gibi ajanların HBV replikasyonunu baskıladığının gösterilmesi,
- RNA temelli antiviral yaklaşımlar içinde özellikle RNA interferensi ve küçük interfere edici RNA (siRNA) molekülleri ile transkripsiyon veya transkripsiyon sonrasında gen susturulması.

DeneySEL aşamalardaki bu yaklaşımların kronik hepatit B tedavisindeki etkisi, ancak klinik çalışma sonuçları ile gösterilebilecektir.

HBV antiviral etkinliğinin ve direncin saptanması ve izlenmesi

Virus yükünün ölçülmesi temel yaklaşımdır. Duyarlılığı yüksek HBV DNA testleri ile yükselen virus yükü saptanabilir. Antiviral direncin özgül olarak saptanabilmesi, genotipik ve fenotipik testlerle mümkündür. Genotipik araştırma için nükleik asit dizi analizi doğrudan PCR ürünleri üzerine veya klonlama ile yapılabilir. Doğrudan PCR üzerine dizi analizi ile virus popülasyonunda ancak %20 veya üzerinde mutant varsa saptanabilir; klonlama ile bunun üstesinden gelinebilir, ancak çok sayıda klon gereksinim olduğundan pratik değildir. Restriksiyon fragman polimorfizm analizi ile total virus popülasyonunun %5'i saptanabilir, ancak bilinen her mutasyon için endonükleaz reaksiyonları gerekir. Bu yöntemlerin iş yükü fazladır ve özel deneyimli personel ve laboratuvar koşulları gerekir. Pirosekans yöntemi ise çok küçük miktarlarda varyant popülasyonlarını (%0.1) saptayabilen hızlı bir testtir. Tek nükleotid değişikliklerini saptayabilen hibridizasyon yöntemleri arasında (*mass*) spektrofotometrik DNA ölçümü (MALDI-TOF MS) ile %1 oranındaki dirençli varyantlar saptanabilir; ticari olarak bulunan ters hibridizasyon yöntemi ile %5-10 oranındaki dirençli mutantlar saptanabilir; oligonükleotid mikro-array kullanılan DNA "chip" teknolojileri ile çok sayıda mutasyon duyarlı bir şekilde saptanabilir. Hibridizasyon testlerinin sınırlılığı sadece bilinen mutasyonları saptayabilmesi ve her mutasyon için olası prob setlerinin gerekliliğidir.

In vitro fenotipik testler arasında; viral polimeraz enzimatik testleri, dirençli HBV mutantlarını çoğaltan hücre dizileri ve dirençli mutantların genomunun transfer edildiği hücre kültürü modelleri bulunmaktadır. Bu testlerin, çapraz-direnç profillerini araştırmadaki rolleri kritiktir.

Virolojik nüks (*breakthrough*), tedaviye uyumlu bir hastada virus yükünün $1\log_{10}$ IU/ml üzerinde artışı ile tanımlanır; genellikle ardından genotipik direnç saptanır.

HCV replikasyonunu doğrudan etkileyen antiviraller

Hepatit C tedavisinde yeni bir dönem başlamaktadır; zira günümüzde kullanımda olan pegile interferon ve ribavirin (pIFN/RBV) tedavisinin toksisite ve etkinlik sorunu nedeniyle, özgül olarak virusu temizlemeyi hedefleyen ilaç kombinasyon tedavileri (*Specifically targeted anti-viral therapy for hepatitis C*; STAT-C) üzerinde çalışılmaktadır. HCV replikon ve tam hücre kültür sistemlerindeki gelişmeler sayesinde HCV replikasyon döngüsü hakkında artan bilgi ve antiviral ajanların test edilebilmesi bu yöndeki çalışmaları hızlandırmıştır.

Viral enzimler, hücresele reseptörler ve viral replikasyonda rol alan hücresele proteinler hedef olarak seçilmektedir. Ayrıca, daha düşük toksisiteli, uzun yarı ömürlü ve yüksek potansiyelli yeni interferon ve ribavirin versiyonları üzerinde de çalışmalar devam etmektedir. Proteaz ve polimeraz inhibitörleri, tedavi almamış hastalarda, standart pIFN/RBV tedavisine göre daha kısa sürede kalıcı viral yanıtı %20'den fazla artırmıştır.

Çalışılmakta olan antiviral hedefler arasında; viral giriş faktörleri (SR-B1, CD81, virus glikoproteinlerine karşı nötralizan antikorlar), translayon ile ilgili hedeflerden NS3/4A proteaz (telaprevir ve boceprevir inhibe eder), NS5B polimeraz, NS2/3 otoproteaz ve NS3 helikaz başta gelmektedir. Ayrıca NS4B ve NS5A proteinleri gibi enzimatik olmayan hedefler de bulunmaktadır. Replikasyon inhibitörleri (nükleozid/nükleotidler, non-nükleozidler), P7 iyon kanalı inhibitörleri, yeni interferonlar, yeni ribavirinler, immünomodülatörler ve nitazoksanid gibi başka tiazolidler de çalışılmaktadır. MikroRNA'lar ve siklofilinler gibi hücresele hedefler de bulunmaktadır.

HCV ilaç direnci

HCV replikasyon hızının ve hata oranının yüksek olması, viral türümsü çeşitliliğini ve konak immün yanıtına karşı viral adaptasyonları kolaylaştırmaktadır. Viral popülasyonlarda dirençli viruslar bulunmaktadır; ilaç baskısı altında bu varyantlar hızla seçilir.

Genotipik ilaç direnç testleri moleküler testlere dayanmaktadır. Nükleik asit dizi analizi altın standart olmakla birlikte, duyarlılığı artırılmış gerçek zamanlı PCR temelli testlerle minör mutantlar erken dönemde saptanabilmektedir. Dirençli virusun bulaşması, virusun replikasyon etkinliği (viral uyum) ve dirençli virusların virus arşivinde kalıp kalmadığı konuları henüz net değildir. Viral ilaç direnç paternleri HCV genotipleri ile ilişkilidir. Genotip 1a daha sık değişiklik gösterir ve direnç oranı daha yüksektir.

Proteaz inhibitörlerine karşı dirençle ilişkili mutasyonlar tanımlanmış; A156V/T, V36+R155 ve V36+A156S, telaprevire karşı yüksek direnç ile ilişkilendirilmiştir. Proteaz inhibitörleri arasında çapraz direnç yüksektir. V36A/M, T54A/S, R155K/T ve A156S telaprevir ve boceprevire karşı düşük düzeyde direnç ile ilişkili bulunmuştur. Geliştirilen diğer proteaz inhibitörlerine karşı direnç ile ilişkilendirilmiş mutasyonlar da tanımlanmıştır. Ancak, α -ketoamid bileşiği olan telaprevir ve boceprevir tarafından seçilen değişiklikler, diğer proteaz inhibitörleri (danoprevir, vaniprevir, TMC-435, BI-1335) tarafından seçilenlerle örtüşmemektedir.

Nükleozid analogu polimeraz inhibitörleri ile ilişkili mutasyonlar da tanımlanmıştır. Örneğin, S96T ve N142'deki mutasyon R1479 ilacı ile, S282T ise valopicitabin ile seçilmektedir. Non-nükleozid polimeraz inhibitörlerinin toksisitesi düşük olmakla

birlikte, dirence en açık olan gruptur. Bu grup, polimeraz molekülünde şekil değişikliklere neden olur. Polimeraz molekülünün beş farklı cebi olması nedeniyle farklı direnç patern gruplarının bulunması ilaç grupları arasında çapraz direnci engeller.

HCV kombinasyon tedavisinin gündeme geldiği bu yeni dönemde, ilaçların biyoyararlanımı ve toksisiteyi dikkate alınarak, etkinlikleri korunacak şekilde tedavi protokolleri oluşturulurken direnç paternlerinin çalışılması önem kazanmaktadır.

Kaynaklar

1. Belon CA, Frick DN. Helicase inhibitors as specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C. *Future Virol* 2009; 4: 277-293.
2. Dryer PD, Limketkai BN, Martin CM, et al. Screening for hepatitis C virus non-nucleotide resistance mutations in treatment-naïve women. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 945-8.
3. Grimm D, Thimme R, Blum HE. HBV life cycle and novel drug targets. *Hepatol Int* 2011; 5: 644-53.
4. Kuntzen T, Timm J, Berical A, et al. Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naïve patients. *Hepatology* 2008; 48: 1769-78.
5. Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, et al. Therapeutic silencing of micro-RNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 2010; 327: 198-201.
6. Lange CM, Sarrazin C, Zeuzem S. Review article: specifically targeted anti-viral therapy for hepatitis C - a new era in therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 32: 14-28.
7. Lau GK, Ye D. Novel insights into the association between HLA-DP variants and persistent hepatitis B virus infection: a genome wide association study. *Gastroenterology* 2010; 138: 394-6.
8. Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, et al. Antiviral drug resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology* 2007; 46: 254-65.
9. Margeridon-Thermet S, Shulman NS, Ahmed A, et al. Ultra-deep pyrosequencing of hepatitis B virus quasispecies from nucleoside and nucleotide reverse-transcriptase inhibitor (NRTI)- treated patients and NRTI-naïve patients. *J Infect Dis* 2009; 199: 1275-85.
10. Pawlotsky J-M, Chevaliez S, McHutchison JG. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* 2007; 132: 1979-98.
11. Petersen J, Dandri M, Mier W, et al. Prevention of hepatitis B infection in vivo by entry inhibitors derived from large envelope protein. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 335-41.
12. Solmone M, Vincenti D, Prosperi MC, et al. Use of massively parallel ultra-deep pyrosequencing to characterize the genetic diversity of hepatitis B virus in drug-resistant and drug-naïve patients and to detect minor variants in reverse transcriptase and hepatitis B S antigen. *J Virol* 2009; 83: 1718-26.
13. Soriano V, Vispo E, Poveda E, et al. Directly acting antivirals against hepatitis C virus. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1673-86.
14. Vartanian JP, Henry M, Marchio A, et al. Massive APOBEC3 editing of hepatitis B viral DNA in cirrhosis. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000928.
15. Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 2009; 137: 1593-608.
16. Zoulim F. Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection. *Antiviral Res* 2004; 64: 1-15.

İNSAN PAPİLLOMAVİRUS VİROLOJİSİ VE TANISI

Prof. Dr. Ayhan KUBAR

Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Viroloji Bilim Dalı, Ankara

Genel özellikler

İnsan papillomavirus (HPV)'lar skuamöz epitel hücrelerinde enfeksiyon yapan, 52-55 nm çapında, 72 kapsomerli ikozahedral kapsidleri olan, küçük ve zarfsız DNA viruslarıdır^{1,2}. HPV genomu yaklaşık olarak 7800-8000 baz çiftinden oluşan çift sarmallı sirküler DNA yapısındadır. DNA sarmallarından sadece biri genetik bilgi taşıyıcı ve RNA'ya transkripte edilir. DNA, tüm HPV tiplerinde yaklaşık 8 açık okuma bölgesi (*Open reading frame*; ORF)'nden oluşur ve ana hatları ile üç bölüme ayrılır²⁻⁴. Birinci bölge; hücre transformasyonu ve viral DNA replikasyonu ile ilgili erken (E) proteinleri kodlar ve yaklaşık 4000 baz çifti (bç) büyüklüğündedir. İkinci bölge; virus partikülünün yapısal proteinlerini (L1, L2) kodlar ve yaklaşık 3000 bç'den oluşur. Üçüncü bölge; kodlanmayan bölgedir, "Long control region (LCR)" veya "upstream regulatory region (URR)" olarak adlandırılır, viral DNA replikasyonunun başlangıcı ve transkripsiyonu düzenleyen elementleri içerir ve yaklaşık olarak 900-1000 bç büyüklüğündedir^{2,3}.

Replikasyon ve patogenezi

Papillomaviruslar yaralar ve abrazyonlardan geçerek epitel tabakasında aktif bölünme özelliğine sahip tek hücre tipi olan bazal epitel hücrelerini enfekte etmektedir³. Virus "heparan sülfat proteoglikanlar" ve "alfa 6 integrin" gibi yüzey proteinlerine bağlanarak endositozla hücre içine alınır ve sonrasında HPV genomu ikozahedral protein kılıfından ayrılarak hücre çekirdeğine girer^{1,5}. HPV genomunun replikasyonu, diğer küçük DNA viruslarında olduğu gibi, kritik olarak konak hücre replikasyon mekanizmalarına bağımlıdır³. Viral DNA enfekte bazal epitel hücrelerinin çekirdeğinde hücresel genomdan ayrı düşük kopya sayılı bir plazmid gibi varlığını sürdürebilir veya hücresel genomla entegre olabilir³. Yara iyileşmesi sırasında bazal hücre proliferasyonu ile beraber virus replikasyonu da gerçekleşir⁵. Yassı epitel hücreleri bazal membrandan yüzeye doğru hareket ederken değişim geçirirler ve çoğalma özellikleri olmayan matür epitel hücrelerine dönüşürler; ancak HPV DNA matür hücrelerde replike olmaya devam eder. Çünkü HPV'lerin kodladığı E6 ve E7 proteinleri hücresel hedeflerle etkileşerek hücreye DNA sentezi yapabilme yeteneği kazandırır

ve böylece viral DNA replikasyonu tetiklenir^{3,4}. Sadece yüksek riskli HPV tiplerinde görülen integrasyon genellikle E1 ve E2 gen bölgelerinde olur, bu sırada E2 gen bölgesi parçalanır ve inaktif hale geçer. Bunun sonucu olarak integre genom içeren hücrelerde E6 ve E7 ekspresyonu ve kontrolsüz hücre çoğalması baskılanamaz ve kansere dönüşüm başlar. Kanser dönüşümünün nadiren de olsa integrasyon olmandan da gerçekleşebildiği gösterilmiştir³. E6 proteini onkogeneizde önemli rol oynar, p53 tümör süpresör proteinine bağlanıp hücresel ubikütün ligaz aracılı bir süreç ile bu proteinin hızlıca yıkılmasını indükler^{2,3}. E7 proteini ise retinoblastoma (Rb) tümör süpresör proteinine ve ilişkili proteinlere bağlanır ve onları stabilize eder; sonuçta hücreyi S fazına götüren E2F proteinini serbestleştirir^{2,3}. Her iki mekanizma da apoptozun inhibisyonu ve immortalizasyon sonucu preinvazif ve invazif lezyonların gelişmesi ile sonuçlanır¹.

Laboratuvar Tanısı

Klinik hastalık evresindeki bir HPV enfeksiyonunun tanısı mevcut lezyonlar ve bunlara ait belirtilerin değerlendirilmesi ile konulurken, subklinik enfeksiyonların tanısı ancak kolposkopik, sitopatolojik ve histolojik incelemeler sırasında konulabilir. Latent asemptomatik HPV enfeksiyonlarının tanısı ise sadece moleküler testler ile konulabilmektedir.

HPV rutin hücre kültürü ortamlarında üretilmemektedir¹. Enfeksiyöz viral partiküller sadece ksenograft veya organotipik raft kültürlerinde üretilabilmektedir. Fakat uygulaması zor olan bu yöntemler, tanıdan ziyade araştırma ve aşı geliştirme programlarında kullanılmaktadır¹. Gelişen teknoloji ile birlikte virus benzeri partiküllerin (VLP) üretilmesi, HPV enfeksiyonlarını tespit etmek için L1 kapsid proteinine karşı oluşan antikorların kümülatif olarak ölçülebilmesini mümkün kılmıştır^{6,7}. Ancak serolojik testler, aktif ve geçirilmiş enfeksiyonları ayırt edemezler ve duyarlılıkları da düşük olduğundan tanı ve tarama testi olarak yaygın kullanım alanı bulmamışlardır⁷. Bu nedenlerden dolayı HPV enfeksiyonlarının tanısı temel olarak viral nükleik asitlerin tespitine dayanmaktadır⁷. Bu bölümde, HPV enfeksiyonlarının tanısında kullanılan moleküler yöntemler özetlenmiştir.

Moleküler tanı yöntemleri

HPV-DNA tespit yöntemleri son 20 yılda, düşük duyarlılık ve özgüllüklü testlerden [filtreli in situ hibridizasyon (FISH) gibi], özgüllüğü artmış ama duyarlılığı düşük testlere (southern blot hibridizasyon, dot blot hibridizasyon ve hybrid capture tüp deneyleri de dahil olmak üzere) kadar değişecek şekilde geliştirilmiştir⁶. HPV-DNA

tespiti için 1995'te *hybrid capture I* yöntemi ve sonraki yıllarda bu yöntemin geliştirilmiş versiyonu olan *hybrid capture II* (HC2) yöntemleri kullanıma girmiştir. HC2 (Digene, ABD), 1999'da Food and Drug Administration (FDA) tarafından HPV tarama testi olarak onaylanmıştır⁸. Günümüzde, HC2 ve aynı yıllarda geliştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek testler yaygın olarak kullanılmaktadır⁶. Pozitif DNA testleri, mevcut enfeksiyon belirtici olarak kabul edilirken, viral DNA'nın saptanmaması genellikle HPV enfeksiyonu yokluğu olarak yorumlanır⁶. Ancak latent enfeksiyonlar, örnekleme hataları ve olası yanlış negatif test sonuçları nedeniyle HPV-DNA saptanamayabilir.

HPV-DNA amplifikasyon testleri

HPV-DNA tespiti, tiplendirmesi ve kantitasyonunu tek basamakta yapabilen ve yüksek kontaminasyon kontrolü sağlayan “real-time” PCR (RtPCR) tekniklerinin geliştirilmesiyle laboratuvar uygulamaları önemli ölçüde kolaylaşmıştır⁷. HPV-DNA'nın PCR ile tespiti için genel primerlerin kullanıldığı geniş spektrumlu GP-PCR (general primer-mediated PCR) ve tipe özgü primerlerin kullanıldığı TS-PCR (type-specific PCR) olmak üzere iki temel yaklaşım vardır⁷. Genel primerlerin çoğu korunmuş gen bölgesi olan L1 gen bölgesini hedefler. E1 bölgesini hedefleyen geniş spektrumlu PCR primerleri de rapor edilmiş, fakat yaygın olarak kullanılmamıştır⁷. HPV-DNA'yı geniş spektrumlu olarak algılayabilen primer sistemlerine GP5+/6+, MY09/11, PGMY09/11 ve SPF-10 örnek olarak gösterilebilir^{6,7}. Tipe özgü primerler kullanılarak HPV-DNA saptama ve tiplendirme işlemleri tek basamakta yapılabilmektedir. Çok sayıda patojen HPV tipi enfeksiyon etkeni olarak klinik örneklerden izole edilebildiğinden dolayı, tek bir örnek birden fazla HPV tipi varlığı açısından inceleneceği zaman TS-PCR yaklaşımı emek-yoğun ve pahalıdır. Ayrıca, TS-PCR uygulamalarında her bir PCR primer setinin tipe özgü olma durumu doğrulanmalıdır⁷. Bununla beraber HPV saptama ve tiplendirmenin karmaşıklığı, multipleks yaklaşımlara gereksinim duyulmasına neden olmuş ve araştırmacılar tarafından her biri ayrı özgüllüğe sahip çeşitli primer çiftlerinin aynı reaksiyonda kullanılabildiği real-time PCR tabanlı multipleks PCR sistemleri geliştirilmiştir⁹. Sadece hedef varlığında sinyal üreten moleküler işaretli boncukların kullanıldığı süspansiyon array teknikleri ile de, PCR ürünleri tek tüpte multipleks olarak saptanabilmektedir. Bu teknikte özgül absorpsiyon spektrumuna sahip bir boncuk seti bir süspansiyon yöntemiyle kombine edildiğinde 100 farklı prob tek bir reaksiyonda ayrı ayrı ölçülebilmektedir¹⁰.

HPV-RNA amplifikasyon testleri

PreTect HPV-Proofer (AS Norchip, Norveç), NucliSENS EasyQ (BioMerieux, Fransa)

ve Aptima (Gen-Probe, ABD) gibi ticari sistemler, E6/E7 mRNA'ları hedefleyen RNA amplifikasyon yöntemleridir. Bunlardan PreTect HPV Proofer ve NucliSENS EasyQ yöntemleri gerçek zamanlı multipleks nükleik asit sekans bazlı amplifikasyon (NASBA) temelinde çalışırlar^{7,11}. Aptima tekniği ise transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA) temelli bir yöntemdir¹². PCR öncesinde bir ters transkripsiyon (RT) basamağı içeren yöntemler ile de özgül viral RNA varlığı araştırılabilmektedir^{6,7}.

Amplifikasyon ürünlerini tanımlayan sistemler

HPV enfeksiyonlarının tanısında amplifikasyon ürünlerini tanımlamak için standart agaroz jel elektroforezi (AGE), "restriction fragment length polymorphism (RFLP)", southern blot, lumineks temelli testler, revers-hibridizasyon, mikroplak hibridizasyon, floresan boyalı kapiller elektroforez ve DNA dizi analizi gibi yöntemler kullanılabilmektedir⁷.

Diğer moleküler tanı yöntemleri

HPV genomunun fiziksel durumu da potansiyel bir tanısallık belirteç olarak incelenmiştir⁷. Bu amaçla integre viral DNA'yı saptamaya yönelik PCR temelli protokoller geliştirilmiştir. HPV integrasyonunun belirlenmesi APOT (Amplification of Papillomavirus Oncogene Transcripts) tekniğinde olduğu gibi viral selüler füzyon transkriptlerinin tanımlanması ile veya HPV transkriptlerinin ligasyon aracılı PCR ile tespit edilmesi yollarıyla gerçekleştirilebilir^{7,13}.

Kaynaklar

1. Lambert PF, Collins A (ed). Papillomaviruses, pp: 18-26. In: Molecular Biology of Human Viruses, Encyclopedia of Virology. 2008, 3rd ed. Academic Press Elsevier, USA.
2. Jo H, Kim JW. Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. Cancer Therapy 2005; 3: 419-34.
3. Psyrri A, DiMaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. Nat Clin Pract Oncol 2008; 5: 24-31.
4. Mürger K, Baldwin A, Edwards KM, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. J Virol 2004; 78: 11451-60.
5. Mürger K. The role of human papillomaviruses in human cancers. Front Biosci 2002; 7: 641-9.
6. Gravitt PE, Viscidi RP. Measurement of exposure to human papillomaviruses, pp: 119-41. In: Rohan TE, Shah KV (eds), Cervical Cancer: From Etiology to Prevention. 2004. Kluwer Academic Publishers, USA.
7. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. J Clin Virol 2005; 32: S43-51.
8. Malloy C, Sherris J, Herdman C. HPV DNA Testing: Technical and Programmatic Issues for Cervical Cancer Prevention in Low-Resource Settings. 2000. PATH, USA. <http://screening.iarc.fr/doc/HPV-DNA-Testing-Issues.pdf>

9. Poljak M, Kocjan BJ. Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8: 1139-62.
10. Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, et al. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 504-12.
11. Molden T, Kraus I, Skomedal H, et al. PreTect™ HPV-Proofer: Real-time detection and typing of E6/E7 mRNA from carcinogenic human papillomaviruses. *J Virol Methods* 2007; 142: 204-12.
12. Getman D, Aiyer A, Dockter J, et al. Efficiency of the APTIMA HPV Assay for detection of HPV RNA and DNA targets. *J Clin Virol* 2009; 45: S49-54.
13. Luft F, Klaes R, Nees M, et al. Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells. *Int J Cancer* 2001; 92: 9-17.

ÜLKEMİZDE İNFLUENZA TİP B ENFEKSİYONLARI

Dr. Meral AKÇAY CİBLAK

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Ani başlayan yüksek ateş, öksürük, halsizlik, miyalji ve baş ağrısı gibi belirtilerle karakterize olan ve toplumda hızlı yayılım göstererek salgınlara neden olabilen influenza virus enfeksiyonları, belirtisiz seyredebileceği gibi, akciğerler, kalp, beyin, karaciğer, böbrekler ve kasları da içeren farklı organların tutulumuna yol açarak kimi zaman ölümlü sonuçlanan geniş kapsamlı bir hastalık tablosuna da neden olabilirler¹. Tüm dünyada her yıl erişkinlerin %20'si, çocukların %5'i semptomatik influenza enfeksiyonu geçirirken, 3-5 milyon kişide enfeksiyon ağır seyir göstermekte ve 250-500 bin kişinin yaşamını yitirdiği hesaplanmaktadır^{2,3}. İnfluenza virusları her yıl tekrarlanan epidemilerin yanı sıra, kimi zaman da pandemilere de yol açmaktadır^{4,5}.

Orthomyxoviridae ailesinde yer alan influenza viruslarının influenza A, influenza B ve influenza C olmak üzere üç cinsi (tipi) bulunmaktadır. Bunlardan influenza A ve B virusları günümüzde her yıl tekrar eden yaygın epidemilere yol açmaktadır. Morfolojik olarak influenza A ve B viruslarını birbirlerinden ayırt etmek mümkün değildir⁶. Ancak bu iki tip virusun hem moleküler hem de epidemiyolojik özellikleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin influenza A viruslarının antijenik olarak birbirinden farklı çok çeşitli alt tipleri (H1N1, H3N2, H2N2, H5N1 gibi) bulunmasına karşın, influenza B viruslarının antijenik olarak birbirinden farklı Victoria ve Yamagata olmak üzere sadece iki "soy"u bulunmaktadır. Bu iki virus arasındaki önemli farklılıklardan biri de konak çeşitliliğidir. İnfluenza A viruslarının konak aralığı oldukça geniştir ve bu virusların doğal rezervuarları dünyada yaygın olarak bulunan su kuşlarıdır⁷. Yabani su kuşlarında genetik olarak durağan olan ve hastalık tablosu oluşturmeyen influenza A virusları, karakuşlarına ya da memeli türlerine bulaştıklarında virusun ve bulaştığı canlıların özelliğine bağlı olarak kimi zaman pandemik seyir gösteren salgınlara neden olurlar. Hastalık oluşturdıkları canlılar içinde, insan, evcil kanatlılar, at, köpek, kedi, balina gibi farklı türler yer almaktadır⁸. Genetik ve konak çeşitliliği nedeniyle sadece influenza A virusları pandemik potansiyel taşımaktadır. İnfluenza B viruslarının genel olarak insanları enfekte ettiği kabul edilse de, konak çeşitliliği konusundaki bilgiler sınırlıdır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, influenza B viruslarının insan dışındaki canlıları da, örneğin fokları ve domuzları da enfekte ettiğini göstermiştir⁹. İnfluenza B viruslarının mutasyon oranları A tipine göre daha düşük, genetik çeşitlilikleri de A viruslarına kıyasla daha sınırlıdır^{10,11}. İnfluenza B suşlarının farklı serotiplerinin bulunmaması, bu virusa karşı bağışıklık kazanımının

küçük yaşlarda başlamasını sağlar. Ancak sonuçta kısıtlı da olsa devamlı bir mutasyon söz konusu olduğundan dolayı, influenza B viruslarına karşı kazanılan bağışıklık da yaşam boyu ya da uzun süreli olmaz⁷. Hem farklı alt tiplerinin bulunmaması, hem de konak çeşitliliğinin kısıtlı olması nedeniyle influenza B virusları pandemi oluşturma riski taşımazlar¹². Bu nedenle influenza A viruslarına kıyasla influenza B virusları üzerinde yapılan araştırmalar sınırlı kalmıştır.

İnfluenza B viruslarının her iki soyunun da 1980'lerden önce dolaşıma girdiği düşünülmektedir. Geçtiğimiz birkaç yıl öncesine kadar Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Avrupa ve Türkiye'de dolaşımdaki oranları influenza A viruslarıyla kıyaslandığında oldukça düşük olan influenza B viruslarının dolaşımdaki oranı giderek artmaya başlamış, geçtiğimiz 2010-2011 sezonunda dünyanın birçok ülkesinde dolaşımdaki dominant virus olma özelliğini kazanmıştır^{13,14}. İnfluenza B viruslarının dolaşımdaki oranının giderek artması ile birlikte bu virusların dolaşımda bulunan soyu araştırılmaya başlanmış ve dünya genelinde bazı ülkelerde her iki soyun aynı zamanda dolaşımda olduğu, kimi ülkelerde ise sadece bir soyun dolaşımda olduğu bildirilmiştir (<http://www.euroflu.org>). Oysa mevcut aşı içeriğinde, dolaşımdaki her iki influenza A virus alt tipi (H1N1, H3N2) temsil edilirken, influenza B virusunun iki soyundan yalnızca biri temsil edilmektedir. Aşının etkinliğini olumsuz etkileyen bu durumun düzeltilmesi, her iki influenza B soyunun da aşı içeriğine alınması için, influenza B viruslarının dünyadaki davranışının incelenmesi önem taşımaktadır.

İnfluenza ile ilgili kısıtlı olan verilerden biri de, farklı virusların neden olduğu klinik seyir ile ilgilidir. İnfluenza benzeri hastalıklara (İBH) ait semptomlar arasından genel olarak influenzaya atfedilen semptomlar iyi tanımlanmıştır; ancak, farklı influenza virus türlerinin neden olduğu semptomları tanımlayabilecek veri sınırlı düzeydedir.

Farklı coğrafyalarda dolaşımda olan influenza B viruslarının antijenik özelliklerini ve klinik seyirlerini karşılaştırmak ve influenza B enfeksiyonlarının neden olduğu sosyoekonomik kayıpları saptamak amacıyla 2010-2011 sezonundan itibaren Türkiye ile Fransa arasında ortak bir çalışma (IBGP) yürütülmektedir. Çalışma, mevcut süzgeç sistemi üzerinden yürütülmekte olup, yalnızca birinci basamakta hizmet veren aile hekimlerine başvuran hastalardan toplanan verileri değerlendirmektedir. Bu yazıda söz konusu çalışmanın ilk aşamasından elde edilen Türkiye verileri özetlenmiştir.

Araştırmanın birinci dönemi 27 Aralık 2010 tarihinde başlamış ve 17 Nisan 2011 tarihinde tamamlanmıştır. Araştırmaya Antalya, Bursa, Edirne, İstanbul ve İzmir illerinden toplam 145 aile hekimi katılmıştır. Çalışma gereği, influenza surveyansı

kapsamında influenza benzeri hastalık ön tanısı alan hastalardan alınan burun sürüntüsü örnekleri kesin tanı için laboratuvara gönderilmiştir. Laboratuvarda RT-PCR yöntemi ile influenza B tanısı alan hastalar olgu grubu, influenza B tanısı almayanlar ise kontrol grubu olarak gönüllülük esasına dayanarak çalışmaya dahil edilmiştir. Olgu ve kontrol grupları arasında yaş grubu eşleştirmesi yapılmıştır. Olgu ve kontrol grubundaki hastalara ait veriler üç ayrı zaman diliminde toplanmıştır:

0. Gün: Hasta aile hekimine ilk başvurduğu gün, “standart hasta sürveyans veri formu” doldurularak bilgiler kaydedilmiştir.

7. Gün: İlk başvuru tarihinden sonraki 7±2 gün sonra hastalarla irtibat kurularak “hasta takip formu” doldurulmuştur.

28. Gün: İlk başvuru tarihinden 28±5 gün sonra hasta ile yeniden irtibat kurularak ikinci “hasta takip formu” doldurulmuştur.

Üç ayrı dönemde toplanan veriler Stata MP11 istatistik programı kullanılarak analiz edilmiştir. İnfluenza B viruslarının antijenik özellikleri, Dünya Sağlık Örgütü’nün sağladığı reaktifler kullanılarak hemaglütinasyon inhibisyon (HAI) testi ile saptanmıştır.

Sonuçlar değerlendirildiğinde, çalışmaya dahil edilen 155 influenza B virusunun 60’ının antijenik yapısı saptanabilmiştir. Bunların 59’nun B Yamagata soyundan, 1 tanesinin de B Victoria soyundan olduğu anlaşılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 155 olgunun 115’inin erişkin (15-65) yaş grubuna dahil oldukları gözlenmiştir. Buna göre erişkin grubundaki hastaların sosyoekonomik kayıpları Tablo 1’de özetlenmiştir.

Tablo 1. Erişkin influenza B olgularının neden olduğu sosyoekonomik kayıplar

İş günü kaybı	4 gün
Hastaneye yatırılan kişi sayısı	9/115 kişi (%7)
Antibiyotik reçete edilen hasta sayısı	58/115 (%50)
Semptomların tamamen ortadan kalkma süresi	5 gün

IBGP projesinin birinci dönem araştırmasının Türkiye verileri değerlendirildiğinde, influenza B viruslarının neden olduğu sosyoekonomik kayıpların gözardı edilemeyecek kadar önemli olduğu görülmektedir. Çalışmanın yürütüldüğü dönemde, influenza aşısının içeriğinde influenza B/Victoria virusu bulunmaktadır. Türkiye’de dolaşım-

da olan influenza B viruslarının büyük çoğunluğunun B/Yamagata soyundan olması, aşı içeriği ile uyumlu olmadığını göstermiştir. Influenza B enfeksiyonlarında tedavi amaçlı antibiyotik kullanım oranının da (%50) oldukça yüksek olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak bu veriler, influenza B enfeksiyonlarının önlenmesinin önemini ortaya koymakta; en etkin korunma yöntemi olan aşılarda içeriğinde her iki influenza B virus soyunun da bulunmasının gerekliliğini vurgulamaktadır. Bunlara ek olarak bu veriler, gereksiz antibiyotik kullanımının önüne geçilmesi için influenza enfeksiyonlarının laboratuvar tanısının önemini ortaya koymaktadır.

Kaynaklar

1. Cox NJ, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses: Influenza, pp: 385-433. In: Mahy BWJ, Collier L (eds), Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Volume 1: Virology. 1998, 9th ed. Hodder Arnold Publishers, New York.
2. Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. Lancet 2003; 362: 1733-45.
3. Bragstad K, Nielsen LP, Fomsgaard A. The evolution of human influenza A viruses from 1999 to 2006: a complete genome study. Virol J 2008; 5: 40.
4. Kilbourne ED. Influenza pandemics of the 20th century. Emerg Infect Dis 2006; 12: 9-14.
5. Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. Emerg Infect Dis 2006; 12: 15-22.
6. Lamb RA, Krug RM. Orthomyxoviridae. The viruses and their replication, pp: 605-47. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al (eds), Fundamental Virology. 1996. Lippincott- Raven, Philadelphia.
7. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol Rev 1992; 56: 152-79.
8. Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses, pp: 1691-740. In: Knipe DM, Howley PM (eds), Fields Virology. 2007. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
9. Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Martina BE, Bestebroer TM, Fouchier RA. Influenza B virus in seals. Science 2000; 288: 1051-3.
10. Nobusawa E, Sato K. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. J Virol 2006; 80: 3675-8.
11. Drake JW. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 4171-5.
12. Zambon MC. Epidemiology and pathogenesis of influenza. J Antimicrob Chemother 1999; 44 Suppl B: 3-9.
13. Centers for Disease Control and Prevention. Update: Influenza Activity. United States October 2, 2011-February 11, 2012. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2012; 61: 123-8.
14. EuroFlu. High influenza activity across the European Region. EuroFlu Electronic Bulletin 2011; <http://www.euroflu.org> (Erişim: 19 Nisan 2012).

SÖZEL BİLDİRİLER

SÖZEL BİLDİRİLER

6 Haziran 2012

- 08.30 – 08.37 **OP-01** Ekizoğlu M, Sultan N, Koike S, Krapac IG, Roderick I Mackie RI: Toprak ve gübreden izole edilen bakterilerde tetrasiklin efluks genlerinin araştırılması.
- 08.40 – 08.47 **OP-02** Erdal Yıldırım B, Yalınay Çırak M, Elmas Ç: Piperasilin/tazobaktamın subminimal inhibitör konsantrasyonlarının *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının biyofilm yapımı üzerine etkilerinin araştırılması.
- 08.50 – 08.57 **OP-03** Koydemir HC, Külah H, Özgen C, Alp A, Haşçelik G: MEMS tabanlı mikro- elektrokimyasal sensör ile metisilin-dirençli *Staphylococcus aureus* tanısı

7 Haziran 2012

- 08.30 – 08.37 **OP-04** Ünalı Ö, Yalınay Çırak M: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *Escherichia coli* suşlarında TEM, SHV ve CTX-M enzimlerinin genomik değerlendirilmesi ve CTX-M geninin plazmid transformasyonu yoluyla aktarımının incelenmesi.
- 08.40 – 08.47 **OP-05** Arı FE, Durmaz R, Güldemir D, Ötgün S, Acar B, Ertek M: Tek-aşamalı multiplex PCR ile 13-valanlı pnömokok konjuge aşı kapsamındaki *Streptococcus pneumoniae* serotiplerinin hızlı tanısı.
- 08.50 – 08.57 **OP-06** Ülger Toprak N, Bekdemir P, Söyletir G, Korten V: Bağışık ödünlü bir hastanın servikal lenf bezinden izole edilen ve yeni isimlendirilen bakteri; *Nocardia marmarensis* sp. nov

8 Haziran 2012

- 08.30 – 08.37 **OP-07** Özensoy Töz S, Tetik Vardarlı A, Çulha G, Zeyrek FY, Ertabaklar H, Özbel Y, Alkan MZ, Gündüz C: *Leishmania* parazitinin tür ve tür içi genotipik farklılıklarının real-time PCR yöntemi ile saptanması.
- 08.40 – 08.47 **OP-08** Kalaycıoğlu AT, Baykal A, Güldemir D, Coşkun A, Bakkaloğlu Z, Korukluoğlu G, Torunoğlu MA, Ertek M, Durmaz R: Türkiye’de 2011 yılında tespit edilen kızamık viruslarının genetik analizi: Genotip D9 viruslarının ülkemizde ilk kez görülmesi.
- 08.50 – 08.57 **OP-09** Bozdayı G, Dinç B, Meral M, Altay A, Çalış U, Dallar Bilge Y, Dalgıç B, Ahmed K: Ankara’da 0-5 yaş arası çocuklarda nested RT-PCR yöntemi ile rotavirus genotiplerinin belirlenmesi.

TOPRAK VE GÜBREDEN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERDE TETRASİKLIN EFLUKS GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Melike Ekizoğlu¹, Nedim Sultan², Satoshi Koike³, Ivan G Krapac⁴, Roderick I Mackie³

¹Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji AD, Ankara

²Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Ankara

³Department of Animal Sciences, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois, USA

⁴Illinois State Geological Survey, Champaign, Illinois, USA.

Direnç gelişimiyle doğrudan ilgisi olduğu ispatlanan aşırı antibiyotik kullanımı, hastanelerle sınırlı değildir ve hayvancılıkta da yaygın olarak görülmektedir. Hayvancılıkta antibiyotik tedavisi, profilaktik ve büyümeyi artırmak amacıyla kullanılmaktadır. Antibiyotikler neredeyse hiç değişikliğe uğramadan vücuttan atılmakta ve dışkının gübre olarak kullanılması ile toprağa, yer altı ve yer üstü sulara karışmaktadır. Bu çalışmanın amacı tetrasiklinin yaygın kullanıldığı bir çiftlikten alınan toprak ve gübre örneklerinden izole edilen bakterilerin fenotipik ve genotipik direnç profillerini belirlemektir. Bakterilerin tetrasiklin duyarlılıkları agar dilüsyon ve E-test yöntemleriyle saptanmıştır. PCR ile 16S rRNA gen bölgesi çoğaltılmış ve dizi analizi yapılarak bakteriler tanımlanmıştır. Tetrasiklin efluks genlerinin [*tet(C)*, *tet(H)* ve *tet(Z)*] varlığı minimum inhibitör konsantrasyon değerleri 16->256 µg/ml olan 76 izolatta PCR ile araştırılmıştır. Bu izolatların %34'ünde, bu genlerden en az birisinin varlığı saptanmıştır. Direnç geni taşıyan bu bakterilerin %42'si gübreden, %58'i topraktan izole edilmiştir. İzolatların %50'si *tet(Z)*, %29'u *tet(C)* ve %21'i de *tet(H)* geni taşımaktadır. Direnç geni taşıyan bakterilerin %54'ü gram-negatiftir. Bu bakterilerin %47'si *Burkholderia* türleridir. *Agrococcus* ve *Simplicispira* olmak üzere iki türde tetrasiklin direnç geni ilk kez gösterilmiştir. Ayrıca daha önce tetrasiklin direnç geni taşıdığı bilinen *Acinetobacter* ve *Lysobacter* türlerinde *tet(C)*; *Burkholderia* türlerinde *tet(C)* ve *tet(H)*; *Streptomyces* türlerinde ise *tet(Z)* genleri ilk defa saptanmıştır. Bu sonuçlar, tetrasiklin direnç genlerini taşıyan bakterilerin çeşitliliğinin artmakta olduğunu göstermektedir. Ayrıca, gübre uygulandıktan sonra üç ay süreyle tetrasiklin dirençli bakterilerin toprakta kalabildiği belirlenmiştir. Tetrasiklin direnç genlerinin ve konak bakterilerin belirlenmesi, çiftliklerden çevreye dirençli genlerin transferinin izlenmesinde önemli bir unsurdur.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik, direnç, gübre, tetrasiklin, toprak

PİPERASİLİN/TAZOBAKTAMIN SUBMİNİMAL İNHİBİTÖR KONSANTRASYONLARININ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SUŞLARININ BİYOFİLM YAPIMI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Berna Erdal Yıldırım¹, Meltem Yalınay Çırak¹, Çiğdem Elmas²

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD; ²Histoloji ve Embriyoloji AD, Ankara.

Pseudomonas aeruginosa'nın biyofilm oluşturma yeteneği ve antimikrobiyallerin biyofilme penetrasyonundaki zorluklar *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisini güçleştirmektedir.

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P.aeruginosa* suşlarının piperasilin/tazobaktam (P/T) subminimal inhibitör (sub-MİK) konsantrasyonlarında biyofilm oluşturma yeteneklerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. *P.aeruginosa* olarak tanımlanan 24 adet suşun antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile test edilmiştir. Suşların biyofilm yapımı mikrotitrasyon plağı yöntemi ile; minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) ise mikrodilüsyon yöntemi ile saptanmıştır. MİK/2, MİK/4 ve MİK/8 konsantrasyonlarda P/T içeren kuyucuklardaki biyofilm oluşumları araştırılmıştır. Seçilen bir suşun, P/T'ın MİK/2, MİK/4 ve MİK/8 konsantrasyonlarında oluşturduğu biyofilm tabakası, taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak görüntülenmiştir. Suşların %20.8'inin zayıf, %25'inin orta kuvvetli ve %54.2'sinin kuvvetli biyofilm yaptığı saptanmıştır. Suşların %91.7'si P/T'a duyarlı, %8.3'ü ise dirençli bulunmuştur. Suşların MİK değerlerinin sınırları 2-256 µg/ml olarak bulunmuştur. Sub-MİK konsantrasyonlarda biyofilm yapımının doz artışına bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir. En fazla biyofilm oluşumunun azaldığı konsantrasyon MİK/2 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç SEM görüntülerine bakılarak da doğrulanmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada, *P.aeruginosa* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılan P/T'ın sub-MİK konsantrasyonlarının biyofilm oluşumunu azalttığı saptanmıştır. Sub-MİK konsantrasyonlarının yeni tedavi stratejileri açısından dikkate alınması ile iyileşme sürecinde olumlu sonuçlar alınacağı düşünülmektedir. P/T gibi *P.aeruginosa*'ya yönelik antimikrobiyallerin doz aralıklarının tekrar değerlendirilmesinin klinik uygulamalarda önemli olacağı düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Biyofilm, piperasilin/tazobaktam, Pseudomonas aeruginosa, subminimal inhibitör konsantrasyon*

MEMS TABANLI MİKRO-ELEKTROKİMYASAL SENSÖR İLE METİSİLİN DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* TANISI

Hatice Ceylan Koydemir¹, Haluk Külâh², Canan Özgen³, Alpaslan Alp⁴, Gülşen Haşçelik⁴

Orta Doğu Teknik Üniversitesi, ¹ODTU-MEMS Araştırma ve Uygulama Merkezi; ²Elektrik ve Elektronik Mühendisliği Bölümü; ³Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara.

⁴Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji AD, Ankara.

Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli etkenlerinden biridir. MRSA kaynaklı enfeksiyonlarda morbidite ve ölüm oranlarını azaltmak için erken tanı kritiktir. Günümüzde kullanılan geleneksel yöntemler kültüre dayanmaktadır. Doğru tanı için gerekli olan 24-72 saatlik inkübasyon, tanı süresini artırmakta ve sonuçların analizi için uzman personel gerekmektedir. Bu nedenle, geleneksel yöntemler hızlı ve doğru tanı gerektiren nokta analizi (point-of-care diagnosis) sistemleri için uygun değildir. Mikro-Elektro-Mekanik Sistemler (MEMS) ve entegre devre teknolojileri ile elektronik parçaların minyatürizasyonu, biyolojik analitlerin nokta analizi uygulamaları için yüksek duyarlılığa sahip, düşük fiyatlı ve taşınabilir tanı platformları geliştirilmesine olanak sağlamıştır. MEMS tabanlı biyosensörlerde MRSA tanısı için genel olarak; optik, manyetik, mekanik ve elektrokimyasal olmak üzere dört yöntem vardır (Ceylan Koydemir H, et al. Biosens Bioelectron 2011;29:1-12). Bu yöntemler içerisinde elektrokimyasal MRSA tanısı, taşınabilir, düşük fiyatlı, yüksek hassasiyetli ve uygulaması kolay olması gibi nedenlerle umut vaat etmektedir. Bu çalışmada, MRSA tanısı için çip üzerinde referans (Ag), çalışma (Au), ve yardımcı (Pt) elektrotlar ve mikrokanallardan oluşan MEMS tabanlı mikro-elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir. Hibridizasyonun tanısı, Hoechst 33258 redoks işaretçisi ile diferensiyel puls voltametrisi kullanılarak yapılmıştır. Hibridizasyonu iyileştirmek için, kaptır probun katlanması Mfold Web Server kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca, sensörün özgüllüğü *S.aureus* ve *S.epidermidis* suşlarının *femA* genleri ile test edilmiştir. Deneysel sonuçlar, geliştirilen sensör ile 0.01 nM derişimdeki 23-mer'lik *mecA* geni parçasının tanısının yapılabildiğini göstermiştir. Sonuç olarak, bu sensör nokta analizinde MRSA'nın hızlı tanısı için kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: Elektrokimyasal biyosensör, BiyoMEMS, MRSA, tanı

GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ (GSBL) ÜRETEN *ESCHERICHIA COLI* SUŞLARINDA TEM, SHV VE CTX-M ENZİMLERİNİN GENOMİK DEĞERLENDİRİLMESİ VE CTX-M GENİNİN PLAZMİD TRANSFORMASYONU YOLUYLA AKTARIMININ İNCELENMESİ

Özlem Ünal¹, Meltem Yalınay Çırak²

¹Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara. ²Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Ankara.

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne başvuran hastalardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarında TEM, SHV ve CTX-M tipi GSBL varlığının araştırılması, CTX-M gen bölgesinin genomik incelenmesi ve CTX-M pozitif bulunan suşlarda direncin aktarılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. 2003-2008 tarihleri arasında, 113'ü hastane, 167'si toplum kökenli hastalardan izole edilmiş 280 *E.coli* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Konvansiyonel yöntemlerle suşların antibiyotik duyarlılık profilleri ve GSBL üretimleri gösterilmiş; TEM, SHV ve CTX-M geni varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır. Dizi analizi ile CTX-M alt tipleri belirlenmiştir. CTX-M geni pozitif suşlarda plazmid izolasyonu ve transformasyon deneyi yapılmış, transformantlarda PCR yöntemiyle CTX-M geni araştırılmıştır.

GSBL üretimi gösterilen 280 *E.coli* suşunun PCR ile %71.4'ü TEM, %32.5'i SHV ve %73.2'si CTX-M pozitif bulunmuştur. Yıllara göre TEM, SHV ve CTX-M tipi GSBL'lerin birliktelikleri ve dağılımları Tablo 1'de, CTX-M alt tiplerinin dağılımları Tablo 2'de verilmiştir.

TEM ve SHV tipi GSBL'ler daha çok hastane kökenlidir. CTX-M tipi enzimler ise hem hastane hem de toplum kökenli suşlardan izole edilmesiyle büyük problem oluşturmaktadır. Çalışmamızda suşların %67.8'i toplum kökenlidir. Sonuçlarımıza göre direnç profilinin yıllar içinde değiştiği, TEM pozitiflik oranının düşerken (%88.6'dan %46.3'e) CTX-M pozitiflik oranının arttığı (%35.8'den %92.7'ye), SHV oranının değişmediği görülmüştür. 2008 yılına ait bir suşta CTX-M-33 alt tipinin bulunması, son yıllarda CTX-M grubu enzimlerin çeşitliliğinin artabileceğini göstermiştir. CTX-M pozitif suşların %82.4'ünde direncin plazmidler üzerinde taşındığı gösterilmiştir. Plazmidler üzerinde beta-laktamların yanı sıra pek çok antibiyotiğe karşı direnç genleri de taşınmaktadır. Bu nedenle, sadece hastane kökenli değil, toplum kökenli enfeksiyonlarda da gerekli korunma ve kontrol önlemlerinin alınması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: CTX-M, *Escherichia coli*, GSBL, SHV, TEM

Tablo 1. Yıllara göre TEM, SHV ve CTX-M tipi GSBL

<i>GSBL Tipi</i>	<i>Yıllar (suş sayısı)</i>						<i>Toplam (280)</i>
	<i>2003 (53)</i>	<i>2004 (29)</i>	<i>2005 (39)</i>	<i>2006 (18)</i>	<i>2007 (72)</i>	<i>2008 (69)</i>	
TEM	24	2	12	1	1	2	42
SHV	1	1	-	1	-	1	4
CTX-M	5	8	1	-	12	23	49
TEM ve SHV	9	1	11	3	4	-	28
TEM ve CTX-M	11	13	10	10	24	26	94
SHV ve CTX-M	-	-	-	-	8	11	19
TEM, SHV ve CTX-M	3	3	4	3	23	4	40
Yukarıdakilerin hiçbirini taşımayan	-	1	1	-	-	2	4

Tablo 2. Yıllara göre CTX-M alt tiplerinin dağılımı.

<i>Yıl (Suş sayısı)</i>	<i>CTX-M alt tipi (Suş sayısı)</i>
2003 (19)	CTX-M-15 (19)
2004 (22)	CTX-M-15 (17) CTX-M-3 (2) CTX-M-1 (3)
2005 (20)	CTXM-15 (17) CTX-M-3 (2) CTX-M-1 (1)
2006 (13)	CTX-M-15 (13)
2007 (67)	CTX-M-15 (63) CTX-M-3 (2) CTX-M-1 (2)
2008 (64)	CTX-M-15 (54) CTX-M-3 (1) CTX-M-1 (8) CTX-M-33 (1)
Toplam (205)	CTX-M-15 (183) CTX-M-3 (7) CTX-M-1 (14) CTX-M-33 (1)

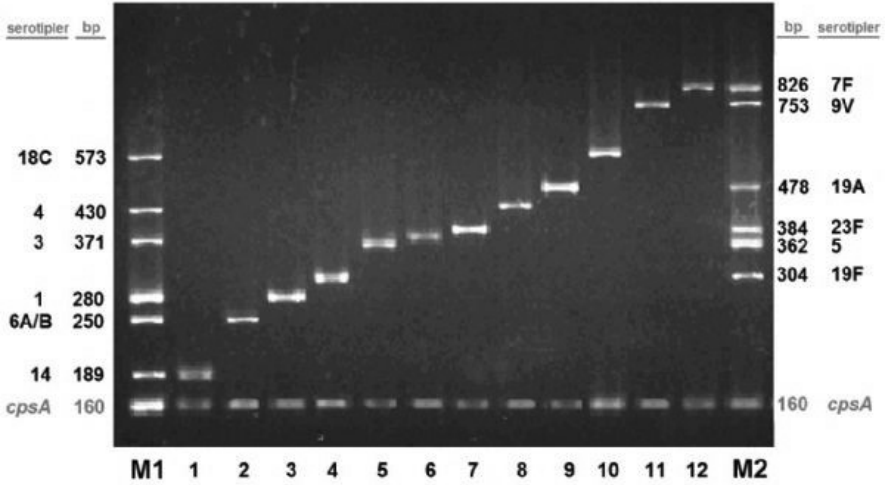
TEK-AŞAMALI MULTİPLEKS PCR İLE 13-VALANLI PNÖMOKOK KONJUGE AŞI KAPSAMINDAKİ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* SEROTİPLERİNİN HIZLI TANISI

Fatma Filiz Arı¹, Rıza Durmaz¹, Dilek Güldemir¹, Selin Ötgün², Bülent Acar², Mustafa Ertek¹

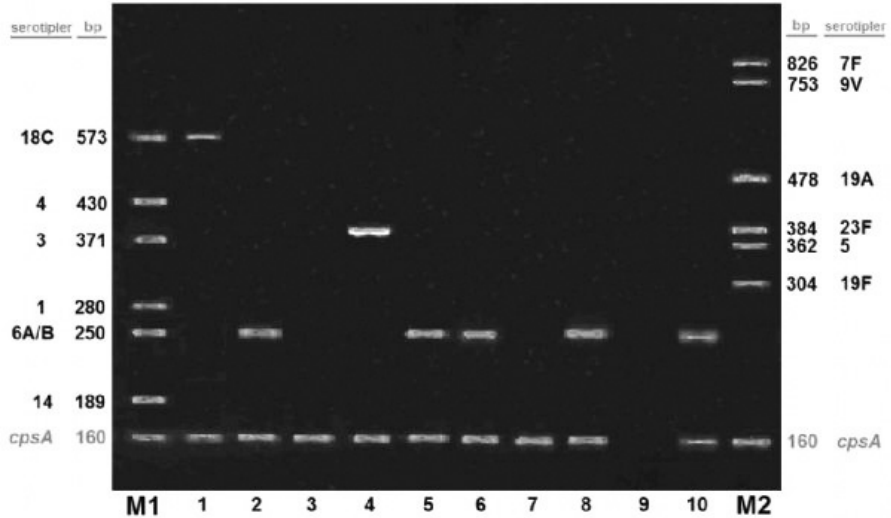
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, ¹Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı; ²Bakteriyoloji-Mikoloji Araştırma Laboratuvarı, Ankara.

Dünya genelinde yılda yaklaşık 1 milyon çocuğun ölümüne sebep olan *Streptococcus pneumoniae* bakterisinin 90'dan fazla serotipi vardır. Bunlardan 25 kadarı invazif pnömokokal hastalıklara neden olmaktadır. Pnömokok konjuge aşılar (PCV7, PCV10 ve PCV13) sayesinde invazif pnömokokal hastalıklarda ve bunlara bağlı ölümlerde ciddi azalma sağlanmıştır. Pnömokok serotip dağılımının düzenli şekilde takibinin yapılması mevcut aşılardan koruyuculuğunun belirlenmesi için ve yeni aşı üretimi açısından son derece önemlidir. Bu çalışmada, PCV13 aşı serotiplerinin multipleks PCR ile hızlı tanısı hedeflenmiştir. PCV13 aşı kapsamındaki serotipleri hedefleyen primer çiftleri, *Taq* DNA polimeraz ve PCR tamponu içeren multipleks PCR miksleri hazırlanmış; serotipi bilinen kontrol DNA'larını içeren tüplere eklenmiş; total hacmi 25 µl olan PCR örnekleri amplifiye edilmiş; serotip-spesifik amplikonlar %3'lük *nusieve* agaroz jelde ayrıştırılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Multipleks miks içeriği ve PCR koşulları optimize edilerek aşı serotipinde olan bir pnömokok izolatını tek reaksiyonda tespit edecek hale getirilmiştir (Şekil 1). Multipleks PCR testinin özgüllük ve duyarlılığı, kurumumuza serotip tayini için gönderilen 182 klinik izolat kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 2). *S.pneumoniae* tanısı konulan izolatlardan 111'inin aşı kapsamında ve 39'unun da aşı-dışı serotipler olduğu saptanmıştır. Diğer 32 izolatın ise pnömokok olmadığı tespit edilmiştir. Multipleks PCR ve geleneksel *Quellung* testi ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında %100 uyum olduğu izlenmiştir. Geliştirdiğimiz tek-aşamalı multipleks PCR testi ile *S.pneumoniae* izolatlarının PCV13 aşı serotiplerinden biri olup olmadığı hızlı, etkin ve ekonomik olarak belirlenebilmektedir. Sonuç olarak, PCR ekipmanı bulunan her laboratuvarıda kolaylıkla uygulanabilir olan bu yöntem, özellikle örnek sayısının fazla olduğu tarama çalışmalarında pahalı antiserum ve özel deneyim gerektiren *Quellung* testine alternatif olarak kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: Moleküler serotiplendirme, multipleks PCR, PCV13, *Streptococcus pneumoniae*



Şekil 1. Multipleks PCR ile amplifiye edilen kontrol izolatlarının jel elektroforez sonuçları. 1-12: 14, 6A/B, 1, 19F, 5, 3, 23F, 4, 19A, 18C, 9V ve 7F serotip kontrol örnekleri. M1: cpsA ve serotip 14, 6A/B, 1, 3, 4 ve 18C belirteçleri. M2: cpsA ve serotip 19F, 5, 23F, 19A, 9V ve 7F belirteçleri.



Şekil 2. Serotip tanısı için multipleks PCR ile amplifiye edilen *S.pneumoniae* izolatlarının jel elektroforez sonuçları. 1-10: Serotipleri test edilen klinik izolatlar (1, serotip 18C; 2, serotip 6A/B; 3, aşı-dışı serotip; 4, serotip 23F; 5, serotip 6A/B; 6, serotip 6A/B; 7, aşı-dışı serotip; 8, serotip 6A/B; 9, pnömokok değil; 10, serotip 6A/B). M1 ve M2: cpsA ve serotip-spesifik DNA belirteçleri.

BAĞIŞIK ÖDÜNLÜ BİR HASTANIN SERVİKAL LENF BEZİNDEN İZOLE EDİLEN VE YENİ İSİMLENDİRİLEN BAKTERİ; *NOCARDIA MARMARENSIS* SP. NOV

Nurver Ülger Toprak¹, Pınar Bekdemir¹, Güner Söyletir¹, Volkan Korten²

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; ²Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul.

Marmara Üniversitesi Hastanesi'nde yatan bir hastanın servikal lenf bezinden izole edilen, daha önce adı bilinmeyen gram-pozitif, dallanan, aerob bir bakteri fenotipik ve moleküler taksonomik yöntemlerle tanımlanmıştır. Yapılan 16S rRNA ve *secA* genleri dizilemesi, biyokimyasal test ve antibiyotik duyarlılık sonuçları, bu bakterinin *Nocardia* genusu içinde yer aldığını, ancak diğer *Nocardia* türlerinden farklı olduğunu göstermiştir. Hareket etmeyen, modifiye EZN ile boyanabilen, katalaz aktivitesine sahip bakteri, kanlı, Sabouraud dekstrozu ve 7H11 agarda, 37°C'de 5-7 günde kirli beyaz düzensiz, koloniler oluşturmaktadır. Şekerlerden glukoz, mannitol, maltoz, laktoz ve sakkarozu kullanmaktadır. Alkalen fosfataz, lipaz esteraz, lösin arilamidaz, asit fosfataz, naftol-AS-BI-fosfohidrolaz, β-glukosidaz, β-galaktosidaz, α-galaktosidaz ve N-asetil-β-glukozamidaz aktivitelelerini göstermektedir. Eskülin, üre ve tirozini hidrolize etmekte, ancak sitozin, ksantin ve jelatini etkilememektedir. İzolat, disk difüzyon testinde siprofloksasin, amikasin, gentamisin, trimetoprim sülfometoksozole hassasiyet; ampicilin, amoksisilin klavulonik asit, imipenem, sefepim, kloramfenikol, eritromisine direnç göstermiştir. Bakterinin solunum kinonları: MK-8 (H₄ω-cycl); polar lipidleri: fosfatidil-etanolamin, difosfatidil-gliserol, fosfatidil-inositol, fosfatidil-inositol-mannozid; hücre duvarı şekerleri: galaktoz, glukoz, arabinoz, riboz; mikoloik asitleri: C₄₈, C₅₀, C₅₂, C₅₄; temel yağ asitleri: 16:0, 18:0 10-metil, 18:1 w9c ve peptidoglikan tipi DL-DAP'tan oluşmaktadır. DNA dizi kompozisyonunda G+C oranı %66.3 bulunmuştur. Üniversitemizin adı verilerek bakteri, *Nocardia marmarensis* sp. nov. olarak isimlendirilmiştir. Gen dizisi, HQ241933 (16S rRNA) ve HQ241934(*secA*) numaralarıyla gen bankasında yerini almış, uluslararası kültür koleksiyonlarında DSM 45525^T ve CCUG 61503^T numaralarıyla sertifikalandırılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Nocardia marmarensis*, taksonomi, tanımlama

LEISHMANIA PARAZİTİNİN TÜR VE TÜR İÇİ GENOTİPİK FARKLILIKLARININ REAL-TIME PCR YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI

Seray Özensoy Töz¹, Aslı Tetik Vardarlı², Gülnaz Çulha³, Fadile Yıldız Zeyrek⁴, Hatice Ertabaklar⁵, Yusuf Özbel¹, M. Ziya Alkan¹, Cumhuriyet Gündüz²

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Parazitoloji Anabilim Dalı; ²Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir.

³Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Antakya, Hatay.

⁴Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa.

⁵Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın.

Leishmania parazitlerinin yol açtığı enfeksiyonun, Türkiye’de kutanöz (KL) ve visseral (VL) leishmaniasis olmak üzere iki klinik formu görülmektedir. Türkiye’de KL etkenleri olarak *L.tropica* ve *L.infantum*, VL etkeni olarak ise sadece *L.infantum* saptanmıştır. *Canine leishmaniasis* (KanL) ise Türkiye’de her bölgede daha yaygın olarak görülmekte ve etkeninin *L.infantum* olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, hızlı ve standardize bir moleküler biyolojik tanı yöntemi geliştirilmesi, tanı ile birlikte *Leishmania* tür tayini yapılabilmesi ve tür içi farklılıkların saptanabilmesi için nükleer DNA’daki “internal transcribed spacer” (ITS1) bölgesinin real-time PCR yöntemi ile incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, 289 KL ve 47 VL olgusu ile 66 KanL tanılı köpekten elde edilen klinik örnekler ve 87 adet *Leishmania* izolatu kullanılmıştır. Olgulardan alınan EDTA’lı kan, kemik iliği yayma preparatı, lezyon aspirasyon yayma preparatı ve lenf aspirasyon örneklerinden DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA örneklerinin ITS1 bölgesine özgün olarak dizayn ettiğimiz primer ve probalar kullanılarak real-time PCR yöntemi ile analizleri gerçekleştirilmiştir. Tüm olguların genotiplendirilmeleri erime eğrisi pik analizine göre *L.tropica*, *L.infantum* ve *L.major* olarak belirlenmiştir. ITS1 real-time PCR ile pozitif olarak saptanan 402 klinik örneğin 341’inde (%84.8) tür ayrımı gerçekleştirilmiş, 61’inde (%15.2) ise çift pik elde edilmiştir. İzolat örneklerinin ise 84’ünde tür ayrımı yapılmış (68 *L.tropica*; 16 *L.infantum*), 3 örnekte ise çift pik elde edilmiştir. Real-time PCR ürünlerinden 134 tanesine sekans analizi yaptırılarak sonuçların doğruluğu kontrol edilmiştir. Sonuç olarak, tanı amaçlı standart ve hızlı bir yöntem geliştirilmiş olup, tanının doğru ve hızlı bir şekilde koyularak, *Leishmania* parazitinin tür ve tür içi genotipik farklılıklarının belirlenmesi sağlanmıştır.

Bu çalışma TÜBİTAK - 107S154 no’lu proje tarafından desteklenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Leishmaniasis*, tanı, real-time PCR, genotip

TÜRKİYE’DE 2011 YILINDA TESPİT EDİLEN KIZAMIK VİRUSLARININ GENETİK ANALİZİ: GENOTİP D9 VİRUSLARININ ÜLKEMİZDE İLK KEZ GÖRÜLMESİ

Atila Taner Kalaycıoğlu¹, Atakan Baykal², Dilek Güldemir³, Aslıhan Coşkun⁴, Zekiye Bakkaloğlu³, Gülay Korukluoğlu², Mehmet Ali Torunoğlu⁵, Mustafa Ertek⁶, Rıza Durmaz⁷

¹Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara; ²Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars.

³Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, ²Viroloji Referans Laboratuvarı; ³Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı; ⁴Aşı ile Önenebilir Hastalıklar Daire Başkanlığı; ⁵Bulaşıcı Hastalıklar Kontrol Programları, Ankara.

⁶Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara; ⁷Erzincan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzincan.

⁷Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara; ⁸Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale.

Kızamık virusunun epidemiyolojik verilerle birlikte genetik analizi, süveyans programı ve bulaş yollarının belirlenmesi açısından önemlidir. 2011 yılında, Fransa başta olmak üzere birçok Avrupa ülkesinde kızamık salgınları görülmüştür. Yine bu yıl içinde ülkemizde başta İstanbul merkezli olmak üzere 111 vaka ile sınırlı küçük bir salgın yaşanmıştır. Çalışmamızda, salgın kaynağının ve bulaş yollarının tespiti amacıyla 23 vakadan izole edilen virusun genotiplendirilmesi yapılmıştır. Bu amaçla viral nükleoproteini kodlayan genin 450 nükleotid uzunluğundaki karboksil uç (COOH-terminal) bölgesi sekanslanmıştır. Sekans verilerinin Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) referans virusları ile yapılan filogenetik analizi sonucu, İstanbul iline ait 20 vakanın ülkemizde ilk kez görülen D9 genotipinde olduğu, diğer üç vakanın D4 genotipinde olduğu saptanmıştır. Genotip D9, Uzak Doğu kaynaklı olup, bu coğrafyadan başta Avrupa ülkeleri olmak üzere diğer bölgelere yayılmıştır. Ülkemizde tespit edilen genotip D9 virusları, hem kendi içerisinde hem de çeşitli Avrupa ülkeleri (İngiltere, Fransa, Danimarka, İspanya, Rusya) ile Malezya ve Japonya’da görülen viruslarla %99.5-100 sekans benzerliği göstermiştir. Bu sebeple ülkemizde ilk kez görülen genotip D9 virusları, adı geçen ülkelerden herhangi biri üzerinden ülkemize import edilmiş olabilir. Genotip D4 virusları ise, 2010 yılında ülkemizde görülen import vakalardan saptanan viruslarla aynı kümede yer almakta olup, Fransa’da saptanan genotip D4 virusları ile oldukça yüksek nükleotid sekans homolojisi göstermektedir. Bu bilgiler ışığında bu virusların da import olması ihtimali düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Kızamık virusu, genotiplendirme, nükleoprotein, filogenetik analiz, Türkiye

ANKARA'DA 0-5 YAŞ ARASI ÇOCUKLARDA NESTED RT-PCR YÖNTEMİ İLE ROTAVİRUS GENOTİPLERİNİN BELİRLENMESİ

Gülendam Bozdayı¹, Bedia Dinc², Melda Meral¹, Aylin Altay¹, Uğur Çalıř¹, Yıldız Dallar Bilge³, Buket Dalgıç⁴, Kamruddin Ahmed⁵

¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakóltesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

²Saęlık Bakanlığı Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi, Mikrobiyoloji Lab. Ankara.

³S.B. Ankara Eğitim Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara.

⁴Gazi Üniversitesi Tıp Fakóltesi, Pediatrik Gastroenteroloji Anabilim Dalı, Ankara.

⁵Research Promotion Project, Oita University, Yufu, Oita, Japonya.

Bu çalışmada, 0-5 yaş arası akut gastroenteritli çocuklarda rotavirus enfeksiyonu prevalansının belirlenmesi ve genotip tayini yapılması amaçlanmıştır. Çalışmamıza, Ocak 2006 - Temmuz 2011 tarihleri arasında ishal şikayeti ile başvuran 889 olgu dahil edilmiştir. Olgulardan toplanan dışkı örneklerinde rotavirus antijeni, ELISA (Rotaclone®, Meridian Diagnostics, ABD) yöntemi ile saptanmış ve ELISA pozitif örneklerden fenol-kloroform-izoamil-alkol yöntemi ile RNA elde edilmiştir. G genotiplerinin belirlenmesi için, Beg9 ve End9, P genotiplerinin belirlenmesi için Con2 ve Con3 primerleri kullanılmıştır. PCR ürünleri %2 agaroz jel elektroforezinde yürütölmüştür. Örneklerin %27.1'inde ELISA ile rotavirus antijeni pozitif bulunmuş; örneklerin PCR ile %76.3'ünde G, %79.6'sında P tipleri saptanmıştır. G tiplerinin %28.2'si G1, %33.1'i G2, %2.7'si G3, %2.7'si G4, %30.4'ü G9, %0.5'i G1+G9 ve %0.5'i G2+G9 olarak tanımlanmış; %1.6'sının G tipi tanımlanamamıştır. P tiplerinin % 22.4'ü P4, %4.1'i P6, %69.2'si P8, %0.5'i P9 ve %2'si P4+P8 olarak tanımlanmış; %1.5'inin P tipi belirlenememiştir. G9P[8] tiplerinin ardından G1P[8] tipleri en sık karşılaşılan tipler olmuştur. Rotavirus pozitifliği en sık (%34.8) 12-23 aylık çocuklar arasında tespit edilmiştir. En yüksek ELISA pozitifliği; yıllara göre incelendiğinde en sık (%35.3) 2006 yılında, aylara göre incelendiğinde ise en sık (%39.2) Mart ayında saptanmıştır. Sonuç olarak, ölkemizde yapılan önceki çalışmalarla uyumlu olarak G1 ve G9 tipleri yüksek oranda tespit edilmiş; ancak G4 oranında G2 lehine belirgin bir değişiklik gözlenmiştir. Çalışmada tespit edilen P tipleri ise daha önceki yıllar ile benzerlik göstermektedir. Yıllara göre değerlendirdiğimizde ise 2006 yılından sonra aşının ölkemize girişi ile ishal görölme oranı ve ishallerli hastalarda rotavirus görölme oranı azalmaya başlamıştır. Bulduğumuz genotiplerin yıllara göre dağılımındaki dalgalanmanın nedeninin globalleşme olduğu düşünölmüştür.

Anahtar kelimeler: Rotavirus, genotip, RT-PCR

POSTER BİLDİRİLER

POSTER BİLDİRİLER

Poster No : PP-001 – PP-035

Tartışma günü : 6 Haziran 2012 (12.30 – 13.30)

Konu : Bakteriyoloji

Poster No : PP-036 – PP-068 ve PP-104

Tartışma günü : 7 Haziran 2012 (12.30 – 13.30)

Konu : Bakteriyoloji, Mikoloji, Parazitoloji, Genel Mikrobiyoloji

Poster No : PP-069 – PP-103

Tartışma günü : 8 Haziran 2012 (12.30 – 13.30)

Konu : Viroloji

İDRAR YOLU ENFEKSİYONU ETKENİ TOPLUM KÖKENLİ *ESCHERICHIA COLI* SUŞLARINDA ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLİ VE İNTEGRON GEN KASETLERİNİN TARANMASI: ÇOK MERKEZLİ ÇALIŞMA

Ayşegül Çopur Çiçek¹, Zeynep Çizmeci², Pervin Özlem Balcı³, Mehmet Fırat⁴, Fatma Sarı⁵, Ahmet Çalışkan⁶, Gülhan Yağmur⁷, Metin Sancaktar⁸, Yasemin Ay Altıntop⁹, Sibel Ak¹⁰, Nazan Yıldız¹¹, Osman Birol Özgümüş¹

¹*Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Rize.*

²*Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara.*

³*Tokat Devlet Hastanesi, Tokat.*

⁴*Özel OSM Ortadoğu Hastanesi, Şanlıurfa.*

⁵*Servergazi Devlet Hastanesi, Denizli.*

⁶*Kahramanmaraş Devlet Hastanesi, Kahramanmaraş.*

⁷*Fatih Devlet Hastanesi, Trabzon.*

⁸*Kadın Hastalıkları-Doğum ve Çocuk Hastanesi, Kayseri.*

⁹*Niğde Devlet Hastanesi, Niğde.*

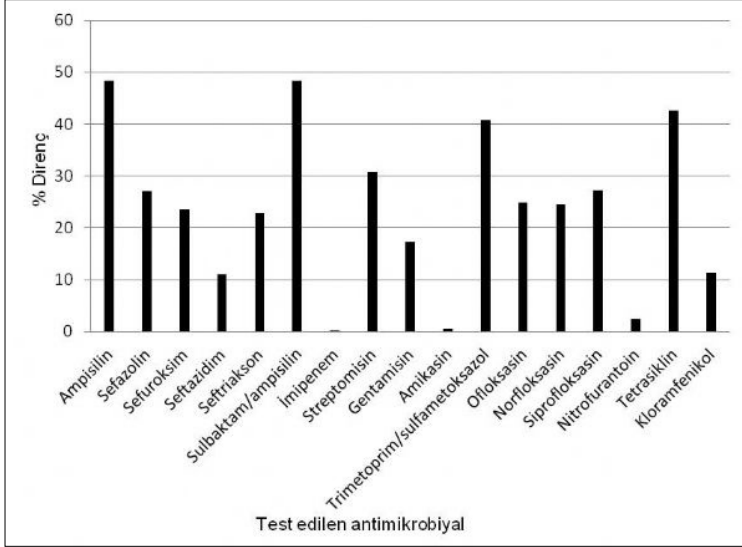
¹⁰*Malatya Devlet Hastanesi, Malatya.*

¹¹*Beyhekim Devlet Hastanesi, Konya.*

Bu çalışmada, farklı illerimizdeki devlet hastanesi polikliniklerine başvuran hastalardan, toplum kaynaklı enfeksiyon etkeni olarak izole edilen 626 *Escherichia coli* suşunun antibiyotik direnç paternleri ve integron gen kasetlerinin taranması amaçlanmıştır. Antibiyotik duyarlılık testleri CLSI önerilerine göre; gen kasetlerinin taranması ise sınıf 1 ve sınıf 2 integronların integraz genlerine (*intI1* ve *intI2*) ve değişken bölgelerine özgü PCR protokolleri ile yapılmıştır. Bu raporda, çalışmanın tamamlanan ilk bölümünde, beş devlet hastanesinden (Denizli, Kahramanmaraş, Kayseri, Şanlıurfa ve Tokat) gelen ve tüm merkezlerde aynı yöntemle tanımlanan 275 izolata ait sonuçlar sunulmuştur. *E.coli* suşlarının ampisilin, tetrasiklin, trimetoprim/sülfametoksazol, streptomisin, sefazolin, sefuroksim, sulbaktam/ampisilin, ofloksasin/siprofloksasin, norfloksasin, seftriakson, gentamisin, kloramfenikol, seftazidim, nitrofurantoin, amikasin ve imipeneme karşı direnç oranları sırasıyla; %48.3, %42.7, %40.8, %30.8, %27, %25.7, %25.1, %24.9, %24.6, %22.9, %17.3, %11.4, %11, %2.5, %0.6 ve %0.2 olarak tespit edilmiştir (Şekil). Beş il-den gelen 275 suşun 79 (%28.7)'ünde *intI1*, 13 (%4.7)'ünde ise *intI2* geni saptanmıştır. Bu suşların 45 (%56.9; 45/79)'inde, tüm suşların ise %16.3 (45/275)'ünde yaklaşık 800-2.900 baz çifti (bç) arasında değişen sınıf 1 integron varlığı belirlenmiştir. Suşların 6 (%46.1; 6/13)'sında, tüm suşların ise %2.1 (6/275)'inde yaklaşık 1.600-2.100 bç arasında değişen sınıf 2 integron çoğaltılmıştır (Tablo). İntegron oranının yüksekliği ile streptomisin ve trimetoprim/sülfametoksazol gibi bazı antibiyotiklere direnç yüksekliği dikkat çekici bulunmuştur. Çalışmamızda, Niğde, Malatya, Konya ve Ankara'daki hastanelerden izole edilen *E.coli* suşlarında *intI1* geni pozitiflik oranları sırasıyla %43.7 (21/48), %25.5 (12/47), %24.5 (15/61) ve %24.7 (21/85) olarak bulunmuş olup, bu izolatlarda gen ka-

setleri tarama çalışmaları devam etmektedir. Sonuç olarak, dünyada ve ülkemizde antibiyotiklere karşı gelişen direnç çalışmalarına epidemiyolojik anlamda katkı sağlamak için, bakteriyel direncin moleküler epidemiyolojisine yönelik çalışmaların yapılarak, ülke genelini yansıtacak verilerin elde edilmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Escherichia coli*, PZR, integron



Şekil 1. *E.coli* suşlarının antimikrobiyallere direnç oranları

Tablo 1. Beş il'e ait taraması tamamlanan *E.coli* suşlarının integron içeriği.

İl (Suş sayısı)	int11 içeren suş n(%) ¹	Sınıf 1 İntegron içeren suş n(%)	int12 içeren suş n(%) ²	Sınıf 2 integron içeren suş n(%)
Denizli (n=44)	14 (31.8)	6 (13.6)	0	0
Kahramanmaraş (n=48)	17 (35.4)	7 (14.5)	3 (6.2)	3 (6.3)
Kayseri (n=48)	8 (16.6)	5 (10.4)	0	0
Şanlıurfa (n=41)	12 (29.2)	8 (19.5)	5 (12.1)	1 (2.4)
Tokat (n=94)	28 (29.7)	19 (20.2)	5 (5.3)	2 (2.1)
Toplam (275)	79 (28.7)	45 (16.3)	13 (4.7)	6 (2.1)

¹Sınıf 1 integraz geni; ²Sınıf 2 integraz geni;

ESCHERICHIA COLI VE KLEBSIELLA SPP. İZOLATLARINDA PLAZMİD KAYNAKLI AMP-C BETA-LAKTAMAZ ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

Hilal Balıkçı, Selda Güvenman, Z. Cibali Açıkgöz

T.C. Sağlık Bakanlığı Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara.

Bu çalışmada, hastanemizde izole edilen gram-negatif çomaklardaki plazmid kaynaklı AmpC beta-laktamaz (pAmpC) prevalansı, pAmpC tespitinde kullanılan fenotipik testlerin etkinliği ve dirençten sorumlu ampC genlerinin dağılımına ilişkin veri toplanması hedeflenmiştir. Laboratuvarımıza 2008-2011 tarihleri arasında gönderilen klinik örneklerden üretilen 1030'u *E.coli*, 286'sı *Klebsiella* spp. olmak üzere toplam 1316 izolat çalışmaya dahil edilmiştir. İzolatlara, Kirby-Bauer Disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılık testleri uygulanmıştır. Bu testler sonucunda sefoksitine (FOX) dirençli bulunan 36 izolatta (%2.7) Boronik Asit İnhibisyon Testi (BAİT), Sefoksitin Hodge Test (SHT) ve AmpC Disk Testi (ACDT) ile; FOX'a duyarlı ancak üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli (S3R) 165 izolatta ise, inhibitörlü/inhibitörsüz sinerji testleri ile; pAmpC varlığı, fenotipik olarak araştırılmıştır. Fenotipik olarak pAmpC pozitifliği saptanan izolatlar doğrulama amaçlı multipleks PCR uygulanmıştır. FOX'a dirençli 36 izolatın 21'inde (%58) SHT, 18'inde (%50) ACDT, 6'sında (%17) BAİT pozitif bulunmuştur. Söz konusu 36 izolatın sadece 10'unda (%27) PCR ile pAmpC varlığı saptanmış ve üretilen enzimin CMY-2 olduğu belirlenmiştir. PCR sonuçları esas alındığında; BAİT, ACDT ve SHT'nin özgüllükleri sırasıyla %97, %69 ve %58; duyarlılıkları ise %50, %100 ve %100 olarak hesaplanmıştır. FOX'a duyarlı S3R izolatlarından fenotipik olarak pAmpC şüpheli olan 16'sına PCR uygulanmış; hepsi negatif bulunmuştur. Sonuç olarak hastanemiz izolatlarındaki pAmpC prevalansı %0.8'dir. Öte yandan, mevcut hiçbir fenotipik testin tek başına pAmpC tespitinde yeterli olmadığı; pAmpC tarama-doğrulaması için bu testlerin birlikte kullanılmasının doğru olacağı kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *AmpC* beta-laktamaz, plazmid, boronik asit

GSBL POZİTİF VE KİNOLON DİRENÇLİ *ESCHERICHIA COLI* KLİNİK İZOLATLARINDA CTX-M, TEM, SHV TİPİNDEKİ BETA-LAKTAMAZ VE *GYRA* GENLERİNİN PREVALANSININ PCR İLE TESPİT EDİLMESİ

Emel Banu Büyükünāl Bal¹, Münevver Günaydın¹, Süleyman Durmaz², Erkan Yula³, Duygu Perçin⁴

¹Sütçü İmam Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kahramanmaraş.

²Düziçi Devlet Hastanesi, Osmaniye.

³Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Hatay.

⁴Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

Çoklu direnç, β-laktam grubuna dahil antibiyotiklerin birden fazlasına karşı gelişebilirken, bu özellik bazen β-laktam yapısına sahip olmayan kinolon gibi antibiyotikler için de söz konusu olabilmektedir. Bu çalışmada GSBL pozitif ve kinolon direnciyle ilgili genlerin *E.coli* klinik izolatlarında tespit edilmesi amaçlanmıştır. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 109 adet fenotipik GSBL pozitif ve kinolon dirençli klinik *E.coli* izolatı kullanılmıştır. İzolatların tür düzeyinde tanımlanmaları Phoenix otomotize sisteminde yapılmıştır. Fenotipik GSBL direnci çift-disk sinerji testi, kinolon direnci ise disk difüzyon testi ile belirlenmiştir. GSBL üreten ve kinolon dirençli *E.coli* izolatları PCR çalışması öncesinde -70°C'de Microbank®'larda saklanmıştır. Çalışma esnasında ise, suşlar kanlı agara pasajlanarak 35°C'de 18-24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonrasında Tryptic Soy Broth içerisine inoküle edilerek üretilen saf koloniler tüm hücrel DNA örneklerini elde etmek amacıyla kullanılmıştır. DNA örnekleri, β-laktamaz direnç genleri (CTX-M, TEM, SHV) ve kinolon direncinden sorumlu *gyrA* gen varlıkları yönünden spesifik PCR primerleri ile çoğaltılmıştır. Amplifikasyon ürünleri agaroz jel elektroforezinde ayrılarak, görüntüleme sisteminde gözlenmiştir. PCR analiz sonuçları, CTX-M tipindeki β-laktamaz geninin 101 izolatta (%93), SHV tipindeki genin 79 izolatta (%73), TEM tipindeki genin ise 55 izolatta (%50) bulunduğunu göstermiştir. İzolatların 40 tanesinde, CTX-M, TEM ve SHV tipindeki β-laktamaz genlerinin tümü bir arada tespit edilmiştir. Kinolon direncinden sorumlu *gyrA* geninin amplifikasyonu ise 60 izolattan 59'unda saptanmıştır. Sonuçlar, GSBL pozitif ve kinolon-dirençli *E.coli* izolatları arasında direnç genlerinin PCR ile yüksek oranda tespit edilebileceğini göstermiştir. Ülkemizde farklı direnç genlerinin birlikte ifade edildiği izolatların prevalansında da artış görüldüğü desteklenmektedir.

Anahtar kelimeler: CTX-M, *E.coli*, *gyrA*, SHV, TEM

GSBL POZİTİF VE KİNOLON DİRENÇLİ *ESCHERICHIA COLI* KLİNİK İZOLATLARINDA GENETİK İLİŞKİNİN ENTEROBACTERIAL REPETITIVE INTERGENIC CONSENSUS PCR (ERIC-PCR) İLE BELİRLENMESİ VE FİLOGENETİK GRUPLARIN SAPTANMASI

Emel Banu Büyükkunal Bal¹, Münevver Günaydın¹, Erkan Yula², Süleyman Durmaz³, Duygu Perçin⁴

¹Sütçü İmam Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kahramanmaraş.

²Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Hatay.

³Düziçi Devlet Hastanesi, Osmaniye.

⁴Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

Bakteri genomlarında tekrarlı dizilimlerden olan Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) dizimlerini hedef alan ERIC-PCR metodu, özellikle enterik bakterin genomlarındaki genetik farklılıkların belirlenmesinde yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışmada, GSBL pozitif ve kinolon dirençli 42 adet *E.coli* izolatının genetik farklılıklarının ERIC-PCR yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Ek olarak, 107 adet *E.coli* izolatının dahil olduğu filogenetik gruplar incelenmiştir. Genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla genomik DNA örnekleri ERIC-1R ve ERIC-2 primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. Bunun yanı sıra izolatlar, *E.coli*'de önceden tespit edilen 4 esas filogenetik grubun (A, B1, B2, D) bulunma sıklığı yönünden de incelenmiştir. Bu amaçla önceden belirtilen multipleks PCR yöntemi ile üç farklı primer seti kullanılmıştır. Filogenetik grupların belirlenmesi ise izolatların tümünden elde edilen hücresel DNA örnekleri kullanılarak yapılmıştır. ERIC primerlerine dayalı parmak izi analizleri sonucunda ERIC-1 primeri ile boyları 179 ila 7250 baz çifti arasında değişen bantlar saptanırken, ERIC-2 primeri ile boyları 141 ila 8353 baz çifti arasında değişen bantlar (3-9) saptanmıştır. Genetik ilişkinin ERIC primerleri ile belirlenmesi sonucunda oluşturulan genetik ağaçlarda her iki primer ile ayırt edilen grupların sayılarında farklılıklar gözlenmiştir. PCR amplifikasyon ürünü gözlemlenen 107 örneğin filogenetik grupta sonuçları; 49 örneğin D, 33 örneğin B2, 24 örneğin A ve 1 örneğin B1 gurubuna dahil olduğunu göstermiştir. Çalışma sonuçları, klinik *E.coli* izolatlarında D ve B2 filogenetik gruplarına dahil olanların çok sık tespit edildiğini, bunu A filogenetik grubunun izlediğini, B1 filogenetik grubuna dahil izolatların ise çok nadir düzeyde bulunduğunu göstermiştir. Klinik *E.coli* izolatlarında ERIC primerlerine dayalı genetik farklılıkların belirlenmesinde, ERIC-1'in ERIC-2'ye göre daha üstün olduğu görülmektedir.

Anahtar kelimeler: *E. coli*, ERIC-PCR, GSBL, Kinolon

ÇOK MERKEZLİ ÇALIŞMA: *ACINETOBACTER BAUMANNII* İZOLATLARINDA PER-1 TÜRÜ GSBL SIKLIĞI

Gülşah Aşık¹, Mehmet Özdemir², Muhammed Güzel Kurtoglu³, Server Yağcı⁴, Lutfiye Öksüz⁵, Mustafa Gül⁶, Esra Koçoğlu⁷, Emel Sesli Çetin⁸, Adnan Seyrek⁹, Mustafa Berktaş¹⁰, Ahmet Ayyıldız¹¹, İhsan Hakkı Çiftçi¹²

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

²Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya.

³Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarı, Konya.

⁴S.B. Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

⁵İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

⁶Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş.

⁷Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bolu.

⁸Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta.

⁹Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ.

¹⁰Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van.

¹¹Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum.

¹²Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sakarya.

PER-1 üreten *P.aeruginosa* suşları Türkiye dahil dünyanın çeşitli coğrafi bölgelerinden bildirilse de, *Acinetobacter* türlerinde daha çok Türkiye ve Kore'den bildirilmiştir. Ülkemiz-de *A.baumannii* izolatlarında PER-1 türü β -laktamaz enzimi ile ilgili yapılan çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada Türkiye'nin farklı bölgelerinden, farklı yıllarda izole edilmiş *A.baumannii* suşlarında PER-1 enziminin sıklığı ve yıllar içindeki değişiminin belirlenmesi amaçlanmıştır. Türkiye'nin yedi farklı coğrafik bölgesinde bulunan dokuz üniversite ve iki devlet hastanesinde, 2008-2011 yılları arasında izole edilen toplam 763 *A.baumannii* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Bakteriler konvansiyonel yöntemler ve otomatize sistemlerle tanımlanmış, disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. DNA izolasyonunu takiben tür spesifik OXA-51 geni varlığı ile doğrulanan *A.baumannii* suşlarında, PER-1 gen bölgesi real-time PCR uygulanarak araştırılmıştır. İzolatların tümünün seftazidim ve aztreonama dirençli, sefepime %95 oranında dirençli olduğu, karbapenem ve aminoglikozid direncinin de oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Toplam 763 izolatın 188'inde (%24.6) PER-1 geni varlığı gösterilmiştir. PER-1 enzimi en fazla 2008 yılında Van'da izole edilen suşlarda (%74.2) gözlenirken bunu sırasıyla, %72.1 oranıyla Bolu 2009 yılı, %46.9 oranıyla Kahramanmaraş 2008 yılı ve %32.3 oranıyla Konya 2009 yılı izolatlarının izlediği görülmüştür. Anadolu'nun farklı bölgelerinde PER-1 enzimi üreten *A. baumannii* izolatları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (χ^2 testi, $p<0.001$). Çalışmamızda PER-1 enzimi üreten suşların oranında yıllar içerisinde azalma eğilimi, karbapeneme dirençli suşların oranında da artış eğilimi görülmektedir. PER-1 türü GSBL üreten suşların özellikle 2008-2009 yıllarında bazı merkezlerde yüksek oranda saptanması, direnç profili değişim sürecinin bir göstergesi olarak yorumlanabilir.

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, GSBL, PER-1

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ YOĞUN BAKIM VE CERRAHİ SERVİS HASTALARINDAN İZOLE EDİLEN ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII* İZOLATLARININ REPETITIVE SEQUENCE BASED-PCR (REP-PCR) YÖNTEMİ İLE KÖKENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Osman Kılınç¹, Buket Cicioğlu Arıdoğan², Ayşe Gül Özseven³, Selçuk Kaya²,
Emel Sesli Çetin²

¹Kars Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Kars.

²Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta.

³Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars.

Çalışmamızda, Şubat 2009-Haziran 2010 tarihleri arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Yoğun Bakım ve Cerrahi servis hastalarından izole edilen, 48 çoklu ilaç dirençli *A.baumannii* izolatının rep-PCR DiversiLab yöntemi ile moleküler benzerliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Araştırmamızda DiversiLab rep-PCR'ın otomatik ticari kit haline getirildiği sistemi temel alınmıştır. Analiz işlemi DiversiLab Software Version 3.4, Pearson korelasyon katsayısı ile yapılmış ve dendogramlar oluşturulurken UPGMA %1 optimizasyon ayarı kullanılmıştır. İzolatların DNA patern benzerlikleri otomatik rep-PCR yöntemi kullanan DiversiLab sistemi ile belirlenmiştir. İzolatlar 2009 ve 2010 yıllarını içeren iki farklı gruba ayrılmıştır. 2009 yılına ait 19 suşun DiversiLab Software Version 3.4 kullanılarak, Pearson korelasyon katsayısı ve UPGMA %1 optimizasyon ayarı kullanılarak ve benzerlik çizgisi %95,3 alındığında, elde edilen dendogramlarda 4 farklı kümede yığılmanın gözlemlendiği 7 farklı patern olduğu tespit edilmiştir. 2010 yılına ait 29 suşun ise aynı yöntemlerle elde edilen dendogramlarda 5 farklı grup ve 13 farklı patern olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonunda, 2009 yılına ait 19 izolatın DiversiLab sistemi ile yapılan moleküler çalışmasında 7 farklı patern oluşmuştur (Tablo 1). 2010 yılına ait 29 izolatın analizinde ise, 13 farklı patern oluşmuştur. Bu paternlerin 21 tanesi 5 kümeye ait bulunmuş ve kalan 8 izolatın her biri farklı patern oluşturmuştur (Tablo 2). 2009 suşlarında toplam 7 farklı patern olduğu, 2010 yılına ait suşların analizinde ise daha dağınık bir profil gözlemlendiği ve 13 farklı patern oluşturduğu tespit edilmiştir. *A.baumannii* salgınlarının kaynağının hızlı ve doğru tespiti, enfeksiyonun tedavisi ve salgının kontrolü açısından önemlidir. Bu amaçla moleküler temelli çalışmaların daha fazla yapılmasına ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Çoklu ilaç direnci, *Acinetobacter baumannii*, rep-PCR, DiversiLab

Tablo 1. 2009 yılına ait suşlar ile DiversiLab sisteminde oluşan paternler.

<i>Paternler</i>	<i>Suş no.</i>	<i>Bant farkı</i>
P14	35-36-39-41-43-46	I (Bant farkı yok): Aynı örnek
P4	31-38-42-47	I (Bant farkı yok): Aynı örnek
P12	32-33-34-44	I (Bant farkı yok): Aynı örnek
P15	30-40	I (Bant farkı yok): Aynı örnek
P2	48	D (>3 bant farkı): Farklı örnek
P3	37	D (>3 bant farkı): Farklı örnek
P11	45	D (>3 bant farkı): Farklı örnek

Tablo 2. 2010 yılına ait suşlar ile DiversiLab sisteminde oluşan paternler.

<i>Gruplar</i>	<i>Paternler</i>	<i>Suş no.</i>	<i>Bant farkı</i>
G1	P1	1-5-6-8-9-12-16-19	I (Bant farkı yok): Aynı
G2	P3	17-18	I (Bant farkı yok): Aynı
G3	P2	2-3-14-15-20-26	I (Bant farkı yok): Aynı
G4	P4	7-22-28	I (Bant farkı yok): Aynı
G5	P5	10-23	I (Bant farkı yok): Aynı
	P6	11	S (2 bant farkı): Benzer
	P7	21	İzolât
	P8	27	S (2 bant farkı): Benzer
	P9	13	İzolât
	P10	24	D (>3 bant farkı): Farklı
	P11	25	S (2 bant farkı): Benzer
	P12	29	İzolât
	P13	4	D (>3 bant farkı): Farklı

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII* KÖKENLERİNDE KARBAPENEM DİRENÇ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

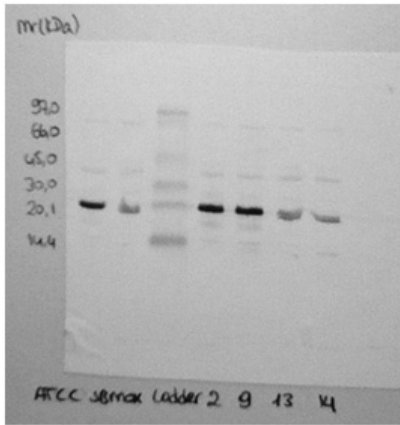
Deniz Güneşer Merdan¹, Jean Marie Pagès², Burak Aksu¹, Güner Söyletir¹, M. Ufuk Hasdemir¹

¹Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

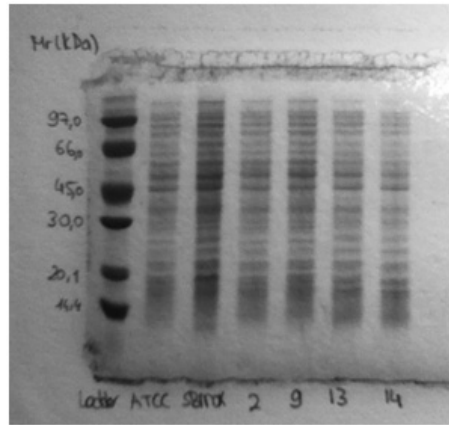
²Université de la Méditerranée – UMR MD1, UFR Médecine, Marsilya, Fransa.

Bu çalışmada, *Acinetobacter baumannii* kökenlerinin karbapenem direnç mekanizmalarının fenotipik ve genotipik olarak saptanması ve karbapenem direnciyle ilişkilendirilen CarO porin proteininin bu dirence katkısının araştırılması amaçlanmıştır. Çoklu ilaç direnci gösteren, AdeB efluks proteinini yüksek düzey eksprese ettiği bilinen 4 klinik köken işleme alınmış; *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 ve *A.baumannii* SBMoX2 referans kökenleri olarak kullanılmıştır. Antibiyotik duyarlılıkları sıvı mikrodilüsyon tekniği kullanılarak yapılmıştır. Karbapenemaz varlığı Modifiye Hodge ve EDTA Disk Sinerji Testleriyle; *oxa-23*, *-24*, *-58*, *imp*, *vim* genleri PCR ile araştırılmıştır. CarO porin proteinini, SDS-PAGE ve Western Blot ile saptanmıştır. Ayrıca *carO* geni çoğaltılarak DNA dizi analizine gönderilmiştir. İmipenem ve meropeneme dirençli izolatlarımızın MİK değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir. 2 ve 9 no'lu izolatlarda fenotipik olarak karbapenemaz üretimi saptanmazken; 13 ve 14 no'lu izolatların karbapenemaz ürettiği belirlenmiştir. 9 no'lu izolatta *oxa-23*; 13 ve 14 no'lu izolatlarda *oxa-24* ve *oxa-58* saptanmıştır. 13 ve 14 no'lu izolatlarda *carO* geninin, *A.baumannii* ATCC 19606 *carO*'suna göre önemli farklılıklar gösterdiği ortaya konmuştur. Çalışmamız 13 ve 14 no'lu izolatlarımızın karbapenem direncinin hem enzimatik mekanizmalarla hem de *carO* genindeki mutasyonlarla ilişkili olduğunu göstermektedir. *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606'nın *carO* protein dizisi (GenBank Ulaşım No: ACN32319) ile karşılaştırıldığında, bu mutasyonların 13 ve 14 no'lu izolatların CarO protein dizisinde 132.-160.; 200.-235. aminoasitleri arasında önemli değişikliklere yol açabileceği görülmüştür. 2 ve 9 no'lu izolatların fenotipik olarak karbapenemaz üretmemesi, ayrıca CarO porin ekspresyonunun *A.baumannii* ATCC 19606 ile benzer olması, bu izolatlardaki karbapenem direncinin efluks ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, karbapenem, direnç, *carO*



Resim 1. İzolatların SDS-PAGE görüntüleri.



Resim 2. İzolatların Western Blot görüntüleri.

Tablo 1. İzolatlara ait fenotipik ve genotipik test bulguları.

		İzolat No			
		2	9	13	14
MİK Değerleri	Imipenem	8 µg/ml	8 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml
	Meropenem	4 µg/ml	4 µg/ml	8 µg/ml	8 µg/ml
Karbapenemaz Fenotipik Testler	ModifiyeHodge Testi	Negatif	Negatif	POZİTİF	POZİTİF
	EDTA Disk Sinerji Testi	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Karbapenemaz Genotipik Testler	<i>oxa-23</i>	Negatif	POZİTİF	Negatif	Negatif
	<i>oxa-24</i>	Negatif	Negatif	POZİTİF	POZİTİF
	<i>oxa-58</i>	Negatif	Negatif	POZİTİF	POZİTİF
	<i>imp-1</i>	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
	<i>vim-2</i>	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
DNA Dizi Analizi	<i>Gen Düzeyinde</i>	% 99	% 99	% 81	% 78
ATCC 19606 ile homoloji	<i>Protein Düzeyinde</i>	% 100	% 100	% 70	% 71

YENİDOĞAN YOĞUN BAKIM ÜNİTESİNDEN İZOLE EDİLEN *ACINETOBACTER BAUMANNII* İZOLATLARININ AP-PCR VE REP-PCR TEKNIĞİ İLE KLONAL YAKINLIKLARININ İZLENMESİ

Harun Gülbudak¹, Gönül Aslan¹, Seda Tezcan¹, Gürol Emekdaş¹, Gülden Ersöz²,
Mahmut Ülger¹

*Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; ²Enfeksiyon Hastalıkları
Anabilim Dalı, Mersin.*

Hastane enfeksiyonlarına sebep olan çoklu ilaca dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarının hızla yayılması önemli bir problem olmaya devam etmektedir. Çalışmada yenidoğan yoğun bakım ünitesinden izole edilen *A.baumannii* izolatlarının klonal yakınlıklarının AP-PCR (Arbitrarily primed polymerase chain reaction) ve rep-PCR (repetitive sequence based PCR) yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya 12.10.2011-01.11.2011 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi yenidoğan yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan elde edilen 4 klinik örnek ve enfeksiyon kontrol komitesinin hasta ve hasta çevresi taramaları sonucu elde edilen 7 hasta örneği ile 3 çevre örneği olmak üzere toplam 14 izolat dahil edilmiştir. İzolatların antibiyotik direnci CLSI önerileri doğrultusunda disk difüzyon testi ile belirlenmiştir. *A.baumannii* izolatları arasındaki genetik yakınlığın belirlenmesinde uygulanan AP-PCR yönteminde M13 primeri; rep-PCR için ise *Acinetobacter* Diversilab DNA parmakizi kiti (Diversilab, bioMerieux, Fransa) kullanılmıştır. Çalışılan izolatların biri dışında hepsinin çoklu ilaç direncine sahip olduğu belirlenmiştir. İzolatlar arasında üç farklı AP-PCR paterni elde edilmiş; bu paternlerden biri dışında diğerleri çok yakın ilişkili izolatlar olarak değerlendirilmiştir. rep-PCR'da çalışmaya dahil edilen 14 izolatın 11'i bir ana klon oluştururken, 3 izolatın birbirinden bağımsız olarak ana klondan farklı genotip dalı oluşturduğu belirlenmiştir. 11 izolat %95 genotip benzerliği göstererek salgın ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca bu izolatlardan %97 ve üzeri benzerlik gösteren 4'lü, 3'lü, 3'lü ve 1'li alt klonlar elde edilmiştir. AP-PCR ve rep-PCR sonuçları arasında belirgin bir farklılığa rastlanmamıştır. İzolatlar arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesi, yeni enfeksiyon kontrol önlemlerinin hızla uygulanmasında büyük önem taşımaktadır. Kullanılan rep-PCR tekniğinin, salgına neden olabilecek izolatların belirlenmesinde oldukça kullanışlı ve hızlı bir yöntem olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, rep-PCR, Diversilab, klonal ilişki

ÇOK İLACA DİRENÇLİ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* VE *ACINETOBACTER BAUMANNII* HASTANE İZOLATLARINDA *qacEΔ1* DEZENFEKTAN DİRENÇ GENİ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Ceren Özkul¹, Melike Ekizoğlu¹, Didem Kart¹, Dolunay Gülmez², Meral Özalp¹

Hacettepe Üniversitesi, ¹Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; ²Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Dezenfektanlar hastane enfeksiyonlarının kontrolünde önemli bir role sahip olup, uygun şekilde kullanılmadıkları zaman mikroorganizmaların duyarlılığının azalmasına, özellikle de antibiyotik direncinin seçilmesine yol açabilmektedirler. Kuarterner amonyum bileşiklerini (QAC) içeren dezenfektanlar hastane enfeksiyonlarının önlenmesi ve dezenfeksiyon amacıyla hastanelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, integron üzerinde taşıyan ve kuarterner amonyum bileşiklerine karşı dirençten sorumlu olduğu bilinen *qacEΔ1* geninin, çok ilaca dirençli *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. hastane izolatlarında araştırılmasıdır. Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Klinik Patoloji Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen çok ilaca dirençli *A.baumannii* (n=24) ve *P.aeruginosa* (n=11) suşları çalışmaya alınmıştır. *qacEΔ1* varlığı polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırılmıştır. DNA örnekleri fenol-kloroform-izomilalkol yöntemi ile ekstrakte edilmiştir. *qacEΔ1* gen bölgesinin 300 baz çiftlik kısmını çoğaltan 5'-TAGCGAGGGCTTTACTAAGC-3' ve 5'-ATTGAGAATGCCGAACACCG-3' primer dizileri kullanılmıştır. *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* izolatları için *qacEΔ1* geni pozitifliği sırasıyla %29.2 (n=7) ve %9.1 (n=1) olarak bulunmuştur (toplam %22.8). Biyosidlere karşı dirençte rol oynayan *qacEΔ1* geninin *A.baumannii* izolatlarında daha sık bulunduğu tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen suşların tümü çok ilaca dirençli olmasına rağmen ancak %22.8'inin *qacEΔ1* geni taşıdığı belirlenmiştir. Direnç geni taşıyan izolatların fenotipik direnç yönünden de araştırılması önem taşımaktadır. Sonuç olarak bu çalışmada az sayıda bakteri izolatı ile elde edilen verilere göre, antibiyotik direncinin dezenfektan direnci ile ilişkili olabileceği konusunda bir yorum yapılabilmesi, ancak çok ilaca dirençli hastane izolatlarının dezenfektan direnciyle ilgili sürveyans çalışmalarının yapılması ile mümkün olabilecektir.

Anahtar kelimeler: Dezenfektan direnci, *qacEΔ1*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*

AAEAH'DE HASTANE ENFEKSİYONLARINDAN İZOLE EDİLEN *ACINETOBACTER* TÜRLERİNDE AMİNOGLİKOZİD DİRENCİ: FENOTİP, GENOTİP VE KLONAL DAĞILIM ARAŞTIRMASI

Selda Güvenman, Hilal Balıkcı, Z. Cibali Açıkgöz

Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara.

Çoklu ilaç direncine sahip *Acinetobacter* türleri, yüksek mortaliteli hastane enfeksiyonlarına (HE) yol açan önemli patojenler arasındadır. Bu türlere bağlı enfeksiyonların tedavisinde beta- laktam/beta-laktamaz inhibitörleri ve karbapenemler, tek başına ya da aminoglikozidlerle (AMG) birlikte kullanılırlar. Bu çalışmada hastanemizden izole edilen 200 *Acinetobacter* izolatında disk difüzyon (DD) yöntemi ile 8 farklı aminoglikozidin duyarlıklarına bakılmış; sonuçlara göre direnç fenotipleri belirlenmiştir. İzolatların 80'ine agar dilüsyonla MİK tayini yapılmıştır. Tüm fenotipleri temsilen 50 izolatta, bulunması en olası 5 enzim genine (*aacC1*, *aphA1*, *aphA6*, *aadB*, *aac6'1h*) multipleks PCR ile bakılmış ve bunların arasında klonal ilişki varlığı araştırılmıştır. Gentamisin (GEN), amikasin (AK) ve tobramisin (TOB) direnç oranları çalışılan dönem için sırasıyla %77.5, %88 ve %58.5; MİK ortanca değerleri 64, 256, 8 µg/mL olarak belirlenmiştir. İzolatların 42'sinde *aphA6*, birinde *aphA6* ve *aphA1*, birinde *aadB*/*aac6'1h* genleri ile uyumlu amplifikasyon bantları elde edilmiştir. DD test sonuçlarına göre 11 fenotip, ERIC-PCR sonuçlarına göre 43 klon tespit edilmiştir. Başlangıçta varken sonra kaybolan, başlangıçta yok iken sonra ortaya çıkan fenotipler yanında, tüm AMG'lere dirençli ve incelenen dönem boyunca varlığını sürdüren panrezistan bir fenotipin de varlığı ortaya çıkmıştır. AMG-panrezistan fenotipte izolatlar hastanemizde hakim fenotip olarak en az 2006'dan beri dolaşımdadır. GEN ve TOB direnci zaman içinde azalırken AK direnci artmakta ve MİK düzeyleri de yüksek seyretmektedir. İzolatlarımızda *aphA6* geni yaygın olarak bulunmaktadır; ancak mevcut direnç fenotiplerini sadece bu enzimin varlığı ile açıklamak doğru değildir. Araştırılmayan veya araştırıldığı halde tespit edilemeyen genlerin ve mekanizmaların var olması mümkündür.

Anahtar kelimeler: *Acinetobacter*, aminoglikozid, direnç, ERIC-PCR, fenotip

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLATLARINDA PLAZMİD ARACILI KİNOLON DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI

Yeliz Tanrıverdi Çaycı, Ahmet Yılmaz Çoban, Murat Günaydın

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Samsun.

Pseudomonas aeruginosa ciddi nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan bir bakteridir. Kinolonlar özellikle de siprofloksasin tedavide kullanılan önemli ajanlardandır. Kinolonlara direnç sıklıkla kromozomal mutasyonla olmaktadır. Ancak son yıllarda plazmid aracılı kinolon direnci de saptanmıştır. Bu genler *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *qepA* ve *aac(6')-Ib-cr* genleri olarak bilinmektedir. Çalışmada, klinik örneklerden izole edilen 300 *P.aeruginosa* izolatında plazmid aracılı kinolon direncine neden olan gen bölgelerinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda izole edilen 300 *P.aeruginosa* izolatı test edildi. *QnrA*, *qnrB*, *qnrC* ve *qnrS* genleri multipleks PCR yöntemiyle, *qepA* ve *aac(6')-Ib-cr* gen bölgeleri ise tekli PCR işlemiyle çalışıldı. *Aac (6')-Ib* geni taşıdığı saptanan izolatların *aac(6')-Ib-cr* varyantı olup olmadığının tespiti için sekans işlemine tabi tutuldu (Macrogen, Korea). PCR işlemleri sonucunda *P.aeruginosa* izolatlarında *qnr* ve *qepA* genlerini taşıyan izolat tespit edilmedi. *Aac(6')-Ib* geni taşıyan 6 izolat tespit edildi. Bu izolatların *aac(6')-Ib-cr* varyantı olup olmadığının tespit edilmesi için yapılan sekans işlemi sonucunda izolatların *aac(6')-Ib-cr* varyantı olmadığı görüldü. Plazmidle aktarılan kinolon direncine neden olan bu genler bugüne kadar *Enterobacteriaceae* ailesine ait birçok bakteride tespit edilmiştir. Bununla birlikte, insan kökenli olmayan bir *P.flourescens* ve bir *P.putida* izolatında *qnrB* geninin varlığı gösterilmiş olmasına rağmen, *P.aeruginosa* izolatlarında bu genler henüz tespit edilememiştir. Ancak Martinez ve ark.'nın 1998 yılında yaptığı bir çalışmada deneysel olarak *qnrA1* plazmiti *P.aeruginosa* suşuna aktarılmıştır. Bu çalışma, *P.aeruginosa* klinik izolatlarında *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *qepA* ve *aac(6')-Ib-cr* determinantlarının araştırıldığı ülkemizdeki ilk çalışmadır.

Anahtar kelimeler: *P.aeruginosa*, *qnr*, *qepA*, *aac(6')-Ib-cr*, kinolonlar

KİSTİK FİBROZİSLİ ÇOCUKLARDAN SOYUTLANAN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SUŞLARINDA ÇEŞİTLİ VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN VE *lasI/R rhII/R* GENLERİNİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Meral Karaman¹, Fatih Fırınır², Özkan Karaman², Nevin Uzun², İsmail Hakkı Bahar³

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Multidisipliner Laboratuvarı; ²Çocuk Alerji Bilim Dalı, ³Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

Çevreyi algılama sistemi, bakterilerde çeşitli virülans faktörlerinin gen ekspresyonu, spor oluşumu, biyofilm oluşumu gibi birçok olayın gerçekleştirilmesini düzenlemektedir. Çevreyi algılama sistemleri içinde sinyal molekülü olarak N-açıl homoserin lakton molekülleri (AHL) sıklıkla görülmektedir. *P.aeruginosa*'da biyofilmin de içinde olduğu çeşitli virülans faktörlerinin üretimi AHL sinyal moleküllerinden *lasI/R* ve *RhlI/R* sisteminin kontrolü altındadır. Çalışmamızda çocukluk yaş grubu kistik fibrozis hastalarından soyutlanan *P.aeruginosa* suşlarında çeşitli virülans faktörlerinin ve *lasI/R rhII/R* genlerinin varlığı araştırılmıştır. Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Çocuk Alerji Polikliniğinde kistik fibrozis tanılı 37 hasta bir yıl süresince izlenmiştir. Bu hastalardan bir yıl içinde üç kez klinik yakınmaları nedeniyle polikliniğe başvuran, akciğer dinleme bulguları olan, derin orofaringeal sürüntü örneklerinde 10^4 - 10^5 koloni *P.aeruginosa* üreyen altı hasta ve bu hastalara ait 18 suş çalışmaya dahil edilmiştir. Suşlarda biyofilm, pyosyanin, alkalen proteaz üretimi ve *lasI*, *rhII*, *lasR* ve *rhlR* gen bölgelerinin varlığı araştırılmıştır. Bölgeye özgü primerler ile PCR analizi sonucunda; hastalardan dördünde soyutlanan suşlarda *lasI*, *rhII*, *lasR* ve *rhlR* gen bölgeleri olumlu, ikisinde ise olumsuz olarak saptanmıştır. Hastalara ait *P.aeruginosa* suşlarında biyofilm, pyosyanin ve alkalen proteaz sonuçları tabloda özetlenmiştir. Hastaların test edilen üç örneğinde, bir yıllık süre içinde koloni morfolopinde değişiklik görülmekle birlikte, çalışılan virülans faktörleri üretimi ve *lasI*, *rhII*, *lasR* ve *rhlR* gen bölgelerinin varlığı açısından bir değişiklik izlenmemiştir.

Anahtar kelimeler: Kistik fibrozis, *P.aeruginosa*, PCR, virülans

Tablo. İzolatlarda *lasI*, *rhII*, *lasR* ve *rhlR* gen bölgelerinin varlığı, biyofilm, pyosyanin ve alkalen proteaz üretimi sonuçları.

Hasta No	<i>lasI</i> *	<i>lasR</i> *	<i>rhII</i> *	<i>rhlR</i> *	Biyofilm**	Pyosyanin***	Alkalen proteaz
1	+	+	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	-	-	+
3	+	+	+	+	+++	+	+
4	-	-	-	-	+++	+	-
5	-	-	-	-	+	-	+
6	+	+	+	+	++	+	+

lasI*(605 bp), *lasR* (730 bp), *rhII*(625 bp), *rhlR* (725 bp) ** 590 nm'de optik dansite (OD) sonuçlarına göre; OD<1 Biyofilm negatif, 1<OD<2 Zayıf pozitif (+), 2<OD<3 Orta pozitif (++), 3<OD Güçlü pozitif (+++) olarak değerlendirilmiştir. *520 nm'de OD sonuçlarına göre.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARINDA BİYOFİLM OLUŞUMU İLE İLİŞKİLİ QUORUM SENSING GENLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Berna Erdal Yıldırım, Meltem Yalınay Çırak

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

Pseudomonas aeruginosa hastane enfeksiyonlarına yol açan fırsatçı patojenlerin başında yer almaktadır. *P.aeruginosa*'ya ait bazı virülans faktörlerinin salınımı Quorum Sensing (QS) olarak adlandırılan hücre yoğunluğuna bağımlı bir mekanizma ile kontrol edilmektedir. Bu çalışmada; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P.aeruginosa* suşlarında biyofilm yapım şiddeti ile QS genleri arasında ilişki olup olmadığının ortaya konulması amaçlanmıştır. *P.aeruginosa* olarak tanımlanan 24 tane suşun biyofilm yapımının değerlendirilmesinde mikrotitrasyon plağı yöntemi kullanılmıştır. QS genleri (*lasI*, *lasR*, *rhII* ve *rhIR*) varlığını göstermek için PCR yapılmıştır. Biyofilm yapımı yönünden çalışmaya alınan 24 suştan 5 tanesinin zayıf, 6 tanesinin orta kuvvetli, 13 tanesinin kuvvetli biyofilm yaptıkları saptanmıştır. QS genlerinin biyofilm düzeylerine göre dağılımı tabloda gösterilmiştir. Zayıf, orta kuvvetli ve kuvvetli biyofilm yapan tüm suşlarda (%100) *rhII* geni dikkat çekici olarak hepsinde saptanmıştır. Bu sonuca bağlı olarak *rhII* geninin biyofilm oluşumunun her aşamasında önemli bir rol aldığı söylenilebilir. Olgun biyofilmin oluşumu için gerekli olduğu bilinen *lasI/lasR* genlerinin orta kuvvetli ve kuvvetli biyofilm yapan suşların %100'ünde saptanmış olması ayrıca dikkat çekici bir sonuçtur. *rhIR* geninin bazı suşlarda gösterilememesi bu genin ifadenememiş olabileceğini düşündürmektedir. Bu izolatlardaki mutasyon varlığının ileri moleküler çalışmalarla araştırılması yararlı olacaktır.

Anahtar kelimeler: *Biyofilm, polimeraz zincir reaksiyonu, Pseudomonas aeruginosa, quorum sensing*

Tablo. QS genlerinin biyofilm düzeylerine göre dağılımı.

	<i>lasI</i>	<i>lasR</i>	<i>rhII</i>	<i>rhIR</i>
Zayıf biyofilm n(%)	4 (80)	4 (80)	5 (100)	3 (60)
Orta kuvvetli biyofilm n(%)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	4 (66.7)
Kuvvetli biyofilm n(%)	13 (100)	13 (100)	13 (100)	6 (46.2)
Toplam n(%)	23 (95.8)	23 (95.8)	24 (100)	13 (54.2)

ENTEROBACTERIACEAE KLİNİK İZOLATLARINDA BETA-LAKTAMAZ AKTİVİTESİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Gül Bayram¹, Nuran Delialioğlu², Gürol Emekdaş², Candan Öztürk², Mehmet Sami Serin³

Mersin Üniversitesi ¹Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu; ²Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; ³Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri, Mersin.

Enterobacteriaceae suşlarında geniş spektrumlu beta-laktamaz üretimi (GSBL) yaygın direnç mekanizmalarındandır. Başta *Escherichia coli* ve *Klebsiella* türleri olmak üzere bakteriler arasında hızla yayılmakta ve tedavide ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Bu çalışmada, hastane enfeksiyonlarından sıklıkla izole edilen *E.coli* ve *K.pneumoniae*'da beta-laktamaz direncinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması amaçlandı. Çalışmaya, Ekim 2010- Ekim 2011 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilen toplam 106 *E. coli* ve 25 *K. pneumoniae* suşu dahil edildi. Tüm suşlarda çift disk sinerji (ÇDST) testi ile GSBL varlığı ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile beta-laktamaz direncinden sorumlu gen bölgeleri TEM, SHV, OXA-1, CTX-M (grup 1, 2, 8, 9 ve 25), AmpC tipi beta-laktamaz gen bölgeleri ACC, FOX, MOX, LAT, DHA, CIT, EBC ve karbapenem direncinden sorumlu gen bölgeleri VEB, GES, PER, VIM, IMP, KPC, GES ve OXA-48 araştırıldı. Çalışmada, 106 *E.coli* izolatının ÇDST ile 87'si GSBL pozitif ve 19'u negatif bulundu. Bu 106 izolatın 96'sında CTX-M grup 1, ikisinde CTX-M grup 9 ve dördünde CTX-M grup 1 ve 9 bölgeleri, 35'inde TEM, 39'unda OXA ve 22'sinde her iki gen bölgesi ve ikisinde LAT gen bölgesi, bir izolatda OXA-48, bir izolatda VIM, bir izolatda KPC, bir izolatda PER saptandı. 25 *K. pneumoniae* izolatının 18'inde CTX-M grup 1, ikisinde CTX-M grup 9, ikisinde CTX-M grup 1 ve CTX-M grup 9, birinde KPC geni saptandı. Tüm izolatlarda CTX-M 8 ve CTX-M 25 gen bölgeleri negatif bulundu. *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarında yüksek oranda CTX-M grup 1 ve 9 bölgeleri tespit edildi. Sonuç olarak, *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarında beta-laktamaz direncinin araştırılması epidemiyolojik verilerin elde edilmesini sağlayacak ve tedavide yol gösterici olacaktır.

Anahtar kelimeler: *Enterobacteriaceae*, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, polimeraz zincir reaksiyonu

GRAM NEGATİF BAKTERİLERİN MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİNDE BAZI PCR TABANLI YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

Aynur Fidanboyu, Hüseyin Taşlı

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

Bu çalışmada bakterilerin klonal yakınlıklarının belirlenmesine yönelik PCR tabanlı tiplendirme yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, çeşitli klinik örneklerden izole edilen 30 *Escherichia coli*, 30 *Klebsiella pneumoniae* ve 30 *Pseudomonas aeruginosa* kökeni alındı. Bakterilerin DNA ekstraktları “repetitive extragenic palindromic element” (REP) PCR, “enterobacterial repetitive intergenic consensus” (ERIC) PCR ve “arbitrarily primed” (AP) PCR yöntemleri ile en az iki kez incelendi. ERIC-PCR ve REP-PCR’ın hem *E.coli* hem de *P.aeruginosa* kökenleri için %100 tekrarlanabilir olduğu saptandı. Uygulanan yöntemler karşılaştırıldığında, *E.coli* kökenlerinin tiplendirmesinde ERIC-PCR ve REP-PCR yöntemleri 27 kökeni aynı bularak %90 oranında tutarlılık gösterdi. *P.aeruginosa* kökenleri için, bu tutarlılık %100 olarak saptandı. *K.pneumoniae* kökenlerinin tiplendirmesinde ise ERIC-PCR ve REP-PCR yöntemlerinin tutarlılığının %63’e düştüğü görüldü. AP-PCR’da ise her üç bakteri türü için tekrarlanabilirlik çok düşük olup çoğu köken için bant profili gözlenemedi. Bu nedenlerden dolayı AP-PCR’ın diğer yöntemlerle karşılaştırılması mümkün olmadı. Bu çalışmada REP-PCR ve ERIC-PCR yöntemlerinin gram-negatif bakterilerin ayrıştırılmasında veya klonal yakınlıklarının belirlenmesinde kullanılabileceği, AP-PCR’ın ise ERIC-PCR ve REP-PCR’a alternatif olamayacağı sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: ERIC-PCR, REP-PCR, AP-PCR, moleküler tiplendirme

İDRAR KÜLTÜRLERİNDEN SOYUTLANAN BAZI *ENTEROBACTERIACEAE* TÜRLERİNİN GSBL ÜRETİMİYLE ERTAPENEM VE DİĞER ANTİBİYOTİKLERE DİRENCİ

Aytekin Çıkman¹, Nadire Seval Gündem²

¹Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Erzincan.

²Erzincan Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Erzincan.

Enterobacteriaceae üyeleri, üriner sistem enfeksiyonlarında en sık izole edilen bakterilerdir. Çalışmada idrar kültürlerinden izole edilen *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. ve *Enterobacter* spp. suşlarının ertapenem dahil antibiyotik duyarlılıkları ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimi araştırılmıştır. Laboratuvarımızda Ocak 2012- Mart 2012 tarihleri arasında konvansiyonel yöntemlerle tanımlanan *E.coli*, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp. ve *Enterobacter* spp. suşlarının antibiyotik duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi, GSBL üretimi ise çift disk sinerji yöntemi ile CLSI'nın önerileri doğrultusunda araştırılmıştır. Çalışmada 117'si *E.coli*, 23'ü *Klebsiella* spp. ve 4'er *Proteus* spp. ile *Enterobacter* spp. olmak üzere toplam 148 suş izole edilmiştir. *E.coli* suşlarının 26'sı (%22), *Klebsiella* spp. suşlarının 8'i (%35) GSBL pozitif olarak değerlendirilmiş; *Proteus* spp. ile *Enterobacter* spp. suşları için GSBL üretimi saptanmamıştır. İzole edilen tüm suşlar ertapenem ve meropeneme duyarlı bulunmuştur. Piperasilin-tazobaktam ve amikasin *Enterobacteriaceae* türlerine en etkili diğer antibiyotikler olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, ertapenem tek doz kullanım avantajı ile, idrar kültürlerinden izole edilen GSBL pozitif suşlar dahil olmak üzere, *Enterobacteriaceae* türlerine son derece etkili bulunmuş ve bu bakteriler ile oluşan üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde iyi bir alternatif olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Ertapenem, *Enterobacteriaceae*, GSBL, üriner sistem enfeksiyonu

YARA KÜLTÜRLERİNDE ÜREYEN MİKROORGANİZMALAR VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI

Nadire Seval Gündem¹, Aytekin Çıkman²

¹Erzincan Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji, Erzincan.

²Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji, Erzincan.

Bu çalışmada, yara yeri örneklerinden izole edilen patojen mikroorganizmaların dağılımı ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Mart 2011-Şubat 2012 tarihleri arasında Erzincan Devlet Hastanesi ve Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarlarına farklı kliniklerden gönderilen yara yeri örneklerinin kültürü yapılmış, kültürde üreme tespit edilen mikroorganizmalar konvansiyonel yöntemlerle tanımlanmış ve Kirby-Bauer disk-difüzyon yöntemiyle CLSI önerilerine göre antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. *E.coli* ve *Klebsiella* spp. suşlarında GSBL (genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz) varlığı çift disk sinerji yöntemiyle, stafilokok suşlarında metisilin direnci sefoksitin ve oksasilin diskleriyle araştırılmıştır. Toplam 153 yara yeri örneğinin 71'inde (%46.4) üreme saptanmıştır. Bu etkenlerin 48'i (%67.6) gram-pozitif, 23'ü (%32.4) gram- negatif bakteri olarak tespit edilmiştir. En sık izole edilen bakteriler sırasıyla *Staphylococcus aureus* 23 (%32.4), koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) 18 (%25.3), *Escherichiae coli* 8 (%11.3), *Klebsiella* spp. 7 (%9.9) *Pseudomonas aeruginosa* 5 (%7), *Streptococcus* spp. 4 (%5.7), *Streptococcus pyogenes* 3 (%4.2) ve *Acinetobacter* spp. 3 (%4.2) olarak belirlenmiştir. Stafilokok ve streptokoklarda glikopeptid direnci saptanmazken, *S.aureus*'ların %21.8'i ve KNS'ların %33.3'ü metisiline dirençlidir. Sekiz (%11.3) *E.coli* suşunun 4'ünde (%50) ve 7 (%9.9) *Klebsiella* suşunun 2'sinde (%28.6) GSBL pozitifliğine rastlanmıştır. İzole edilen gram-negatif bakteriler için karbapenemler, aminoglikozidler ve sefaperazon sulbaktamın en etkili antibiyotikler olduğu saptanmıştır. Hastanelerde belirli zaman aralıklarında yara enfeksiyonu etkeni olan mikroorganizmalar ve bunların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ampirik tedaviye ışık tutması açısından önemlidir.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik duyarlılık, yara kültürü, yara yeri enfeksiyonu

KARBAPENEM DİRENÇLİ GRAM NEGATİF SUŞLARDA NEW DELHI METALLO-BETA-LAKTAMAZ (NDM-1) VARLIĞININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Kerametdin Yanık, Dilek Emir, Cafer Eroğlu, Adil Karadağ, Akif Koray Güney, Murat Günaydın

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Samsun.

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enzimi üreten hastane enfeksiyonu etkenleri mortalite ve morbiditeyi olumsuz yönde artırmaktadır. GSBL üreten suşlar önceleri karbapenemlere duyarlı iken son yıllarda bu grup antibiyotiklere de dirençli hale gelmişlerdir. Karbapenem direnci bu enfeksiyonların tedavisinde kullanılacak seçenekleri de kısıtlamaktadır. Son iki üç yılda karbapenemleri parçalayan New Delhi metallo-beta-laktamaz (NDM-1) üreten suşlar da birçok ülkeden bildirilmiştir. NDM-1 çoğunlukla birden fazla antibiyotik sınıfına dirençli izolatlarda saptanmıştır. Hastane ve toplum kaynaklı NDM-1 yayılımının belirlenmesi alınacak önemler açısından çok önemlidir. Bazı ülkelerde NDM-1 geni taşıyan bakterilerin erken tespiti için çeşitli tanı yöntemleri ve sürveyans sistemleri geliştirilmiştir. Bu amaçla biz de bölgemizdeki NDM-1 taşıyan suşların varlığını moleküler yöntemlerle araştırdık. Çalışmaya 10 Haziran-10 Ekim 2011 tarihleri arasında mikrobiyoloji laboratuvarında Vitek2 ve Phoenix sistemleri ile karbapenem (imipenem, meropenem, doripenem ve ertapenem) orta derece duyarlı ve dirençli saptanan 210 suş alındı. Suşlara DNA ekstraksiyonu sonrası NDM-1 gen bölgesine ait primerler kullanılarak PCR testi uygulandı. Çalışmaya alınan suşların tür dağılımı ve karbapenem duyarlılıkları tabloda verildi. Çalışmamızda PCR yöntemi ile incelenen hiçbir suşta NDM-1 gen bölgesi ait pozitiflik saptanmadı. Aynı anda birçok antibiyotik direncine neden olan ve son yıllarda birçok ülkeye yayılan NDM-1 direnç geni taşıyan bakterilere henüz bölgemizde rastlanmadı. Çalışmamız nispeten kısa bir süreyi kapsadığından daha geniş süreyi içeren yeni suşlarla NDM-1 takibine devam edilmesi uygun olacaktır. NDM-1 taşıyan suşların varlığını ve yayılımını engellemek için yurtdışından gelen hastalarda izolasyon şartları en iyi şekilde yerine getirilmelidir.

Anahtar kelimeler: *Gram negatif basil, NDM-1, PCR*

Tablo. NDM-1 çalışılan suşların tür dağılımı ve karbapenem duyarlılıkları.

<i>Suşlar (n)</i>	<i>İmipenem (n: 210)</i>			<i>Meropenem (n: 210)</i>			<i>Doripenem (n: 70)</i>		
	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>R</i>
<i>A.baumannii</i> (132)	0	1	131	0	1	131	-	-	-
<i>P.aeruginosa</i> (54)	4	2	48	1	3	50	4	6	44
<i>P.putida</i> (5)	0	1	4	0	0	5	-	-	-
<i>E.cloacae</i> (8)	0	1	7	2	2	4	2	2	4
<i>E.aerogenes</i> (3)	0	2	1	2	0	1	2	0	1
<i>K.pneumoniae</i> (3)	0	0	3	0	0	3	0	0	3
<i>P.rettgeri</i> (2)	0	1	1	1	0	1	1	0	1
<i>E.coli</i> (2)	1	1	0	0	1	1	-	-	-
<i>C.freundii</i> (1)	0	0	1	0	0	1	-	-	-
Toplam (210)	5	8	197	6	7	197	9	8	53

n: Suş sayısı; **S:** Duyarlı; **I:** Orta duyarlı; **R:** Dirençli

KARBAPENEM DİRENÇLİ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* SUŞLARINDA OXA-48 VE KPC VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

İhsan Hakkı Çiftçi¹, Engin Karakeçe¹, Gülşah Aşık², Tayfur Demiray¹, Halil Er²

¹Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sakarya.

²Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Afyonkarahisar.

Gram-negatif bakteriler arasında β -laktam antibiyotiklere direnç gelişimi açısından klinikte sorun yaratan en önemli mekanizma β -laktamaz yapımıdır. Farklı bakteri türleri tarafından sentezlenen 400'ü aşkın β -laktamaza her geçen gün yeni tanımlanan enzimler eklenmektedir. Çalışmamızda hastanemizdeki ilk kez karşılaşılan karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatında karbapenemaz aktivitesine sahip enzimlerden olan OXA-48 ve KPC varlığının moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada iki karbapenem dirençli *K.pneumoniae* suşu incelenmiştir. Tanımlama ve antibiyotik duyarlılık test çalışmaları Vitek2 otomatize sistemi ile gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonunu takiben moleküler tanımlama için *K.pneumoniae* 23S rRNA gen bölgesi, antibiyotik direncinin moleküler profilinin belirlenmesi için de OXA-48 ve KPC gen bölgeleri uygun primerler aracılığı ile polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırılmıştır. Otomatize sistemle *K.pneumoniae* olarak tanımlanan suşların 23S rRNA gen bölgesinin gösterilmesiyle tanımlama moleküler olarak doğrulanmıştır. Karbapenem direnciyle ilişkili olarak her iki suşun da OXA-48 gen bölgesine sahip olduğu gözlenmiştir. KPC gen bölgesiyle ilişkili pozitiflik saptanamamıştır. Laboratuvarımızda izole edilen karbapenem dirençli *K.pneumoniae* suşlarının, küçük M tipi koloni morfolojileri, zayıf laktoz pozitiflikleri ve üreyi geç hidrolize etmeleri ile konvansiyonel çalışmalarda farklı algılara neden olabileceği gözlenmiştir. Sonuç olarak, Vitek2 otomatize sisteminin *K.pneumoniae* suşları için OXA ya da KPC uyarısı ve doğru tanımlanması olumlu bulunmuştur. Benzer uyarı veren çok sayıda izolatla yapılacak moleküler çalışmaların konunun netleştirilmesine katkı sağlayacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Klebsiella pneumoniae*, OXA-48, KPC

KAN VE DIŞKI ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *SALMONELLA* VE *SHIGELLA* SUŞLARININ TÜR DAĞILIMI VE ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ ORANLARI

Mehmet Parlak¹, Yasemin Bayram², Mustafa Berktaş²

¹*Van Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Van.*

²*Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van.*

Diğer gram-negatif türlerinde olduğu gibi *Salmonella* ve *Shigella* izolatlarının antibiyotik direnç oranlarında artışa dikkat çekilmektedir. Çalışmada kan ve gaita örneklerinden soyutlanan *Salmonella* ve *Shigella* cinsi bakterilerin serotiplerinin dağılımı ve çeşitli antibiyotiklere direnç durumunun belirlenmesi amaçlanmıştır. 2006-2011 yılları arasında dışkı ve kan örneklerinden elde edilen 46 *Salmonella* ve 21 *Shigella* cinsi bakteriye ait tanımlama ve antibiyogram sonuçları geriye dönük olarak incelenmiştir. Gaita örnekleri selenit-F besiyerinde sekiz saat inkübasyondan sonra EMB agara ve SS agara ekilmiş ve 18-24 saat ve 37°C'de kültürü yapılmıştır. Kan kültür örnekleri BacT/Alert (bioMérieux, France) otomatize sistemde inkübe edilmiştir. Suşlarının tür düzeyinde tanımlanması ile antibiyotik duyarlılık testlerinde BD Phoenix (Becton Dickinson, USA) otomatize sisteminden yararlanılmıştır. Söz konusu bakteriler için antibiyotik seçiminde 2010 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) klavuzu esas alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen *Salmonella* suşlarının 21'i *S.typhi*, 19'u *Salmonella* spp., 4'ü *S.paratyphi* A, birer *S.pullorum* ve *S.choleraesuis* ssp. *choleraesuis* olarak tanımlanmıştır. *Shigella* suşlarının 12'si *S.flexneri*, 6'sı *S.boydii*, 2'si *S.sonnei* ve biri *S.dysenteriae* olarak belirlenmiştir. *Salmonella* ve *Shigella* suşlarına en etkili antibiyotikler sırasıyla imipenem, meropenem, siprofloksasin, levofloksasin, seftazidim, piperasilin-tazobaktam sefepim ve sefotaksim olarak izlenmiştir. *Salmonella* ve *Shigella* suşlarında antibiyotiklere direnç oranları tabloda verilmiştir. *Salmonella* ve *Shigella* izolatlarında antibiyotiklere direnç oranları düşük olarak bulunmuştur. Ampirik antibiyotik tedavisine yön vermesi ve dirençli suşların neden olduğu enfeksiyonların önüne geçebilmek için antimikrobiyal direncin izlendiği buna benzer çalışmaların periyodik olarak bildirilmesi önem taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: *Antibiyotik direnci, Salmonella, Shigella, tür dağılımı*

Tablo. *Salmonella* ve *Shigella* suşlarında antibiyotiklere direnç oranları.

<i>Antibiyotik</i>	<i>Grup</i>	<i>Salmonella spp. (n=46)</i>	<i>Shigella spp. (n=21)</i>
		<i>Dirençli suş Sayı (%)</i>	<i>Dirençli suş Sayı (%)</i>
Amikasin	B	46 (100)	21 (100)
Sefazolin	A	46 (100)	21 (100)
Sefoksitin	B	46 (100)	21 (100)
Gentamisin	A	46 (100)	21 (100)
Trimetoprim-Sülfametoksazol	B	20 (43)	14 (67)
Tetrasiklin	C	5 (11)	14 (67)
Aztreonam	C	3 (7)	1 (5)
Sefepim	B	2 (4)	1 (5)
Sefotaksim	B	2 (4)	1 (5)
Seftazidim	C	2 (4)	0
Piperasilin-Tazobaktam	B	2 (4)	0
Siprofloksasin	B	1 (2)	1 (5)
Levofloksasin	B	1 (2)	1 (5)
İmipenem	B	0	0
Meropenem	B	0	0

VANKOMİSİN DİRENÇLİ ENTEROKOKLARDA DİRENCİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Engin Karakeçe¹, İhsan Hakkı Çiftci¹, Gülsah Aşık²

¹Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Sakarya.

²Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Afyonkarahisar.

Doğada yaygın olarak bulunan, insan ve hayvanların gastrointestinal sisteminin üyesi olan, sıklıkla kullanılan antibiyotiklere direnç geliştirebilen enterokoklar, hastanede yatan riskli hasta grupları için önemli bir patojendir. Bu çalışmada, hastanemizde yatan riskli hastalardan izole edilen vankomisine dirençli enterokoklarda (VDE) direnç tiplerinin moleküler yöntemle araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya 417 rektal sürüntü ve 4 idrar olmak üzere 421 örnek dahil edilmiştir. Konvansiyonel bakteriyolojik çalışmaların ardından tanımlama, antibiyotik duyarlılık ve minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) verileri otomatize sistemle (Vitek2) elde edilmiştir. VDE suşlarında *vanA* ve *vanB* gen bölgesi varlığının araştırılmasında; 'Mag 16 Bacterial DNA Extraction Kit' (Fluorion, Iontek) ve Fluorion VRE QLP 1.0 (Iontek) gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (q-PCR) kitleri üretici firma önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. Riskli hasta gruplarından alınarak laboratuvara gönderilen rektal sürüntü ve idrar örneklerinin 52 (%12.3)'ünde VDE kolonizasyonu tespit edilmiştir. VDE suşlarının 51 (%98)'inin *E.faecium*, birinin (%2) ise *E.faecalis* olduğu belirlenmiştir. İzole edilen VDE suşlarının beşi (%10) teikoplanine duyarlı bulunmuştur. Çalışma kapsamında incelenen 52 VDE suşunun q-PCR ile moleküler direnç geni araştırmaları sonucunda, tüm suşların *vanA* direnç tipine sahip olduğu saptanmıştır. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de VDE yayılımı ve direnç tiplerinin izlenmesi hastane enfeksiyonlarının önlenmesi açısından önemlidir. Hastanemizde yapılan tarama çalışmalarında diğer çalışmalarla uyumlu olarak, sıklıkla *vanA* tipi direnç genine sahip *E.feacium* izole edilmiştir. Ancak suşların klonal ilişkisi henüz ortaya konamamıştır. Bu ilişkinin gösterilmesi hastane enfeksiyonlarının izlenmesi ve önlenmesine katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Enterokok, vankomisin, direnç, kolonizasyon, PCR

ÇOK MERKEZLİ ÇALIŞMA: TÜRKİYE GENELİNDE ALTI MERKEZDE YATAN HASTALARDAN İZOLE EDİLMİŞ ENTEROKOK SUŞLARININ VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yağmur Babat¹, Senem Akgül², Uğur Arslan³, Tuba Kayman⁴, Esvet Mutlu⁵, Mustafa Özyurt⁶, Vesile Yazıcı⁷, Bülent Bozdoğan⁸

¹Adnan Menderes Üniversitesi BİLTEM Epidemiyoloji Birimi, Aydın.

²Manisa Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü, Manisa.

³Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Konya.

⁴Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü, Kayseri.

⁵Antalya Atatürk Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü Antalya.

⁶GATA Haydarpaşa Mikrobiyoloji Bölümü, İstanbul.

⁷Derince Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü, Kocaeli.

⁸Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD; ADU BİLTEM Epidemiyoloji Birimi, Aydın.

Enterococcus türleri, özellikle de *E.faecium* ve *E.faecalis*, hastane enfeksiyonlarının önemli etkenleridir. Enterokokların virülansı birçok gen ile ilişkilidir. Bunlardan *agg* geni, ökaryotik hücre adesyonuna katılan agregasyon proteinini; *gelE* geni, jelatin, kollajen, hemoglobin ve diğer biyoaktif bileşiklerin hidrolizine yol açan ekstraselüler metalloendopeptidazı; *cylA*, *cylB*, *cylM* ve *cylL*-*cylS* genleri sırasıyla sitolizinin aktivasyonu, transporthu, posttranslasyonel modifikasyonu ve sitolizin prekürsör proteinlerini; *cpd*, *cob*, *ccf*, *cad* genleri, insan lökositleri için kemotaktik ve konjugasyonu kolaylaştırıcı seks feromonlarını; *Esp* geni, bağışıklıktan kaçmada rol alan hücre duvarı ile ilişkili proteini; *efaAfs* ve *efaAfm* genleri ise sırasıyla *E.faecalis* ve *E.faecium*'daki adezinleri kodlamaktadır. Bu çalışmanın amacı Türkiye'de altı merkezden alınan izolatlar arasında virülans genlerinin oranlarını test etmektir. Çalışmaya katılan merkezlerden 3 ay boyunca yatan hastalardan izole edilen ve enterokok olarak tanımlanan suşlar ileri analiz için ADÜ BİLTEM'e gönderilmiştir. Çalışmaya katılan altı merkezden gelen izolatların Instagen Matrix (Bio-Rad) ile DNA ekstraksiyonları yapılmış ve virülans genlerinin varlığı PCR ile araştırılmıştır. Üç aylık süre boyunca Antalya'dan 21, İstanbul'dan 20, Kayseri'den 66, Kocaeli'nden 72, Konya'dan 43 ve Manisa'dan 44 suş izole edilmiştir. Test edilen 266 izolatta en yüksek oranda *ccf* (%91.4) geni varlığı saptanmış; bunu sırasıyla *efaAfs* (%69.9), *cpd* (%65), *esp* (%59), *cob* (%45.5), *gelE* (%39.5), *cylM* (%33.8), *agg* (%32.7), *cylA* (%20.7), *cylB* (%20.3) ve *efaAfm* (%14.7) izlemiştir. Virülans genlerinin merkezlere göre dağılımı tabloda gösterilmiştir. Türkiye'de 6 merkezden gelen enterokok izolatlarında virülans genlerinin prevalansı yüksek düzeyde bulunmuştur. Sürveyans çalışmaları hastalık etkeni enterokoklar arasında virülans faktör dağılımını ve olası değişiklikleri izleme olanağı verecektir.

Anahtar kelimeler: Enterokok, virülans faktörleri, çok merkezli

Tablo. Altı merkezden izole edilen enterokok suşlarında virülans faktörlerinin dağılımı.

	Virülans faktörlerinin yüzdeleri										
MERKEZ (Suş sayısı)	gelE	esp	efa Afs	efa afm	agg	ccf	cob	cpd	cylA	cylB	cylM
ANTALYA (21)	33	57,1	52,4	42,9	38,1	100	52,4	52,4	23,8	23,8	23,6
İSTANBUL (20)	35	65	55	25	40	90	55	65	25	25	0
KAYSERİ (66)	57,6	65,9	69,7	33,3	45,5	98,5	25,8	71,2	15,2	30,3	28,8
KOCAELİ (72)	43,1	40,3	80,6	16,7	20,8	75	55,6	73,6	15,3	12,5	12,5
KONYA (43)	14	76,7	67,4	41,9	41,9	97,7	62,8	65,1	11,6	30,2	34,9
MANİSA (44)	36,4	61,4	70,5	54,5	18,2	97,7	34,1	47,7	6,8	6,8	11,4
TOPLAM(266)	39,5	59	69,9	33,8	32,7	91,4	45,5	65	14,7	20,7	20,3

S.AUREUS KÜÇÜK KOLONİ VARYANTLARININ GENOTİPLENDİRİLMESİNDE REP-PCR (DIVERSILAB) VE “PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS” UYUMU?

Server Yağcı¹, Cemal Bulut¹, Burçin Şener², Ali Kudret Adiloğlu³, Sami Kınıklı¹, Ali Pekcan Demiröz¹, Gülşen Hasçelik²

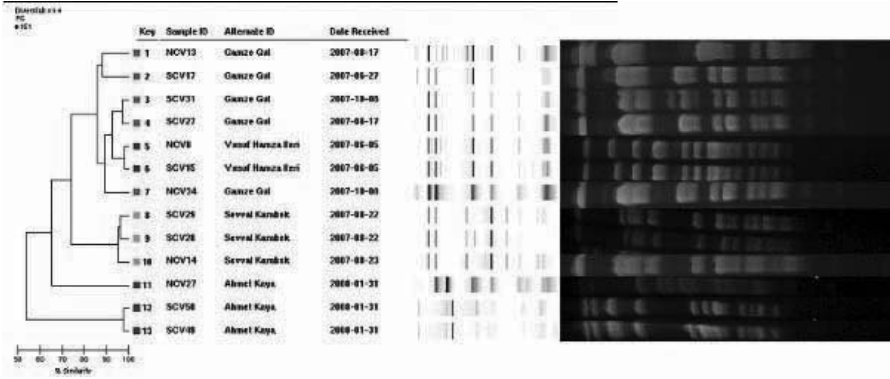
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, ¹Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği;

³Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

²Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Staphylococcus aureus suşlarının genotiplendirilmesinde “Pulsed-Field Gel Electrophoresis” (PFGE) altın standart yöntem olarak kabul görmektedir. Ancak pahalı ve zaman alıcı olan bu yöntemin uygulanması teknik donanım ve yoğun emek gerektirmektedir. Son yıllarda, yarı otomatize “repetitive-sequence-based polymerase chain reaction” (rep-PCR) DiversiLab sistemi (DL) mikroorganizmaların daha kolay ve hızla tiplendirilmesini sağlayan bir cihaz olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada kistik fibrozis (KF) hastalarından izole edilen özellikle küçük koloni varyantları (KKV) olmak üzere *S.aureus* suşlarının tiplendirilmesinde DL ve PFGE sonuçları arasındaki uyumun araştırılması amaçlanmıştır. Kistik fibrozis hastalarının solunum yolu örneklerinden izole edilmiş 24 normal *S.aureus* ve 34 *S.aureus* KKV, PFGE ve rep-PCR (DiversiLab, BioMerieux, France) yöntemleri ile tiplendirilmiştir. DL ile çalışılan suşlar iki ayrı zamanda, iki ayrı kişi tarafından ve farklı laboratuvarlarda tiplendirilmiştir. Referans yöntem olarak alınan PFGE ile DL sonuçlarının uyumu değerlendirilmiştir. Tüm suşlar her iki yöntemle de aynı, ya da farklı olarak sınıflandırılmıştır. Her hastanın örnekleri kendi içerisinde karşılaştırılmış, hastalar arası karşılaştırma yapılmamıştır (Şekil). Toplam 58 suş her iki yöntemle tiplendirilmiş; DL ile yapılan ilk çalışmada 13 suшта, ikinci çalışmada ise 19 suшта uyumsuz sonuç alındı. İlk çalışmada %77, ikinci çalışmada ise %66 olmak üzere ortalama %71.9 uyum saptanmıştır. Bu çalışmada ilk kez DL ile *S.aureus* KKV tiplendirilmiştir. *S.aureus* genotipleri arasındaki farkın belirlenmesinde, PFGE’de, DL’e göre daha fazla sayıda bant farkının gerekliliği, iki yöntem arasındaki uyum farkının nedeni olarak gösterilebilir. Çalışmada rep-PCR ile PFGE sonuçları arasında orta derecede bir uyum saptanmış olmasına rağmen, teknik açıdan uygulanması kolay olan DL daha hızlı sonuç vermiştir.

Anahtar kelimeler: Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE, rep-PCR, *S.aureus* küçük koloni varyantı



Şekil. Diversilab ve PFGE sonuçlarının karşılaştırılması (PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis; SCV: Küçük koloni varyantı; NCV: Normal koloni)

METİSİLİN DİRENÇLİ STAFİLOKOKLARDA SINIF 1 İNTEGRON VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE ANTİBAKTERİYEL DİRENÇ İLE İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ

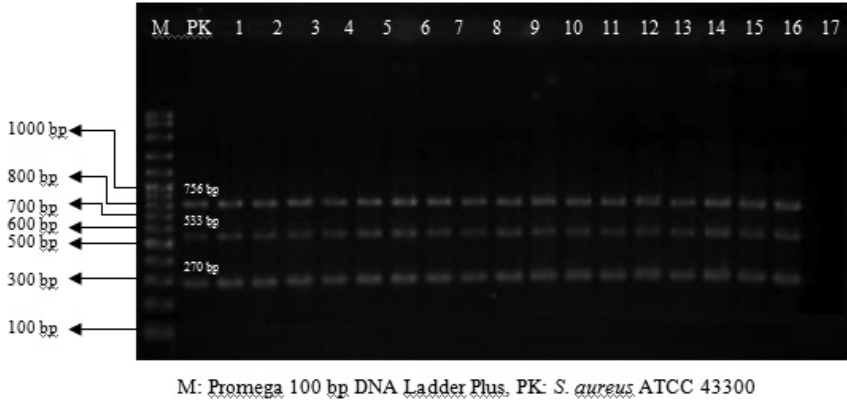
Akif Koray Güney¹, Tuba Yıldırım², Belma Durupınar¹

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun.

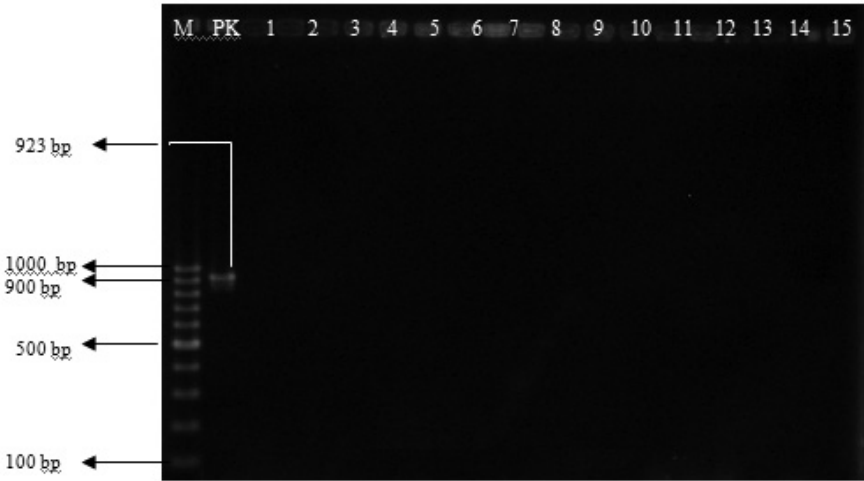
²Amasya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Amasya.

Metisilin dirençli stafilokoklar (MRS) hastanelerde izole edilen en yaygın patojenlerdendir. *S.aureus* nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak sıklıkla karşımıza çıkan klasik bir patojen iken, koagülaz negatif stafilokokların nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak önemi giderek artmaktadır. Metisilin direnci ve diğer ek antibiyotik dirençleri klinik stafilokok izolatlarında tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır. İntegronlar antibiyotik direnç yayılımında rol alan mobil genetik elementlerdir. Özellikle sınıf 1 integronların gram-negatif bakterilerde antibiyotik direnci ile olan ilişkisi irdelenmesine rağmen, stafilokokların da içinde bulunduğu gram-pozitif bakteriler ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen 100 MRS izolatında sınıf 1 integron varlığının araştırılması amaçlandı. İzolatların tanımlaması ve metisilin direnci fenotipik olarak tespit edildikten sonra, izolatların tanımlanması ve metisilin direnci, 16S rRNA, *nuc* ve *mecA* gen bölgelerine özgül primerlerin kullanıldığı multipleks PCR ile genotipik olarak doğrulandı (Şekil 1). Çalışmaya dahil edilen 100 MRS izolatında sınıf 1 integron varlığı *int1* gen bölgesine özgül primerlerin kullanıldığı PCR yöntemi ile araştırıldı. Pozitif kontrol suşunda *int1* gen bölgesini temsil eden 923 bp'lık bant tespit edilmesine rağmen, hiçbir klinik izolatta integron 1 varlığı tespit edilmedi (Şekil 2). Yaptığımız çalışma stafilokoklarda ve gram-pozitif bakterilerde integron varlığının araştırıldığı ilk çalışma olması nedeniyle ülkemiz açısından önemlidir.

Anahtar kelimeler: Metisilin dirençli stafilokok, antibiyotik direnci, integron



Şekil 1. 1-17 no'lu MRS izolatlarının multipleks PCR sonrası 16S rRNA, nuc ve mecA gen bölgelerinin jel görüntüsü.



Şekil 2. *Int1* varlığı tespit edilemeyen 1-16 no'lu MRS izolatlarının PCR jel görüntüsü.

METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARINDA KLONAL İLİŞKİNİN PULSED-FIELD JEL ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

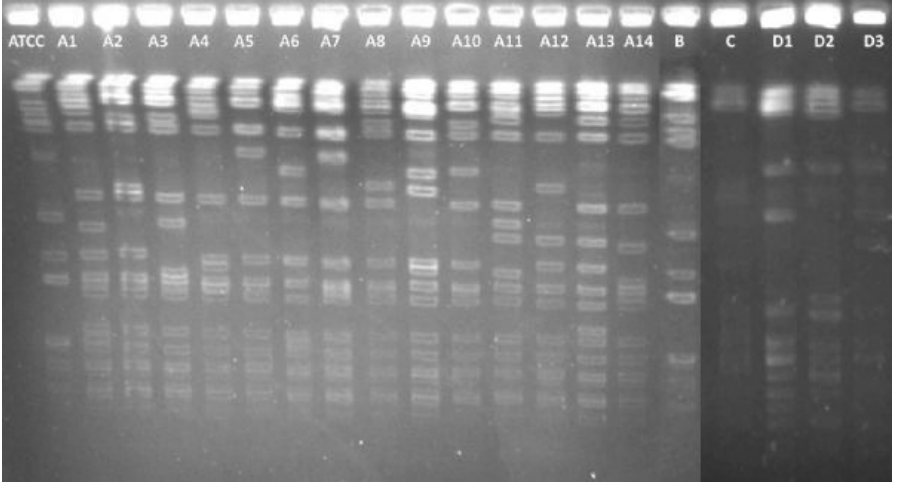
Tuğrul Hoşbul¹, Bülent Bozdoğan², Tunçer Haznedaroğlu¹, Mustafa Özyurt¹

¹Gata Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul.

²Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

Çalışmamızda GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesinde metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları arasındaki çapraz bulaşın pulsed-field jel elektroforez (PFGE) yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya 2006–2008 yılları arasında klinik örneklerden izole edilen 105 tekrar içermeyen MRSA suşu dahil edildi. Agaroz jel içerisine alınan MRSA suşlarının lizis işlemi gerçekleştirildikten sonra lizis tamponu uzaklaştırıldı ve tüplere, içerisinde 20 µl proteinaz K bulunan 1 ml'lik proteinaz K solüsyonu pipetlendi. Tüpler çalkalamalı su banyosunda 50°C'de 30 dakika bekletildi. İnkübasyon sonrası proteinaz K solüsyonu aspire edildi ve 1 ml TE tamponu ile 37°C'deki çalkalamalı su banyosunda 30 dakika süre ile üç kez yıkandı. Kromozomal DNA *Sma*I enzimi ile kesildikten sonra fragmanlar CHEF DR III elektroforez sisteminde 0.5X TBE ile 200 V (6 V/cm), 14°C ısıda, atım zamanı 5-25 sn olacak şekilde 18 saat süre ile yürütüldü. Jel etidyum bromür ile boyanarak, UV ışığı altında görüntülendi ve fotoğraflandı. Oluşan bant patternleri birbirinin aynısı ise aynı klon, altı banda kadar bant farklılığı söz konusu ise klonal ilişkili olarak yorumlandı ve klonal varyant olarak kabul edildi. Çalışmamızın sonunda dört ayrı klonun varlığı tespit edildi (Resim). Suşların %95.2 (100/105)'sinin A klonu olduğu görüldü; D klonundan 3 suş, B ve C klonlarından ise birer suş olduğu gözlemlendi. A klonu içerisinde 14 varyant saptandı, bunlardan A1 (35 suş) ve A2 (25 suş) pulsotiplerinin en yaygın pulsotip olduğu tespit edildi. A3 ve A12 ikiye suş; A4, A5 ve A7 üçer suş, A6 ve A13 dörder suş; A8 ve A11 sekizer suş; A9, A10 ve A14 birer suş içermekteydi. D klonu içerisinde ise 3 ayrı pulsotipten (D1, D2 ve D3) birer suş olduğu belirlendi. Sonuç olarak hastanemizde egemen bir pulsotipin olduğu izlendi. Bu pulsotipin 14 varyantının olması, klonun hastanede uzun süredir egemen olduğunun göstergesi olarak kabul edilebilir.

Anahtar kelimeler: Klonalite, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, pulsed-field jel elektroforezi



Resim. Saptanan klonlar ve varyantlarına ait jel görüntüsü (*Dört ayrı klonun varlığı saptanmıştır*)

METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARINDA *ERMA*, *ERMB*, *ERMC* VE *MSRA/B* DİRENÇ GENLERİNİN DAĞILIMI

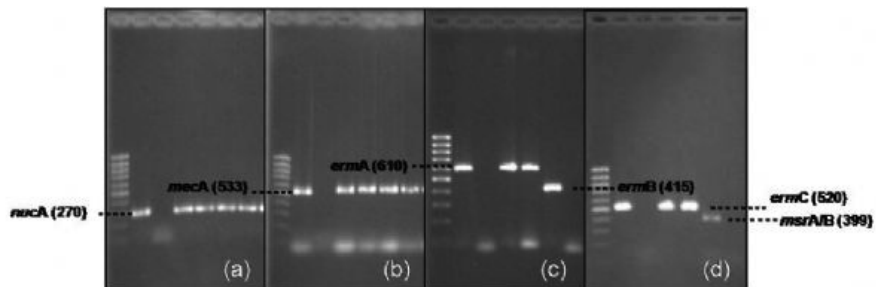
Tuğrul Hoşbul¹, Bülent Bozdoğan², Tunçer Haznedaroğlu¹, Mustafa Özyurt¹

¹Gata Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul.

²Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Aydın.

Çalışmamızda metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarında makrolid-linkozamid-streptogramin (MLS) antibiyotiklere direnç gelişiminden başlıca sorumlu olan *erma*, *ermB* ve *ermC* ile *msrA/B* direnç genlerinin dağılımının saptanması amaçlanmıştır. Çalışmaya 2006–2008 yılları arasında yatan hastalardan izole edilen 105 MRSA suşu dahil edildi. İzolatların MLS grubu antibiyotiklere duyarlılıkları, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Makrolidler için 15 µg'lık azitromisin, klaritromisin ve eritromisin; linkozamidler için 2 µg'lık klindamisin; streptograminler için 15 µg'lık kinupristin-dalfopristin diskleri kullanıldı. Suşların tür düzeyinde tanımlanması, konvansiyonel yöntemlere ilave olarak *nucA* geni özgül primerleri kullanılarak PCR yöntemi ile yapıldı. Metisilin direnci sefoksitin diski kullanılarak belirlendi ve *mecA* geninin varlığı PCR yöntemi ile doğrulandı. *erma*, *ermB*, *ermC* ve *msrA/B* direnç genleri özgül primerler aracılığıyla ayrı uygulamalarda olmak üzere PCR yöntemi ile araştırıldı. Amplikonlar agaroz jel elektroforezi ile ayrıldı ve görüntüldü (Resim). İzolatların 104'ü (%99) makrolidlere dirençli bulundu. İzolatların %59 (62/105)'unda makrolidlere ve linkozamidlere indüklenebilir direnç, %40 (42/105)'ında yapısal direnç saptandı (Tablo 1). Tüm izolatlar streptograminlere duyarlı bulundu. Makrolid dirençli suşların %96.2 (100/104)'sinde *erma*, %35.6 (37/104)'sında *erma* ve *ermC* birlikteliği ve %3.8 (4/104)'inde *ermB* direnç geni saptandı; *msrA/B* direnç geni tespit edilmedi (Tablo 2). Hastanemizdeki MRSA izolatları arasında makrolidlere yüksek oranda direnç saptanmıştır. Makrolidlere dirençten başlıca sorumlu genin *erma* olduğunu bulunmuştur. Linkozamidlere hassasiyet MRSA suşları arasında %60 civarında olsa bile indüklenebilir direnç nedeniyle tedavide kullanılmalarında direnç gelişimi riski göz önünde tutulmalıdır.

Anahtar kelimeler: Direnç geni, makrolid-linkozamid-streptogramin direnci, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*



Şekil. Amplikonlara ait jel görüntüleri [*nucA* (a, 270 bç), *mecA* (b, 533 bç), *ermA* (c, 610 bç), *ermB* (c, 415 bç), *ermC* (d, 520 bç) ve *msrA/B* (d, 399 bç) gen bölgelerine ait amplikonlar]

Tablo 1. İzolatların fenotipik direnç dağılımı.

Direnç Fenotipi	İzolat Sayısı (%)
iMLSB	62 (59)
cMLSB	42 (40)
Duyarlı fenotip	1 (1)

iMLSB: İndüklebilir MLS direnci; *cMLSB*: yapısal MLS direnci

Tablo 2. İzolatlarda tespit edilen direnç genlerinin dağılımı.

Direnç Genleri	İzolat Sayısı (%)
<i>ermA</i>	100 (96.2)
<i>ermB</i>	4 (3.8)
<i>ermC</i> *	0
<i>msrA/B</i>	0
<i>ermA+ermC</i>	37 (35.6)

**ermC* direnç geni yalnızca *ermA* birlikteliği şeklinde saptanmıştır

STAPHYLOCOCCUS AUREUS İZOLATLARINDA ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ VE DİRENÇ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Ebru Şebnem Yılmaz¹, Özkan Aslantaş²

¹Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Hatay.

²Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Hatay.

Bu çalışmada, 97 *Staphylococcus aureus* klinik izolatının 14 farklı antimikrobiyale olan direnç ve direnç mekanizmalarının araştırılması amaçlandı. İzolatların antimikrobiyallere duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi kullanılarak, direnç genleri ise PCR ile araştırıldı. Ayrıca, siprofloksasin dirençli izolatlarda *grrA* ve *gyrA*, rifampin dirençli izolatlarda ise *rpoB* geninin sekans analizi yapıldı. İzolatların tamamı vankomisine duyarlı bulunurken; penisilin, ampisilin, eritromisin, tetrasiklin, amoksisilin-klavulanik asid, siprofloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol, oksasilin, fusidik asid, rifampin, klindamisin, gentamisin ve mupirosine sırasıyla %83.5, %77.3, %63.9, %16.5, %16.5, %15.5, %15.5, %13.4, %12.4, %6.2, %6.2, %6.2 ve %5.2 oranında direnç görüldü. Penisilin dirençli 81 izolatın 46'sında *blaZ* geni; oksasilin dirençli 13 izolatın 11'inde *mecA* geni belirlendi. Eritromisin dirençli 62 izolatla direnç genlerinin sıklığı sırasıyla *ermC* (57), *msrA* (20), *mphC* (17), *ermA* (12) ve *ermB* (4) olarak tespit edildi. Tetrasiklin dirençli 16 izolatın 9'unda *tetM* ve 7'sinde *tetK* geni; gentamisin dirençli 6 izolatın 3'ünde *aac(6')/aph(2'')*-*aph(3')-IIIa*, 2'sinde *aac(6')/aph(2'')* ve 1'inde de *aph(3')-IIIa* geni belirlendi. Klindamisin dirençli 6 izolatın 5'inde *lnuA* geni tespit edildi. Fusidik aside dirençli 12 izolatın 6'sında *fusB*, 2'sinde *fusB-fusC* ve 2'inde *fusC* geni; mupirosin dirençli 5 izolatın ise sadece 1'inde *ileS-2* geni belirlendi. Siprofloksasin dirençli 15 izolatla *grrA* geninde sıklıkla Ser80Phe, *gyrA* geninde ise Ser84Leu mutasyonu olduğu görüldü. Rifampin dirençli izolatların tamamında ise *rpoB* geninde Leu466Ser mutasyonu tespit edildi. Sonuç olarak, izolatların antimikrobiyallere değişen oranlarda direnç gösterdiği ve bu dirence farklı genetik mekanizmaların aracılık ettiği görüldü. *S.aureus* suşlarında klinik öneme sahip antimikrobiyallere olan direncin kontrol edilmesinde direncin devamlı izlenmesinin önemli olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal direnç, genotip, *Staphylococcus aureus*

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARINDA MUPİROSİN DUYARLILIĞI

Jale Göktepe, Burak Aksu

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

Staphylococcus aureus hem nozokomiyal hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olan önemli bir patojendir. Mupirosin, *S.aureus*'un neden olduğu yüzeysel enfeksiyonların tedavisinde ve bu bakterinin nazal taşıyıcılığının eradikasyonunda kullanılan topikal bir antibiyotiktir. Mupirosin kullanımı sonrasında stafilokoklarda direnç gelişebilmektedir.

Çalışmanın amacı, çeşitli klinik tablolardan enfeksiyon etkeni olarak soyutlanan *S.aureus* izolatlarında, mupirosin duyarlılığının araştırılması ve dirençli olduğu belirlenen kökenlerde direncin genetik temelinin saptanmasıdır. 2006-2010 yıllarını kapsayan dönemde, M.Ü.Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden soyutlanan, 70 metisiline dirençli (MRSA) ve 179 metisiline duyarlı (MSSA) *S.aureus* izolatı çalışmaya alınmıştır. Mupirosin dirençli izolatlar agar tarama yöntemi ile belirlenmiştir. Bu kökenlerde mupirosin MİK tayini için agar dilüsyon yöntemi kullanılmış ve plazmidle kodlanan *mupA* geni varlığı PCR ile araştırılmıştır. Üç MRSA izolatı (%4.29) ve 2 MSSA izolatı (%1.12) agar tarama yöntemiyle mupirosine dirençli olarak saptanmıştır. Dirençli MRSA izolatlarının tamamında mupirosin MİK değeri >1024 mg/L olarak belirlenmiştir. MSSA izolatlarının MİK değerleri, 128 mg/L ve >1024 mg/L olarak saptanmıştır. PCR ile araştırılan *mupA* geni, 3 MRSA ve bir MSSA izolatında pozitif bulunmuştur. Düşük düzey mupirosin direnci, izolösil-tRNA sentetaz (*ileS*) genindeki nokta mutasyonları ile ortaya çıkmaktadır. Yüksek düzey mupirosin direnci ise farklı yapıda bir *ileS* geni (*mupA*) taşıyan plazmid aracılığı ile kodlanır ve kökenler arasında aktarılabilir. Yüksek düzey mupirosin direnci *S.aureus* izolatlarının %1.6'sında (3 MRSA ve 1 MSSA) saptanmıştır. Bu bulgular, bölgemizde mupirosinin stafilokoklara karşı kullanılabilecek alternatif bir topikal antibiyotik olabileceğini desteklemektedir.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik direnci, mupirosin, *Staphylococcus aureus*

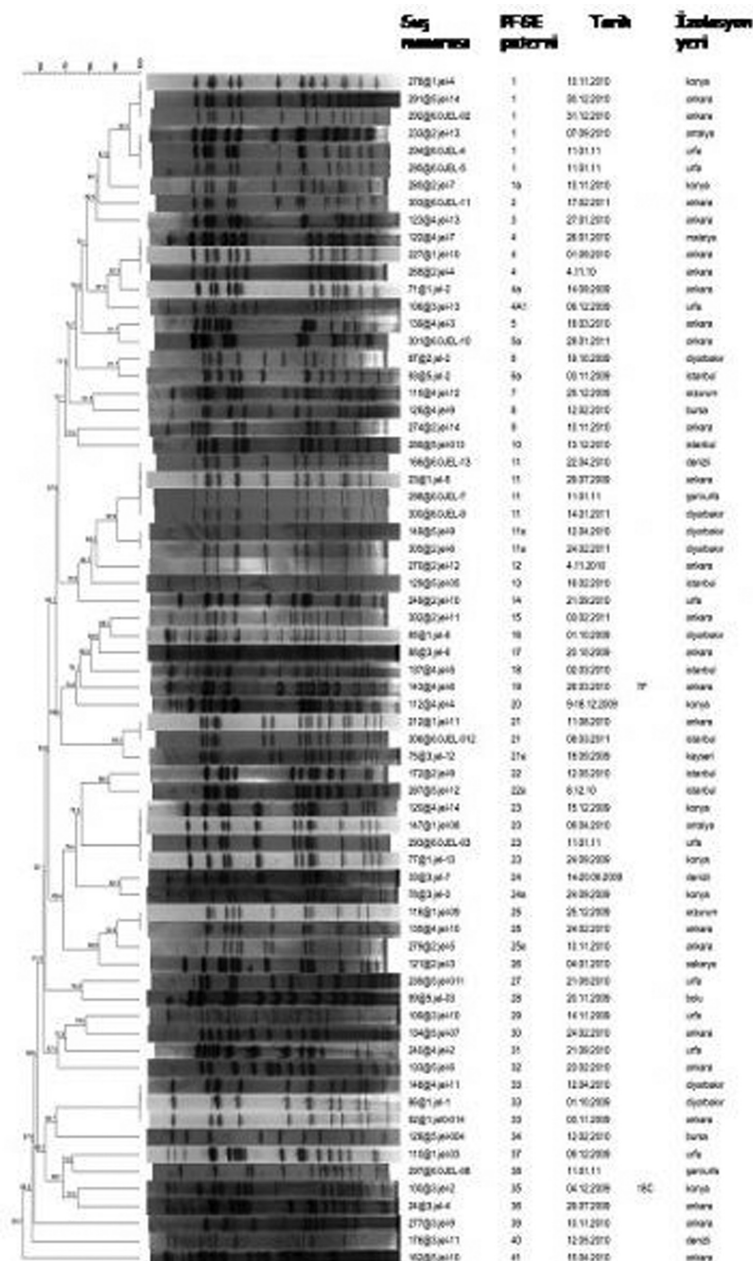
TÜRKİYE'DEKİ İNVAZİF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ENFEKSİYONLARININ MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ

Özlem Ünal¹, Sümeyra Acar, Selin Ötgün, Dilek Güldemir, Ayşegül Gözalan, Mustafa Ertek, Rıza Durmaz

¹Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara.

Streptococcus pneumoniae toplum kökenli pnömoni, otitis media, sinüzit, menenjit, ampiyem, bakteriyemi, septik artrit gibi morbiditesi ve mortalitesi yüksek çeşitli enfeksiyonların en önemli nedenlerinden biridir. Pnömokokların yayılmasını kontrol etmek için yerel, ulusal ve uluslararası düzeyde izolatların epidemiyolojik ve genetik akrabalığını belirlemek gerekmektedir. Bu çalışmanın amacı; Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilmiş invazif *S.pneumoniae* suşlarının klonal ve serotip ilişkilerinin belirlenmesidir. İn-vazif pnömokok enfeksiyonu olan hastalardan izole edilmiş toplam 69 *S.pneumoniae* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. İzolatları tanımlamak için konvansiyonel testler ve serotiplendirilmesi için *quellung* reaksiyonu kullanılmıştır. Suşlar arasındaki klonal ilişkiyi belirlemede PFGE (pulsed field gel electrophoresis) yöntemi kullanılmıştır. Toplam 69 *S.pneumoniae* izolatı arasında 51 genotip saptanmıştır. Bu genotiplerden 21'i ayırt edilemez veya yakın ilişkili olarak belirlenmiş; 39 suş (%56.6) klonal yönden ilişkili bulunmuştur (Şekil). Geri kalan 30 genotip, 30 suş (%43.4) içerdüğinden özgül olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlarımız invazif pnömokok enfeksiyonlarının yarıdan fazlasının ülke çapında çapraz bulaş sonucu olduğunu göstermiştir. Aynı genotip içinde farklı serotipler, farklı genotipler içinde aynı serotipler saptanmıştır. Bazı serotiplerde genetik çeşitlilik gösterilmiştir. *S.pneumoniae* izolatları için tek başına serotiplemenin epidemiyolojik haritalama için yeterli olmadığı görülmüştür. Bu izolatlar moleküler yöntemler kullanılarak analiz edilebilir. İn-vazif pnömokok enfeksiyonlarını önlemek için sıkı kontrol programları kullanılmalı ve enfeksiyonlar ulusal düzeyde takip edilmelidir.

Anahtar kelimeler: Moleküler epidemiyoloji, PFGE, *S.pneumoniae*



Şekil. *S.pneumoniae* PFGE paternleri.

STREPTOCOCCUS PYOGENES SUŞLARINDA EMM GENOTİPLERİNİN DAĞILIMI

Uğur Arslan¹, Erman Oryaşın², Zeynep Eskin², Hatice Türk Dağı¹, Duygu Fındık¹, İnci Tuncer¹, Bülent Bozdoğan²

¹Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Konya.

²Adnan Menderes Üniversitesi, BİLTEM Epidemiyoloji Birimi, Aydın.

Streptococcus pyogenes (A grubu streptokok veya AGS), tonsillofarenjitin en yaygın bakteriyel etkenidir. Ayrıca otitis media, impetigo, nekrotizan fasiit, bakteriyemi, sepsis ve toksik şok benzeri sendrom gibi hastalıklara yol açabilmektedir. M proteinini kodlayan *emm* geni epidemiyolojik çalışmalarda genotiplendirme amacıyla kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, hastanemizde izole edilen AGS suşlarının *emm* tiplerinin belirlenmesidir. 2008-2009 yıllarında izole edilen toplam 35 suş çalışmaya alınmıştır. İzolatların moleküler tanısı 16S rRNA geni sekans analizi ile yapılmıştır. CDC'nin *emm* tiplendirmesi için önerdiği spesifik primerler kullanılarak PCR yöntemi ile gen amplifikasyonu yapılmıştır. 16S rRNA ve *emm* için elde edilen ampliconlara sekans analizi (Macrogen, Güney Kore) uygulanmıştır. Sonuçlar CDC'nin *emm* sekans veri bankası ile karşılaştırılıp *emm* tipleri belirlenmiştir. 16S rRNA sekansları NCBI Blast programı kullanılarak gen bankası ile karşılaştırılmıştır. Çalışmaya alınan 35 AGS suşunun 16S rRNA sekansı gen bankasıyla karşılaştırılmış ve *S. pyogenes* olarak tanımlanmıştır. Bu 35 izolatın 23'ünde *emm* primerleri ile amplicon elde edilmiş ve sekans yapılmıştır. 23 izolat arasında 15 farklı *emm* genotipi saptanmıştır. En yaygın *emm* tipleri *emm1* (%22), *emm89* (%13), *emm18* (%9) ve *emm19* (%9) olarak belirlenmiştir. Mevcut AGS aşısı 26 valanlı olup 1, 1.2, 2, 3, 5, 6, 11, 12, 14, 18, 19, 22, 24, 28, 29, 33, 43, 59, 75, 76, 77, 89, 92, 94, 101 ve 114 *emm* tiplerini içermektedir. Sonuç olarak izolatların *emm* tiplerinin %74'ü 26 valanlı aşı suşunda bulunmaktadır. Çok merkezli çalışmalarla Türkiye'de sık rastlanan *emm* tiplerinin belirlenmesi ülkemiz için etkin aşının hazırlanmasına katkıda bulunacaktır.

Anahtar kelimeler: *Streptococcus pyogenes*, *emm* genotiplendirme

KLİNİK ÖRNEKLERDE *STREPTOCOCCUS PYOGENES* ARANMASI: YENİ BİR REAL-TIME PCR UYGULAMASI

Kurtuluş Buruk, Gülçin Bayramoğlu, Rukiye İşlek, Neşe Kaklıkkaya, İlknur Tosun, Faruk Aydın
Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.

Klinik örneklerde *Streptococcus pyogenes*'in hızlı ve doğru tanısı, hem hastanın hızlı tedavisi hem de gereksiz antibiyotik kullanımını önlemektedir. Konvansiyonel *S.pyogenes* tanısı 2 günlük bir süreci kapsamaktadır. Real-time PCR çeşitli enfeksiyon etkenlerinin tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte *S.pyogenes* tanısında kullanılan moleküler bazlı çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada, *S.pyogenes*'in tanısında kullanılabilecek, laboratuvar içi valide bir real-time PCR (RtPCR) dizaynı planlanmıştır. RtPCR için *speB* geni kullanılmış; primerler ve floresan işaretli prob konsantrasyonları optimize edilmiştir. DNA izolasyonu kaynatma yöntemiyle yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak *S.pyogenes* ATCC19615 suşunun çeşitli sulandırılmaları kullanılmıştır. Ayrıca 12 bakteri ve 1 maya türü standart suşları kullanılarak testin özgüllüğü araştırılmıştır. Testin klinik suşlardaki geçerliliğini gözlemek amacıyla klasik yöntemlerle *S.pyogenes* olarak tanımlanmış ve -20°C'de saklanmış 37 suş ile 36 pozitif ve 30 negatif boğaz sürüntü örneği çalışmaya alınmıştır. Her örnek iki kere çalışılmıştır.

S.pyogenes speB RtPCR ile pozitif kontrol suşunun sulandırılmaları test edildiğinde saptama alt sınırı 2 bakteri olarak belirlenmiştir. *S.pyogenes* dışı standart suşların tamamı bu yöntemle negatif olarak bulunmuştur. Saklamalardaki pozitif 37 suşun sonucu konvansiyonel yöntemle uyumlu şekilde pozitif olarak belirlenmiştir. Konvansiyonel yöntemlerle pozitif veya negatif olarak tanımlanan 66 örneğin sonuçları ise tabloda sunulmuştur. Konvansiyonel yöntemle pozitif olarak belirlenen örneklerdeki 7 negatiflik, ve 4 negatif örnekte karşılaşılan pozitiflik geriye dönük kültür şansı olmadığı için doğrulanamamıştır. Sonuç olarak, duyarlılık ve özgüllüğü %80'in üzerinde olan yaklaşık 2.5 saatte sonuç alınabilen hassas bir RtPCR yöntemi geliştirilmiştir. Geriye dönük ekim işleminin gerçekleştirileceği ve internal kontrolü olan yeni metodoloji ile, *speB* RtPCR'ın ileri validasyonunun yapılmasına devam edilmektedir.

Anahtar kelimeler: *Streptococcus pyogenes*, real-time PCR

Tablo. Boğaz sürüntü örneklerinde *speB* RtPCR ve konvansiyonel yöntemin karşılaştırılması.

		Konvansiyonel Yöntem		
		Pozitif	Negatif	
RT-PCR	Pozitif	29	4	PPV %87.9
	Negatif	7	26	NPV %78.8
		Duyarlılık %80.5	Özgüllük %86.6	

BÖLGEMİZDE İZOLE EDİLEN *BRUCELLA* SUŞLARININ KONVANSİYONEL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANIMLANMASI VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIĞININ BELİRLENMESİ

Mehmet Parlak¹, Hüseyin Güdücüoğlu², Yasemin Bayram², Aytekin Çıkman³, Selçuk Kılıç⁴, Mustafa Berktaş²

¹Van Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Van.

²Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van.

³Erzincan Üniversitesi, Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Erzincan.

⁴Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Bakteriye Zoonozlar Referans Laboratuvarı, Ankara.

Bu çalışmada, bölgemizde izole edilen brucella suşlarının konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle tanımlanması ve tedavide kullanılan temel ilaçlara ek olarak tigesiklin ve azitromisin için antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi amaçlandı. Ocak 2009-Haziran 2011 tarihleri arasında laboratuvarımızda izole edilen 75 *Brucella* suşu çalışmaya dâhil edildi. Tüm suşların CO₂ gereksinimi, H₂S üretimi, tiyonin ve bazik fuksinli besiyerlerinde üreme, üreaz aktivitesi, faj duyarlılığının tespiti, monospesifik A ve M antiserumları ile aglütinasyon özelliklerine göre konvansiyonel tiplendirme yapıldı. Moleküler tiplendirme için iki aşamalı bir yöntem kullanıldı. İlk olarak *Brucella* genusundaki altı türün ayırımına yönelik olarak *Brucella* multipleks PCR kiti (FC Biotek Code: 0301, Türkiye), *B. melitensis* olarak tanımlanan örnekler için ise *B. melitensis* biyovar tiplendirme PCR kiti (FC-Biotek, Code: 0302, Türkiye) kullanıldı. Tüm suşların antibiyotik duyarlılıkları E-test ile belirlendi. Konvansiyonel biyotiplendirme sonucunda suşların 73'ü *B. melitensis* biyovar 3, diğer ikisi *B. abortus* biyovar 3 olarak belirlendi. *B. melitensis* suşlarının moleküler olarak tiplendirme sonuçlarında *B. melitensis* biyovar 2 olarak saptandı. Antimikrobiyal duyarlılık testinde MİK50 ve MİK90 sonuçlarına göre doksisisiklin en etkili antibiyotik olarak bulundu. MİK90 sonuçlarına göre doksisisiklinden sonra sırasıyla tigesiklin, trimetoprim-sülfametoksazol ve siprofloksasin en etkili bulundu. En yüksek MİK50 ve MİK90 değerine sırasıyla azitromisin, rifampisin ve streptomisin sahip olduğu görüldü. Sonuç olarak, *B. melitensis* biyovar tayinine yönelik moleküler yöntemin konvansiyonel biyotiplendirme ile uyumlu olmadığı görülmektedir. Bruselloz tedavisinde doksisisiklin, rifampisin ve streptomisin gibi temel ilaçların etkin olduğu bulunmuş; tigesiklinin, bruselloz tedavisine alternatif bir ilaç olabileceği, ancak azitromisinin, yüksek direnç oranı ile tedavide uygun bir ajan olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik duyarlılık, biyotiplendirme, *Brucella*, E-test

BURKHOLDERIA CEPACIA SUŞLARININ PULSED-FIELD JEL ELEKTROFOREZ (PFGE) İLE MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ

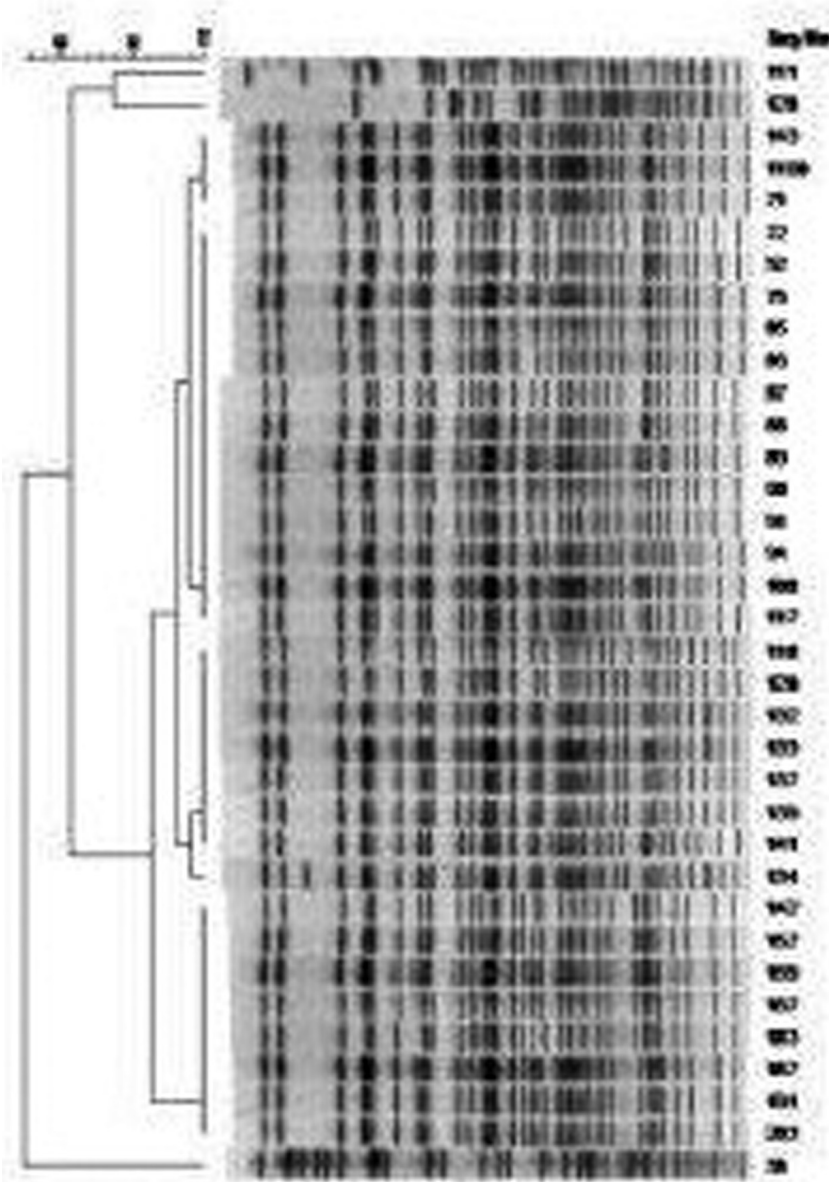
Nebahat Aydoğan¹, Mehmet Bayraktar², Özlem Ünal¹, Alper Karagöz¹, Rıza Durmaz¹

¹Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara.

²Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Şanlıurfa.

Burkholderia cepacia, son yıllarda yoğun bakım ünitelerinde ölümcül enfeksiyonlara neden olan önemli bir patojendir. Bağışık yanıt sistemi baskılanmış veya kistik fibrozisli hastalarda; sepsis, menenjit, pnömoni, akciğer absesi gibi enfeksiyonlara yol açarak yaşamı ciddi bir şekilde etkilemektedir. Bu çalışmanın amacı; hastane enfeksiyonu etkeni olarak üretilen *B.cepacia* suşlarının, pulsed-field jel elektroforez (PFGE) metodu ile değerlendirilerek hastalar arasındaki bulaşın yaygınlığını ortaya koymaktır. 2011 yılında Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde yatan hastalarından izole edilen 35 *B.cepacia* suşu, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı'nda incelenmiştir. Toplam 35 suşun arasından 7 genotip belirlenmiş; dört küme ve üç özgül profil bulunmuştur (Şekil). Otuz iki suş, dört küme içinde değişiklik göstermiştir. Her bir küme birbiriyle bir bant farkıyla ayrılmaktadır. Kümeleşme oranı %91.4 (32/35) olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, hastane ortamında çapraz bulaş sonrasında *B.cepacia* salgınlarının olabileceği mutlaka düşünülmelidir. Ülkemizde halen farklı hastaneler ve ünitelerde *B.cepacia* salgınları bildirilmektedir. Önemli hastane enfeksiyonu etkeni olan bu suşların genotipik profillerinin belirlenmesi, kontrol için önemli katkılar sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Pulsed-field jel elektroforez (PFGE), *Burkholderia cepacia*, hastane enfeksiyonu



Şekil. *Burkholderia cepacia* suşlarının PFGE profili (n=35).

KLİNİK *BACTEROIDES FRAGILIS* KÖKENLERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMU VE QUORUM SENSİNG GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Burak Aksu¹, Gülgün Boşgelmez Tınaz², Nurver Toprak Ülger¹, Güner Söyletir¹

Marmara Üniversitesi ¹Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; ²Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı, İstanbul.

Gram-negatif bakteriler, konağı enfekte etmek ve hastalık oluşturmak için patojeniteye katkıda bulunan bir seri virülans faktörü üretirler. Virülans faktörlerinin üretimini koordine etmek için ise küçük, difüze olabilen N-açıl homoserin lakton türevi sinyal molekülleri üreterek, birbirleriyle haberleşirler. Quorum-sensing (QS) olarak adlandırılan bu olay, bakteriye kendi hücre popülasyon yoğunluğunu izleme ve buna bağlı olarak davranışlarını düzenleme olanağı verir. İlk defa bir balık patojeni olan *Vibrio fischeri*'de tanımlanan bu sistemin, daha sonra birçok gram-negatif patojen tarafından; biyoluminesans, antibiyotik biyosentezi, konjugasyon, virülans faktörlerinin üretimi ve biyofilm oluşumu gibi çeşitli fizyolojik işlemlerde kullanıldığı keşfedilmiştir. Gram-negatif aerob bakterilerdeki QS sistemi çok detaylı çalışılmasına rağmen anaerob bakterilerde QS çalışmaları yok denecek kadar azdır. Anaerob bakteriler normal vücut florasının önemli bir kısmını oluşturur ve fırsatçı enfeksiyonlara yol açabilirler. Klinik örneklerden izole edilen anaerob bakteriler arasında *Bacteroides fragilis* birinci sırada yer almaktadır. Bu bakterinin sıklıkla izole edilmesi bir takım virülans faktörlerine sahip olmasına bağlanmıştır; diğer bir önemi ise antibiyotiklere artan oranda direnç geliştirmesidir. Çalışmamızda, 55 klinik *B. fragilis* izolatında QS genleri ve biyofilm oluşumu araştırılmıştır. Bu amaçla 9 muhtemel *luxR* homologu gen bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır. Ayrıca izolatların *Pseudomonas aeruginosa* kültür supernatanı varlığında biyofilm üretimindeki farklılıkları incelenmiştir. Tüm izolatlarda *luxR* homologu gen bölgeleri saptanmış ve *P. aeruginosa* supernatanı varlığında biyofilm üretiminde anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p=0.0000001$). Sonuçlarımız, aerob bakterilerde önemli bir virülans faktörü olan biyofilm üretimi ve QS sisteminin *B. fragilis*'de de varlığını göstermektedir. Verilerimiz bu grup bakterilerde yapılacak benzer çalışmalara temel oluşturacaktır.

Anahtar kelimeler: *Bacteroides fragilis*, biyofilm, quorum-sensing

HASTANEDE YATAN İSHALLİ HASTALARDA BAĞIRSAK FLORASININ İNCELENMESİ VE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* TOKSİNİNİN ARAŞTIRILMASI

Hande Kostul¹, Nuran Delialioğlu¹, Elif Şahin Horasan², Gürol Emekdaş¹, Candan Öztürk¹, Necdet Kuyucu³

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Tıbbi Mikrobiyoloji AD; ²Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD; ³Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Mersin.

Clostridium difficile antibiyotikle ilişkili ishal ve pseudomembranöz kolitin en önemli etkenidir. Buna toksin A/B oluşturan suşlar sebep olmaktadır. Bu çalışmada, hastanede yatan ve ishal gelişen hastaların bağırsak florasının incelenmesi ve dışkıda *C.difficile* toksin A/B varlığının araştırılması amaçlandı. Çalışmaya, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na Eylül 2010 - Ekim 2011 tarihleri arasında farklı kliniklerde yatan ve ishal gelişen hastalardan gönderilen toplam 158 dışkı örneği alındı. Örneklerin makroskopik, mikroskopik incelemeleri ve *Salmonella* ve *Shigella* yönünden bakteriyolojik kültürleri yapıldı. *C.difficile* toksin A/B, ELFA [Enzyme Linked Fluorescent Immunoassay; Vidas, Biomerieux, Fransa] yöntemiyle çalışıldı. *C.difficile* toksin A/B yönünden incelenen 158 dışkı örneğinin 18 (%11.4)'ünde toksin A/B pozitif olarak tespit edildi. Bunların 16 (%88.8)'sı çocuk ve ikisi (%11.2) yetişkin hastalara ait örneklerdi. Toksin pozitif olan 18 hastanın dışkı kültürlerinde normal flora elemanlarının ürediği saptandı. Mikroskobik olarak 5 (%27.7) hastada eritrosit ve lökosit görüldü. *C.difficile* toksin A/B pozitif bulunan hastaların kullandığı antibiyotiklere bakıldığında 5'inin penisilin grubu, 3'ünün sefalosporin grubu, 3'ünün karbapenem, 2'sinin beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü, birinin penisilin-sefalosporin ve birinin sefalosporin-karbapenem kombinasyonu aldığı tespit edildi. Sonuç olarak, hastanede yatan ishallerde %11.4 oranında *C.difficile* toksin A/B pozitifliği tespit edildi. Bu hastaların büyük bir kısmının penisilin, sefalosporin veya karbapenem grubu antibiyotik aldığı belirlendi. Hastanede yatan ishallerde *C.difficile* toksin araştırılmasının tanı ve tedavi açısından gerekli olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik kullanımı, *C.difficile* toksin A/B, ishal

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİNDE BAKTERİYEL MENENJİT ETKENLERİNİN DAĞILIMI VE PREVALANSI

Bilge Gültepe, Hüseyin Güdücüoğlu, Yasemin Bayram, Mustafa Berktaş

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van.

Menenjit hızlı tanı ve erken tedavi yapılması gereken, morbiditesi ve mortalitesi yüksek bir enfeksiyon hastalığıdır. Menenjitlerin çoğunda tedavi etiyoloji bilinmeden başlanmaktadır. Ampirik antimikrobiyal tedavi seçimi coğrafi bölgedeki yaygın olan patojenlere, hastanın yaşına ve o bölgedeki patojenlerin antibiyotik duyarlılıklarına göre yapılmaktadır.

Çalışmamızda çeşitli kliniklerden menenjit ön tanısı ile gönderilen toplam 100 BOS örneğinde bakteriyel menenjit etkenleri Speed-Oligo Bacterial Meningitis Test (Vir-cell, Spain) yöntemi ile araştırılmıştır. Bu yöntem ile, dört örnekten *S.pneumoniae* ve bir örnekten *N.meningitidis* izole edilmiş; *H.influenzae* ise belirlenmemiştir. Menenjit hastalarında uygun ve yeterli antimikrobiyal tedavi için öncelikle etkenin belirlenmesi gerekmektedir. PCR gibi moleküler yöntemlerle etkenlerin erken saptanması mümkün olmaktadır. Ortamda bulunan inhibitörler, kontaminant maddeler ve DNA izolasyonundan kaynaklanan hatalar ile yöntemin standardize olmaması gibi nedenlerden kaynaklanan yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlara rağmen moleküler yöntemlerin önemini koruduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Bakteriyel menenjit, Speed-Oligo bacterial meningitis test, prevalans*

VANKOMİSİNE DİRENÇLİ ENTEROKOKLARDA TÜR VE DİRENÇ GENLERİNİN (*vanA*, *vanB* ve *vanC-1*) MULTİPLEKS PCR YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI

Fatma Filiz Arı¹, Ayşegül Çopur Çiçek², Zeynep Çizmeci³, Dilek Güldemir¹, Pervin Özlem Balcı⁴, Rıza Durmaz¹

¹Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı, Ankara.

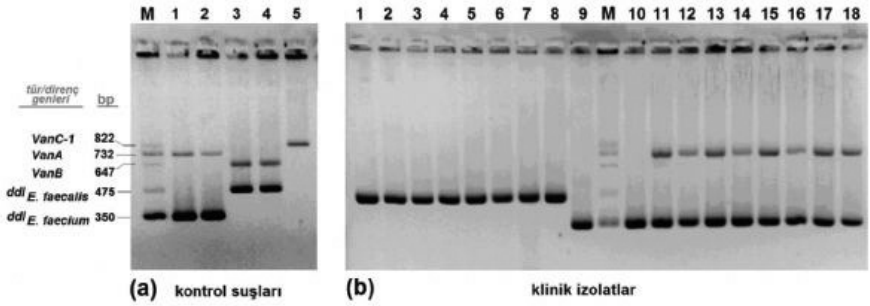
²Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Rize.

³Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

⁴Tokat Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Tokat.

Nozokomiyal enfeksiyon etkenlerinden olan vankomisine dirençli enterokok (VRE)'lerin tedavisi ciddi sorun oluşturmaktadır. Enterokok türlerinin sebep olduğu klinik olguların %95'ini oluşturan *E.faecium* ve *E.faecalis*'te *vanA* ve *vanB* direnci; daha az görülen *E.gallinorum*'da ise *vanC-1* direnci yaygındır. Günümüzde, VRE'lerin tanısında zaman alıcı ve pahalı konvansiyonel yöntemlerin yerini moleküler teknikler almaktadır. Bu çalışmanın amacı, ülkemizde sıklıkla görülen enterokok türleri ve direnç tiplerinin hızlı tanısında kullanılabilecek bir multipleks PCR protokolünün geliştirilmesidir. Çalışmada, *E.faecium*, *E.faecalis* ve *E.gallinorum* (*vanC-1*), *vanA* ve *vanB* sekanslarını tanıyan 5 ayrı primer çifti, *Taq* DNA polimeraz ve PCR tamponu içeren multipleks PCR miksi ile kaynatma yöntemiyle elde edilen kontrol suşlarına ait DNA'lar, belli oranlarda karıştırıldıktan sonra örnekler amplifiye edildi ve PCR ürünleri %3'lük *nusieve* agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Kontrol DNA'lar ile yapılan deneylerde, multipleks miks içeriği ve PCR koşulları bir enterokok izolatının tür ve direnç genlerini tek reaksiyonda amplifiye edecek şekilde optimize edildi (Şekil 1a). Geliştirilen multipleks PCR ile 44 klinik izolat analiz edildi (Şekil 1b). Çalışmamızda, konvansiyonel testler ve multipleks PCR sonuçlarının son derece uyumlu olduğu görüldü. Multipleks PCR ile duyarlı *E.faecium* (n=8) ve *E.faecalis* (n=2) izolatları %100 doğrulukla saptanırken, 34 *vanA* dirençli *E.faecium* izolatının yalnızca birinde *vanA* geni saptanamadı (%97). Sonuç olarak, çok sayıda klinik izolatın *E. faecium*, *E. faecalis* ve *E. gallinorum* türlerinden hangisi olduğunu ve ayrıca direnç tiplerini bir gün içerisinde tespit edebilen ve yüksek duyarlılık gösteren bu PCR protokolünün tarama çalışmalarında ve özellikle salgın durumunda zaman kazandıracağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Enterococcus faecalis*, multipleks PCR, *vanA*, *vanB*, *vanC*, vankomisin dirençli enterokok



Şekil 1. Multipleks PCR optimizasyonu ve klinik enterokok izolatlarına ait analiz sonuçları. **(A)** Kontrol suşları: 1 ve 2, *E. faecium* (vanA); 3 ve 4, *E. faecalis* (vanB); 5, *E. gallinarum* (vanC-1). **(B)** Klinik izolatlar: 1-8, *E. faecalis* (duyarlı); 9 ve 10, *E. faecium* (duyarlı); 11-18, *E. faecium* (vanA). **M:** DNA belirteçleri.

ANKARA İLİNDEKİ ÇEŞİTLİ HASTANELERDEN İZOLE EDİLEN *A.BAUMANNII* SUŞLARI ARASINDAKİ KLONAL İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hünkar Şahin¹, Ali Kudret Adiloğlu¹, Ufuk Önde¹, Ayşe Esra Karakoç¹, Ziya Cibali Açıkgöz⁴, Cemal Bulut², Ümmü Gül Erdem³

S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, ¹Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı;

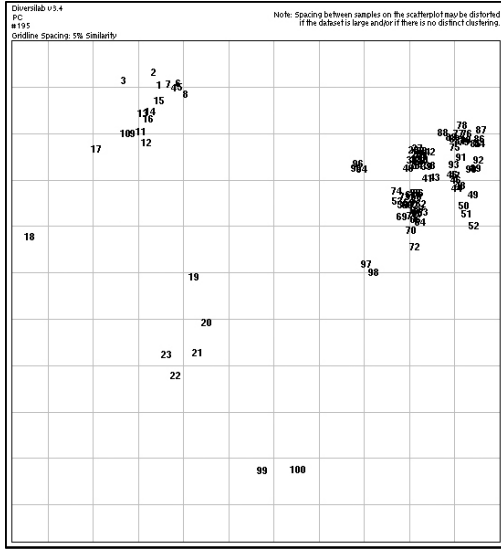
²Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

³S.B. Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

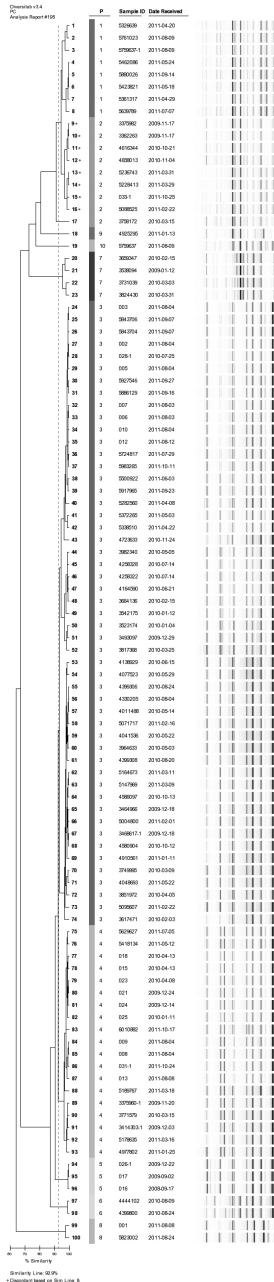
⁴S.B. Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Bu çalışmaya Eylül 2008-Ekim 2011 tarihleri arasında S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, S.B. Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve S.B.Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesinden izole edilen toplam 100 *A.baumannii* suşu alınmış olup bu suşların yarı otomatize repetitif PCR (Diversilab®) yöntemiyle genotiplendirilmesi ve klonal ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen izolatların DNA ekstraksiyonu, amplifikasyonu ve genotiplendirilmesi firmanın önerileri doğrultusunda yarı otomatize repetitif PCR (Diversilab®) yöntemiyle gerçekleştirildi. Değerlendirme için benzerlik hesabı yapılmasında Diversilab yazılımı Pearson korelasyonu ile rep-PCR profilleri otomatik olarak karşılaştırıldı. Verilerin analizinde her bir izolat için jel benzeri görüntü, yüzde benzerlik oranları, dendogram ve scatterplot raporları oluşturuldu (Şekil 1). Tüm suşlar benzerlik oranlarına göre 1 den 10'a kadar klonlara ayrıldı (Şekil 2). Klon içerisindeki benzerlikler %95 ve üstü idi. En çok suş kapsayan 3. ve 4. klonlar (3. klonda 51 ve 4. klonda 19 suş) arasındaki benzerlikler %92.9 idi (Dendogramda yanında işaret olanlar). İlk 4 klonda (1, 2, 3 ve 4. klonlar) sadece bir bant farkı bulunmakta idi. Diğer klonlar arasındaki benzerlikler ise %63-92.9 arasındaydı. Çalışmamızda 3. ve 4. gruplarda bulunan suşların hem hastanemizden izole edilen suşlar hem de diğer hastanelerden izole edilen suşları da kapsamı nedeniyle, Ankara'da çalışmaya alınan hastaneler arasında çapraz bulaş olduğu söylenebilir. Bunun nedenlerinin; hastaneler arasında özellikle yoğun bakımda yatan hastaların hem hastane içi hem de hastaneler arası transferlerinin etkili olduğu, ünite içi yayılımın ise, çalışan personelin uyması gereken üniversal güvenlik kurallarına riayet etmemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *A.baumannii*, klonal ilişki, rep-PCR



Şekil 1. Tüm suşların genotipleme sonrası oluşturulan scatterplot grafiği.



Şekil 2. Tüm klonlara ait dendrogram.

KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN GRAM NEGATİF BAKTERİLER VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI

Olca Özçolpan, Semra Kurutepe, Hörü Gazi, Vesile Tuba Balaban Eraz
Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Manisa.

Kan dolaşımı enfeksiyonlarında etkenlerin dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları yıllar içinde değişmektedir. Diğer yandan bu enfeksiyonların yüksek morbidite ve mortaliteye sahip olduğu iyi bilinmektedir. Belirli aralıklarla kan kültürlerinden izole edilen bakterilerin duyarlılık profillerinin belirlenmesi, ampirik tedavi protokollerinin oluşturulmasında ve hasta prognozu açısından önem taşımaktadır. Bu çalışmada, Ekim 2011-Nisan 2012 tarihleri arasında hastanemizde yatarak tedavi gören hastalara ait kan kültürü örneklerinden izole edilen gram-negatif mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Kan kültürü için BACTEC 9050 (Becton-Dickinson) sistemi kullanılmıştır. Mikroorganizmaların identifikasyonu konvansiyonel, yarı ve tam otomatize yöntemlerle yapılmış olup, antibiyotik duyarlılıkları CLSI önerilerine göre belirlenmiştir. Bu süre içerisinde 1013 kan kültürü örneği değerlendirilmiş olup, 297 bakteri izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerin 98 (%33)'i gram negatif, 199 (%67)'u gram-pozitif olarak değerlendirilmiştir. En sık izole edilen gram-negatif bakteri *Acinetobacter* spp. olup (%30.6), onu sırasıyla *Klebsiella pneumoniae* (%23.5), *Escherichia coli* (%23.5), *Pseudomonas* spp. (%11.2), *Brucella* spp. (%3.1), *Serratia marcescens* (%2) ve *Stenotrophomonas maltophilia* (%2) izlemiştir. *Acinetobacter* spp.'nin en duyarlı olduğu antibiyotikler kolistin ve amikasin; *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli*'nin en duyarlı olduğu antibiyotikler ise aminoglikozidler ve sefoperazon-sulbaktam olarak belirlenmiştir. *Pseudomonas* spp.'de ise direnç oranları genel olarak düşük olmakla birlikte, amikasin ve tazobaktam/piperasilin en etkili antibiyotikler olarak saptanmıştır. Sonuç olarak, özellikle *Klebsiella* türlerinde karbapenem direncinde saptanan görece artış nedeniyle, hastanemizde bu grup antibiyotiklerin gereksiz kullanımlarının kısıtlanması ve direnç oranlarının düzenli takibinin gerekli olduğu düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik, direnç, gram negatif bakteri, kan kültürü

YOĞUN BAKIM ÜNİTELERİNDE YATAN HASTALARIN ALT SOLUNUM YOLU ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN GRAM NEGATİF BAKTERİLER VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI

Vesile Tuba Balaban Eraz, Hörü Gazi, Semra Kurutepe, Olcay Özçolpan

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Manisa.

Alt solunum yolu enfeksiyonları, hastanelerde özellikle de yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) yatan hastalarda önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Nozokomiyal alt solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan mikroorganizmalar arasında gram-negatif bakteriler ön sıralarda yer almaktadırlar. Son yıllarda bu bakterilerde artan antibiyotik direnci tedavi sorunlarına neden olmaktadır. Bu çalışmada, Ekim 2011-Nisan 2012 tarihleri arasında Celal Bayar Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD Bakteriyojoloji Laboratuvarına, anestezi, cerrahi, nöroloji, dahili ve koroner yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan hastalardan gönderilen alt solunum yolu örneklerinin kültür ve antibiyogram sonuçları retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Belirlenen süre içerisinde laboratuvarımıza 237'ü endotrakeal aspirat, 27'si balgam, 11'i bronkoalveolar lavaj ve 5'i plevral mayi olmak üzere toplam 280 örnek gönderilmiştir. Üreyen bakterilerin tanımlanmasında konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemler, yarı ve tam otomatize tanı kitleri kullanılmıştır. Bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları CLSI önerileri doğrultusunda belirlenmiştir. Üreme saptanan 123 örneğin %93.8'inden gram-negatif, %6.2'sinden gram-pozitif bakteri izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen gram-negatif bakteriler sıklık sırasına göre *Acinetobacter* spp. (%50.4), *Pseudomonas* spp. (%31.7) *Stenotrophomonas maltophilia* (%5.6), *Klebsiella* spp. (%4), *Escherichia coli* (%3.2) ve *Serratia marcescens* (%3.2) olarak tanımlanmıştır. Non-fermentatif gram-negatif bakterilere kolistin ve amikasin, enterik gram-negatif bakterilere ise karbapenemler ve aminoglikozidler en etkili antibiyotikler olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, hastanemiz yoğun bakım ünitelerinde saptanan *Pseudomonas* spp. izolasyon ve antibiyotik direnç oranlarında izlenen görece artış nedeniyle hastane enfeksiyonu kontrol önlemlerinin önemine dikkat çekilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Alt solunum yolu, gram negatif bakteri, yoğun bakım ünitesi*

EGE BÖLGESİ'NDE İZOLE EDİLEN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* KÖKENLERİNİN SPOLİGOTİPLENDİRME YÖNTEMİYLE GENOTİPLENDİRİLMESİ

Fethiye Ferda Yılmaz Köz¹, Cengiz Çavuşoğlu², Hüseyin Taşlı¹, Mine Hoşgör Limoncu¹
Ege Üniversitesi ¹Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji AD; ²Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İzmir.

Tüberküloz epidemiyolojisinde kullanılan spoligotiplendirme, kromozomal DR lokusundaki polimorfizmin gösterilmesi temeline dayanan moleküler bir yöntemdir. Bu çalışmada Ege Bölgesi'nde çeşitli klinik örneklerden izole edilen 114 *Mycobacterium tuberculosis* kökeninin spoligotiplendirme yöntemi ile tiplendirilmesi amaçlandı. *M. tuberculosis* izolatlarının kaynatma ve sonikasyon yöntemiyle DNA ekstraksiyonu yapıldı. Elde edilen DNA'ların 36 bp'lik DR bölgeleri DR lokusunu hedef alan biotinle işaretlenmiş primerler kullanılarak PCR ile amplifiye edildi. Amplifikasyon sonrası PCR ürünü denatüre edildikten sonra, farklı *spacer* bölgelere komplementer 43 farklı sentetik *spacer* oligonükleotidin bağlı olduğu membranla hibridize edildi. Hibridizasyon sinyalleri kemilüminesan (ECL) kit kullanılarak X-Ray filmi yüzeyinde leke şeklinde görüntülendi. Sonuçlar Oktal kodlama anahtarı kullanılarak 0-7 arasında 15 rakamdan oluşan "Oktal kod" formatına çevrildi. Elde edilen veriler SpolDB4 veri tabanına girilerek kümeler ve aileler belirlendi. Spoligotiplendirme ile elde edilen klonal grup dağılımında; 97 kökenin (%85.1) 17 küme içerisinde yoğunlaştığı, 17 kökenin (%14.9) ise SpolDB4 veri bankasındaki suşlarla karşılaştırma sonucunda bilinen hiçbir kümeye uymayan *orphan* suşlar oldukları görüldü. En büyük kümenin 50 köken (%43.9) ile T1 kümesi olduğu, ikinci sıradaki LAM7 TUR ailesinin 10 köken (%8.8) içerdiği, H3 ailesinin 9 köken (%7.9) ile bu kümeleri takip ettiği görüldü. Ülkemiz, tüberküloz insidansının orta düzeyde olduğu ülkeler arasında yer almaktadır. Dünyada, *M. tuberculosis* suşlarının epidemiyolojisi ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmasına karşın, ülkemizde yapılan çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır. Bu çalışmadan elde edilen verilerin *M. tuberculosis* ile ilgili yeni çalışmalara ışık tutacağı ve ülkemizdeki tüberküloz epidemiyolojisinin karakterinin belirlenmesi için yararlı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis*, spoligotiplendirme, epidemiyoloji

ULUSAL TÜBERKÜLOZ REFERANS LABORATUVARI'NDA 2008-2010 YILLARI ARASINDA TESPİT EDİLEN ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİ *M. TUBERCULOSIS* SUŞLARINDA BEIJING GENOTİPİ

İsmail Ceyhan, Hülya Şimşek, Alper Karagöz, Nurhan Albayrak, Ahmet Arslantürk, Figen Sezen, Gülnur Tarhan, Rıza Durmaz

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı, Ankara.

Tüberküloz (TB) gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sağlık sorunudur. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotipi, dünyada tüm TB olgularının dörtte birinden fazlasına neden olan ve sıklıkla ilaç direnci ile ilişkili bir suştur. Bu çalışmada, 2008-2010 yılları arasında Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı (UTRL)'na ileri analiz için gönderilen çoklu ilaç dirençli (ÇİD) *M.tuberculosis* izolatlarının esas spoligotip ailelerini belirlemek ve Türkiye'nin farklı yerlerinden gönderilen ÇİD-TB olgularındaki Beijing genotipi sıklığını analiz etmek amaçlanmıştır. Akciğer tüberkülozuna ait toplam 51 ÇİD-TB izolatı; 2008-2010 yılları arasında dördü İstanbul, biri İzmir ve biri de Antalya olmak üzere 6 büyük TB laboratuvarından UTRL'ye gönderilmiştir. İzolatlar spoligotiplendirme ve 24 lokus MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable number of tandem repeat*) yöntemleri ile tiplendirilmiştir. Çalışılan 51 ÇİD-TB izolatı 16 farklı spoligotip paterni sergilemiştir. Bunlardan 49 izolatı içeren 14 küme olduğu, ikisinin tanımlanmış herhangi bir kümeye uymayan *orphan* olduğu tespit edilmiştir. T kümesi 21 izolatı (%41.1) içeren predominant kümeyi oluşturmaktadır. Bunu Latin Amerikan ve Mediterranean (14 izolat; %27.4), Haarlem (5 izolat; %9.8), Beijing (4 izolat; %7.8), X (2 izolat; %3.9), S (2 izolat; %3.9) ve U (1 izolat; %1.9) kümeleri izlemektedir. MIRU-VNTR sonuçlarının %19.6 kümelenme oranı sergilediği saptanmıştır. Bu ön çalışmanın sonuçları, %19.6'lık kümelenme oranı gösteren ÇİD-TB içerisinde Beijing genotipinin ülkemiz için önemli bir sorun oluşturmadığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis*, *Beijing genotipi*, spoligotiplendirme, MIR-VNTR

DİRENÇLİ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* İZOLATLARINDA SİPROFLOKSASİN DİRENCİNİN SAPTANMASINDA TETRAZOLYUM MORU VE RESAZURİN TESTLERİNİN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Emrah Ruh, Hamdiye Yeşim Öcal, Pınar Yurdakul, Zeynep Sarıbaş, Alpaslan Alp
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Antimikobakteriyel ajanlara karşı direncin hızlı saptanması, tüberküloz hastalarının tedavisi açısından çok önemlidir. Bu çalışmada tetrazolyum moru (TM) ve resazurin (RES) testlerinin *Mycobacterium tuberculosis* klinik izolatlarının hızlı tanımlanması ve siprofloksasin duyarlılıklarının belirlenmesindeki etkinliği değerlendirilmiştir. Bu amaçla, birinci sıra ilaçlardan en az birine dirençli olduğu belirlenmiş 30 *M.tuberculosis* klinik izolatına, siprofloksasin duyarlılığının test edilmesi amacıyla TM ve RES testleri ile birlikte altın standart orantı (proporsiyon) yöntemi uygulanmıştır. İnkübe edilmekte olan test tüplerine TM ve RES 5, 7, 10 ve 12. günlerde eklenmiş ve testler dört set olacak şekilde yapılmıştır. TM testinde sarıdan koyu mora her türlü renk değişikliği mikobakteriyel üreme olarak değerlendirilmiştir. RES testi için ise maviden pembeye herhangi bir renk değişikliği bakteriyel üreme olarak kaydedilmiştir. Mikobakteriyel üreme ve direncin saptanması için gerekli süre, 30 *M.tuberculosis* klinik izolatının 25 tanesi için 7 gün olarak tespit edilmiştir. Ancak başlangıç inokulum miktarı düşük olan 5 izolat için mikobakteriyel üreme değeri 10 ve 12. günlerde saptanmıştır. Siprofloksasin içeren besiyerlerinde renk değişikliği gözlenmesi durumunda, bu izolatlar dirençli olarak kabul edilmiştir. Çalışma sonucunda, TM ve RES testleriyle uygulanan siprofloksasin duyarlılık testi sonuçları orantı yöntemi sonuçlarıyla tamamen uyumlu olarak bulunmuş ve bu testlerin *M.tuberculosis* klinik izolatlarının üreme ve siprofloksasin dirençlerinin belirlenmesi açısından pratik ve hızlı testler olarak kullanım alanı bulabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis*, resazurin, siprofloksasin, tetrazolyum moru

HATAY İLİNDE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* SUŞLARININ SPOLİGOTİPLENDİRME YÖNTEMLERİ İLE GENOTİPLENDİRİLMESİ

Erkan Yula¹, Melek İnci¹, Ülkü Oral Zeytinli², Ayşe Karacalı², Fatih Köksal²

¹Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Hatay.

²Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Adana.

Mycobacterium tuberculosis kompleksi üyelerinin neden olduğu akciğer ve akciğer dışı enfeksiyonlar önemini giderek artırmaktadır. Özellikle düşük sosyoekonomik düzey, kötü hijyen ve kalabalık yaşam koşullarının tüberküloz insidansını artırdığı bildirilmektedir. Tüberkülozun toplum içerisindeki yayılımı, endemi ve epidemileri, reenfeksiyon ve reaktivasyon ayırımı moleküler bazlı epidemiyolojik yöntemlerle izlem altına alınabilmektedir. Bu çalışmanın amacı, Hatay ilindeki hastalardan izole edilen *M.tuberculosis* suşlarının moleküler düzeyde tiplendirilmesidir. Çalışmaya, Hatay ilinde 2010 ve 2011 yıllarında tüberküloz ön tanılı hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen 19 *M.tuberculosis* suşu dahil edildi. Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına pulmoner ve ekstrapulmoner tüberküloz ön tanısı konan hastalardan gönderilen örnekler BacT/ALERT MP (BioMérieux, Fransa) şişelerine ekildi ve tanımlamada BacT/ALERT 3D (BioMérieux, Fransa) sistemi kullanıldı. Aynı zamanda Löwenstein-Jensen (BioMérieux, Fransa) besiyerine ekim yapılarak 37°C'de 6-8 hafta inkübe edildi. Üreme saptanan suşlardan nitrat, niasin ve katalaz testleri pozitif olanlar ve parabenzoik asitli besiyerinde üremeyenler *M.tuberculosis* olarak tanımlandı. Genotip tespiti Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji bölümünce gerçekleştirildi. Sıvı besiyerinden bakteriyel DNA, Mickle doku parçalayıcısı ile izole edildi. *M.tuberculosis* kompleksi içinde yer alan izolatların genotipik özellikleri spoligotiplendirme yöntemi ile araştırıldı. Çalışmaya dahil edilen 19 *M.tuberculosis* izolatının spoligotiplendirme metodu ile tiplendirilmesi sonucu X3 genotipi 2 suшта, LAM7 TUR genotipi 5 suшта, T1 genotipi 7 suшта, T3 genotipi 3 suшта, H3 genotipi 2 suшта tespit edildi. Sonuç olarak bölgemize ait egemen suşun T1 ailesine ait suşlar olduğu, bunu ikinci sırada LAM7 TUR ailesinin izlediği belirlendi.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis*, MIRU-VNTR, spoligotiplendirme, Hatay

ÇUKUROVA BÖLGESİNDE MIRU-VNTR VE SPOLİGOTİPLENDİRME YÖNTEMLERİ İLE BELİRLENEN İLK *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BEIJING SUŞLARI

Ülkü Oral Zeytinli¹, Erkan Yula², Özlem Aycan Kaya³, Ayşe Karacalı¹, Fatih Köksal¹

¹Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Adana.

²Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Hatay.

³Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji AD, Hatay

Beijing genotipine sahip *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının çoklu ilaç direncine sahip oldukları ve prevalanslarının dünya çapında giderek arttığı bildirilmiştir. Bu çalışmanın amacı, Çukurova bölgesinde 2010 yılına kadar Beijing familyasına ait suş bulunmayıp sadece Şanlıurfa'da tespit edilirken, Aralık 2011'den sonra Çukurova bölgesinde de bu suşun yayılmaya başladığını bildirmektir. Çalışmaya Mersin, Adana, Osmaniye, Kahramanmaraş, Hatay, Şanlıurfa ve Gaziantep illerinden Tüberküloz Dispanseri ve Göğüs Hastalıkları gibi çeşitli birimlerden gönderilen 623 suş dahil edildi. Pulmoner tüberkülozlu hastalardan BACTEC MGIT 960 TB sıvı kültür yöntemi ile izole edilen suşların genomik DNA'sı, Mickle doku parçalayıcısı ile elde edilerek spoligotiplendirme ve 12 lokus MIRU-VNTR yöntemlerinin kombinasyonları ile araştırıldı. Beijing genotipine ait suşların rifampisin direnci ise BACTEC MGIT 960 TB sıvı kültür yöntemi ile belirlendi. Çalışmaya dahil edilen tüm suşlar spoligotiplendirme metodu ile tiplendirildi. Toplam 623 suş arasında Beijing genotipi 8 (%1.28) suшта tespit edildi. Ocak 2007-Haziran 2010 arası tespit edilen 6 izolatin yalnızca tek bir ilde (Şanlıurfa) olduğu bulundu. Bu tarihler arasında Çukurova bölgesinde Beijing genotipi tespit edilmezken, Aralık 2011 tarihinden sonra izole edilen iki Beijing genotipi *M.tuberculosis* suşu Adana ilinden izole edilmiştir. Adana ilinde izole edilen Beijing suşlarından bir tanesi rifampisine dirençli bulunurken, diğer suş rifampisine duyarlı bulunmuştur. Sonuç olarak bazı çoklu ilaç dirençli suşların (Beijing genotipi) ülkemize güneydoğu illerimize komşu Irak ve Suriye ile artan sınırlar arası hareketlilik ve göç dalgaları ile gelmiş olabileceğini ve Çukurova bölgesinden de yakın illere muhtemel geçişlerin olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: *Beijing genotipi, Mycobacterium tuberculosis, spoligotiplendirme, MIRU-VNTR, Çukurova*

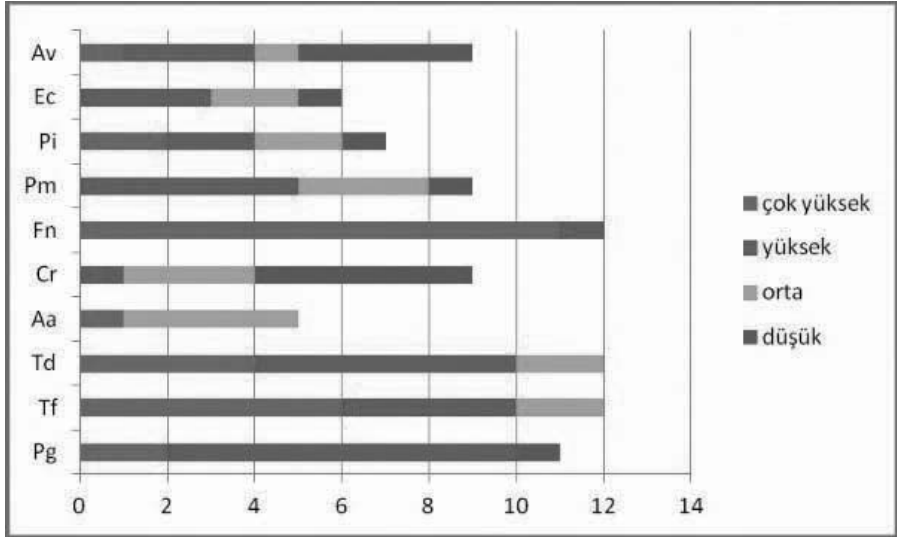
PERİ-İMLANTİTİS ETKENLERİNİN 16S rRNA BAZLI BİR MİKROARRAY TEKNİĞİ İLE İNCELENMESİ: RETROSPEKTİF ÇALIŞMA

Nursen Topcuoğlu, Selin Yıldız, Güven Külekçi

İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Mikrobiyoloji Bilim Dalı, İstanbul.

Son yıllarda yaygınlık kazanan diş implant uygulamaları ile ilgili enfeksiyonlar, genellikle osseointegrasyon tamamlandıktan sonra görülürler. Hem yumuşak hem sert dokuyu etkileyen enfeksiyona peri-implantitis denir. Peri-implantitiste etken olan ağız mikroorganizmalarının tanıları zor ve zaman alıcı anaerob teknikler gerektirdiğinden, günümüzde kolay, hızlı ve güvenilir moleküler teknikler tanıda ön plana çıkmıştır. Bu çalışma ile laboratuvarımıza Aralık 2009-Temmuz 2011 tarihleri arasında peri-implantitis tanısı ile gönderilen submukozal örneklerin periodontal patojenler için geliştirilen bir mikroarray sistemi ile analiz sonuçlarının geriye dönük olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. On iki submukozal biyofilm örneği ParoCheck®10 mikroarray sistemi ile incelenmiştir. Bu sisteme göre, bakterilerin 16SrRNA gen parçasını kodlayan oldukça konserve bir primer ile çoğaltıldığı PCR sonrası oluşan florofor (Cy5) etiketli tek iplikli DNA parçaları, çip üzerine fikse edilmiş 10 periodontal bakteri türüne özel tamamlayıcı dizilere hibridize edilmiştir. Bağlanmış etiketli proplar monokromatik ışıkla stimülasyonla özel bir mikroarray tarayıcıda saptanmış ve sonuçlar ParoCheck® analiz yazılımı ile negatif, düşük, orta, yüksek ve çok yüksek olarak değerlendirilmiştir. Ortalama cep derinliği 5 mm olan örnek alınan bölgelerin tümünde sondalamada kanama bulunmaktadır. Örneklerin tümünde *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* ve *Fusobacterium nucleatum*; 11'inde (%92) *Porphyromonas gingivalis*; dokuzunda (%75) *Camphylobacter rectus*, *Parvimonas micra* ve *Actinomyces viscosus*; yedisinde (%58) *Prevotella intermedia*; altısında (%50) *Eikenella corrodens* ve beşinde (%42) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pozitif bulunmuştur. Bakterilerin düzeylerine göre dağılımı şekilde gösterilmiştir. Rutin laboratuvar sonuçlarının bildirilmesi kanıta dayalı antibakteriyel ya da antiinflamatuvar tedavi protokollerinin geliştirilebilmesine katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Mikroarray, peri-implantitis, anaerob bakteri



Şekil. Örneklerde bulunan bakterilerin düzeylerine göre dağılımı.

Av: *Actinomyces viscosus*; **Ec:** *Eikenella corrodens*; **Pi:** *Prevotella intermedia*; **Pm:** *Parvimonas micra*; **Fn:** *Fusobacterium nucleatum*; **Cr:** *Camphylobacter rectus*; **Aa:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; **Td:** *Treponema denticola*; **Tf:** *Tannerella forsythia*; **Pg:** *Porphyromonas gingivalis*.

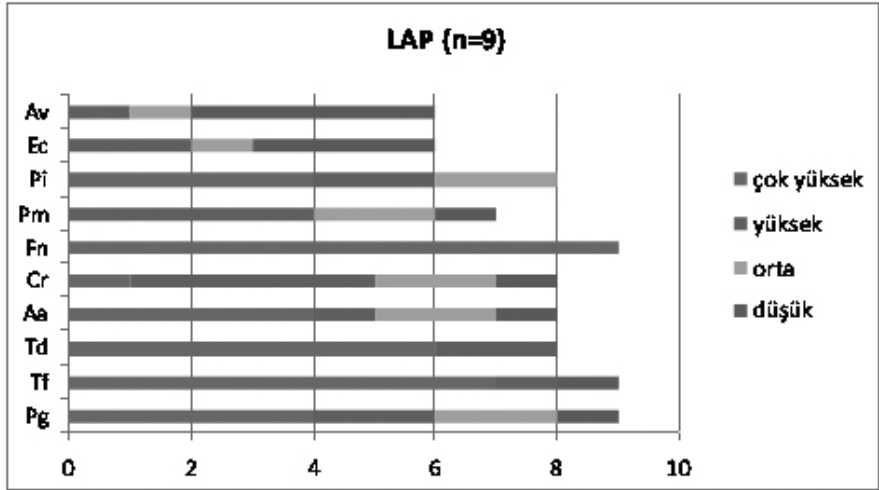
AGRESİF PERİODONTİTİSİN FARKLI TİPLERİNDE PERİODONTAL PATOJENLERİN DAĞILIMININ MİKROARRAY TEKNİĞİ İLE İNCELENMESİ

Nursen Topcuoğlu, Selin Yıldız, Güven Külekçi

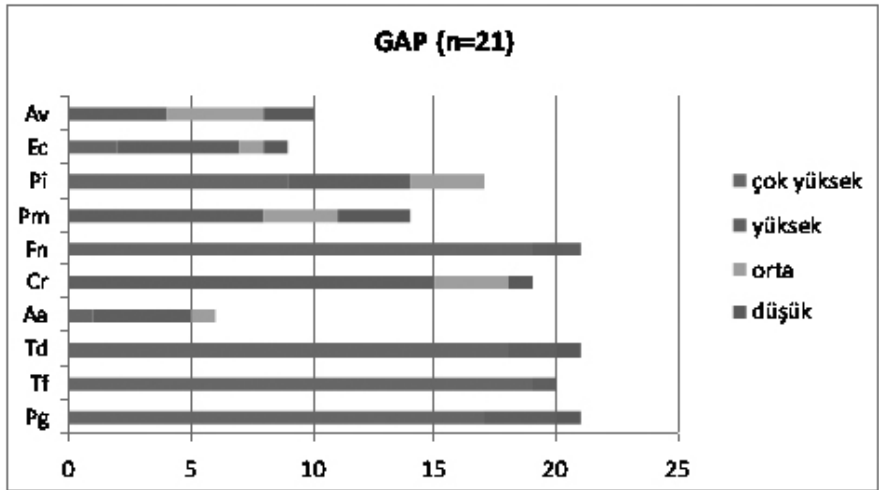
İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Mikrobiyoloji Bilim Dalı, İstanbul.

Agresif periodontitis genellikle erken yaşlarda klinik olarak belirti veren, hızlı ilerleyen ve şiddetli seyreden bir grup periodontitis olarak tanımlanabilir. Farklı klinik özelliklerine göre lokalize agresif periodontitis (LAP) ve generalize agresif periodontitis (GAP) olarak iki tipe ayrılır. Antibiyotik tedavisinin gerekliliğine karar vermek ve tedaviye yanıtı izlemek için mikrobiyolojik inceleme esastır. Bu çalışma ile laboratuvarımıza Ağustos 2009-Mart 2012 tarihleri arasında agresif periodontitis tanısı ile gönderilen subgingival biyofilm örneklerinin periodontal patojenler için geliştirilen bir mikroarray sistemi ile analiz sonuçlarının geriye dönük olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Klinik olarak 21'i GAP ve dokuzu LAP tanısı konulmuş hastalardan alınan toplam 30 subgingival biyofilm örneğinde 10 periodontal patojenin varlığı ve düzeyleri ParoCheck®10 mikroarray sistemi ile incelenmiştir. İncelenen örneklerin tümünde *Porphyromonas gingivalis* ve *Fusobacterium nucleatum* belirlenmiş; GAP örneklerinin birisi hariç tüm örneklerde *Tannerella forsythia*; LAP örneklerinden birisi hariç tüm örneklerde *Treponema denticola* pozitif bulunmuştur. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, GAP örneklerinin sadece %29'unda bulunmuşken; tedavi sonrası örnek alınan bir hasta hariç LAP örneklerinin tümünde pozitif bulunmuştur. Bakterilerin düzeylerine göre dağılımları Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir. Klinik tanı ile uyumlu sonuçlar veren bu mikroarray sistemi, periodontal örneklerin incelenmesinde kolay, hızlı ve güvenilir bir teknik olarak diğer testlere alternatif olarak kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: *Agresif periodontitis, mikroarray, periodontal patojen*



Şekil 1. Lokalize agresif periodontitiste bakteri düzeyleri



Şekil 2. Generalize agresif periodontitiste bakteri düzeyleri

Av: *Actinomyces viscosus*; **Ec:** *Eikenella corrodens*; **Pi:** *Prevotella intermedia*; **Pm:** *Parvimonas micra*; **Fn:** *Fusobacterium nucleatum*; **Cr:** *Camphylobacter rectus*; **Aa:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; **Td:** *Treponema denticola*; **Tf:** *Tannerella forsythia*; **Pg:** *Porphyromonas gingivalis*.

YÜKSEK BOR TOLERANSINA SAHİP BİR *STAPHYLOCCUS AUREUS* SUŞUNUN İZOLASYONU VE FİLOGENETİK ANALİZİ

Bekir Çöl¹, Merve Sezer¹, Esra Dibek¹, Hatice Güneş¹, Ahmet Arslantürk²

¹*Muğla Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Lab, Muğla.*

²*Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Tüberküloz Referans Lab, Ankara.*

Staphylococcus aureus birçok patojenik etkiye sahip, başlıca hastane enfeksiyonu kaynaklarından olan, gram-pozitif bir bakteridir. Ayrıca, *Staphylococcus* cinsine ait bakteriler, tüm dünyada rastlanan ve toprakta bulunan mikroorganizmalardır. Hastane kaynaklı *S.aureus* üzerinde özellikle enfeksiyon ve antibiyotik direnci açısından birçok çalışma yapılmıştır. Tedavi zorluğuna neden olan, bu direnç fenotiplerinin detaylı moleküler nedenleri sorgulanmakta ve bunun için uygun model bakteriler kullanılmakta ve yenileri araştırılmaktadır. Bu çalışmada, bor madenlerinden toplanan örneklerden bor toleransı yüksek bakterilerin izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu sırasında, elde edilen suşlardan bir tanesi, *S.aureus* türü olarak karşımıza çıkmıştır. Borik asit ile zenginleştirme yöntemi ile yapılan izolasyon sonrası, saf koloniler elde edilmiş, genomik DNA izolasyonu ve PCR sonucunda 16SrRNA geni çoğaltılmıştır. Sekanslama ve BlastN analizi sonucu, bu genin dizisinin, *S.aureus* türünün gen dizisine %99 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen izolatın bor toleransı, birkaç teknikle belirlenmiş ve bakterinin 150 mM borik asit içeren besiyerinde ürettiği gözlenmiştir. Karşılaştırma amacıyla *S.aureus* ATCC 6538 suşu üzerinde bor tolerans belirleme deneyleri yapılmış ve 25 mM borik asit içeren besiyerinde üreme görülürken, 50 mM ve daha fazla borik asit içeren ortamda hiçbir üreme görülmemiştir. Dolayısıyla, yeni elde edilen ve 16SrRNA gen sekansına dayalı olarak tanımlanması ve filogenetik analizi yapılan izolat, 6 kat daha fazla miktarda bor'a direnç gösterebilmektedir. Bu izolat, direnç fenotipine neden olan genlerin bulunması ve yeni moleküler mekanizmaların aydınlatılması için, birçok çalışmada kullanılabilecek, uygun bir model organizma adaydır.

Anahtar kelimeler: *Staphylococcus aureus*, 16SrRNA geni, bor, direnç

ACEP BOR MADENİNDEN İZOLE EDİLEN BOR TOLERANSI YÜKSEK BAZI BAKTERİLERİN 16S rRNA GEN SEKANS ANALİZİ İLE TANIMLANMASI

Bekir Çöl¹, Ramazan Karakaya¹, Aslı Tanrıseven¹, Nihan Akgüç¹, Ahmet Arslantürk²

¹*Muğla Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Lab, Muğla.*

²*Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Tüberküloz Referans Lab, Ankara*

Dünya bor rezervlerinin %72'si ülkemizde bulunmaktadır. Bor'un kullanıldığı birçok alan vardır; ancak canlılar üzerine olan etkisi hakkında yapılan çalışmalar göreceli olarak yetersizdir. Son zamanlarda yapılan çalışmaların sonuçlarına göre, bor'un önemi daha da artmıştır. Örneğin bor, bazı kanserli hücrelerin büyümesini inhibe etmektedir; ancak detaylı moleküler mekanizmalar henüz açığa kavuşturulmamıştır. Bunun kısmen nedeni, bor ile ilgili moleküler biyoloji çalışmalarının insan hücrelerinde yapılmasının zor olması ve zaman almasıdır. Bu konudaki bir yaklaşım, başka organizmaları, örneğin bakterileri kullanarak, bor'un hücre işlevleri üzerindeki etkisini araştırmaktır. Bu açıdan uygun bakterilerin bulunması gerekmektedir. Bu çalışmada, Acep Bor madeni ve çevresinden toplanan bor'ca zengin toprak örneklerinden bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bor tolerans değerlerinin belirlenmesini takiben, 200 mM borik asit toleransına sahip olan üç adet izolat elde edilmiştir. Bu isolatların tür ve en azından cins düzeyinden tanımlanmalarının yapılabilmesi için, 16SrRNA gen sekansları belirlenmiştir. Bu isolatların gen dizilerinin BlastN analizine göre, *Acinetobacter lwoffii*, *Pseudomonas plecoglossicida-putida* ve *Pseudomonas stutzerii* türlerine yüksek benzerlik gösterdikleri bulunmuştur. Ayrıca, bu isolatların 16SrRNA gen sekansına dayalı filogenetik ağaçları oluşturularak, söz konusu bakterilerin bor biyolojisi çalışmalarında alabilecekleri roller tartışılmıştır. Bu isolatların en yakın türünün bilinmesi, hem bor'lu ortamlardaki bakteri çeşitliliğinin anlaşılması, hem de bor ve bakteri ilişkisinin mikrobiyolojik, biyokimyasal ve moleküler yönden incelenmesi açısından oldukça önemlidir.

Anahtar kelimeler: *Bor, tolerans, Acinetobacter, Pseudomonas, 16SrDNA*

TAVUK KÖKENLİ *SALMONELLA INFANTIS* SUŞLARINDA ATİPİK RİBOPRİNT PROFİLLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Özlem Şahan, Hamit Kaan Müştak, Ebru Torun, Yörük Divanoğlu, Mehmet Akan, Kadir Serdar Diker

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Salmonella Infantis Türkiye’de tavukçuluk endüstrisinde gittikçe artan bir öneme sahip olmaktadır. Bu nedenle enfeksiyon epidemiyolojisinin ayrıntılı olarak incelenmesi gerekmektedir. Çalışmada, kanatlı kümeslerinden ISO 6579 standartlarına göre izole edilen ve cins/tip spesifik antiserum seti ile serogruplandırılan *S. Infantis* suşları kullanıldı. İncelenen 15 *S. Infantis* suşunun ribozomal operon *PvuII* enzim kesimi ile tanımlanmasında RiboPrint kütüphanesinde kayıtlı 4 kalıp ile 0.85’in altında benzerlik gösterdiği belirlendi. Bu çalışmada, 15 suşun enzimatik kesim profillerinin kendi aralarındaki benzerlik oranları ve olası ribogrupları incelendi. Onbeş *S. Infantis* suşunun tekrarlanan serotiplendirmesinde “6,7,14:r:1,5” antijenik formülüne sahip olduğu kesinleştirildi. Bu suşlar, RiboPrint kütüphanesindeki QC_PVUII-103 örneği ile 0.84-0.60, DUP_PVUII-2133 örneği ile 0.84-0.61, DUP_PVUII-1071 örneği ile 0.84-0.77, DUP_PVUII-1072 örneği ile 0.84-0.52 arasında benzerlik gösterdi. İncelenen *S. Infantis* suşlarının kendi içinde yapılan benzerlik analizinde, 5 suşun diğerlerine 0.85’in altında benzerlik gösterdiği belirlendi. Bunların içinden en düşük benzerlik oranını 0.46-0.58 ile bir suş gösterdi. Eşsiz profil gösteren 5 suş kendi aralarında 0.12-0.20 benzerlik düzeyinde ilişkili bulundu. Bunların dışında kalan 10 suşun iki temel profilden birine girdiği anlaşıldı. Sonuçlar, RiboPrint’in *S. Infantis* ayırımını doğru olarak gerçekleştirdiğini ve önceden belirlenmiş *S. Infantis* kalıplarına ek olarak Türkiye’de etçi tavuk popülasyonunda olası 7 *S. Infantis* profilinin bulunduğunu gösterdi. Popülasyonda çok sayıda farklı *S. Infantis* ribotipinin bulunması, bu parametrenin epidemiyolojik kaynak analizinde kullanılabileceğini gösterdi.

Anahtar kelimeler: *Ribotip, Salmonella Infantis, tavuk*

SALMONELLA İZOLATLARININ *SALMONELLA ENTERITIDIS* – SPESİFİK PCR VE SEROGRUPLANDIRMA SONUÇLARI

Zafer Ata¹, Serpil Kahya², Evren Erköse¹, Seran Temelli¹, Ayşegül Eyigör¹, Kamil Tayfun Carlı²

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, ¹Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü;

²Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

Bu çalışmada, laboratuvarımızda 2000-2011 yılları arasında sürdürülmüş olan bazı çalışmalardan izole edilmiş olan kanatlı (13 tavuk dışkı, 3 tavuk kloakal sürüntü, 1 karga barsak, 3 civciv barsak, 1 tavuk göz, 6 *drag swab*), kanatlı eti (18 tavuk kanat, 6 bütün piliç, 11 tavuk pizola, 3 piliç baget, 8 hindi boyun, 1 hindi but, 3 hindi kuşbaşı, 1 hindi jambon) ve yumurta (8 yumurta iç, 5 yumurta kabuk) orijinli toplam 91 adet Salmonella izolatının Salmonella Enteritidis-spesifik PCR (SE-PCR) sonuçları ile seroagruplandırma sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Toplam 27 kanatlı izolatının 15'i (%55.6) SE-PCR ile pozitif ve seroagruplandırmada tümü O:9 (D1) ve bir izolat hariç tümü H antijeni G kompleks olarak bulunmuştur. 38 tavuk eti izolatının 8'i (%21.1) SE-PCR ile pozitif ve seroagruplandırmada O:9 (D1), H antijeni G kompleks olarak saptanmıştır. 13 hindi eti izolatının 2'si (%15.4) SE-PCR pozitif bulunmuş olup, izolatlardan biri serogrup O:4 (B) ve H antijeni negatif, diğeri ise O:9 (D1), H antijeni G kompleks olarak saptanmıştır. 13 yumurta izolatından 10'u (%76.9) SE-PCR pozitif ve O:9 (D1), H antijeni G kompleks olarak belirlenmiştir. Bir hindi eti izolatının SE-PCR pozitif olmasına rağmen farklı bir serogrup olarak belirlenmesi, izolatın halen saf olmamasından ya da SE-PCR'in özgüllüğünün yetersizliğinden kaynaklanabileceği olasılıklarından yola çıkarak, SE-PCR negatif olarak bulunan bazı izolatlar rastgele seçilmiş ve seroagruplandırmaları yapılmıştır. Test edilen izolatların bir yumurta izolatı hariç hiçbirinin O:9 seroagrubunda olmadıkları saptanmıştır. Sonuçlar SE-PCR'ın S.Enteritidis taramasında genel olarak etkin olabileceğini göstermekle beraber seroagruplandırma sonrasında serotiplendirme işlemleri tamamlandığında daha etkin olarak değerlendirilebilecektir.

Anahtar kelimeler: *Salmonella Enteritidis, PCR, serotiplendirme*

DAMIZLIK TAVUK KÜMESLERİNDE *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* (MG) VE *MYCOPLASMA SYNOVIA* TEŞHİSİ İÇİN LIGHT CYCLER SYBR GREEN I REAL-TIME PCR VE MG-ELISA

Zafer Ata¹, Seran Kahya², Evren Erköse¹, Seran Temelli¹, Ayşegül Eyigör¹, Kamil Tayfun Carlı²

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, ¹Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü; ²Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

Bu çalışmada, *Mycoplasma gallisepticum* (MG) teşhisi için, 13 farklı firmanın, 77 adet damızlık kümesindeki tavuklardan alınan 1953 adet kan ve *Mycoplasma synoviae* (MS) teşhisi için de, 5 firmanın 32 damızlık kümesindeki 935 tavuktan alınan trakeal sürüntü örnekleri, LightCycler SYBR Green I real-time PCR (LC SG I rPCR; Roche, ABD) ve MG-ELISA (Nobilis, Intervet International B.V. Hollanda) yöntemleri ile çalışılmıştır. Kanların, ELISA testi için serumları ayrılmış ve trakeal sürüntü örnekleri, 4'lü ya da 5'li havuz oluşturularak real-time PCR (rPCR) için DNA ekstraksiyonları QIAMP DNA mini kit (QIAGEN, Almanya) ile yapılmıştır. rPCR sonuçlarına göre, kümes bazında, MG için %23.4 (18/77) ve MS için %6.3 (2/32) pozitiflik bulunurken, %68.8 (53/77) oranında kümeste ELISA ile MG-seropozitif bulunmuştur. Örnek bazında değerlendirildiğinde; 444 adet MG-PCR'dan 76 adedi (%17.1), 204 adet MS-PCR'dan 12 adedi (%5.9) ve 1953 adet MG-ELISA testinden 469 adedi (%24) pozitif bulunmuştur. Çalışma sonunda MG enfeksiyonu için ELISA ile taranarak seropozitif bulunan kanatlı sürülerinde, seropozitifliğin doğrulanması için LC SG I rPCR yöntemi uygun olarak bulunmuş ve rPCR yöntemi ile MS enfeksiyonu prevalansının da yüksek olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Mycoplasma gallisepticum*, gerçek zamanlı PCR, tavuk

YUMURTACI IRK TAVUK KÜMESİ *DRAG SWAB* NUMUNELERİNDE *SALMONELLA* ARANMASINDA ISO 6579 YÖNTEMİ, LIGHT CYCLER REAL-TIME POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (LC-RPCR) VE DUPONT BAX Q7-RPCR SİSTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Serpil Kahya¹, Burcu Tuğ¹, Zafer Ata², Kamil Tayfun Carlı¹

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, ¹Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; ²Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Bursa.

Salmonella genusundaki bakterilerin oluşturduğu salmonellozlar, önemli zoonoz enfeksiyonlardan biridir. Bütün kanatlı yetiştirme tipleri için önemli olan bu hastalık, vertikal bulaşma özelliğine de sahip olduğundan, yumurtacı tavuklar için özel bir öneme sahiptir. Geliştirildiği 2000 yılından beri daha çok gıda kaynaklı örneklerde kullanılmış hazır kitlelere dayalı testlerden biri olan ve daha önce doğal kontamine kanatlı dışkı örneklerinden yayınlanmış bir çalışmaya rastlanılamayan Dupont Bax Q7 real-time polimeraz zincir reaksiyonu (rPCR) sistemi, tavuk *drag swab* örneklerinden *Salmonella* teşhisi için ilk kez çalışılmıştır. Aynı örnekler, daha önce tavuk dışkı örneklerinde başarıyla çalışılmış olan bakteriyolojik yöntem (ISO 6579/A1) ve SYBR Green I LightCycler rPCR (SG I LC rPCR) yöntemi ile de çalışılarak bütün yöntemlerin sonuçları karşılaştırılmıştır. Çalışılan *drag swab*'lar, *Salmonella* varlığı yönünden örnek bazında 174 *boot swab*'ın 11'i (%6.3), kümes temel alınarak değerlendirildiğinde ise 58 kümeden 4'ü (%6.9), ISO 6579, SG I LC rPCR ve Bax Q7 rPCR yöntemleri ile *Salmonella* pozitif olarak bulunmuştur. Karşılaştırmalı çalışmamızın sonucunda, *Salmonella* tespitinde Dupont Bax Q7 sisteminin, daha önce çalıştığımız ISO 6579/A1 ve LC SG I rPCR sistemi kadar duyarlı olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Salmonella*, LC-rPCR, Dupont Bax Q7-rPCR, tavuk

HAYVANLARDAN İZOLE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI* SUŞLARINDA PLASMİD İLİŞKİLİ KİNOLON DİRENCİ

Hamit Kaan Müştak¹, Tuba İça², Alper Çiftci³, Kadir Serdar Diker¹

¹Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

²Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kütahya.

³Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun.

Hayvanlarda ve insanlarda çok çeşitli enfeksiyonlara neden olan *Escherichia coli*'lerde kinolon direnç gelişimine neden olan başlıca faktörler, kromozomal mutasyonlar ve plazmidler ile aktarılan direnç genleridir. Bu çalışmada, toplam 259 *E.coli* suşunun nalidiksik asit ve siprofloksasin direnci, agar dilüsyon yöntemi ile; plazmid ilişkili kinolon direnç belirleyicilerinden olan qnrA, qnrB ve qnrS genlerinin varlığı ise konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanılarak araştırıldı. Antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre; 94 tavuk *E.coli* suşundan 47 (%50)'si, 66 koyun *E.coli* suşundan 3 (%4.5)'ü, 52 sığır *E.coli* suşundan 5 (%9.6)'i ve 47 köpek *E.coli* suşundan 3 (%6.4)'ü siprofloksasine dirençli bulundu. Bu çalışmada araştırılan bütün plazmid ilişkili kinolon direnç belirleyicileri içerisinde, izole edilen 94 *E.coli* tavuk suşu arasında qnrA geni, sadece 5 (%5.3) tavuk izolatında saptandı. Bu çalışma, Türkiye'de *E.coli* hayvan izolatlarında plazmid ilişkili kinolon direncinin değerlendirildiği tek rapordur.

Anahtar kelimeler: *Escherichia coli*, hayvan, kinolon direnci, plazmid ilişkili

ANTİNÜKLEER ANTİKOR POZİTİF SERUMLARIN RETROSPEKTİF OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Yasemin Derya Gülseren, Mihriban Yücel, Ali Kudret Adiloğlu

S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

Bu çalışmada, 1.10.2011-11.04.2012 tarihleri arasında Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına kabul edilen 3872 antinükleer antikor (ANA) tetkik sonucu retrospektif olarak değerlendirilmiştir. ANA testi immüno Floresan antikor (IFA, Euroimmun) yöntemi ile HEP-2 ve maymun karaciğer dokuları kullanılarak 1/100 sulandırım ile çalışılmıştır. Hasta raporlarında boyanma paterni ve ışınma seviyesi birlikte rapor edilmiştir. ANA sonucu pozitif hataların yaş, cinsiyet, klinik, boyanma paterni ve ışınma seviyesi dağılımı yapılmıştır. Olguların 120 (%58)'si kadın, 86 (%41.7)'si erkek olup, yaş dağılımı; 11 (%5.3) 1.dekad, 27 (%13.1) 2.dekad, 30 (%14.6) 3.dekad, 54 (%26.2) 4.dekad, 51 (%24.8) 5.dekad, 16 (%7.8) 6.dekad, 7 (%3.4)'şer 7. ve 8. dekad ve 3 (%1.5) 9.dekad olarak tespit edilmiştir. ANA pozitif olguların 13 (%6.3)'ü çocuk hastalıkları, 73 (%35.4)'ü dahili birimler, 14 (%6.8)'ü cerrahi birimler, 57 (%27.7)'si dermatoloji, 24 (%11.7)'ü fizik tedavi, 19 (%9.2)'u nefroloji ve 6 (%2.9)'sı diğer (aile hekimliği, özürölüler polikliniği, vb) bölümlere başvuran hastalardır. ANA boyanma paternleri irdelendiğinde; 132 (%65)'sinin granüler, 24 (%11.7)'ünün homojen, 25 (%12.2)'inin nükleolar, 13 (%6.3)'ünün sentromer ve 6 (%2.9)'sının periferik paternde olduğu tespit edilmiştir. Işınma düzeyleri ise; 168 (%81.5) örnekte (+), 19 (%9.2) örnekte (++), 9 (%4.3) örnekte (+++) ve 6 (%2.9) örnekte (++++) olarak belirlenmiştir. Granüler paternde ANA pozitifliğinin insidansı 4. ve 5. dekadda diğer dekadlara göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). ANA testinde pozitif sonuç tek başına hastalık tanısı koymak için yeterli olmadığı gibi, negatif sonuç da hastalık tanısını ekarte ettirmemektedir. Yaşlı hastalarda, kronik enfeksiyon varlığında veya bazı ilaçların kullanıldığı durumlarda yalancı ANA pozitifliği gözlenebilmektedir. Bu nedenle ANA değerleri hastalığın klinik bulgularıyla beraber değerlendirilmelidir.

Anahtar kelimeler: ANA, immüno Floresan antikor, boyanma paterni

FRANCISELLA TULARENSIS ANTİKORLARI POZİTİF OLAN HASTA SERUM ÖRNEKLERİNDE BARTONELLA HENSELAE ANTİKORLARININ ARAŞTIRILMASI

Çağrı Ergin¹, Aynur Karadenizli², Müşerref Tatman Otkun³, Yüksel Akkaya¹, Özgün Kiriş Satılmış¹, Alper Akçalı³, Hüseyin Uzuner²

¹Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

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

³Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çanakkale.

Francisella tularensis ülkemizde son 70 yılda farklı bölgelerde salgınlar meydana getiren tularemi hastalığı etkenidir. Tulareminin endemik olduğu bölgelerde tüberküloz, bartonelloz, yersinyoz ve bruselloz ayırıcı tanıda değerlendirilmelidir. *F.tularensis* ve *Bartonella henselae* benzer vektörel geçiş ve coğrafi dağılım özelliği göstermektedir. Bartonelloz tanısında immünofluoresan antikor tekniğinde (IFAT) duyarlılık %14-100, özgüllük %0-100 arasında bildirilmektedir. Tularemi hastalarının serumlarında 20 yılı aşan süre ile antikor varlığının devam ettiği bilinmektedir. *F.tularensis* antikorları *Brucella*, *Bartonella* gibi α -proteobakterilerle çapraz reaksiyon vermektedir. Sunulan araştırmada tularemi seropozitif örneklerde *B.henselae* antikorlarının varlığı IFA tekniği ile araştırılmıştır. Araştırmaya 90 serum örneği (60 tularemi seropozitif, 30 seronegatif) alınmıştır. Tulareminin serolojik değerlendirmesi ticari antijen kullanılarak mikroaglutinasyon yöntemi ile; *B.henselae* serolojisi antijen olarak Vero hücrelerinde eş-kültür yapılan ATCC 49982 (Houston-1) kökeni kullanılarak IFAT ile araştırılmıştır. Çalışmaya alınan 60 tularemi seropozitif serum örneğinin 37'sinde (%61.7), 30 seronegatif serum örneğinin ise 2'sinde (%6.7) *B.henselae* antikorları saptanmıştır ($p<0.001$). Tularemi seropozitifliğinin titresindeki artış ile birlikte, saptanan *B.henselae* pozitifliği de artmaktadır ($r^2=0.317$). Elde edilen veriler *F.tularensis* antikorlarının varlığında IFA testi ile yüksek oranda *B.henselae* pozitifliği saptandığını göstermektedir. Endemik bölgelerde yapılacak bartonelloz taramalarında, aktif hastalık sonrasında tularemi seropozitifliğinin uzun süre saptanabildiği durumlarda veya sessiz tularemi enfeksiyonu varlığında, IFA yöntemi ile yapılacak *B.henselae* taramalarının yüksek oranda çapraz reaksiyon nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar verebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Anahtar kelimeler: *Francisella tularensis*, *Bartonella henselae*, çapraz reaksiyon, seroloji

DNA DİZİ ANALİZİ İLE TANIMLANAN *MUCOR CIRCINELLOIDES* KOLONİZASYONU OLGUSU

Merve Aydın¹, Özlem Güzel Tunçcan², Ayşe Kalkancı³, Dilek Arman², Semra Kuştimur³

¹*Erzincan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzincan.*

²*Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara.*

³*Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.*

Şubat 2011’de kolon kanseri tanısı alan 49 yaşındaki erkek hastada Kasım 2011’de pnömoni gelişmesi üzerine Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları servisine yatırılmıştır. Hastada Mart 2011’de Tip II diyabet gelişmesi nedeniyle insülin tedavisi başlanmıştır. Hasta en son Ekim 2011’de kemoterapi almıştır. Pnömoni sırasında gelişen diyare nedeniyle tedavisi siprofloksazin ve metronidazol olarak düzenlenmiştir. Hasta nötropenik olmayıp, kan sayımı 19.370 hücre/mm³ lökosit ve bunların %96’sı nötrofil olarak belirlenmiştir. Balgam ve gaita yaymasında yoğun şekilde hif saptanması, balgam ve gaita kültüründe küf üremesi nedeniyle amfoterisin B tedavisi başlanmıştır. Kanda galaktomannan antijeni negatif saptanmıştır. Balgam ve gaita kültüründe üretilen küf mantarı morfolojik olarak *Mucor* cinsi ile uyumlu bulunmuş, tür tanımı yapılamamıştır. Akciğer bilgisayarlı tomografisinde metastaz ile uyumlu, fungal enfeksiyonla uyumsuz lezyonlar saptanmıştır. Paranasal sinüs tomografisinde patoloji saptanmamıştır. Hastanın amfoterisin B tedavisinin 7. gününde alınan balgam kültüründe *Acinetobacter* üremiştir. Hastanın tedavisi imipenem ve kolistin olarak değiştirilmiş, hastada hipoksi gelişmesi ve şikayetlerinde artış nedeniyle elektif olarak entübe edilmiştir. Septik şok tablosu gelişen hastaya linezolid tedavisi eklenmiştir. Yatışının 21. gününde hasta kaybedilmiş, otopsi yapılamamıştır. Hastanın sistemik mukormikoz ile uyumlu olmaması nedeniyle *Mucor* ile yaygın kolonize olmuş olgu olarak kabul edilmiştir. Küf kolonisinin tür düzeyinde tanımlanması için DNA dizi analizi uygulanmıştır. Ribozomal DNA üzerindeki “Internal transcribed spacer” (ITS) bölgesi hedeflenmiş, ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak bölge çoğaltılmıştır. “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing” kiti ve ABI Prism 310 otomatik DNA dizi analizi cihazı kullanılmıştır. Diziler BLAST veri bankası ile karşılaştırıldığında DQ118990.1 kaydı ile %99 uyumluluk bulunmuştur. Küf mantarı *Mucor circinelloides* olarak isimlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Dizi analizi, ITS, immün süpresif hasta, *Mucor circinelloides*

KONTRASEPSİYON UYGULANAN KADINLARDA VULVOVAJİNA KANDİDOZU: ANTİFUNGAL DUYARLILIK SONUÇLARI VE VİRÜLANS ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRMASI

Ahmet Barış Güzel¹, Ümran Küçükğöz Güleç¹, Merve Aydın², Ramazan Gümral³, Ayşe Kalkancı⁴, Macit İlkit⁵

¹Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Adana.

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

³Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

⁴Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

⁵Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana.

Doğurganlığın istemli kontrolünü sağlayan kontrasepsiyon yöntemlerinin vulvovajina kandidozunu artırdığı yönünde bilgiler bulunmaktadır. Bu çalışmada, Mart-Haziran 2011 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı polikliniklerine başvuran ve çeşitli kontrasepsiyon yöntemleri kullanan 18-49 yaş arası 506 kadın, vulvovajina kandidozu varlığı yönünden muayene edilmiş ve elde edilen 129 *Candida* kökeni in vitro çalışmaya dahil edilmiştir. 127 *Candida* kökeni, CHROMagar *Candida* besiyeri, germ tüp testi, mısır unu agarda klamidospor oluşturma ve karbonhidrat asimilasyonu (ID20C, ID32C) kullanılarak tanımlanırken, *Kluyveromyces marxianus* ve *Pichia kudriavzeii* kökenleri DNA dizi analizi yöntemiyle tanımlanmıştır. *Candida albicans* kökenlerinin tür tanımlamaları hifal duvar proteini (HWP1) gen polimorfizmi ve özgül primerler (CR-f 5'-GCT ACC ACT TCA GAA TCA TCA TC-3' ve CR-r 5'-GCA CCT TCA GTC GTA GAG ACG-3') kullanılarak doğrulanmıştır. *C. albicans* kompleksi içinde *C. africana*, *C. stellatoidea* ve *C. dubliniensis* türleri saptanmamıştır. Hastalar akut vulvovajina kandidozu (AVVK), semptomatik rekürren vulvovajina kandidozu (sRVVK), asemptomatik rekürren vulvovajina kandidozu (asRVVK) ve kontrol grubu olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Antifungal duyarlılık testi için CLSI M27-A3 mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak flukonazol, itraconazol, ketokonazol, mikonazol, klotrimazol ve borik asit için MİK değerleri belirlenmiştir. Virülans faktörü olarak fosfolipaz, proteinaz ve hemolitik aktivite değerlendirilmiştir. AVVK ve RVVK'lı hastalardan izole edilen kökenlerin MİK değerleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır. AVVK ve RVVK'lı hastalardan izole edilen kökenler kontrol grubuyla karşılaştırıldığında proteinaz ve fosfolipaz üretimi önemli ölçüde yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). İmidazol grubu antifungaller, triazollere ve borik aside göre daha etkin bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: *Candida spp.*, kontrasepsiyon, vulvovajina kandidozu

ÇEVRESEL *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* TARAMALARINDA YENİ BİR BESİYERİ OLARAK *SOLANUM MELONGENA* (PATLICAN) İÇERİKLİ BESİYERİNİN PERFORMANSININ ARAŞTIRILMASI

Mustafa Şengül¹, Çağrı Ergin¹, Tuğba Kartal²

Pamukkale Üniversitesi, ¹Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; ²Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Denizli.

Cryptococcus neoformans'ın çevresel kolonizasyon odaklarının saptanmasında, enzim aktivitesine bağlı pigment oluşumunun gösterildiği seçici besiyerleri kullanılmaktadır. Bu amaçla doğal farklı melanin öncüsü kimyasalları içeren besiyerleri hazırlanmıştır. Sunulan çalışmada ülkemizde yaygın olarak yetişen *Solanum melongena* (patlıcan) bitkisiinden hazırlanan, çevresel örneklerden *C.neoformans*'ın hızlı ve kolay tanımlanmasına yönelik yeni bir besiyeri sunulmaktadır. Araştırmada ilk aşamada standart *C.neoformans* kökenlerinin *S.melongena* (SM) besiyerinde pigment oluşumu incelendi. İkinci aşamada, sürekli çevresel kolonizasyonun gösterildiği Gökova-Akyaka bölgesinden 19 *Eucalyptus camaldulensis* ağacından örnekleme yapıldı. Basit Staib agar (bSA), Pal agar, tütün agar ve SM agar besiyerine ekilen örnekler iki hafta süre ile oda ısısında inkübe edildi. Tüm besiyerlerinin içeriğine %0.4 kloramfenikol ve %0.5 bifenil ilave edildi. S koloni şeklinde, kahverengi pigment oluşturan koloniler, Gram boyama, Dalmau agar morfolojisi, 37°C'da üreme, üreaz aktivitesi ve kanavanin-glisin-brom timol agar reaksiyonu ile incelendi. SM agarda *C.neoformans*'ın kolaylıkla pigment oluşturduğu görüldü. Araştırmaya alınan 19 *E.camaldulensis* örneğinden bSA, Pal ve SM agar besiyerlerinde 11, tütün agar besiyerinde 10 *C.neoformans* izolasyonu yapıldı. Koloni sayısı ortancaları bSA, Pal agar, tütün agar ve SM agar için sırasıyla 34, 31, 36 ve 31 koloni/petri olarak bulunurken, en erken koloni oluşumu bSA, en geç koloni oluşumu SM agar besiyerlerinde gözlemlendi. Tüm besiyerlerinde saprofitik çevresel küf üremeleri baskılanamadı. Çevresel örneklerde *C.neoformans*'ın varlığının taranmasında, içeriği ticari olarak kolay bulunan, hızlı ve güvenilir tanımlama yapılabilen besiyerleri önemlidir. Bu çalışmada test edilen *S.melongena*'dan hazırlanan besiyerinin de bu çalışmalarda kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: *Cryptococcus neoformans*, *Solanum melongena*, kültür, pigment, patlıcan

DERMATOLOJİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN MAYALARIN FARKLI YÖNTEMLERLE TANIMLANMASI

Mine Aydın¹, Ayşe Demet Kaya¹, Gamze Erfan², Şule Kaya²

¹Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ

²Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı, Tekirdağ.

Dermatolojik örneklerden, dermatofitlerin yanı sıra maya türleri de izole edilmektedir. Maya izolatları farklı antifungal duyarlılık patenlerine sahip olduğundan tedavi başarısını yönlendirmede, izolatların tanımlanması önemlidir. Çalışmamızda dermatolojik örneklerinden izole edilen mayaların farklı yöntemlerle tanımlanması ve sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır. Dermatoloji polikliniğinden gönderilen deri ve tırnak örnekleri direkt mikroskopik olarak ve Sabouraud Dekstroz Agar (SDA, BD)'a ekilerek değerlendirilmiş, maya üremesi saptananlar ayrılmıştır. Tanımlama için izolatlar, geleneksel yöntemlerle birlikte, kromojenik besiyerlerinden CHROMagar ve BIGGY Agar (Salubris)'a ekim yapılarak 37°C'de 48-72 saatlik inkübasyondan sonra renklerine göre yorumlanmıştır. Standart suş olarak *C. albicans* (ATCC 90028), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) ve *C. krusei* (ATCC 6258) kullanılmıştır. Toplam 161 dermatolojik örneğin 18 (%11)'inden maya izole edilmiştir. Maya suşlarının izole edildiği örneklerden 12 (%67)'si deri, 6 (%33)'sı tırnaktır. Mayaların 4 (%22)'ü *C. glabrata*, 4 (%22)'ü *C. tropicalis*, 2 (%11)'si *C. albicans*, 2 (%11)'si *C. parapsilosis*, 2 (%11)'si *Saccaromyces cerevisiae*, 2 (%11)'si *Rhodotorula* spp., 1 (%6)'i *C. krusei* ve 1 (%6)'i *Trichosporon* spp. olarak tanımlanmıştır. Tanımlamada CHROMagar'ın özellikle *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* ve *C. krusei*'yi doğru tanımladığı, ancak diğer izolatların tanımlanmasında yarar sağlamadığı; BIGGY agarın ise tüm izolatlar için tanımlama özelliğinin sınırlı olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, dermatolojik örneklerde maya izolatlarının farklı cins ve türlerde olması ve *Candida* izolatları arasında da albicans dışı türlerin sıklığı göz önüne alındığında, tür düzeyinde tanımlamanın gerekli olduğu saptanmış ve kullanılacak kromojenik besiyerlerinin mutlaka referans bir yöntemle birlikte değerlendirilmesi gerektiği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Candida*, maya, tanımlama, kromojenik besiyer

İKİ FARKLI YÖNTEM KULLANILARAK GAITA ÖRNEKLERİNDE *DIENTAMOEBA FRAGILIS*'İN ARAŞTIRILMASI

Zeliha Gültür Yalçın¹, Ümit Aksoy², Engin Karakeçe¹

¹S.B. Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sakarya; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD, İzmir.

²Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD, İzmir.

Dientamoeba fragilis çeşitli gastrointestinal yakınmalara neden olan kalın barsak yerleşimli bir parazittir. Polimorfik trofozoit yapıda olması, kist formunun gösterilmemesi, bağırsak dışında hızla parçalanması, salin ve iodinli preparatlarda çekirdek yapısının görülebilmesi nedeniyle tanısında direkt bakı yeterli olmamakta ve parazit kolaylıkla gözden kaçmaktadır. *D. fragilis*'in *patognomonik* olan nükleus özellikleri, tek ya da çift oluşuyla ve merkezinde kümelenen 4-8 kromatin halinde olan parçalı karyozom yapısı ile kalıcı boyamalı preparatlarda izlenmektedir. Bu çalışmada, bağırsak pasajı dışında hızla bozulan bu parazitin tanısını, fiksatif solüsyon içindeki gaita örneğine uygulanan demir hematoksilen (FeH) boyama ve -20 derecede saklanan gaita örneklerine uygulanan konvansiyonel PCR yöntemleri ile gerçekleştirmek ve bu yöntemleri *D. fragilis*'in tanısı açısından karşılaştırmak amaçlanmıştır. Çalışmada, 292 diyareli hastanın sodyum asetat fiksatif (SAF) içine alınmış olan tüm gaita örneklerine FeH boyama yöntemi uygulanmıştır. Moleküler tanısı için de "small subunit ribozomal" DNA gen bölgesi çoğaltılmıştır. Tüm olgular arasında *D. fragilis* pozitifliği FeH boyama ile %16.4 (48/292) olup, PCR yöntemiyle %18.1 (53/292) sıklıkta *D. fragilis* saptanmıştır. FeH boyama yöntemi referans olarak alındığında, çalışmada kullanılan PCR yönteminin duyarlılığı %85.4, seçiciliği %95 olarak tespit edilmiştir. İki test arasındaki tutarlılık, (kappa değeri) 0.77'dir. Çalışma sonuçlarımız, direkt rutin incelemelerle saptanmasının güç olduğu *D. fragilis*'in tanısına önem verilmesi gerektiğini göstermiştir. Fiksatifli örneklerin boyanarak incelenmesi, hatta kronik diyareli ve immün yetmezlikli hastalarda PCR yönteminin kullanılması, gerçek parazit sıklığına ve parazit hakkında açığa çıkmamış bilgilere ulaşılmasını sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: *Dientamoeba fragilis*, fiksatif, demir hematoksilen, PCR, tanı

SALGIN ÖRNEKLERİNİN PARAZİTOLOJİK İNCELENMESİNDE MİKROSKOBİK, ANTİJEN TARAMA VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

Selma Uslu¹, Evren Eken¹, Ayşegül Taylan Özkan¹, Handan Kalaycıoğlu², Cahit Babür¹

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, ¹Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ulusal Paraziter Hastalıklar Referans Laboratuvarı; ²Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Daire Başkanlığı, Ankara.

Aralık 2011-Mart 2012 tarihlerinde Ankara, Amasya, Balıkesir, Burdur, Gümüşhane, İstanbul, Kırklareli, Niğde, Sakarya ve Tekirdağ İl Sağlık Müdürlükleri tarafından ishal salgınlarına ait dışkı örnekleri “paraziter etken saptanmadığı” beyanıyla yalnızca bakteriyo-lojik/virolojik tetkik talebiyle Kurumumuza gönderilmiştir. Bu kapsamda Salgın Koordina-törlüğünce laboratuvarımıza yönlendirilen 78 dışkı örneği, nativ-lugol, konsantrasyon ile mikroskopik; *Cryptosporidium/Giardia* direkt floresan antikor (DFA) (CeLLabs), *Entamo-eba histolytica* adezin antijeni ELISA (Wampole) ile immünolojik; ve *Entamoeba histoly-tica*, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* sp. ve *Dientamoeba fragilis* multipleks real-ti-me PCR (Aus diagnostic) ile moleküler yöntemlerle değerlendirilmiştir. Dışkı örneklerinin 40’ı kadın, 38’i erkek hastaya aittir. Herhangi bir yöntemle, olguların 15 (%19.2)’inde en az bir parazit saptanmış, bunların üçünde ise ikişer parazit (%3.9) bulunmuştur. Parazit saptananların sekizi kadın (%53.3), yedisi (%46.7) erkektir. Ayrıca altı hastada değişen yoğunluklarda lökosit görülmüş, bunların yalnızca birinde PCR yöntemi ile *G.intestinalis* belirlenmiştir. Saptanan parazitler arasında *Endolimax nana*, *Entamoeba coli*, *D.fragilis*, *Blastocystis hominis*, *E.histolytica*, *G.intestinalis*, *Ascaris lumbricoides* ve *Cryptospori-dium* spp. bulunmaktadır. *D.fragilis* yalnızca moleküler yöntemlerle tespit edilebilmiştir. *Cryptosporidium* spp, *G.intestinalis* ve *E.histolytica* da genellikle ya immünolojik ya da moleküler yöntemlerle saptanmıştır. Sonuç olarak, dışkı örneklerinin uygun koşullarda ve hızlı bir şekilde taşınmaması laboratuvar tanısını olumsuz yönde etkilemektedir. İshal salgınlarında parazitler etkenlerin de rol alabileceği göz ardı edilmemeli; özellikle ishal yakınması olan olgularda etiolojinin anlaşılabilmesi için moleküler incelemeler de dahil olmak üzere birden fazla yöntem birlikte kullanılmalıdır.

Anahtar kelimeler: *İshal, multipleks real-time PCR, parazit, salgın, tanı*

Tablo. Aralık 2011-Mart 2012 tarihleri arasında İl Sağlık Müdürlükleri tarafından gönderilen ishal salgınındaki olgulara ait dışkı örneklerinde saptanan parazitler.

Salgının görüldüğü il (gelen örnek sayısı)	Salgın tarihi	Parazit saptanan örnek sayısı	Tanımlanan etken(ler)	Tanı yöntemi
Ankara (3)	Aralık 2011	1	<i>Endolimax nana</i> + <i>Entamoeba coli</i>	Mikroskopi
Amasya (19)	Mart 2012	1	<i>D.fragilis</i>	PCR
Balıkesir (5)	Aralık 2011/ Mart 2012	1	<i>D.fragilis</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	PCR ve mikroskopi
Burdur (1)	Mart 2012	1	<i>E.histolytica</i>	ELISA
Gümüşhane (5)	Ocak 2012	1	<i>G.intestinalis</i>	PCR
İstanbul (3)	Şubat 2012	1	<i>E.histolytica</i>	PCR
Kırklareli (7)	Şubat 2012	0	-	-
Niğde (11)	Mart 2012	3	<i>E.histolytica</i> (n:2), <i>Ascaris lumbricoides</i> (n:1)	ELISA ve mikroskopi
Sakarya (13)	Şubat/Mart 2012	3	<i>G.intestinalis</i> (n:2), <i>Blastocystis hominis</i> (n:1)	DFA, PCR, mikroskopi
Tekirdağ (11)	Mart 2012	3	<i>G.intestinalis</i> , <i>D.fragilis</i> , <i>E.histolytica</i>	PCR

TÜRKİYE'DEKİ *PLASMODIUM VIVAX* İZOLATLARINDA MSP-1 GEN POLİMORFİZMİ

Fadile Yıldız Zeyrek¹, Shin Ichiro Tachibana², Fehmi Yüksel¹, Nebiye Doni¹, Nirianne Palacpac³, Nobuko Arisue³, Toshihiro Horii³, Cevayir Çoban⁴, Kazuyuki Tanabe²

¹Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa.

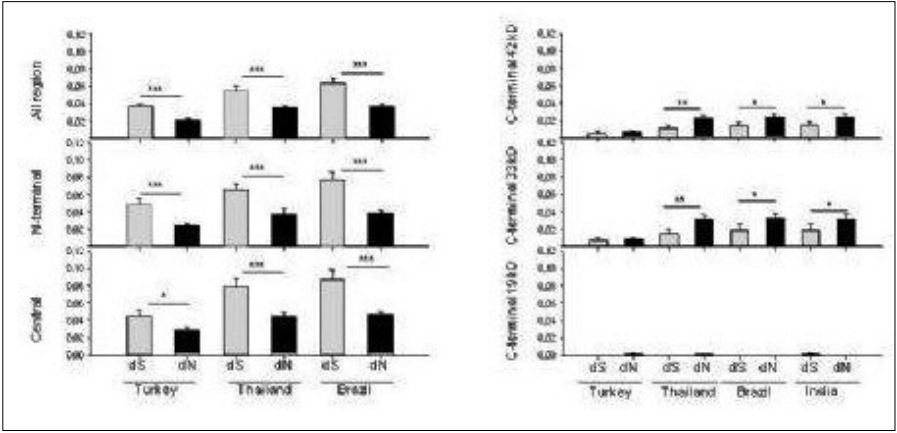
²Laboratory of Malarology, International Research Center of Infectious Diseases, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan.

³Department of Molecular Protozoology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan.

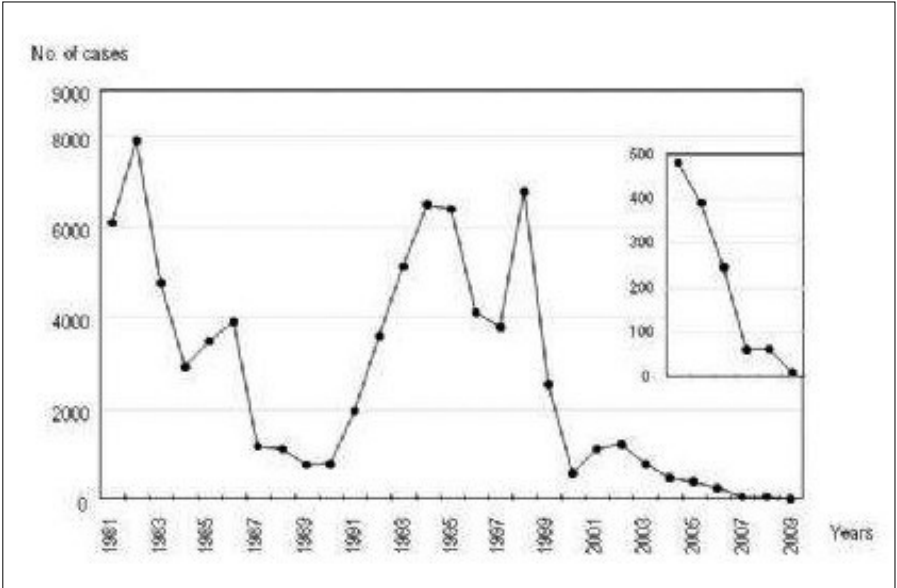
⁴Laboratory of Malaria Immunology, WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Japan.

Plasmodium vivax merozoit yüzey proteini (PvMSP-1), 200 kDa ağırlığında, merozoit yüzeyinden salgılanan ve vivax sıtmasına karşı en önemli kan evresi aşısı adaylarından biridir. Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde sıtma uzun yıllardan beri görülmekte ve etken olarak sadece *P.vivax* izole edilmektedir. Bu bölgede dolaşan suşlardaki polimorfizmi anlamak için elde edilen izolatların MSP-1 geninin tamamı (5.2-5.3 kb) ve dört mikrosatellit lokusu (MS8, MS9, MS15 ve 3.502) sekanslanarak, diğer coğrafik bölge suşlarıyla karşılaştırılmıştır. Türkiye ve diğer coğrafik bölgelerden elde edilen sekansların karşılaştırılmalı analizi sonucunda, Türkiye izolatlarında sınırlı polimorfizm olduğu görülmüştür (Şekil 1). Diğer coğrafik bölge örneklerinde 280. aminoasitte, Türkiye örneklerinde 162. aminoasitte tek nükleotid polimorfizmi (SNP) bulunmuştur. Tanımlanan sekiz yeni SNP'in sadece Türkiye izolatlarına özgü olduğu görülmüştür. Bu sekiz SNP arasında 1706, D/E değişikliği bir aşısı adayı moleküllü olan C-terminal 19-kDa polipeptid üzerinde olması ile oldukça kayda değerdir ve şu ana kadar bu polipeptid üzerinde bildirilen tek değişiklik olan 1709, K/E değişikliğinden farklıdır. PvMSP-1 poli-Q bölgesi oldukça polimorfik olan, *P.vivax* genetik çeşitliliğinin izlenmesinde kullanılan önemli bir moleküler göstergedir. Poli-Q polimorfizm analizine göre Türkiye suşlarının tamamının Belem subtipinde olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, PvMSP-1 ve mikrosatellit analizleri Türkiye'de *P.vivax* popülasyonunda ciddi anlamda düşük genetik çeşitlilik olduğunu ortaya çıkarmıştır. Veriler Türkiye'de son vivax parazit popülasyonunun bir darboğazda olduğunu göstermektedir. Bu çalışma ile ortaya çıkan parazit popülasyonundaki darboğazın, Türkiye'de yıllık sıtma insidansındaki dramatik azalma ile uyumlu olduğu görülmüştür (Şekil 2.). Bu durum, son yıllarda bölgede yapılan sıtma ile mücadelenin önemli bir sonuca ulaştığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: *Plasmodium vivax*, *Pvmsp1*, polimorfizm, Türkiye



Şekil 1. Sinonim (dS) ve sinonim olmayan (dN) mutasyonların oranı ve yerlerinin Türkiye, Tayland ve Brezilya örneklerinde karşılaştırılması (PvmSP1 sekansı üç bölgeye ayrıldı: N-terminal, sentral- ve C-terminal bölge. C-terminal 42-kDa polipeptid bölge 33-kDa ve 19-kDa bölgelere ayrıldı * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)



Şekil 2. Şanlıurfa'da *P. vivax* vakalarının 1981-2009 yılları arasındaki yıllık dağılımı (2004 yılından itibaren vaka sayılarındaki düşüş belirgin olarak görülmektedir)

AYDIN İLİNDE İNSANDAN İZOLE EDİLEN *GIARDIA INTESTINALIS* GENOTİPLERİNİN TANIMLANMASI: ÖN ÇALIŞMA

Sema Ertuğ¹, Serçin Özlem³, Hatice Ertabaklar¹, Bülent Bozdoğan²

Adnan Menderes Üniversitesi, ¹Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı; ²Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; ³Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı, Aydın.

Giardia intestinalis insan ve hayvanlarda dünyada yaygın olarak görülen kamçılı bir protozondur. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda A, B, C, D, E, F ve G olmak üzere yedi genotipi tanımlanmıştır. Bu genotiplerden yalnızca A ve B grubunun hem insan- da hem de çok sayıdaki memeli hayvanda saptandığı, diğer grupların ise sınırlı konak özgüllüğü gösterdiği bildirilmektedir. Bu çalışmanın amacı, Aydın'da giardiasisli olguların dışkılarından elde edilen *G.intestinalis* suşlarının genotiplendirilmesi ve elde edilen sonuçların klinik bulgular ile ilişkisinin değerlendirilmesidir. Dışkıda mikroskopik olarak *Giardia* saptanan 15 örnekten DNA ekstraksiyonu (Macherey- Nagel. NucleoSpin Tissue® Kit) yapılmış ve *Giardia* DNA'sı hem 16srRNA geninin 292 bp'lik kısmını çoğaltan RH11 ve RH4 primerleri, hem de beta-giardin geninin 753 bp'lik kısmını çoğaltan G7, G759 primerleri kullanarak PCR ile çoğaltılmıştır. On örnekte *Giardia*'ya ait özgül bant görüntüsü elde edilmiş ve PCR ürünlerine dizi analizi uygulanmıştır. Clustal programı ile 16 srRNA genine özgü primerler kullanılarak sonuç alınabilen beş PCR ürününün dizi analiz sonuçları için Gen bankasında bulunan referans suş kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmaya göre sonuç alınabilen beş PCR ürününden üç örneğin A1 grubu ile uyumlu olduğu saptanmıştır. Diğer iki örneğin dizi analiz sonucu değerlendirilememiştir. Aynı program kullanılarak beta-giardin genine özgü primerler kullanılarak yapılan beş PCR ürününün dizi analiz sonuçları referans suşlar ile karşılaştırılmış ve bir örneğin A2 grubu ile diğer ikisinin ise B grubu ile uyumlu olduğu saptanmıştır. Diğer iki örneğin sekans sonuçları değerlendirilememiştir. Yapılan ön çalışmamıza göre ilimizde insanlarda saptanan türlerin zoonotik olabileceği düşünülmektedir. Bu konuda yapılacak geniş kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: *Giardia genotip, Giardia intestinalis, PCR, Aydın*

TRICHOMONAS VAGINALIS SUŞLARI ITS BÖLGELERİNİN KARŞILAŞTIRILARAK TÜR İÇİ FARKLILIKLARIN VE TRICHOMONAS VAGINALIS VİRUSUNUN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Hatice Ertabaklar¹, Serçin Özlem³, Sema Ertuğ¹, Bülent Bozdoğan²

Adnan Menderes Üniversitesi, ¹Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı; ²Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; ³Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı, Aydın.

Trichomonas vaginalis, seksüel yolla geçen hastalıkların viral etkenlerden sonra en sık nedeni olan kamçılı bir protozondur. *T.vaginalis* suşları arasındaki genotipik farklılıklar ve bu farklılıkların parazitin virülansı, tedaviye yanıtı ve klinik bulgulara etkisini araştıran az sayıda araştırma bulunmaktadır. Aynı zamanda endobiontların (*Mycoplasma* ve *Trichomonas vaginalis* virus=TVV) dağılımı ve bunların parazitin diğer özellikleri üzerine olan etkileri de belirsizliğini korumaktadır. Bu çalışmada *T.vaginalis* suşlarının “internal transcribed spacer” (ITS) bölgeleri karşılaştırılarak tür içi farklılıkların ve TVV varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Toplam 20 suş çalışmaya dâhil edilmiştir. Total DNA ekstraksiyonu kit kullanarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Suşlardaki 5.5 kb’lık çift sarmallı RNA içeren TVV, izolatlardan elde edilen DNA örneklerinin jelde yürütülmesi ile araştırılmıştır. Ribozomal DNA’nın 5.8S alt ünitesini içine alan ITS bölgesi spesifik primerler kullanılarak çoğaltılmıştır. Amplikonların sekans analizi yapılmış ve sekanslar *T.vaginalis* Tv30:GZ suşunun sekansı ile (Gen bank no AY871048) ClustalW2 programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Elektroforez sonucu test edilen 20 suştan 5’inde TVV varlığı saptanmıştır. Çoğaltılan ITS bölgelerinin sekansları karşılaştırıldığında 20 suştan 5’inde yalnızca 15. bazda A insersiyonu, birinde yalnızca nokta mutasyonu (157.bazda sitozin yerine timin), birinde ise hem insersiyon (15.bazda A insersiyonu) hem de nokta mutasyonu (157.bazda sitozin yerine timin) görülmüştür. Bu ön çalışmamız ile ilk kez Türkiye’den izole edilen *T.vajinalis*’te TVV’nin varlığı ve *T.vajinalis*’e ait tür içi farklılıklar saptanmıştır. Çalışmamızdan elde edilen verilerin, daha sonra yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Genotip, PCR, *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas vaginalis* virusu (TVV)

DIŞKIDA *GIARDIA INTESTINALIS* TANISINDA ÜÇ YÖNTEMİN (MİKROSKOBİK İNCELEME, DİREKT FLORESAN ANTİKOR TESTİ, İMMÜNOKROMATOGRAFİK YÖNTEM) KARŞILAŞTIRMALI OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Senem Yaman Karadam¹, Sema Ertuğ², Hatice Ertabaklar²

Adnan Menderes Üniversitesi, ¹Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı; ²Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın.

Giardia intestinalis'in özellikle gelişmekte olan ülkelerde çocuklarda sıklıkla bağırsak enfeksiyonlarına yol açtığı bilinmektedir. Parazitin tanısında; mikroskopik bakı, boyama yöntemleri, direkt floresan antikor tekniği (DFA), ELISA, immünokromatografi (IK) ve PCR gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüğü ile ilgili fazla çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda *G.intestinalis* tanısında mikroskopik inceleme, DFA ve IK yöntemlerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya dışkı örneklerinde nativ-lugol ve/veya formol-etil asetat çöktürme yöntemi ile *G.intestinalis* saptanan 25 ve kontrol grubu olarak parazit saptanmayan 25 örnek alınmıştır. Çalışmaya alınan dışkı örneklerinde DFA (CeLLabs, Crypto/Giardia-Cel IF) ve IK (RIDA QUICK, Cryptosporidium/Giardia Combi Dipstick) testleri üretici firmaların önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. Çalışmamızda nativ-lugol ve/veya formol-etil asetat çöktürme yöntemi ile *G.intestinalis* saptanan 25 dışkının tamamında DFA ile parazit görülmüştür. IK yöntemi ile 24 örnekte parazite özgü bant saptanırken, bir örnekte saptanamamıştır. Kontrol grubunda 25 dışkının tamamında hem DFA hem de IK yöntemi ile parazit tespit edilmemiştir. Sonuç olarak, *G.intestinalis* tanısında mikroskopik bakı referans olarak alındığında DFA'nın özgüllük ve duyarlılığının %100, IK'in duyarlılığının %96, özgüllüğünün ise %100 olduğu belirlenmiştir. IK yönteminin, kolay uygulanabilmesi, deneyimli personel ve laboratuvar alt yapısı gerektirmemesi, hızlı sonuç vermesi gibi avantajlı yönleri nedeniyle tanı laboratuvarlarında ve ayrıca kitle taramalarında kullanılacağı düşünülmüştür. DFA yönteminin ise alt yapısı güçlü laboratuvarlarda deneyim gerektirmeyen personel tarafından değerlendirebileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: DFA, direkt bakı, *Giardia*, immünokromatografik yöntem

KUTANÖZ LEISHMANIASIS TANISINDA YAYMA, KÜLTÜR VE PCR YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Hatice Ertabaklar¹, Serçin Özlem², Erengül Boduç³, Sema Ertuğ¹

Adnan Menderes Üniversitesi, ¹Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı; ²Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı; ³Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın.

Kutanöz leishmaniasis (KL) tropik ve subtropik ülkelerde sık görülen bir deri hastalığı olup Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde endemik olarak görülmektedir. Son yıllarda Ege Bölgesi de dahil olmak üzere pek çok bölgeye yayılan hastalık Aydın ilinde de varlığını sürdürmektedir. Çalışmamızda KL şüpheli olgulardan alınan örneklerde *Leishmania* spp. varlığı, yayma, kültür ve PCR yöntemi ile araştırılarak, sonuçların karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'na başvuran KL şüpheli 21 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Lezyonlardan alınan örnekler lama yayıldıktan sonra Giemsa ile boyanarak amastigot varlığı ışık mikroskobu ile araştırılmıştır. Alınan örnekler NNN besiyerine ekilmiştir. Örneklerden alınan lam üzerindeki yaymalar -20°C'de saklanmış ve bu lamlar üzerindeki yayma örneklerinden DNA ekstraksiyonu üretici firmanın önerilerine göre ticari bir kit (Macherey-Nagel NucleoSpin Tissue® Kit) kullanılarak yapılmıştır. *Leishmania* spp. kinetoplast DNA'sının 116 bp'lik kısmını çoğaltan 13A ve 13B primerleri kullanılarak PCR çalışılmıştır. Giemsa ile boyandıktan sonra incelenen 21 olgu örneğine ait yaymanın 10'unda (%48) amastigot saptanmıştır. Kültürde örneklerin 12'sinde (%57) promastigot mikroskobik olarak gözlemlenmiştir. PCR yönteminde ise yine örneklerin 12'sinde (%57) parazite özgü bant gösterilmiştir. Her üç yöntemden en az birinde pozitiflik saptanması göz önüne alındığında, 21 olgunun 13 (%62)'üne tanı konulmuştur. Kutanöz leishmaniasis tanısında en yaygın kullanılan yöntem olan boyalı yayma, incelemesi kolay ve ucuz olmakla birlikte deneyimli mikroskobiste ihtiyaç göstermektedir. Son yıllarda pek çok hastalıkta olduğu gibi KL tanısında da moleküler yöntemler kullanılmaktadır. KL tanısında birden fazla yöntemin tanı amacıyla kullanılmasının çok sayıda olgunun tanı almasını sağladığı düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Leishmania, kültür, PCR, yayma, Aydın*

DIŞKIDA *BLASTOCYSTIS SPP.*'NİN ARAŞTIRILMASINDA MODİFİYE FORMOL ETER KONSANTRASYON YÖNTEMİ VE FECONOMICS®'İN KARŞILAŞTIRILMASI

Merve Aydın¹, İlkiz Oğuz², Katren Al Bakkour², Funda Doğruman Al³, İpek Mumcuoğlu⁴, Semra Kuştimur³

¹Erzincan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzincan.

²Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

³Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

⁴Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

Blastocystis spp. henüz patojenitesi tam belirlenememekle birlikte, çeşitli gastro-intestinal semptomlara neden olan, son yıllarda ürtiker ve irritabl barsak sendromu ile ilişkilendirilen bir protozoondur. Doğrudan yayma ve kalıcı boyalı preparatlar incelenildiğinde gözden kaçabilen seyrek *Blastocystis* kistleri, dışkının yoğunlaştırılmasıyla daha kolay saptanabilmektedir. Feconomics® kullanıma hazır bir ticari kit olup, içerdiği emici boncuklar ile santrifüj ya da flotasyona gerek duyulmadan dışkının konsantre edilmesini sağlayabilmektedir. Feconomics®'in etkinliğini değerlendirmek amacıyla, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Laboratuvarları'na çeşitli gastrointestinal sistem şikayetleri ile gönderilen 360 hastaya ait dışkı örneği nativ-lugol yöntemi ile incelenmiş, *Blastocystis spp.* görülen 38 dışkı örneği çalışmaya alınmıştır. Dışkı örnekleri hem rutin uygulanan modifiye formol-eter konsantrasyon (MFEAK) yöntemi ile hem de Feconomics® ile konsantre edilmiştir. Nativ-lugol inceleme yapılmış ve yayma preparat hazırlanarak trikrom boyama yapılmıştır. Nativ-lugol inceleme ve kalıcı boyama yöntemleri protozoonları saptama ve protozoonların tipik morfolojik özelliklerini göstermesine göre değerlendirilmiştir. Mikroskop sahasındaki parazit yoğunluğu az veya çok olarak ifade edilmiştir. MFEAK, çok basamaklı, zaman alıcı zahmetli bir yöntem olup, mikroskop alanında daha fazla dışkı kalıntısı gözlenmektedir. Feconomics® yöntemi ise az basamak içeren, 3 dakikada tamamlanan bir yöntem olup, mikroskop alanında daha az dışkı kalıntısı gözlenmektedir. Her iki konsantrasyon yöntemi sonrasında yapılan trikrom boyamada protozoonun morfolojisinin bozulduğu ve tipik görünümünün kaybolduğu izlenmiştir. Sonuç olarak, Feconomics®'in nativ-lugol inceleme için parazitoloji laboratuvarlarında hızlı ve etkili bir konsantrasyon yöntemi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Artefakt, *Blastocystis*, dışkı, konsantrasyon, trikrom boyama

SERVİKAL İNTRAEPİTELYAL NEOPLAZİ TANILI KADINLARDA HPV TİP DAĞILIMI VE ONKOJENİK AKTİVİTE VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Eyüp Saban¹, Nizami Duran¹, Kenan Dolapçioğlu², Naciye Eryılmaz³, Gülay Gülbol Duran³, Mehmet Kurul⁴

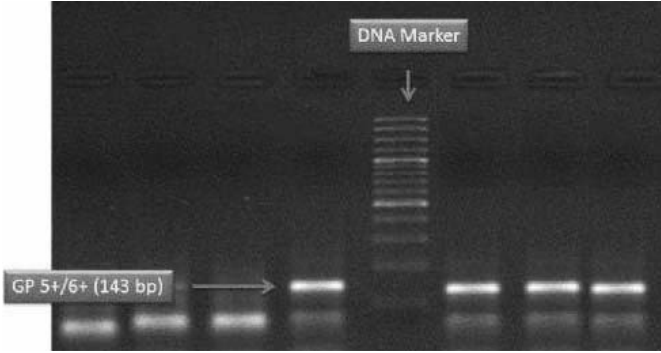
Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Tıbbi Mikrobiyoloji AD; ²Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, Hatay.

³Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, Hatay.

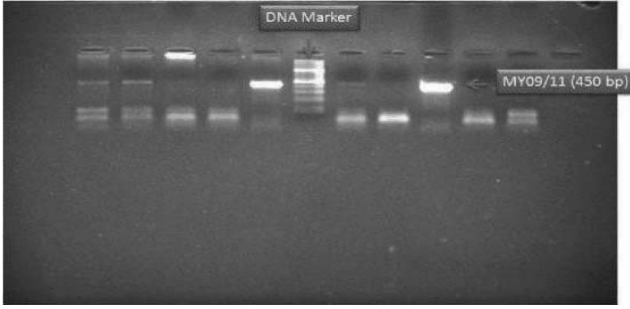
⁴Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Bölümü, Adana.

İnsan papillomavirusları (HPV) servikal kanserin en önemli etiyolojik faktörleridir. Bu çalışmada servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) tanılı kadınlarda HPV tiplerinin belirlenmesi ve yüksek riskli HPV genotiplerinde E6/E7 onkoprotein varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya CIN1 tanılı 69, CIN2 tanılı 26 ve CIN3 tanılı 19 kadın olmak üzere toplam 114 kadın dâhil edilmiştir. Kadınlardan alınan servikal sürüntü örneklerinde HPV DNA varlığı MY09/MY11 ve GP5+/GP6+ primerleri kullanılarak tespit edilirken, fragment analiz yöntemiyle HPV genotiplendirilmesi yapılmış ve NASBA yöntemiyle de yüksek riskli HPV tiplerinde E6/E7 onkoprotein varlığı araştırılmıştır (Şekil 1 ve 2). Çalışmada CIN evrelerine göre dağılım yapıldığında; CIN1 tanılı kadınlarda %23.2 HPV-16, %15.9 HPV-45 ve %11.6 oranında HPV-35 saptanırken; CIN2 tanılı kadınlarda bu oranlar HPV-45 için %53.8, HPV-16 için %26.9 ve HPV-18 için %19.2 olarak tespit edilmiştir. CIN3 tanılı kadınlarda HPV genotip dağılımı ise; HPV-16 %57.9, HPV-45 %52.6 ve HPV-18 %15.8 olarak bulunmuştur (Şekil 3). Ayrıca çalışmada, toplam 31 kadında birden fazla HPV genotipiyle koenfeksiyon tespit edilmiştir. Bunun yanında çalışmada yüksek riskli HPV tipleriyle enfekte 57 kadının %42.1'inde E6/E7 onkoprotein varlığı tespit edilmiştir. E6/E7 onkoproteinleri; HPV-16 ile enfekte toplam 34 kadının %38.2'sinde, HPV-45 ile enfekte toplam 35 kadının %31.4'ünde ve HPV-18 ile enfekte toplam 11 kadının %18.2'sinde tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen bulgular, servikal intraepitelyal neoplazili hastalarda gerek total HPV enfeksiyonu prevalansının, gerekse yüksek riskli HPV tipleriyle enfeksiyon oranının oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca, yüksek riskli HPV tipleriyle enfekte kadınlarda onkojenik aktivite oranı da oldukça yüksek bulunmuştur.

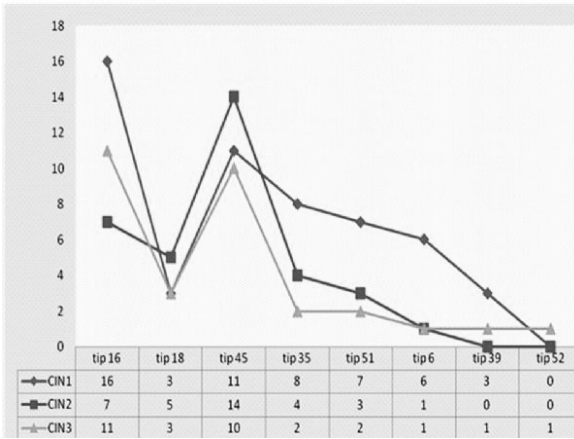
Anahtar kelimeler: HPV, servikal intraepitelyal neoplazi, E6/E7, onkojenik aktivite, genotip



Şekil 1. GP5+/GP6+ gen ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü.
DNA marker; 100 bp, GP5+/GP6+ (143 bp).



Şekil 2. MY09/MY11 gen ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü.
DNA marker; 100 bp, MY09/MY11 (450 bp).



Şekil 3. CIN evrelerine göre HPV genotiplerinin dağılımı.

PREMENOPOZAL VE MENOPOZAL DÖNEMDEKİ KADINLARDA SERVİKAL HPV PREVALANSI

Sümevra Alkış Koçtürk¹, Mustafa Gül², Murat Aral²

¹Kahramanmaraş Şehir Devlet Hastanesi, Kahramanmaraş.

²Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Kahramanmaraş.

İnsan papillomavirusu (HPV) *Papillomaviridae* ailesi içinde yer alan zarfsız, çift sarmallı bir DNA virusudur. Bugün için 200'den fazla tipi tanımlanan HPV'nin 40'tan fazlası anogenital sistem ve diğer alanların epiteliyal ve mukozal yüzeylerini enfekte etmektedir. HPV tipleri pratik olarak servikal kansere sebep olup olmamasına göre düşük (örneğin; tip 6 ve 11) ve yüksek (örneğin; tip 16 ve 18) riskli olarak gruplandırılmaktadır. HPV enfeksiyonları ve servikal kanser arasında güçlü bir bağ bulunmaktadır. Günümüzde, kadınlarda en sık görülen ikinci kanser türünün servikal kanser olması dolayısıyla, servikal kanser ve prekürsör enfeksiyonlarında, HPV DNA araştırılması bir zorunluluk haline gelmiştir. Çalışmamızda Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Jinekoloji ve Menopoz polikliniklerine başvuran ve muayeneleri yapılan 50'si menopoz öncesi ve 50'si menopoz sonrası hastada HPV sıklığı araştırıldı. Alınan endoservikal örnekler Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına ulaştırıldıktan sonra HPV DNA ekstraksiyonu yapıldı. İzole edilen DNA amplifiye edildi ve ardından real-time PCR yöntemi ile HPV DNA pozitif hastalarda HPV tipleri araştırıldı. 100 hastanın 6'sı (%6) HPV DNA pozitif saptandı; bunların 4'ü (%4) postmenopozal, 2'si (%2) ise premenopozal gruptaydı (Tablo). HPV DNA pozitif olan örnekler HPV genotipleri yönünden araştırıldı ve 6 örneğin 2'si (%33.3) tip 6, 2'si (%33.3) tip 45, biri (%16.6) tip 16 ve biri (%16.6) tip 67 olarak bulundu. Bu çalışmada pozitif sonuçlar ile premenopozal veya postmenopozal dönemde olma arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$). Çalışmamızda hayatın iki periyodunda HPV prevalansı ve tip dağılımı değerlendirildi ve dünya genelindeki oranlara benzer sonuçlar bulundu. Ülkemizde farklı gruplarda ve hastane kaynaklı olmayan popülasyonlarda sıklığın belirlenmesi için daha ileri araştırmaların yapılmasının gerekli olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: HPV, menopoz, real-time PCR

Tablo. Yaşlara göre HPV pozitifliğinin dağılımı.

Yaş grubu (olgu sayısı)	HPV pozitif sayı (%)
20-34 (14)	0
35-48 (37)	2 (2)
49-54 (33)	3 (3)
≥55 (16)	1 (1)
Toplam (100)	6 (6)

HUMAN PAPILLOMAVIRUS VARLIĞI MİDE ADENOKARSİNOMU VE *HELICOBACTER PYLORI* ENFEKSİYONUNDA ANLAMLI MIDIR?

Gülendam Bozdayı¹, Bedia Dinç², Nesrin Turhan³, Aylin Altay¹, Seçil Özkan⁴, Yasemin Özün⁵, Birol Bostancı⁶

¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

²S.B. Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

³S.B. Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi, Patoloji Laboratuvarı, Ankara.

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

⁵S.B. Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi, Gastroenteroloji Bölümü, Ankara.

⁶S.B. Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi, Gastroenteroloji Cerrahisi, Ankara.

HPV'nin servikal kanser dışında birçok kanser türleriyle ilişkisi tespit edilmiş olup, gastrik adenokarsinom ve HPV ilişkisine dair çeşitli yayınlar mevcuttur. Gastrit olgularında *Helicobacter pylori* ile birçok enfeksiyon ajanının birlikte rolü olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmanın amacı gastrik adenokarsinom ve *H.pylori* gastriti vakalarında HPV DNA ve HPV tip 16 DNA'sının real-time PCR (RtPCR) yöntemi ile araştırılması ve birlikteliklelerinin irdelenmesidir. Çalışmaya alınan, 60'ı gastrik adenokarsinom, 46'sı *H.pylori* gastriti örneğinin, ksilenle deparafinizasyon işleminden sonra, fenol kloroform izoamil alkol yöntemiyle DNA eldesi gerçekleştirilmiştir. Yüzaltı örnek G6PDH kontrol kiti (Eurogentec, Seraing, Belçika) ile çalışılmış, yeterli doku içerdiği sonucuna varılan 53 adenokarsinom ve 43 *H.pylori* örneği HPV DNA çalışmasına alınmıştır. Amplifikasyonda MY09/MY11 primerleri kullanılarak L1 bölgesi çoğaltılmıştır. Nested RtPCR için MY09/11 ürünleri GP5+/GP6+ primerleri ve Cyanine-5 labeled HPV-16 DNA spesifik probe ile Light Cycler 2.0 (Roche Diagnostics, Almanya) cihazında çalışılmıştır. Gastrik adenokarsinom örneklerinin 14 (%26.4)'ünde HPV DNA, beş (%9.4)'inde HPV-16 pozitif ve biri (%2) miks tip olarak belirlenmiştir. *H.pylori* gastrit örneklerinin 10 (%23.3)'unda HPV DNA, altısında (%14) HPV-16 pozitif, ikisinde (%4.6) miks tip belirlenmiştir. Kontrol grubunun 5 (%19)'inde yalnız HPV-16 pozitifliğine rastlanmıştır. Çalışmamızda gastrik kanserlerde bulunduğumuz %38 HPV DNA pozitifliği literatür ile uyumlu bulunmuş ve kontrol grubu ile arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır. *H.pylori* pozitif hastalarda %42 oranında HPV DNA pozitifliği gösterilmiş olup, kontrol grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Sonuç olarak, *H.pylori* pozitif bulunan olgularda beraberinde HPV'nin de değerlendirilmesi gerektiği görüşündeyiz.

Anahtar kelimeler: Mide kanseri, *Helicobacter pylori*, HPV

SERVİKAL SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE PCR YÖNTEMİYLE İNSAN PAPİLOMAVİRUS VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE TİPLENDİRİLMESİ

Latife Sütçü Kızılkaya, Bahadır Feyzioğlu, Mehmet Özdemir, Bülent Baysal
Konya Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Konya.

Bu çalışmada, Konya bölgesinde insan papillomavirus (HPV) prevalansı, tiplerinin belirlenmesi ve bunların yayma (smear) sonuçlarıyla birlikte irdelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya Mayıs 2010-Mayıs 2011 tarihleri arasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi ve Konya Dr. Faruk Sükan Doğum ve Çocuk Hastanesi Kadın Doğum Polikliniklerine başvuran 21-81 yaşları arasındaki cinsel aktif 180 hasta dahil edildi. Hastalardan Pap smear ve HPV DNA testi için servikal sürüntü örneği alındı. Pap smear testi için örnekler Papanicolaou boyası ile boyanıp Bethesda 2001 terminoloji sistemi ile değerlendirildi. Sürüntü örneklerinden, "High Pure Viral Nucleic Acid" kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) ile DNA izolasyonu yapıldı. INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Amp (Innogenetics, Belçika) kiti ile amplifikasyon yapıldı. PCR ampliconları hibridize edildikten sonra INNO-LiPA HPV Genotyping Extra okuma kartı ile değerlendirildi. Hastaların %18.9'unda (n=34) HPV DNA pozitif bulundu. En sık görülen tipler sırasıyla tip 16 (%20.8), tip 51 (%20.8), tip 6 (%12.6), tip 53 (%8.3) ve tip 52 (%8.3) olarak belirlendi. *Smear* ile, 92 (%51.1) normal, 71 (%39.4) ASCUS (önemi bilinmeyen atipik hücreler), 4 (%2.2) AGUS (atipik glandüler hücreler), 3 (%1.7) ASC-H (atipik skuamöz hücreler), 2 (%1.1) LSIL (düşük derece skuamöz intraepitelyal lezyon), 2 (%1.1) HSIL (yüksek derece skuamöz intraepitelyal lezyon) belirlenirken, artan *smear* derecesi ile HPV DNA pozitiflik oranının arttığı görüldü. Servikal neoplazilerle yakından ilişkili olan HPV enfeksiyonlarının tanısında PCR yöntemleri hızlı, kolay ve güvenilir yöntemlerdir. Bu açıdan risk taşıyan kişilerin saptanması ve uygun klinik yaklaşımın belirlenebilmesi için, HPV tanı testleri mikrobiyoloji laboratuvarında rutin olarak kullanılmalıdır. HPV prevalansı ve tiplerinin dağılımını bilmek ulusal ve uluslararası düzeyde yapılacak aşı çalışmalarına katkıda bulunacaktır.

Anahtar kelimeler: HPV, PCR, Pap smear testi

SERVİKS KANSERİ İÇİN RİSKİ OLAN KADINLARDA HPV TİPLENDİRMESİ VE HPV SIKLIĞININ RİSK FAKTÖRLERİ VE SERVİKAL SMEAR İLE İLİŞKİSİ

Nükhet Kurultay¹, Süreyya Gül Yurtsever¹, Seyran Yiğit²

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, ¹Tıbbi Mikrobiyoloji AD; ²Tıbbi Patoloji AD, İzmir.

Bu çalışmada, hastanemizin Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği'ne çeşitli jinekolojik şikayetlerle başvuran olgularda, HPV sıklığı, tipleri, HPV pozitifliğinin servikal kanser gelişimi için risk faktörleri ve servikal *smear* ile ilişkisinin araştırılması amaçlandı. Çalışmaya, serviks kanseri taraması için başvuran serviks kanseri için risk faktörlerine sahip 208 sağlıklı kadın dahil edildi. Revers hibridizasyon yöntemi ile HPV varlığı ve en sık görülen 16 tipin tayini yapıldı. Servikal *smear* örnekleri, konvansiyonel yöntem ile alındı ve patoloji laboratuvarında 2001 Bethesda sistemi ile değerlendirildi. Olguların ortalama yaşı 35 (yaş aralığı: 21-57) yıl idi. Çalışmada olguların 32 (%15.3)'ünde HPV DNA pozitifliği bulundu. Servikal patoloji sonucu CIN 1-2 tanısı alan 36 olgunun 11'inde (%30.5) HPV tip 6, 16, 18, 31, 33 ve 35; servikal patoloji sonucu normal olan 172 olgunun 21 (%12.2)'inde tip 6, 11, 16, 42, 43 ve 44 varlığı tespit edildi. Pap smear sonucu normal olan 48 olgunun beşinde (%10.4) tip 6, 11 ve 16 pozitifliği saptandı. Atrofi *smear* sonuçlu üç örnekte HPV DNA varlığı izlenmedi. HPV tiplerine göre serviks kanseri için yüksek risk grubundan tip 16, %31 sıklıkla (n=10) saptandı. Risk faktörü değişkenlerinden, en önemli risk faktörünün sigara kullanımı olduğu bulundu (p<0.05). Sonuç olarak çalışmamızda, serviks kanseri için riskli kadınlarda onkojenik HPV tiplerinden tip 16 için yüksek pozitiflik oranı saptandı. PCR temelli HPV'ye özgül INNO-LiPA Line-Prob assay strip yönteminin; cinsel yolla bulaşan hastalık etkeni HPV'nin yüksek risk ve düşük risk tiplerini saptayabilmesi nedeniyle tarama testi olarak kullanılabileceği düşünüldü.

Anahtar kelimeler: Servikal kanser, HPV tiplendirme, servikal sitoloji, risk faktörü

REAL-TIME PCR YÖNTEMİ KULLANILARAK KOLON, REKTUM VE REKTOSİGMOİD BÖLGE TÜMÖRLERİNDE HPV DNA VE HPV TİP 16 DNA'SININ ARAŞTIRILMASI

Aylin Altay¹, İbrahim Uğur Çalış¹, Özgür Ekinci², Ayça Özer Durmuşlu¹, Sezai Leventoğlu³, Ayşe Dursun², Seçil Özkan⁴, Güleendam Bozdayı¹

¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara

²Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji AD, Ankara

³Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi AD, Ankara

⁴Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı AD, Ankara.

Günümüzde kolon ve rektum kanseri ile HPV enfeksiyonu arasındaki ilişkiyi inceleyen çeşitli yayınlar mevcuttur. Bu çalışmada; kolon, rektum ve rektosigmoid bölgede tümör gelişen dokularda HPV DNA ve HPV tip 16 DNA'sının real-time PCR (RtPCR) yöntemi ile araştırılması ve kanser ile ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, 54 kolon, rektum ve rektosigmoid adenokanserli hasta ve kontrol grubu olarak 27 sağlıklı kolon, rektum ve rektosigmoid bölgeden alınan parafinli doku örnekleri dahil edilmiştir. Ksilenle deparafinizasyon işleminden sonra, fenol kloroform izoamil alkol yöntemiyle DNA eldesi gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyonda MY09/MY11 primerleri kullanılarak L1 bölgesi çoğaltılmıştır. RtPCR, MY09/11 ürünleri GP5+/GP6+ primerleri ve "Cyanine-5 labeled HPV 16 DNA specific probe" ile Ligth Cycler 2.0 (Roche Diagnostics, Almanya) cihazında çalışılmıştır. Hasta örneklerinin %11'i HPV pozitif olarak bulunmuştur. Kolon adenokarsinom örneklerinin %7.4'ünde, rektum ve rektosigmoid adenokarsinom örneklerinin ise %3.7'sinde HPV DNA saptanmış; HPV-16 DNA'sına ise rastlanmamıştır. Yaşları 50-59 arasında olanların %16.7'sinde HPV DNA'ya rastlanırken, 60 yaş ve üzerindeki olguların %83.3'ünde HPV DNA pozitifliği saptanmıştır ($p>0.05$). Kontrol grubunun %22.2'sinde HPV DNA pozitif bulunmuştur. Bunların %83.3'ünde HPV DNA pozitifliği, %16.7'sinde ise HPV-16 pozitifliği saptanmıştır. Kontrol grubunda yaş ve HPV pozitiflik dağılımı arasında fark yoktur. Hasta ve kontrol grubu arasında da HPV pozitifliği yönünden istatistiksel bir fark tespit edilmemiştir ($p>0.005$). Çalışmamızın sonucunda, kontrol grubu ile istatistiksel bir fark bulunamamasına rağmen, kanserli hastalarda ileri yaşta HPV DNA pozitiflik oranının arttığı izlenmiştir. Ayrıca, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farkın belirlenememiş olması, kolon, rektum ve rektosigmoid adenokanserlerinin HPV ile bir ilişkisi olmadığını düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: HPV, adenokanser, kolon, rektosigmoid, rektum

HPV YÜKSEK RİSKLİ TİP TAYİNİNDE KULLANILAN İKİ FARKLI PCR TEKNİĞİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Tutku Taşkınoğlu Tanyel, Gizem Aliş Burgucu, Yahya Laleli

Düzen Laboratuvarlar Grubu, Ankara.

Bu araştırmada, insan papillomavirus (HPV) tanısında, 2006 yılında yayınlanan kılavuzlar doğrultusunda yüksek riskli HPV varlığını göstermek için real-time PCR (RtPCR) sistemi ile değiştirdiğimiz uygulamanın, mevcutta kullanmakta olduğumuz revers hibridizasyon (RH) testinin özgüllüğünü karşılayıp karşılamadığını belirlemek amacıyla yaptığımız verifikasyon çalışmasının sonuçları sunulmuştur. Çalışmada, 149 hastadan alınan servikal/üretal sürüntü ve biyopsi numuneleri üzerine HPV genotiplemesi için RH ve RtPCR yöntemleri uygulanmıştır. Ayrıca, CAP (College of American Pathologist) Dış Kalite Kontrol Programı kapsamında gönderilen 5 örnek de her iki sistemde paralel olarak çalışılmıştır. RH ve RtPCR ile paralel olarak çalışılan 149 hasta örneğinin 11 tanesinden; ikisi her iki sistemde ortak olmak üzere, örnek sistem tarafından uygunsuz bulunduğu için sonuç alınamamıştır. Sonuç alınan 138 örneğin (24 erkek, 114 kadın) 31'i biyopsi ve 107'si sürüntü örneğidir. 138 örneğin her iki sistemde çalışılması sonucu cinse göre bireysel sonuçlara dayalı eşleştirme ile elde edilen sonuçlar Tablo 1 ve 2'de sunulmuştur. Ek olarak, CAP dış kalite kontrole ait 5 örneğin sonuçları, her iki sistemde de uygun olarak nitelendirilmiştir. Servikal biyopsi örneğinde yüksek risk bulunmayan hastalarda servikal kanser riski olmadığı kabul edilmektedir. Bu yüzden tespit edilen HPV'nin yüksek risk grubu içinde olduğunu bilmek prognoz ve takip açısından oldukça önemlidir. Her iki sistem de CAP dış kalite kontrol değerlendirmesinde uygun sonuç vermiştir. Düşük riskli HPV tiplendirilmesi aranmadığı takdirde, her iki sistemle elde edilen sonuçlar, sistemlerin analitik açıdan birbirlerine karşı üstünlükleri olmadığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: HPV, revers hibridizasyon, real-time PCR

Tablo 1. Kadın olgulara ait örneklerin (n=114) paralel çalışılan real-time PCR (RtPCR) ve revers hibridizasyon (RH) sonuçları.

		RtPCR		Toplam (RH)
		Yüksek risk	Negatif	
RH	Yüksek risk	30	4	34
	Düşük risk/Negatif	4+4*	72	80
	Toplam (RtPCR)	38	76	114

*Örneklerin 4'ü düşük risk, diğer 4'ü ise negatif olarak saptanmıştır.

Tablo 2. Erkek olgulara ait örneklerin (n=24) paralel çalışılan real-time PCR (RtPCR) ve revers hibridizasyon (RH) sonuçları

		<i>RtPCR</i>		<i>Toplam (RH)</i>
		<i>Yüksek risk</i>	<i>Negatif</i>	
RH	Yüksek risk	4	2	6
	Düşük risk/Negatif	0	18	18
	Toplam (RtPCR)	4	20	24

LARİNKS PRİMER SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMLARINDA İNSAN PAPİLLOMAVİRUS (HPV) SIKLIĞI

Mevlüt Çetin¹, Sevin Kırdar², Gökhan Erpek³, İbrahim Meteoglu⁴

¹*Devlet Hastanesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Kliniği, Uşak.*

²*Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın.*

³*Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, Aydın.*

⁴*Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Aydın.*

Son yıllarda yapılan araştırmalara göre, larinks kanserlerinin etiopatogenezinde insan papillomavirus (HPV) enfeksiyonunun rolünün yanı sıra, yüksek riskli HPV tipleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada, larinks primer skuamöz hücreli karsinomlu hastalarda HPV DNA varlığının ve HPV tiplerinin sıklığının polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve immünohistokimyasal boyama yöntemleri ile araştırılması amaçlanmıştır. Larinks skuamöz hücreli karsinom tanısı almış 47 olgunun parafilmli doku örnekleri çalışılmıştır. HPV DNA varlığı ve tiplendirilmesi için, doku örnekleri “HybriBio HPV Genoarray” testi (HybriBio Ltd, Hong Kong) ile çalışılmıştır. Ksilenle parafinin uzaklaştırılma işleminden sonra örneklerdeki DNA izolasyonu ticari “NucleoSpin Tissue Mini Column” (Macherey-Nagel, Duren, Germany) izolasyon kiti ile yapılmıştır. HPV DNA çoğaltma işlemi, L1 bölgesinden hazırlanan primerler ile, tiplendirme hibridizasyon yöntemi ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. İmmünohistokimyasal boyamada avidin-biyotin kompleks sistemi ile PanHPV, HPV-16 ve HPV-18 boyamaları yapılmıştır. Kanser olgularının 46’sı (%97.9) erkek, biri (%2.1) kadındır. Çalışılan 47 doku örneğinin 15 (%31.9)’inde HPV DNA belirlenmiş; 5 (%10.6) örnekte HPV-16, 5 (%10.6) örnekte HPV-68, bir (%0.2) örnekte HPV-31, bir (%0.2) örnekte HPV-53, iki (%4.25) örnekte HPV tip 16 ve 68 birlikte, bir (%0.2) örnekte ise HPV tip 16 ve 52 birlikte belirlenmiştir. İmmünohistokimyasal PanHPV boyası ile 25 (%53.2) dokuda pozitiflik, HPV-16 boyası ile 27 (%57.4) dokuda pozitiflik bulunurken, HPV-18 boyası ile hiçbir dokuda pozitif sonuç alınmamıştır. Çalışmamızın sonuçları, larinks primer skuamöz hücreli karsinomlu hastalarda HPV enfeksiyonunun sık gözlemlendiğini ve HPV tip 16’nın en fazla olmak üzere HPV tip 68, 31 ve 51 tiplerinin rolü olduğunu desteklemektedir.

Anahtar kelimeler: Larinks karsinomu, insan papillomavirus, tiplendirme

SEMPATOMATİK VE ASEMPATOMATİK KADINLARDA HPV SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE GENOTİPLERİNİN BELİRLENMESİ

Nizami Duran¹, Burçin Özer¹, Arif Güngören², Melek İnci¹, Erkan Yula¹, Hayat Aslan¹,
Naciye Eryılmaz¹, Şeyda Özarslan¹

*Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, ¹Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; ²Kadın Hastalıkları ve
Doğum Anabilim Dalı, Hatay.*

Bu çalışmada, Hatay bölgesinde semptomatik ve asemptomatik kadınlarda HPV sıklığı ve tip dağılımının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, yaşları 17-61 arasında değişen ve genital muayenede servikal erozyonu bulunan 116 semptomatik kadın ile yaşları 18-57 arasında değişen genital muayenede normal serviks bulguları olan 155 kadın olmak üzere toplan 271 servikal sürüntü örneği alındı. Örneklerde HPV DNA varlığı MY09 ve MY11 ile GP5+ ve GP6+ primerleri kullanılarak PCR yöntemiyle tespit edildi. HPV pozitif olarak tespit edilen örneklerin tip tayini fragment analiz yöntemiyle gerçekleştirildi. Toplam 155 asemptomatik (herhangi bir servikal lezyonu bulunmayan) kadının 18 (%11.6)'inde HPV DNA'sı pozitif olarak tespit edilirken, semptomatik (servikal lezyonlu) 116 kadın arasında bu oranın %55.2 (64/116) olduğu bulundu. Semptomatik ve asemptomatik kadınlar arasında HPV varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi ($p < 0.001$). Asemptomatik kadınlarda en yaygın HPV tipinin tip 16 ve tip 45 olduğu tespit edilirken, semptomatik kadınlarda en yaygın tiplerin HPV tip 6 ve tip 16 olduğu izlendi. Asemptomatik kadınların %38.9'u (7/18) HPV-16, %22.2'si (4/18) HPV-45 olarak tespit edilirken, bu tipleri üçüncü sırada %16.7 (3/18)'lik oranla HPV-6'nın takip ettiği saptandı. Servikal semptomlu kadınlarda ise en sık izole edilen HPV tipinin tip 6 (%28.1; 18/64) olduğu tespit edilirken, ikinci en sık izole edilen tipin HPV-16 (%20.3; 13/64) olduğu, bunu HPV-11'in (%10.9; 7/64)'in izlediği belirlendi. Gerek semptomatik gerekse asemptomatik grupta yer alan kadınların HPV ile en sık karşılaştığı yaş aralığının 30-40 yaş grubu olduğu tespit edildi. Sonuç olarak, cinsel yönden aktif kadınlarda HPV enfeksiyonu varlığının incelenmesinin, özgüllük ve duyarlılığı yüksek olan moleküler tabanlı yöntemlerle yapılmasını önermekteyiz.

Anahtar kelimeler: *Semptomatik, asemptomatik, HPV, genital, PCR*

NAİF KRONİK HEPATİT B ENFEKSİYONLARINDA DNA DİZİ ANALİZİ İLE BAZAL ANTİVİRAL DİRENCİN ARAŞTIRILMASI: ÖN ÇALIŞMA

Koray Ergünay¹, Evrim Kahramanoğlu Aksoy², Halis Şimşek², Alpaslan Alp¹, Burçin Şener¹, Gonca Tatar², Gülşen Hasçelik¹

¹Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

²Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Ünitesi, Ankara.

Kronik hepatit B virus (HBV) enfeksiyonu olan ve herhangi bir tedavi almamış (naif) olguların bir kısmında antiviral direnç ile ilişkili mutasyonlar saptanabilmektedir. Bu nedenle antiviral uygulaması öncesinde yapılacak direnç analizi, optimal tedavi rejiminin seçimi ve gereksiz ilaç kullanımının önlenmesi açısından önemlidir. Bu çalışmada, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Ünitesi'nde kronik HBV enfeksiyonu tanısı ile takip edilen ve antiviral tedavi almamış 30 olguda HBV ilaç direnci mutasyonlarının araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, HBV genomunun polimeraz geninin bir kısmı standart bir "nested" PCR protokolü ile çoğaltılarak sık kullanılan ilaçlara karşı direnç mutasyonlarının görüldüğü yaklaşık 250 nükleotidlik bölüm DNA dizi analizi ile incelenmiştir. Elde edilen diziler manuel olarak ve bilgisayar destekli sanal fenotiplendirme arabirimi (geno2pheno.HBV, Genafor, Almanya) kullanılarak, bilinen ilaç direnç mutasyonları açısından değerlendirilmiştir. Tüm olgular genotip D olarak saptanmış, 19'unda (%63.3) çeşitli nükleotid değişiklikleri gözlenmiştir. Saptanan değişiklikler 8 olguda (%26.6) aminoasit değişikliğine neden olmayan sessiz mutasyonlar, 7 olguda ise (%23.3) önemi bilinmeyen mutasyonlar olarak değerlendirilmiştir. Toplam 3 olguda (%10) ise antiviral direnci ile ilişkili mutasyonlar saptamıştır. Bu mutasyonlar bir olguda entekavir+lamivudin (S202G, M204V, L180M, T184N), bir olguda muhtemel lamivudin+adefovir (L180P, A181Q), bir olguda ise muhtemel tenofovir direnci (A194V) şeklindedir. Sonuç olarak, hastanemizdeki ilk kez antiviral uygulanmayan olgularda dirençle ilişkili mutasyonların varlığı gösterilmiştir. Yeni olguların analizleri ve mutasyon saptanan olgularda ileri incelemelerimiz devam etmektedir.

Anahtar kelimeler: HBV, hepatit B, direnç, kronik, naif

LAMİVUDİNE CEVAPSIZ OLGULARDA YMDD MUTASYON VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Efe Serkan Boz, Melike Yeşiller Bedir, Rıza Adaleti, Naz Çobanoğlu, Sebahat Aksaray
S.B. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul.

Hepatit B virusu (HBV), dünyada yaklaşık iki milyar insanın karşılaştığı yüksek enfektiviteye sahip *Hepadnaviridae* ailesinde yer alan bir DNA virusudur. Genellikle akut viral hepatite neden olan HBV, kronikleştiği zaman ileri karaciğer yetmezliği ve siroz gibi ciddi tablolara yol açmaktadır. Kronik HBV enfeksiyonu tedavisinde immünomodülatörler ve viral polimeraz inhibitörleri kullanılmaktadır. Ancak tedavi uzadıkça bu polimeraz inhibitörlerine karşı direnç gelişmektedir. Bu çalışmada, lamivudin tedavisine klinik cevapsız kronik HBV hastalarının serum HBV DNA viral yük seviyelerinin ve Inno-Lipa HBV DR sistemi ile saptanan YMDD motifindeki mutasyonların karşılaştırılması amaçlanmıştır. Kasım 2010-Ocak 2012 tarihleri arasında laboratuvarımıza gönderilen lamivudin tedavisine klinik cevapsız kronik HBV hastalarının serum örneklerindeki HBV DNA viral yük seviyesi (Cobas Tagman48, Roche Diagnostik, Almanya) ölçülmüş, izole edilen HBV'lerdeki viral polimeraz YMDD motifindeki mutasyonlar ters hibridizasyon [InnoLipaHBVDRV2 (Innogenetics N.V. Belçika)] yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 49 serum örneğinin 27'sinde(%55.1) YMDD mutasyonu tespit edilmiş olup beş grupta toplanmıştır. HBV viral yükleri ve dirençler karşılaştırıldığında, 27 hastanın dördünde viral yük 1.7×10^8 IU/ml'nin üzerinde olduğundan değerlendirme dışı bırakılmıştır. Diğer 23 hastanın direnç fenotiplerine göre viral yük ortalamaları tabloda gösterilmiştir. Günümüzde, direnç gelişme oranı daha düşük antiviral ajanların geliştirilmesine rağmen, lamivudin ve adefovir gibi ulusal ve uluslararası rehberlerde ilk seçenek olarak tavsiye edilen viral polimeraz inhibitörlerinin, maliyet-etkin olmaları nedeniyle bir süre daha kullanımda olacakları düşünülmektedir. Dolayısıyla söz konusu ilaç dirençlerinin ve viral yük seviyelerinin periyodik takibinin yararlı olacağı kanısındayız.

Anahtar kelimeler: HBV, kronik hepatit B, YMDD

Tablo. YMDD direnç fenotiplerine göre viral yük ortalamaları.

Direnç tespit edilen kodonlar	Hasta sayısı	Ortalama viral yük (iu/ml)
80 veya 173	5	17788730 ($\pm 39337030,05$)
204	7	11839457 ($\pm 29164546,7$)
204 ve 80	4	22634008 ($\pm 44616738,45$)
204 ve 180	5	18753315 ($\pm 39737449,34$)
80, 204 ve 180	2	350973024 ($\pm 49631218,98$)
TOPLAM	23	18535524,52 ($\pm 35017639,73$)

HCV GENOTİP DAĞILIMININ HCV RNA DÜZEYİ VE YAŞLA İLİŞKİSİ

Efe Serkan Boz, Hande Toptan, Naz Çobanoğlu, Rıza Adaleti, Sebahat Aksaray

S.B. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul.

Hepatit C virusu (HCV), Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre dünya nüfusunun yaklaşık %3'ünü enfekte etmiştir. HCV enfeksiyonu seyrinin ve kullanılan ilaçlara karşı yanıtın virus genotipine bağlı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle günümüzde HCV genotip tayini de tedaviyi yönlendiren testlerin arasında sayılmaktadır. Yapılan çalışmalar ülkemizde HCV genotip 1'in baskın olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte son yıllarda farklı genotiplerdeki HCV'lerin izolasyon oranlarının artış gösterdiği anlaşılmaktadır. Çalışmamızda, farklı HCV genotipleriyle enfekte hastaların, kantitatif HCV RNA viral yükleri ve yaş gruplarına göre karşılaştırılması amaçlanmıştır. Aralık 2010-Ocak 2012 tarihleri arasında laboratuvarımıza gönderilen kronik HCV hastalarına ait serum örneklerindeki HCV RNA viral yük seviyeleri (Cobas Taqman48, Roche Diagnostik, Almanya) ölçülmüş, çoğaltılan HCV gen ürünleri ters hibridizasyon yöntemi ile (Abanalitica, Italy) genotiplendirilmiştir. HCV genotiplerinin, hasta kantitatif viral yük seviyeleri ve yaşları ile ilişkileri Kruskal Wallis testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Değerlendirmeye alınan 73 serum örneğinin %84.9'undan HCV genotip 1, %2.7'sinden genotip 2 ve %12.3'ünden genotip 3 izole edilmiştir. Hastaların yaş ortalamaları 53.9 (± 16.3) yıl, HCV RNA viral yük ortalamaları ise 4961340 (± 7858969) IU/ml olarak saptanmıştır (Tablo). HCV genotipleri ile serum HCV RNA seviyeleri arasında anlamlı istatistiksel fark bulunmamış ($p > 0.05$), ancak hasta yaşları ile anlamlı istatistiksel fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Yakın zamanda yeni tedavi seçeneklerinin gündeme gelmesi ile HCV RNA viral yük tayini ve HCV genotiplendirme testleri daha da önem kazanmıştır. Sonuçlarımız genel Türkiye verileri ile uyumlu olarak, tedaviye dirençli HCV genotipinin hakim olduğunu göstermekle birlikte, belli oranda heterojenite de mevcuttur. Bu nedenle bölgemizde HCV genotip tayininin tedavi protokollerine katkıda bulunacağı kanısındayız.

Anahtar kelimeler: HCV, genotip, kronik hepatit C

Tablo. HCV genotiplerinin kantitatif HCV RNA viral yükleri ve hasta yaşları ile ilişkileri.

Genotip	Hasta sayısı	HCV viral yük ortalaması (iu/ml)	Yaş ortalaması
1	62	4312842 ($\pm 6299600,2$)	55.3 (± 15.7)
2	2	12501613 ($\pm 5430155,8$)	76.5 (± 3.53)
3	9	7753150 ($\pm 14944738,4$)	39.4 (± 11.35)

HEPATOSELÜLER KARSİNOMA (HSK)'DA ÇEŞİTLİ MİKRO-RNA (miRNA) EKSPRESYON DÜZEYLERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLER VE VİRAL HEPATİT C İLE İLİŞKİLİ HSK'DA DEĞİŞİKLİK GÖSTEREN EKSPRESYON PROFİLLERİ İLE OLASI İLİŞKİSİ

Mehmet Sami Serin¹, Lulufer Tamer², Engin Kaplan³, Lokman Ayaz³, Ali Arıcan⁴, Gürol Emekdaş⁵

¹Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji AD, Mersin

²Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD, Mersin

³Mersin Üniversitesi, İleri Teknoloji Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi (MEITAM), Mersin

⁴Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Onkoloji BD, Mersin

⁵Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Mersin.

Son zamanlarda, hem insan hem de hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, miRNA ekspresyon profillerindeki değişikliklerin başta kanser olmak üzere diğer birçok hastalığın etiopatolojisinde rol oynadığını ortaya koymuştur. miRNA'lar yaklaşık 22 nükleotid uzunluğundadır ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar. Farklı formlardaki HSK vakalarında ve HSK hücre dizisi çalışmalarında miRNA ekspresyon profillerinin önemi ortaya koymuş ve HSK moleküler mekanizmalarının anlaşılmasında, tanısında ve yeni terapötik hedef tasarımlarında yeni bir çağ açmıştır. Birçok virus tarafından kodlanan miRNA'lar da keşfedilmiştir. Viral miRNA'ların hücrel ortakları ile ne gibi bir ilişkide oldukları henüz bilinmemektedir. Ancak, miR-122, miR-let-7f, miR-155, miR-146a, miR-296, miR-351, miR-128a, miR-141, miR-141, miR-196, miR-196a, miR-15a, miR-15b, miR-15b, miR-17, miR-106a, miR-181a, miR-29b, miR-93, miR-310, miR-30a, miR-30a-3p, miR-30a-5p, miR-30c, miR-24, miR-221, miR-222, miR-125a-5p, miR-199b, miR-302c, miR-223, miR-34c, miR-29a, miR-29c ve miR-30b gibi çeşitli miRNA ekspresyon profillerindeki değişiklikler ile kronik HCV enfeksiyonu ile ilişkili HSK arasında önemli bir ilişkinin olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda, yukarıda belirtilen 35 miRNA'nın tamamının ekspresyon profilleri 96.96 Dynamic Array IFC'lerin kullanıldığı yüksek kapasiteli qRT-PCR (Fluidigm, Biomark, USA) ile 4 HSK'lı hasta ve 10 sağlıklı kişiden oluşan kontrol grubunda araştırılmıştır. Hasta ve kontrol grubu ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında; miR-122, miR-155, miR-146a, miR-296, miR-196a, miR-15a, miR-15b, miR-17, miR-106a ve miR-93 ekspresyon düzeylerinde önemli değişiklikler olduğu tesbit edilmiştir. Bu çalışmada, Çukurova Kalkınma Ajansı tarafından desteklenen "Moleküler Düzeyde Kanser Erken Tanısı Alt Yapı Projesi"nin (TR62-09-03/032) bazı erken sonuçları sunulmakta olup, bu miRNA'ların ekspresyon profillerindeki değişiklikler ile kronik HCV enfeksiyonu arasındaki olası ilişki araştırma aşamasındadır.

Anahtar kelimeler: HCV, miRNA, ekspresyon, hepatoselüler karsinoma

DÜŞÜK DÜZEY ANTİ-HCV POZİTİFLİĞİNDE HCV-RNA VE ALT DÜZEYLERİNİN TANISAL KATKISI

Metin Özdemir¹, Abdullah Güvenli², Ahmet Kozan¹, Tülay Özdemir¹

¹Gazi Devlet Hastanesi, Samsun.

²Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, İl Halk Sağlığı Laboratuvarı, Samsun.

Anti-HCV testlerinde yalnızca pozitiflik sık rastlanılan tanısall bir sorundur. Bu çalışmada anti-HCV'si pozitif hastalarda; anti-HCV oranları ile HCV-RNA ve alanin amino transferaz (ALT) düzeyleri arasındaki ilişkilerin belirlenmesi amaçlandı. Anti-HCV antikor testi üçüncü jenerasyon, elektrokemilüminesans metod ile "Elecsys Cobas e601 analizyer" (Roche Diagnostics, Germany) cihazında, biyokimyasal testler "Modular P800" (Roche Diagnostics, Germany) biyokimya otoanalizöründe, real-time HCV-RNA PCR testi "RotorGene Q" (Qiagen, Germany) cihazında çalışıldı. İstatistiksel analizde Ki-Kare ve Mann-Whitney U testleri kullanıldı. Anti-HCV'si pozitif (S/CO ≥ 1.0) 352 hastanın serum değerleri, RNA pozitifliğinin anlamlı derecede düştüğü sınır değerlere göre tasnif edildi. Buna göre düşük düzey pozitif (S/CO 1-10 arası) ve yüksek düzey pozitif (S/CO >10) olarak iki grup oluşturuldu. Düşük düzey pozitif grubun %89'u, yüksek düzey pozitif grubun %58'i HCV-RNA negatif olarak tespit edildi ($p<0.001$) (Tablo). Anti-HCV S/CO <1 bulunan 20 hastanın hiçbirisi HCV-RNA pozitif bulunmadı. Yüksek düzey pozitif grubun ALT düzeyi (medyan=30) düşük düzey gruba (medyan=19) göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.001$). Sonuç olarak, serum anti-HCV değeri düşük düzey pozitif bulunan hastaların, HCV enfeksiyonunun halen devam edip etmediğinin anlaşılabilmesi için, HCV-RNA ve ALT düzeyleri ile birlikte değerlendirilmesinin uygun olacağı kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Anti-HCV, HCV-RNA, ALT

Tablo. Anti-HCV ve HCV-RNA'nın gruplar arası dağılım tablosu.

Anti-HCV	HCV-RNA		Toplam	P değeri
	Negatif	Pozitif		
Düşük düzey (S/Co: 1-10)	137 (%89)	17 (%11)	154	0.000
Yüksek düzey (S/Co >10)	83 (%42)	115 (%58)	198	
Toplam	220	132	352	

SAKARYA YÖRESİNDE SAPTANAN HCV RNA POZİTİFLİKLERİNİN İKİ YILLIK ANALİZİ

Engin Karakeçe, İhsan Hakkı Çiftci, Selçuk Kara

Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sakarya.

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir halk sağlığı sorunu olan hepatit C virusu (HCV) kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinomanın en önemli nedenlerinden birisidir. Bu çalışmada; Sağlık Bakanlığı Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesine hepatit ön tanısıyla başvuran hastalarda HCV RNA sıklığı ve viral yüklerinin saptanması amaçlanmıştır. Çalışmada, Ocak 2010-Aralık 2011 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden laboratuvarımıza gönderilen 953 kan örneği ile gerçekleştirilen HCV RNA çalışmaları sonucunda elde edilen veriler retrospektif olarak irdelenmiştir. RNA eldesi otomatize izolasyon Qiagen QIAasyphony cihazı ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (q-PCR) Rotor-Gene RG-3000 (Corbet Research, Qiagen) cihazı ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Hastanemize başvuran 953 HCV şüpheli hastanın %39.1'inde HCV RNA pozitif bulunmuş ve 2010 ve 2011 yıllarında bu oranın sırasıyla %40.3 ve %38.1 olduğu görülmüştür. HCV RNA pozitifliği, kadınlar arasında erkeklere göre hem 2010 hem de 2011 yılında daha yüksek bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizde kadın ve erkekler arasında HCV RNA pozitiflik oranları arasında 2010 yılı için anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0.05$). Viral yüklerin hastalığın seyrine göre değişim gösterdiği izlenmiştir. Çalışma ile hastanemize hepatit ön tanısıyla başvuran hastalarda HCV RNA sıklığı ve viral yük verileri ilk kez ortaya konmuştur. Yıllar arasında anlamlı bir fark saptanmazken, kadın ve erkekler arasındaki sıklık irdelendiğinde 2010 yıllarında kadınlarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olması dikkat çekici bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: *Hepatit C virusu, HCV RNA, PCR*

HASTANEMİZE BAŞVURAN HEPATİT C HASTALARINDA HCV GENOTİP DAĞILIMI

Oğuz Alp Gürbüz, Ümmü Gül Erdem, Zeynep Dansuk, Meral Erol, Mustafa Çağatay
S. B. Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara.

Hepatit C virusu (HCV) 1989 yılında tanımlanmış, sonrasında da tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olmuştur. HCV enfeksiyonları; kronikleşmesi, karaciğer sirozu ve kanserine yol açması nedeniyle önem taşımaktadır. HCV ile enfekte hastaların tedavisinde genotip belirlenmesi klinik seyir ve tedaviye yanıtta önemlidir. Bu çalışmada, S.B Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Bölümü laboratuvarına, HCV genotip saptanması için gönderilen anti-HCV pozitif 75 hastanın sonuçları sunulmuştur. Çalışmaya dahil edilen hastalarda anti-HCV Murex (Biotech S.A Ltd, Güney Afrika), HCV RNA ise Artus (Qiagen, Almanya) kitleri ile çalışılmıştır. HCV genotip dağılımı real-time PCR (Genome Diagnostics Pvt. Ltd, India) yöntemi ile saptanmıştır. Tiplendirmede GenoSen's HCV genotyping 1/2/3/4 kiti ile HCV'nin 1,2,3 ve 4 genotipleri araştırılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 75 hastanın 64'ünün HCV RNA'sı pozitif, 11'inin ise negatif bulunmuştur. Çalışma sonucunda; hastaların 55'i (%73.3) tip 1, dördü (%5.3) tip 2, biri (%1.4) tip 3 olarak saptanmış; genotip 4 tespit edilmemiştir. Hastaların 15 (%20)'inde ise bu dört genotipten hiçbirini saptanamamıştır. Ülkemizde ve dünyada HCV genotip dağılımını göstermek amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda genotip tip 1b'nin en sık görüldüğü (%82-96), tip 1a'nın ikinci sıklıkta (%3.5-14) olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada da %73.3 oranında genotip 1 saptanmış; ancak 1b ve 1a ayrımı yapılmamıştır. Kronik HCV enfeksiyonunda virusun genotipi, tedaviye cevapta en önemli faktörlerden biri olup, genotip 1 ile enfekte olgularda tedaviye cevabın daha düşük olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda da tip 1 en sık saptanan genotip olmuş ve bu olgularda viral yük düzeyleri ile tedavi cevabının ve klinik prognozun takip edilmesinin gerekli olduğu düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: HCV, genotip, HCV RNA

HCV GENOTİPLERİNİN EPİDEMİYOLOJİSİNDE DEĞİŞİKLİK VAR MI?

Özgül Kaya¹, Alev Duran¹, Çağla Çiftçi¹, Tuba Kayman², Arzu Sayiner¹, Hakan Abacıoğlu¹

¹Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İzmir.

²Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Kayseri.

Türkiye’de hepatit C virus (HCV) prevalansı %1.8’dir ve genellikle sağlık hizmetiyle ilişkilidir. HCV’nin 7 genotipi vardır. Ülkemizde en sık tip 1 HCV enfeksiyonlarına rastlanmaktadır. Genotipleme, epidemiyolojik çalışmalar ve tedavi süresini belirlemek için kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesinde (DEUH) iki ayrı dönemde elde edilen genotip çalışmalarını karşılaştırmaktır. 1995 yılından bu yana toplanan veriler de incelenmiş ve epidemiyolojik değişikliğin varlığı sorgulanmıştır. DEUH’de 1995’te yapılan araştırmanın sonuçlarıyla 2005-2012 yılları arasında saptanan HCV genotiplerinin dağılımı Tablo 1’de gösterilmiştir. Genotipleme REA ile yapılmıştır. Diğer verilere PubMed’te ve ulusal dizinlerde yer alan yayınlardan ulaşılmıştır. DEUH’de 2005-2012 yılları arasında toplam 199 hastadan 179’unda genotip 1 %89.9 oranla ilk sıradadır, sonra sırasıyla genotip 3, 2 ve 4 gelmektedir. Ülkemizdeki tüm veriler Tablo 2’de verilmiştir. Genotip 1 HCV enfeksiyon sıklığında %4.2’lik bir düşüş, genotip 4 enfeksiyonlarında ise 5 katlık bir artış vardır. Genotip 1 HCV enfeksiyonlarının sıklığındaki azalma DEUH ve Türkiye verilerinde görülmektedir. Epidemiyolojik ve fileografik veriler tip 1 HCV epidemisinde bir platoya erişildiğini göstermektedir (ülkemizde kanların HCV yönünden 1996 yılından itibaren taranması ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin iyileşmesi). DEUH verilerine göre genotip 3 HCV enfeksiyonlarına 1995’te hiç rastlanmazken daha sonra %4.5 gibi bir oranda rastlanmıştır. Bu hastaların yaş ortalaması (43) diğer genotiplerin yaş ortalamalarından (genotip 1, 2, 4 için sırasıyla 57, 52, 61 yaş) daha düşüktür. Tip 4 HCV enfeksiyonlarındaki artış dikkat çekmektedir. Bu, örneklem büyüklüğü ile ilişkili olarak rastlantısal olabileceği gibi, belirli coğrafik bölgelerde (Kayseri gibi) tip 4 HCV enfeksiyonu yönünden bir odağa da işaret ediyor olabilir. Bu konudaki verilerimiz ikinci olasılığı desteklemektedir. Sonuçta, HCV epidemiyolojisinin Türkiye’de ve DEUH’de değişmekte olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Epidemiyoloji, genotip, HCV

Tablo 1. DEU Hastanesinde 1995 yılı verileri ile 2005-2012 yılları arasındaki HCV genotip verilerinin karşılaştırılması.

	<i>Genotip 1</i>	<i>Genotip 2</i>	<i>Genotip 3</i>	<i>Genotip 4</i>	<i>Toplam</i>
1995	84	3	-	2	89
Hasta sayısı (%)	(94.4)	(3.4)		(2.2)	
2005-2012	179	8	9	3	199
Hasta sayısı (%)	(89.9)	(4.1)	(4.5)	(1.5)	

Tablo 2. 1994-2004 ve 2005-2011 yılları arasında yapılan genotipleme çalışmaları.

	<i>Genotip 1</i>	<i>Genotip 2</i>	<i>Genotip 3</i>	<i>Genotip 4</i>	<i>Karışık</i>	<i>Toplam</i>
1994-2004	855	25	4	10	8	902
Hasta sayısı (%)	(94.8)	(2.8)	(0.4)	(1.1)	(0.9)	
2005-2011	1392	27	23	78	16	1536
Hasta sayısı (%)	(90.6)	(1.8)	(1.5)	(5.1)	(1.0)	
Toplam	2247	52	27	88	24	2438
	(92.2)	(2.1)	(1.1)	(3.6)	(1.0)	

HEPATİT C VİRUSU KOR (CORE) PROTEİNİNİN PROKARYOT VE MEMELİ HÜCRELERİNE KLONLANIP EKSPRESE EDİLMESİ

Ertan Çakmak¹, Zeynep Sercan², Mehmet Ali Öktem¹, Hakan Abacıoğlu¹

¹Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

²Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İzmir.

Hepatit C virusu (HCV), zarflı ve genomu pozitif yönelimli olan bir RNA virusudur. Dünya Sağlık Örgütü'nün tahminine göre dünyada 170 milyondan fazla birey bu virus ile enfektedir. HCV enfeksiyonu, yüksek morbidite ve mortalitenin yanı sıra sağlık ekonomisi için de önemli bir sorundur. Kor (core) proteini virusun kapsidini oluşturmaktadır. Ayrıca bu protein çeşitli hücresel ve immünolojik süreçleri de etkilemektedir. Bu çalışmanın amacı, HCV kor proteinini prokaryot ve memeli vektörlerine klonlamak, eksprese etmek ve saflaştırmaktır. Böylece bu proteinin hücresel ve immünolojik süreçlere etkisini araştırmak mümkün olabilecektir. Kor proteinini kodlayan ilk 178 aminoasitlik dizi, polimeraz zincir tepkimesi (PCR) ile çoğaltılarak pQE-30 ve pQE-40 vektörlerine prokaryotta tek başına, ya da dehidrofolat-redüktaz (DHFR) ile birlikte eksprese edilmek üzere klonlandı. Eksprese edilen proteinler SDS-PAGE ile karakterize edildi. İmmünojenite "western blot (WB)" ve "enzyme immunoassay (EIA)" ile monoklonal antikor (HEP C Ag) kullanılarak araştırıldı. Kor proteinini kodlayan tüm 191 aminoasitlik dizi pFLAG-CMV-3 ve pFLAG-CMV-4 memeli vektörlerine klonlanarak HuH-7 "transient" olarak transfeksiyonu yapıldı. Prokaryotta yüksek ekspresyon ancak kor proteininin ilk 178 aminoasit DHFR ile birlikte eksprese edildiğinde gerçekleşmiştir. Bu proteinin, WB ve EIA ile immünolojik olarak reaktif olduğu gösterilmiştir. Tam uzunluktaki kor proteininin HuH-7'lerde eksprese edildiği WB ile gösterilmiştir. İmmünolojik reaktif "kor-DHFR" proteininin ekspresyonu *E.coli*'de gerçekleştirilmiştir. Bu proteini deneysel ve tanısal amaçla kullanmak mümkündür. Tam uzunluktaki kor proteininin HuH-7 hücrelerine "transient" transfeksiyonu da gerçekleştirilmiştir. Kor proteininin bu hücrelerdeki adezyon yeteneğine etkisi araştırılmaktadır.

Anahtar kelimeler: Hepatit C virusu, core, klonlama, saflaştırma, transfeksiyon

KRONİK HEPATİT C HASTALARINDA HEPATİT C VİRUSU GENOTİPLERİNİN DAĞILIMI

İmran Sağlık, Derya Mutlu, Dilara Öğünç, Gözde Öngüt, Betil Özhak Baysan, Meral Gültekin, Dilek Çolak

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

Kronik karaciğer hastalığının en önemli nedenlerinden biri olan hepatit C virusunun (HCV) 6 farklı genotipi ve 50'den fazla subtipi bulunmaktadır. Hastalığın seyri ve tedavisi genotiplere ve subtiplere göre farklılık göstermektedir. Bu çalışmanın amacı Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Bölümü'ne gönderilen plazma örneklerinde HCV genotiplerinin araştırılmasıdır. Kronik hepatit C hastası olan 276 hastaya ait plazma örneği incelenmiştir. HCV RNA ekstraksiyonu otomatize sistemde (EZ1 Virus Mini Kit v2.0, Qiagene, Almanya) yapılmış, ardından amplifikasyon için revers transkriptaz PCR (GEN-C RT-PCR, NLM, İtalya) gerçekleştirilmiştir. HCV genotip tayini revers hibridizasyon yöntemi ile nitroselüloz stripler üzerinde (GEN-C, Reverse Hybridization Strip Assay, NLM, İtalya) çalışılmıştır. İkiyüzyetmişaltı hastanın 144'ü (%52.1) erkek ve 132'si (%47.8) kadın olup, yaş ortalaması 48.1 yıl (aralık: 8-78) olarak bulunmuştur. Hastaların tümünde HCV RNA pozitifdir. İkiyüzyirmidokuz (%83) hastada genotip 1, 33 (%12) hastada genotip 3, 10 (%3.6) hastada genotip 2 ve 3 (%1.1) hastada genotip 4 saptanmıştır. Genotip 1 olarak saptanan 229 örneğin 182'sinde (% 79.4) genotip 1b, 31'inde (% 13.5) genotip 1a saptanmış, 16 (% 7) örnekte alt tiplendirme yapılamamıştır. Genotip 3 olarak saptanan 33 örneğin 32'sinde (% 97) genotip 3a saptanmış, bir (%3) örnekte alt tiplendirme yapılamamıştır. On genotip 2 örneğinden 2'si (% 20) genotip 2b, 2'si (% 20) genotip 2a veya 2c olarak saptanmış, 6 (%60) örnekte alt tiplendirme yapılamamıştır. Toplam olarak 276 örneğin 1'inde (% 0.4) tiplendirme, 26'sında (% 9.4) ise alt tiplendirme yapılamamıştır. Sonuç olarak; HCV genotiplerinden genotip 1b en yüksek oranda (%65.9) saptanmıştır. Çalışmamızda % 16.6 oranında saptanan genotip 1 dışındaki genotiplerin bölgemize gelen çok sayıda turist ve/veya bölgemize yerleşen yabancı uyruklu kişilerle ilgili olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Hepatit C virusu, kronik hepatit C, genotip*

HCV TANISINDA KULLANILAN ÜÇ FARKLI YÖNTEMİN SONUÇLARININ YORUMLANMASINDA KARŞILAŞILAN ZORLUKLARIN İRDELENMESİ

Osman Aydın¹, Kerametdin Yanık², Gözde Taç¹, Cafer Eroğlu²

¹Sabuncuoğlu Şerefeddin Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Amasya.

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Samsun.

Hepatit C virusunun (HCV) %70'in üstünde kronikleşmesi, %80 akut fazda asemptomatik oluşu, önemli klinik tablolara yol açması ve hastalarda oluşturduğu tedirginlik nedeniyle doğru ve hızlı tanısı önem arz etmektedir. HCV tanısında kullanılan serolojik testlerde atipik profiller sık görüldüğünden, serumda anti-HCV varlığının tespiti tanıda yeterli değildir. Doğrulama testleri ise her laboratuvarıda yapılamamakta; hastalar ise şüpheli test sonuçları için klinisyenden acil ve kesin bilgi beklemektedirler. Çalışmamızın amacı, hastanemizde bizden acil olarak bilgi bekleyen hastaların HCV tanısı için istenen doğrulama test sonuçlarını yorumlarken karşılaştığımız zorlukları klinisyenlerle paylaşmak ve bu konuda literatüre katkı yapmaktır. Çalışmamızda, devlet hastanesinde Vitros 3600 sistemi ile anti-HCV testi pozitif saptanan 86 hastaya doğrulama amaçlı istenen Western blot (WB; INNO LiPA) ve HCV-RNA (Real-time PCR Reagents Kit, Qiagen) test sonuçları ile hastalardan eş zamanlı istenen AST (Sınır değer: 0-42 U/L) ve ALT (Sınır değer: 0-34 U/L) değerleri yorumlandı. Çalışmaya alınan anti-HCV pozitif 86 hastanın 50'si kadın, 36'sı erkektir. 86 hastanın 5'inde (%5.8) HCV RNA pozitifliği saptandı. Bu hastaların sadece üçünün ALT ve AST değerleri yüksekti. 86 hastanın 26'sında (%30.2) ise WB testi pozitif saptandı. Bu hastaların ise yalnızca dördünde ALT ve AST değerleri yüksekti. WB pozitif hastaların 5'inde (%19.2) ve 86 hastanın 11'inde (%12.7) WB test sonucu belirsiz çıkmış olup, bu hastaların HCV RNA test sonuçları negatifti. Sonuç olarak HCV tanısında altın standart testler olsa da bu testler her yerde, her zaman çalışmamaktadır. Zaman kaybetmeden kesin tanısının konulmasını isteyen bazı hastaları, her testin HCV tanısında kendine göre sınırlamaları olduğundan doğru bilgilendirme, yönlendirme ve takiple doğru tanıya ulaşılabilineceği konusunda ikna etmek tek yol gibi görünmektedir. ALT, AST testleri ise HCV tanısında ancak yardımcı parametrelerdir.

Anahtar kelimeler: HCV tanı, ELISA, Western blot, PCR

ROTAVİRUS GENOTİP DAĞILIMINDAKİ GÜNCEL DURUM: ÖN ÇALIŞMA SONUÇLARI

Zekiye Bakkaloğlu¹, Atila Taner Kalaycıoğlu², Ayşegül Çopur Çiçek³, Ekrem Yaşar⁴, Erdal İnce⁵, Bilge Aldemir Kocabaş⁵, Haluk Güriz⁶, Gülay Korukluoğlu⁷, Tunca Atak⁷, Hülya Karademirtok⁷, Rıza Durmaz⁸

¹Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara.

²Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara; Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars.

³Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Rize.

⁴Diyarbakır Çocuk Hastalıkları Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Diyarbakır.

⁵Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Enfeksiyon Anabilim Dalı, Ankara.

⁶Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

⁷Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Viroloji Referans Laboratuvarı, Ankara.

⁸Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara; Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale.

Rotavirus, tüm dünyada beş yaş altı çocuklarda görülen akut gastroenteritin en önemli etkenidir. Her yıl şiddetli rotavirus ishali nedeniyle 600.000'in üzerinde çocuk hayatını kaybetmektedir. Bu çalışmanın amacı, rotavirus ulusal aşılama programına başlamadan önce, ülkemizde sirküle olan rotavirusların genotip dağılımının güncel durumunu ortaya koymaktır. Rotavirusların G ve P genotiplendirilmesi için konsensus primerler ile birlikte G ve P tip spesifik primerlerin aynı anda kullanıldığı ekonomik ve kısa sürede sonuç verebilen multipleks polimeraz zincir reaksiyon yöntemi optimize edilmiştir. Bu yöntem kullanılarak Ankara, Rize, Diyarbakır illeri ağırlıklı olmak üzere farklı illerden gelen ve rotavirus antijeni pozitif saptanmış 50 klinik örnek ile ön çalışmalar yapılmıştır. Çalışmamızda en yaygın G genotipi olarak G9 (%46) bulunmuştur. Diğer G genotiplerinin dağılımı ise %28 G1, %16 G4, %6 G2 ve %4 G12 olarak saptanmıştır. P genotiplerinin %86'sını P[8], %14'ünü P[4] oluşturmaktadır. G ve P genotip kombinasyonları; G9P[8] (%36), G1P[8] (%28), G4P[8] (%16), G9P[4] (%10), G2P[4] (%4), G12P[8] (%4), G2P[8] (%2) olarak belirlenmiştir. Ülkemizde G12 genotipinin varlığı ilk kez gösterilmiş ve G12 genotipi P[8] ile birlikte saptanmıştır. G9P[8] genotip kombinasyonunun arttığı ve baskın hale geldiği belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, ülkemizde önceden bildirilmiş çalışmalarla kıyaslandığında G9 ve P[8] genotiplerinin baskın olduğu, G1 genotipinin ise azalma eğiliminde olduğu görülmüştür. G3 genotipine ise henüz rastlanılmamıştır. Rotavirus genotip dağılımının yıllara göre değişim göstermesi nedeniyle, rotavirus aşısının ulusal aşılama programına dahil edilmesinden önce, ülkemizin tüm bölgelerini kapsayan süreyans ağının kurularak epidemiyolojik çalışmaların yapılması kritik bir öneme sahiptir.

Anahtar kelimeler: G genotip, P genotip, rotavirus

ROTAVİRUS GENOTİPLERİNİN MRT-PCR REVERSE LINE BLOT HİBRİDİZASYON YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

Mustafa Altındış¹, Fadhil Ahsan², Bas Van Der Veer², Kübra Eryeğen¹, Halil Er¹, Aysegül Bükülmez³, Yasin Yoldaş⁴, Marion Koopmans⁵

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Afyon.

²Department of Virology, Erasmus Medical Center, Rotterdam, Hollanda.

³Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Afyon.

⁴S.B. Zübeyde Hanım Doğum ve Çocuk Bakımevi, Afyon.

⁵National Institute for Public Health and Environment (RIVM), Bilthoven, Hollanda.

Çocuklarda rotavirus enfeksiyonu, asemptomatik formdan ölüme neden olan dehidratasyonla seyreden ciddi diareye kadar değişir. Hızlı ve doğru tanısı da tedavi ve korunmada ilk önemli basamaktır. PCR RLB (Reverse Line Blot Hibridizasyon), özellikle norovirus salgınları ve sporadik olgulardaki virusların kolayca saptanmasını ve genotiplenmesini sağlayan bir metoddur. Bu teknik multiplex PCR RLB hibridizasyon olarak modifiye edilmiş ve epidemiyolojik çalışmalarda standart bir prosedür olarak viral tanı ve tiplendirmede geniş bir kullanım alanı bulmak üzeredir. Bu çalışmada ishallerde etken olabilecek rotavirusların PCR RLB ile saptanması ve tiplendirilmesi amaçlanmıştır. Klinik olarak gastroenterit tanısı konulmuş 112 hastanın dışkı örneklerinde kültür yöntemleri ile patojen bakteriler ekarte edildikten sonra, immünokromatografik (IC) yöntem ile (VIKIA Rota-Adeno, BioMerieux) rota ve adenovirus antijenleri araştırılmış, ayrıca örneklerden PCR-RLB yöntemi ile rotavirus saptanması ve genotiplendirilmesi yapılmıştır. Dışkıdan RNA ekstraksiyonu (QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen) sonrası PCR'da tüm örnekler için "Qiagen Hotstar Taq polymerase" (Qiagen) kiti kullanılmıştır. Primerlerin 5' ucu biotinlenmiş, problemler de 5' amin gruplarına sahiplerdir. RT PCR karışımı, Qiagen Kit ve WHO manuel önerileri ile biotinlenmiş PCR ürünleri için modifiye edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 112 dışkı örneğinin 33'ünde rotavirus, 6'sında adenovirus IC test ile pozitif saptanmıştır. PCR-RLB yöntemi ile çalışılan 112 örnekte 40'ü rotavirus açısından pozitif bulunmuş, bu suşların alttür dağılımları 18'i G1P8, 8'i G4P8, 6'sı G9P8 ve 4'ü G2P4 olarak saptanmıştır. Dört örnek ise tiplendirilememiştir. Konvansiyonel RT-PCR ile karşılaştırıldığında PCR-RBL'nin daha ucuz ve güvenli olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda saptanan rotavirus pozitifliği ve genotip dağılımı dünyada yaygın olan genotipler ile korele bulunmuştur. Rotavirus genotip dağılımı bölgesel ve mevsimsel değişimler de gösterebilmektedir.

Anahtar kelimeler: Rotavirus, genotip, RT PCR RLB

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ HASTANESİ MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARINA HERPES SIMPLEX VİRUS DNA'SI ARANMASI İÇİN GÖNDERİLEN KLİNİK ÖRNEKLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İmran Sağlık, Zübeyde Eres Sarıtaş, Derya Mutlu, Betil Özhak Baysan, Gözde Öngüt,
Dilara Ögünç, Dilek Çolak

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

Herpes simplex virus tip 1 ve 2 (HSV-1 ve -2) yaygın olarak görülen, farklı organ ve doku tutulumu ile farklı klinik bulgulara neden olabilen viral enfeksiyon etkenleridir. Bu enfeksiyonlar genellikle asemptomatiktir. Semptomatik olduğunda genellikle ağız ve genital bölgede lezyonlarla seyretmekle birlikte, santral sinir sisteminde tutulum olduğunda viral ensefalit; göz tutulumu olduğunda ise keratokonjunktivit gibi klinik tablolar şeklinde de karşımıza çıkabilir. Bu enfeksiyonlar özellikle immün düşkün hastalarda daha ağır seyretmektedir. Bu çalışmanın amacı, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Bölümü'ne HSV-1 ve -2 DNA varlığının araştırılması için gönderilen çeşitli klinik örneklerle ait sonuçların değerlendirilmesidir. Çalışmaya Ocak 2011-Nisan 2012 tarihleri arasında gönderilen 199 hastadan alınan 188 BOS, 5 plazma, 2 ağız sürüntüsü, 1 amniyon sıvısı, 2 konjunktiva ve 1 lens örneği dahil edildi. Tüm örneklerde DNA ekstraksiyonu EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagene, Almanya) ile yapıldıktan sonra gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu Artus HSV-1/2 RG PCR (Qiagene, Almanya) kiti ile gerçekleştirildi. Yedi (%3.7) BOS örneğinde, 2 (%100) ağız ve 1 (%33.3) konjunktiva sürüntüsünde HSV-1 DNA; 1 (%0.5) BOS örneğinde HSV-2 DNA saptandı. BOS örneklerinde HSV-1 DNA saptanan 7 olgudan 5'i (%71.4) asiklovir tedavisi sonrası iyileşip taburcu olurken 2'si ex oldu. BOS örneğinde HSV-2 DNA saptanan olgu ise bakteriyel menenjit tanısı ve tedavisi sonrasında klinik bulguları düzelerek taburcu edildi. Ağız sürüntüsünde HSV-1 DNA saptanan hastaların her ikisi de immün düşküdü, her ikisinin de dilinde ve mukozalarında yaygın kanamalı lezyonlar vardı; izlemde hastalardan birinde HSV ensefaliti, diğerinde ise HSV keratokonjunktiviti gelişti. Laboratuvarımızda en çok BOS (%94.5) örneklerinde HSV-1 ve -2 DNA'sı araştırılmıştır. Viral ensefalitli olgularda PCR ile erken tanı ve erken antiviral tedavi sonrası hasta sağkalımı %71.4 olarak bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: *Herpes simplex virus, PCR, viral ensefalit, keratokonjunktivit*

RENAL TRANSPLANT ALICILARINDA GANSİKLOVİR DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI

Ajda Turhan¹, Ayşın Zeytinoğlu², Ergül Utkun², Hüseyin Töz³

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Kan Merkezi; ²Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; ³İç Hastalıkları, Nefroloji Bilim Dalı, İzmir.

Transplant alıcılarında sorun olan sitomegalovirus (CMV) hastalığının tedavisinde ve profilaksisinde kullanılan gansiklovir (GCV), valgansiklovir, foskarnet ve sidofovir viral DNA polimerazı hedeflemektedir. Son zamanlarda bu grup hastalarda antiviral tedavinin yaygın kullanımı nedeniyle bu ilaçlara dirençli CMV izolatları bildirilmektedir. Transplant alıcılarında %5-10 oranında görülen ve antiviral tedavinin başarısızlığına yol açan GCV direnci, UL97 bölgesinin sekans analizi ile saptanmaktadır. Çalışmada, posttransplant dönemde, CMV DNA'sı pozitif saptanan renal transplant alıcılarında UL97 bölgesinde tanımlanmış GCV direnç paternleri araştırıldı. Canlı vericiden transplantasyon yapılan ve posttransplant izlemlerinde CMV DNA pozitifliği saptanan 11 renal transplant alıcısı çalışmaya alındı. Bu hastaların dokuzu erkek, ikisi kadındı. Bu olgular 21-65 yaş aralığında olup yaş ortalaması 37.6 yıl idi. İmmün süpresif tedavileri; dördünde prednisolon+mikofenolat mofetil/sodyum+takrolimus, diğer yedisinde prednisolon+mikofenolat mofetil+siklosporin idi. Olguların 10'unda transplantasyon sonrası antiviral profilakside asiviral ve birinde valgansiklovir kullanıldı. Bu olgularda kantitatif CMV DNA 21-183. günlerinde (ortalama 62.7 gün) saptandı ve viral yükleri 1.50×10^2 - 7.33×10^4 IU/ml düzeylerinde (ortalama 7.45×10^2 IU/ml) idi. Nükleik asit izolasyonu (İontek-Mag 16) yapılan örneklerde kantitatif CMV DNA gerçek zamanlı PCR CMV QNP 3.0 Fluorion real-time PCR kiti ile saptandı. Yapılan UL97 sekans analizinde (ABI 3130) GCV için tanımlanan M460V, M460I, H520Q, A591V, C592G, A594V, A594T, L595S, E596G, K599T, C603V, C607F ve C607Y mutasyonları araştırıldı. UL97 GCV mutasyonları aranan 11 olguda saptanmadı. Son yıllarda transplant alıcılarında CMV enfeksiyonunda kullanılan antiviral profilaksi ve tedavi, antiviral dirence neden olmaktadır. Antiviral tedavide klinik/viral yük izleminde yanıt alınamayan olgularda UL97 mutasyonlarının araştırılması önemlidir.

Anahtar kelimeler: CMV, gansiklovir direnci, UL97 mutasyonları

DENGUE VİRUSUNUN (DENV) VENÖZ TROMBOEMBOLİZMDE YERİ OLAN ADAMTS13 EKSİKLİĞİNDEKİ OLASI ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Mehmet Sami Serin¹, Naci Tiftik², Bülent Karakaya², Bahar Tunçtan³, Aylin Döğen¹, Seda Tezcan⁴, Engin Kaplan¹, Gönül Aslan⁴, Gürol Emekdaş⁴, Atilla Yalçın⁵, Zehra Öksüz¹

¹Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji AD, Mersin

²Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji BD, Mersin

³Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji AD, Mersin

⁴Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Mersin.

⁵Medicana Hospital, Ankara.

Bir metalloproteinaz olan ADAMTS13, plazmadaki büyük vWF multimerlerinin parçalanmasında görev almaktadır. ADAMTS13 eksikliği nedeniyle büyük vWF multimerlerinin varlığı, trombotik trombositopenik purpuranın patogeneğinde yer alan majör faktördür. ADAMTS13'e karşı oluşan otoantikorlar önemli faktörlerden birisi olup, oluş nedeni net değildir. Son zamanlarda viral ve paraziter bazı etkenler ile ortaya çıkan pro-inflamatuvar sitokinlerin bu oluşumda rol oynayabileceği bildirilmiştir. Dengue ateşi, sivrisinekler ile bulaştırılan ve dünyada artan bir insidansa sahip olan bir viral hastalıktır. Trombositopeni DENV enfeksiyonunun bulgularından birisidir; ancak mekanizma netleşmemiştir. Son zamanlarda DENV enfeksiyonu ADAMTS13 eksikliği ile ilişkilendirilmektedir. Venöz trombozlu 30 hasta ve 30 kontrol ile yapmış olduğumuz bir çalışmada, kontrol grubuna göre önemli farklılık gösteren, düşük düzeyde ADAMTS13 ve önemli ölçüde yüksek düzey gösteren vWF plazma düzeyleri saptamıştık. Bu çalışmamızda, aynı hasta ve kontrol grubunda DENV RNA, anti-DENV IgG, ADAMTS13 otoantikorları, IL-6 ve nitrotirozin düzeylerini araştırarak hastalığın etiyolojisinde DENV'nun olası rolünü saptamayı amaçladık. 30 hasta ve 30 sağlıklı bireyden oluşan toplam 60 kişiye ait plazma örneklerinde anti-DENV IgG, ADAMTS13 otoantikorları, IL-6 ve nitrotirozin düzeyleri ELISA ile, DENV RNA ise revers transkripsiyon real-time PCR ile araştırıldı. Çalışmada, DENV IgG antikorları hastaların 13 (%43)'ünde ve kontrollerin 3 (%10)'ünde; ADAMTS13 otoantikorları hastaların 7 (%23.3)'sinde ve kontrollerin 1 (%3)'inde; IL-6 düzeyi ise hastaların 10 (%33.3)'unda ve kontrollerin 3 (%10)'ünde yüksek olarak bulunmuştur. Nitrotirozin düzeyi, hasta grubunda ortalama 12 nM ve kontrol grubunda ortalama 12.33 nM olarak saptanmıştır. DENV RNA pozitifliği ise, hasta grubunda 5 (%16.6), kontrol grubunda bir kişide (%3.3) tespit edilmiştir. Sonuç olarak, hasta grubunda saptanan DENV IgG düzeyleri ve DENV RNA pozitifliği kontrol grubuna göre daha yüksek oranda bulunmakla birlikte, daha geniş popülasyonlarda yapılacak olan çalışmalar, bu ilişkiyi daha net olarak ortaya çıkaracaktır.

Anahtar kelimeler: DENV, venöz tromboemboli, ADAMTS13, RT-PCR

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ'NDE KASIM 2011 – NİSAN 2012 TARİHLERİ ARASINDA AKUT SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONU TESPİT EDİLEN ÇOCUKLARDA SAPTANAN VİRAL ETKENLER

İştar Dolapçı¹, Zeynep Ceren Karahan¹, Adem Karbuz², Bilge Aldemir Kocabaş², Ergin Çiftçi², Erdal İnce², Alper Tekeli¹

¹Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

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

Akut viral solunum yolu enfeksiyonları, çocuklarda morbidite ve mortalitenin önemli nedenlerindendir. Klasik tanı yöntemlerine kıyasla moleküler yöntemler, hızları ve yüksek duyarlılıklarıyla viral enfeksiyonların tanısında ön plana çıkmaktadırlar. Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD Moleküler Tanı ve Araştırma Laboratuvarına Ekim 2011–Nisan 2012 tarihleri arasında Çocuk Hastalıkları Kliniği'nden gönderilen 269 adet solunum yolu örneğinde multipleks RT-PCR yöntemi ile tespit edilen viral etkenlerin dağılımı incelenmiştir. Çalışmada yaşları 13 gün-18 yaş arasında değişen 217 hastaya ait 269 örnek değerlendirilmiştir. Hastalardan alınan solunum yolu örneklerinden viral DNA/RNA izolasyonunda Ribospin vRD Viral RNA/DNA ekstraksiyon kiti (GeneAll Biotechnology, Kore), c-DNA eldesinde RevertAid First Strand cDNA Sentez Kiti (Fermantas, Litvanya) kullanılmıştır. Örneklerde, Adenovirus A-E, Coronavirus 229E/NL63-OC43, Parainfluenza virus 1-4, Rhinovirus A/B/C, İnfluenza A/B virus, solunum sentiyal virusu (RSV) A/B, Bocavirus 1-4, Metapneumovirus ve Enterovirus varlığı Seeplex RV15 (Seegene, Kore) ticari tanı kiti kullanılarak multipleks RT-PCR ile üreticinin önerileri doğrultusunda araştırılmıştır. Çalışmada, 269 örneğin 184'ünde (%68.4) en az bir viral etkene ait nükleik asit saptanmıştır. Pozitif örneklerin 95'inde (%51.63) tek, 64'ünde (%34.78) iki, 24'ünde (%13.04) üç, birinde dört viral etken bulunmuştur. Pozitif örneklerin %54.89'unda RSV A/B virüsleri, %35.33'ünde ise influenza A/B virüsleri tek başına ya da başka etkenlerle birlikte saptanmıştır. İki etken saptanan 64 örneğin %56.25'inde etkenlerden birinin RSV, %50'sinde ise influenza virüsleri olduğu tespit edilmiştir. Üç farklı viral ajan bulunan 24 örneğin %70.83'ünde etkenlerden en az birinin influenza virüsleri; %45.83'ünde ise RSV virüsleri olduğu bulunmuştur. Tespit edilen etkenler, mevsimsel dağılım ve klinik bulgularla uyumludur. Çoklu pozitiflik oranı yüksek olup, bu hastalarda klinik tanının ön planda tutulması gereklidir.

Anahtar kelimeler: RT-PCR, solunum yolu enfeksiyonu, viral enfeksiyon

BÖLGEMİZDE SOLUNUM YOLU ENFEKSİYON ETKENİ VİRUSLARIN 2011-2012 SONBAHAR-KIŞ SEZONUNDAKİ DAĞILIMI

Mehmet Özdemir, Bahadır Feyzioğlu, Mehmet Emin Demircili, Mahmut Baykan, Bülent Baysal

Konya Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya.

Akut solunum yolu enfeksiyonları bütün bireylerde en sık görülen hastalıktır. Son zamanlarda influenza, pandemi yapması nedeniyle öne çıkmasına rağmen diğer virüsler da akut üst solunum yolu enfeksiyonlarına sıklıkla neden olmaktadır. Bu çalışmada, bölgemizde akut solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan viral patojenlerin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, 1 Kasım 2011 - 15 Mart 2012 arasında ateş, boğaz ağrısı, öksürük, kırgınlık, baş ağrısı, miyalji, burun akıntısı ve/veya tıkanıklığı olan ve çeşitli kliniklerden gönderilen hasta örnekleri ve laboratuvara başvuran hastalardan alınan boğaz sürüntü örnekleri alındı. Toplam 273 örnekte İnfluenza tip A ve B, Rhinovirus, solunum sinsityal virusu (RSV) A ve B, Parainfluenza virus (PIV) tip 1,2,3 ve 4, Adenovirus, Bocavirus, insan Coronavirus (HCoV)-229E/NL63, HCoV-OC43, Enterovirus ve insan Metapneumovirus (HMPV) pozitifliği multipleks PCR yöntemi ile araştırıldı. Bu örneklerin 160'ı (%58.6) solunum virüsleri açısından pozitif bulundu. Bunların dağılımı; RSV-B 55 (%20.1), İnfluenza A 43 (%15.7), Rhinovirus 20 (%7.3), Parainfluenza-1 17 (%6.2), RSV-A 8 (%2.9), HMPV 7 (%2.5), HCoV-229E/NL63 4 (%1.4), HCoV-OC43 3 (%1), influenza B 2 (%0.7) ve Adenovirus 1 (%0.3) örnekte pozitif bulundu. Konya bölgesinde 2011-2012 sonbahar-kış sezonunda solunum yolu enfeksiyonlarına en sık neden olan virüslerin; RSV-B, İnfluenza A ve Rhinovirus olduğu; PIV 2,3,4, Bocavirus ve enterovirüslerin araştırılan sezonda bölgemizde patojen etken olarak izlenmediği saptandı. Solunum yolu virüslerinin mevsimsel ve bölgesel dağılımının incelenmesi, viral hastalıkların epidemiyolojisi, tanısı ve tedavisi açısından önemlidir. Bu nedenle viral patojenlerin bölgesel izleminin yapılması faydalı olacaktır.

Anahtar kelimeler: *Virus, solunum yolu, enfeksiyon, influenza, PCR*

VİRAL PNÖMONİ TANISI ALAN HASTALARDA ETKENLERİN MULTİPLEKS POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI

Oya Akkaya, Bahadır Feyzioğlu, Mehmet Özdemir, Bülent Baysal
Konya Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Konya.

Akut solunum yolu enfeksiyonları yaygın karşılaşılan önemli bir sağlık sorunudur. Solunum virusları olarak tanımlanan viral patojenler, akut solunum yolu enfeksiyonlarının en önemli etkenleridir. Çalışmamızın amacı Selçuk (Konya) Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi'ne pnömoni nedeniyle başvuran çocuk ve yetişkin hastalarda, viral etkenlerin multipleks PCR yöntemiyle tespit edilmesidir. Ekim 2010–Nisan 2011 tarihleri arasında hastanemize başvuran ve pnömoni tanısı düşünülen 150 çocuk ve 150 yetişkin hastadan nazofarengeal sürüntü örneği alındı. Örnekler çalışılncaya kadar -20°C'de saklandı. Viral DNA/RNA ekstraksiyonu ve amplifikasyonu ticari Seeplex®RV12 (Seegene Inc., MD) multipleks PCR kiti kullanılarak yapıldı. Viral DNA/RNA amplikonları etidyum bromür ile boyanıp %2 agaroz jelde yürütüldü ve oluşan bantlara göre viruslar tanımlandı. Çalışılan örneklerin %46.2'sinde, en az bir virus tespit edildi. Bunların da %45'inin solunum sinsityal virusu (RSV) olduğu belirlendi. Saptanan diğer viruslar, sırasıyla, %19.4 rinovirus, %13.6 influenza A virus, %6.5 parainfluenza virus, %4.3 influenza B virus, %3.6 adenovirus, %2.9 koronavirus ve %1.4 metapnömovirus olarak izlendi. Pozitif 139 örneğin 107 (%35.6)'si çocuk ve 32 (%10.6)'si yetişkin hastalardan elde edildi. Beş (%1.6) hasta numunesinde birden fazla etken belirlendi. 0-4 yaş grubunun %71'inde, 5-9 yaş grubunun ise %75'inde viral etioloji belirlendi. Erişkin hasta grubuna ait örneklerde daha az oranda viral etken belirlenirken bu farklılık istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p>0.537$). Viral pnömoni tanısı alan hasta grubumuzda, RSV en yüksek oranda tespit edilen virus olurken, çocukluk yaş grubu pnömonilerinde viruslar en önemli etiyolojik ajanlar olarak belirlendi. Bu çalışmada kullandığımız multipleks PCR yönteminin, solunum yolu enfeksiyonlarının tanısında kullanılabilecek kolay, hızlı ve güvenli bir test olduğu sonucuna varıldı.

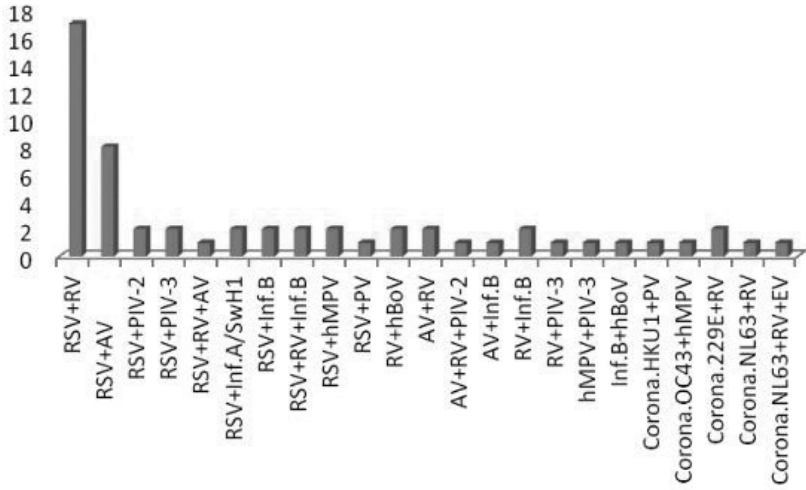
Anahtar kelimeler: *Multipleks PCR, solunum virusları, pnömoni*

SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONU NEDENİYLE HASTANEDE YATAN İNFANTLARDA VİRAL KOENFEKSİYONUN GÖRÜLME SIKLIĞI

Sultan Yolbakan, Ayşe Başak Altaş, Fatma Bayrakdar, Gülay Korukluoğlu
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara.

Solunum yolu enfeksiyonlarının yıllık görülme sıklığı yetişkinlere oranla infanlarda daha fazla olup, neden olduğu hastalık yükü aynı oranda artmaktadır. Hastaneye yatışların en önemli sebebi, görülme sıklığına göre; solunum sinsityal virusu (RSV), insan rhinovirus (HRV) ve influenza viruslarıdır. RSV enfeksiyonu süresince adenovirus (AV) ve HRV tesbit edilmiş olması hastalığın seyrinde ciddi bir artışa sebep olmamaktadır. Ancak RSV ile birlikte insan metapnömovirus (HMPV) koenfeksiyonunun varlığı, infantın yoğun bakım ünitesine alınmasını gerektirmektedir. Biz bu çalışmada, 2010 (40. hafta) - 2012 (10. hafta) tarihleri arasında Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarı'na solunum yolu virusları tanı istemi ile Ankara'daki hastanelerden gönderilen 566 infanta ait örneklerde (nazofaringeal/nazal sürüntü, boğaz sürüntüsü, trakeal aspirat, bronkoalveolar lavaj) viral koenfeksiyonların görülme sıklığını araştırdık. Solunum yolu virusları arasındaki sinerjik etkileşime; yaygın olarak birlikte enfeksiyon oluşturan viruslara da dikkat çekmek istedik. Klinik örneklerde solunum yolu virusları, multipleks RT-PCR tanı sistemi ile Fast Track Diagnostics/Respiratory Pathogen 12/21 (Luxemburg) ve AusDiagnostics/Respiratory Pathogen 12 (Australia) ticari kitleri kullanılarak; Influenza virus A (Inf.A), Inf.A/SwH1, Influenza virus B (Inf.B), Rhinovirus (RV), RSV A/B, Parainfluenza virus (PIV) 1/2/3/4, Coronavirus OC43/ 229E/NL63/HKU1, Parechovirus (PV), Enterovirus (EV), Adenovirus (AV), Human Bocavirus (HBoV) ve Human Metapneumovirus (hMPV) nükleik asidi varlığı açısından incelenmiştir. Örneklerin %89.3'ünde en az bir viral ajan tesbit edilmiş; bunların da %23.5'i RSV pozitif bulunmuştur. RSV pozitif infanların %8.4'ünde ise koenfeksiyon tesbit edilmiştir. Çalışmada total koenfeksiyon oranı %11.6 olarak belirlenmiştir (Şekil). Sonuç olarak %11.6 oranında tesbit edilen viral koenfeksiyonların, özellikle RSV pozitif infanlarda büyük oranda HRV kaynaklı olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Infant, koenfeksiyon, solunum yolu virusları*



Şekil. Ankara'da solunum yolu enfeksiyonu nedeniyle hastanede yatan infantlarda 2010 (40.hafta) -2012 (10.hafta) arasında viral koenfeksiyonların pozitiflik oranı.

KEMİK İLİĞİ TRANSPLANTASYONU YAPILAN HASTALARDA BK VİRUS VARLIĞININ KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE GÖSTERİLMESİ

Seyyal Rota¹, Işıl Fidan¹, Gülsan Sucak², Zübeyde Lale¹

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; ²Kemik İliği Transplantasyon Ünitesi, Ankara.

BK virus (BKV), *Polyomaviridae* ailesinden, küçük, zarfsız, ikozahedral yapılı, çift iplikli DNA virusudur. İmmün sistemi normal kişilerde subklinik enfeksiyonlar oluştururken, immün yetmezlikli hastalarda aktive olarak litik enfeksiyonlara ve çeşitli klinik bulguların ortaya çıkmasına yol açabilir. Bu çalışmada, kemik iliği transplant alıcılarında BKV varlığı ve replikasyon düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Kemik iliği transplantasyon ünitesinden laboratuvarımıza gönderilen 250 hastaya ait 415 örnek (342 idrar, 73 kan) çalışma kapsamına alındı. BKV DNA'sı kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRtPCR) ile tespit edildi. Viral DNA kantitasyonu Qiagen Artus RG PCR kiti (Qiagen, Hamburg) kullanılarak yapıldı. İncelenen 415 hasta örneğinden 45'inde (%10.8) qRt-PCR yöntemi ile BKV DNA pozitif olarak bulundu. İncelenen 342 idrar örneğinin 40'ında (%11.6), 73 kan örneğinin 5'inde (%6.8) BKV DNA pozitif olarak tespit edildi. BKV DNA pozitif olarak bulunan 45 örneğin sadece ikisinde (%4.4) viral yük <500 kopya/mL iken, diğer tüm örneklerde (%95.5) viral yük >500 kopya/mL olarak belirlendi. İnsanlarda latent fazda kalıp, özellikle immün süpresif hastalarda reaktif olarak yaşamı tehdit eden komplikasyonlara yol açabilen BKV'un, kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarda da önemli bir enfeksiyon etkeni olduğu görülmektedir. Bu nedenle bu virusun erken dönemde kantitatif gerçek zamanlı PCR yöntemi gibi güvenilir bir yöntem ile hızlı ve doğru tespiti, bu hastalarda yaşam süresini artırıcı bir faktör olarak rol oynayacaktır.

Anahtar kelimeler: BK virus, kemik iliği transplant alıcısı, polimeraz zincir reaksiyonu

SAĞLIKLI KAN DONÖRLERİNDE TRANSFÜZYONLA GEÇEN VİRUS (TTV) SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Şeyda Özsoy, Esra Koçoğlu, Tekin Taş

Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Bolu.

Transfüzyonla virus enfeksiyonlarının bulaşabildiğine ilişkin ilk veriler 1940'lı yıllara kadar uzanmaktadır. Yapılan birçok çalışmada, TTV (*Transfusion-Transmitted Virus*)'nin de tranfüzyonla geçtiği bildirilmiştir. Bir DNA virusu olan TTV, ilk olarak 1997 yılında transfüzyona bağlı hepatiti olan bir hastanın serumundan izole edilmiştir. Bu çalışmada transfüzyon merkezine başvuran sağlıklı kan donörleri ile hepatit B ve hepatit C hastalarında TTV sıklığının araştırılması ve TTV pozitifler arasında ALT ve AST düzeylerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Hastanemizin transfüzyon merkezine Kasım 2009-2010 tarihleri arasında başvuran, HBsAg, anti-HCV, anti-HIV ve VDRL testleri negatif, 500 gö-nüllü kan donörünün serumu çalışmaya alındı. Ayrıca Mikrobiyoloji Laboratuvarına he-patit ön tanısıyla yollanan ve PCR testleriyle kanında viral genom tesbit edilen hepatit B enfeksiyonlu 100 ve hepatit C enfeksiyonlu 85 hasta serumu çalışmaya dahil edildi. HBsAg, anti-HCV ve anti-HIV testleri makroELISA (Architect i2000SR, Abbott Diagnostic) yöntemiyle, ALT ve AST testleri kinetik yöntem ile (Architect C8000, Abbott Diagnostic) çalışıldı. VDRL testi (Acon) için immünokromatografik yöntemle çalışan kart test kullanıldı. Viral DNA izolasyonu için QIAamp DNA Mini Kiti (Qiagen) kullanıldı. TTV genomu, RT-PCR yöntemi ile (Fluorion-QLS 1.0, İontek) araştırıldı. Sağlıklı kan donörlerinde TTV DNA pozitiflik oranı %79.8 (n=399) iken, HBV DNA pozitiflerde %96 (n=96), HCV RNA pozitif-lerde ise %83.5 (n=71) olarak bulundu. TTV DNA'sı pozitif hepatit B ve C hasta grupları ile sağlıklı kan donörleri, ALT ve AST pozitifliği açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Ancak TTV DNA pozitif olanlarla olmayanlar arasında ALT ve AST pozitifliği açısından anlamlı fark bulunmadı. Bu sonuçlar, TTV'nin hepatit B ile ko-enfeksiyon oluşturabileceğini, ancak karaciğer hücreleri üzerine zarar verici bir etkisinin olmadığını düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: *Transfüzyonla geçen virus, TTV, kan donörü*

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİNDE HSV'YE BAĞLI MENENJİTLERİN PREVALANSI

Bilge Gültepe, Yasemin Bayram, Hüseyin Güdücüoğlu, Mustafa Berktaş

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van.

Viruslar, menenjitin önemli etkenleri arasında yer almaktadır. Ayrıntılı epidemiyolojik ve mikrobiyolojik araştırmalarda hastaların %55-70'inde viral etken belirlenebilmektedir. Herpes simpleks virus (HSV) tip 1' bağlı merkezi sinir sistemi enfeksiyonları, tedavi edilmediğinde genellikle ölümle sonuçlanan ensefalit olarak seyrederken; HSV tip 2 menenjiti sağlıklı bireylerde kendiliğinden iyileşebilmektedir. Çalışmamızda çeşitli kliniklerden (çocuk acil, pediatri, intaniye, nöroloji) menenjit ön tanısı ile gönderilen 100 BOS örneğinde HSV varlığı ve tiplendirmesi kalitatif real-time PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmaya alınan hastaların yaş aralığı 1-49 yaş arasında değişmekte olup, bunların %57'sini 1 yaş olgular oluşturmaktadır. Hastaların %54'ü erkek, %46'sı ise kadındır. Örneklerden nükleik asit izolasyonu otomatize sistem olan EZ1 cihazı (Qiagen, USA) ile yapılmıştır. Çalışmada kullanılan HSV I/II Typing Real-TM kiti, üretici firmanın (Sacace, Italy) önerisi doğrultusunda çalışılmış ve beş BOS örneğinde HSV pozitifliği belirlenmiştir. Tespit edilen HSV'lerin 3'ü tip 2 bulunmuş, 2'si ise tip 1 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak menenjit; gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Bu hastalarda mortalite ve morbiditeyi azaltmak için erken tanı ve tedavi çok önemlidir. Menenjitten şüphelenilen vakalarda herhangi bir kontrendikasyon yoksa lomber ponksiyon yapılarak BOS PCR gibi hızlı sonuç veren yöntemlerle incelenmelidir.

Anahtar kelimeler: *Menenjit, BOS, real-time PCR*

ÇOCUKLARDA EBV ENFEKSİYONUNUN KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE SAPTANMASI

Işıl Fidan, Seyyal Rota, Zübeyde Lale

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

Epstein-Barr virusu (EBV), *Herpesviridae* ailesinde yer alan latent, litik ve persistan enfeksiyonlara yol açabilen bir DNA virusudur. Bebek ve çocuklarda primer EBV enfeksiyonu genellikle asemptomatik veya sublinik olarak seyrettiğinden tanısı zordur. Primer EBV enfeksiyonu, viral kapsid antijeni (VCA)'ne karşı antikor (IgM ve IgG) varlığında, Epstein-Barr nükleer antijenleri (EBNA)'ne karşı antikorların bulunmaması olarak tanımlanır. Ancak, son yıllarda özellikle çocukluk döneminde serolojik testlerdeki düşük duyarlılıklar nedeniyle EBV enfeksiyonun tanısında, kantitatif gerçek zamanlı (real-time) polimeraz zincir reaksiyonu (qRtPCR) geliştirilmiştir. Çalışmamızda, serolojik olarak primer ve geçirilmiş EBV enfeksiyonu saptanan ve EBV-seronegatiflik tespit edilen çocuk hastalara ait serum örneklerinde EBV DNA varlığının qRtPCR yöntemi ile saptanması amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan serum örnekleri 3 gruba ayrıldı; a) Serolojik olarak primer EBV enfeksiyonu belirlenmiş grup; b) Serolojik olarak geçirilmiş EBV enfeksiyonu tespit edilmiş grup; c) EBV seronegatif grup. Serum örneklerinde EBV DNA varlığı qRtPCR ile araştırıldı. Viral DNA kantitasyonu Qiagen Artus EBV RG PCR kiti (Qiagen, Hamburg) kullanılarak yapıldı. Serolojik olarak primer EBV enfeksiyonu belirlenen serum örneklerinin %89.2'sinde, EBV seronegatif örneklerin %4.3'ünde EBV DNA tespit edilirken, geçirilmiş EBV enfeksiyonu bulunan serum örneklerinin hiçbirinde EBV DNA tespit edilemedi. EBV seronegatif örneklerde EBV DNA PCR pozitifliği, aynı örnekten tekrar PCR çalışılarak doğrulandı. Gruplar arasında EBV viral yükü ilgili anlamlı bir fark tespit edilmedi. Sonuç olarak, real-time PCR sisteminin özellikle primer EBV enfeksiyonunun tanısında kullanılabilecek, güvenilir bir yöntem olduğu düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: *EBV enfeksiyonu, polimeraz zincir reaksiyonu*

LABORATUVARIMIZDA KRONİK HEPATİTLİ HASTALARA AİT HBV DNA VE HCV RNA SONUÇLARI VE TAKİPTE UYGUNSUZ TEST İSTEĞİ

Yasemin Bayram¹, Mehmet Parlak², Aytekin Çıkman³

¹Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van.

²Van Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Van.

³Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Erzurum.

Bu çalışmada, kronik hepatit B (HBV) ve hepatit C virus (HCV) enfeksiyonu olan hastalarının takibinde ve tedaviye yanıtın izlenmesinde önemli yer tutan HBV-DNA ve HCV-RNA testi sonuçlarının irdelenmesi amaçlanmıştır. Bir yıllık süre içerisinde serum örneklerinde çalışılan 703 HBV-DNA ve 71 HCV-RNA moleküler testi sonuçları geriye dönük olarak incelenmiştir. HBV-DNA ve HCV-RNA testleri real-time polimeraz zincir reaksiyonu (Roche/COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® System) yöntemiyle çalışılmıştır. Çalışmaya alınan 703 HBV-DNA testinin 262 (%37.3)'si pozitif olup; bunların 208'i (%30) 10^4 - 10^7 kopya/ml arasında, 54'ü (%7) 10^7 kopya/ml üzerinde saptanmıştır. Kopya sayısı $\geq 10^4$ /ml saptanan hastaların 168'i (%64) erkek, 94'ü (%36) kadın olup, yaş aralığı <1 - >60 arasında değişmektedir. HBV-DNA için kopya sayısı 10^4 /ml ve üzeri saptanan 262 hastanın 30'unda (%11) hastada takip amacı ile test tekrar istenmiştir. HBV-DNA negatif saptananlarda test tekrar oranı %6 olarak bulunmuştur. HCV-RNA testi uygulanan 71 hastanın 10'unda (%14) kopya sayısı 10^4 /ml ve üzerinde saptanmıştır. Sonuç olarak, özellikle HBV için olmak üzere HCV gibi kronik enfeksiyonların takibinde önemli yer tutan nükleik asit saptama tetkiklerinin izleminin gerektiği şekilde istenmediği görülmüştür. Bu durumun, negatif hastaların izlenmesi ve pozitif hastaların tedavi yanıtının değerlendirilmesinde zorluklara yol açabileceği aşıkardır. Bu nedenle takibinin yapılarak gerekli düzenleyici önlemlerin alınması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: HBV DNA, HCV RNA

AVIAN CORONAVIRUS İZOLASYONU VE GENOTİPLENDİRİLMESİ

Kamil Tayfun Carlı¹, Fethiye Çöven³, Serpil Kahya¹, Ayşegül Eyigör², Zafer Ata², Seran Temelli²

¹Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, ¹Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; ²Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Bursa.

³Bornova Veteriner Araştırma Enstitüsü, İzmir.

Bu çalışmada, rutin coronavirus aşılamalarına rağmen solunum yolu problemi olan, nefrit gözlenen ve yumurta verimi düşük olan tavukların ilgili bölgelerinden alınan sürüntü (*tracheal swab*, *cloacal swab*) veya organ örneklerinden (akciğer, böbrek, oviduct), bir avian coronavirus olan IBV (*Infectious Bronchitis Virus*)'nin izolasyonu ve genotiplendirilmesi amaçlanmıştır. İzolatlar, bir dubleks real-time PCR (RtPCR) yöntemi ile tanımlanmış ve IBV tanısı doğrulanan izolatların S1 (*Spike1*) çok değişken bölgesinin yaklaşık 400 bazçiftlik bölümüne yönelik "nested" revers transkriptaz PCR (RT-PCR) ile dizilemesi yoluyla genotiplendirilmiştir. Bu bağlamda yaklaşık 980 farklı örnekten oluşan kodlanmış 234 adet örnek kullanılmış; bunların 76'sından IBV izolasyonu yapılmıştır. RtPCR ile tanımlanan 76 IBV izolatının 13'ü, RT-PCR sonucunda dizileme işlemi için uygun amplifikasyon vermiş ve izolatların 12'i IS/1494/06, birisi ise 1489/99 (M41) olarak genotiplendirilmiştir. Bu çalışmada, ülkemizde ilk kez natif IBV'ları izole edilerek, genotiplendirmeleri yapılmış ve olası koruyucu aşı uygulamalarına yönelik projeksiyonlar için veri sağlanmıştır. Ayrıca gerekli olduğunda bu natif izolatlardan aşı tohumu olarak yararlanılabilecektir. Bundan sonraki çalışmalarda, elimizdeki IBV izolatlarının tam S1 gen bölgesi amplifikasyonları sonucu gerçekleştirilecek olan nükleotid ve aminoasit dizi analizleri, bize natif Türkiye avian coronaviruslarının çok değişken gen bölgelerinde mutasyon türleri hakkında kapsamlı bilgiler verecektir.

Anahtar kelimeler: *Avian coronavirus, izolasyon, genotiplendirme*

TOBB HASTANESİNDEN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SUŞLARININ PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE) YÖNTEMİ İLE TİPLENDİRİLMESİ

Nader Alipour¹, Alper Karagöz², Abbas Taner³, Rıza Durmaz², Fatih Yıldız¹

¹ODTU Gıda Mühendisliği Fakültesi, Mikrobiyoloji, Biyoteknoloji, Biyokimya Bölümü, Ankara.

²Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara.

³TOBB-ETU Üniversitesi, TOBB Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

Pseudomonas aeruginosa, hastane enfeksiyonlarına neden olan fırsatçı bir patojendir. Çeşitli mekanizmalar ile *P.aeruginosa*'nın birçok antibiyotiğe direnç kazanması en önemli özelliğidir. Dirençli suşlar ile ortaya çıkan hastane salgınlarının neden olduğu pek çok ölüm vakaları gözlenmektedir. Bu moleküler epidemiyolojik çalışmada, Avrupa'dakine benzer bir salgın durumunun Ankara TOBB Hastanesi'ndeki varlığının araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, idrar yolları, solunum yolları, kan dolaşımı, kulak ve göz enfeksiyonlarından izole edilen *P.aeruginosa* suşları arasındaki klonal ilişki PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) yöntemiyle araştırıldı. Dört yıllık bir dönemde, üroloji, göğüs hastalıkları, yoğun bakım ve bronkoskopi bölümlerinde ameliyat sonrası gelişen *P.aeruginosa* kaynaklı enfeksiyonlar incelendi. Aynı zamanda ameliyathaneden çevresel izolatlarda da elde edildi. Çalışmada, 50'si hastaların klinik örneklerinden, 8'i çevresel örneklerden olmak üzere toplam 58 *P. aeruginosa* suşu izole edildi. PFGE yöntemiyle *P.aeruginosa* klinik ve çevresel izolatlarda arasındaki klonal ilişki belirlendi. Yapılan dendrogram analizi sonucunda, *P.aeruginosa* suşlarına ait 9 küme tespit edildi. Hasta izolatlardaki tümünde (n=50) kaynağın oksijen maskesi, forseps ve bronkoskop olduğu belirlendi. Suşların antibiyotiklere direnç oranları; gentamisin için %55, imipenem için %11, meropenem için %39, ertapenem için %77, piperasilin için %31, siprofloksasin için %10, sülfametoksazol için %50, seftazidim için %23, sefepim için %6, sefoksitin için %16, ampisilin/sulbaktam için %28, tobramisin için %25 ve aztreonam için %10 olarak saptandı; çoklu dirençli izolat oranı ise %33 olarak tespit edildi. Sonuç olarak, salgının kaynağının yoğun bakım ünitesindeki bronkoskop ve cihazların yetersiz dezenfeksiyonu olduğu belirlendi. Sonrasında alınan enfeksiyon kontrol önlemleri ve personel eğitimleri ile 2011-2012 yılında *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının azaldığı izlendi.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, hastane enfeksiyonu, klonal ilişki, pulsed field gel electrophoresis

A

Abacıoğlu, Hakan 311, 313
 Acar, Bülent 198
 Acar, Sümeyra 245
 Açıkgöz, Z. Cibali 209, 219, 257
 Adaleti, Rıza 305, 306
 Adiloğlu, Ali Kudret 235, 257, 277
 Ahmed, Kamruddin 203
 Ahsan, Fadhil 317
 Akan, Mehmet 272
 Akçalı, Alper 278
 Akgüç, Nihan 271
 Akgül, Senem 233
 Akkaya, Oya 323
 Akkaya, Yüksel 278
 Aksaray, Sebahat 305, 306
 Ak, Sibel 207
 Aksoy, Evrim Kahramanoğlu 304
 Aksoy, Ümit 283
 Aksu, Burak 215, 244, 252
 Albayrak, Nurhan 262
 Al, Funda Doğruman 292
 Alipour, Nader 332
 Alkan, M. Ziya 201
 Alp, Alpaslan 195, 263, 304
 Altaş, Ayşe Başak 324
 Altay, Aylin 203, 296, 299
 Altındış, Mustafa 317
 Altıntop, Yasemin Ay 207
 Aral, Murat 295
 Arıncan, Ali 307
 Andoğan, Buket Cicioğlu 213
 Arı, Fatma Filiz 198, 255
 Arisue, Nobuko 286
 Arman, Dilek 279
 Arslantürk, Ahmet 262, 270, 271
 Arslan, Uğur 233, 247
 Aslan, Gönül 217, 320
 Aslan, Hayat 303
 Aslantaş, Özkan 243
 Aşık, Gülşah 212, 229, 232
 Atak, Tunca 316
 Ata, Zafer 273, 274, 275, 331

Ayaz, Lokman 307

Aydın, Faruk 248
 Aydın, Merve 279, 280, 292
 Aydın, Mine 282
 Aydın, Osman 315
 Aydoğan, Nebahat 250
 Ayıldız, Ahmet 212

B

Babat, Yağmur 233
 Babür, Cahit 284
 Bahar, İsmail Hakkı 221
 Bakkaloğlu, Zekiye 202, 316
 Bakkour, Katren Al 292
 Balcı, Pervin Özlem 207, 255
 Bal, Emel Banu Büyükkunal 210, 211
 Balıkcı, Hilal 209, 219
 Baykal, Atakan 202
 Baykan, Mahmut 322
 Bayrakdar, Fatma 324
 Bayraktar, Mehmet 250
 Bayram, Gül 223
 Bayramoğlu, Gülçin 248
 Bayram, Yasemin 230, 249, 254, 328, 330
 Baysal, Bülent 297, 322, 323
 Baysan, Betil Özhak 314, 318
 Bedir, Melike Yeşiller 305
 Bekdemir, Pınar 200
 Berktaş, Mustafa 212, 230, 249, 254, 328
 Bilge, Yıldız Dallar 203
 Boduç, Erengül 291
 Bostancı, Birol 296
 Bozdayı, Gülelendam 203, 296, 299
 Bozdoğan, Bülent 233, 239, 241, 247, 288, 289
 Boz, Efe Serkan 305, 306
 Bulut, Cemal 235, 257
 Burgucu, Gizem Aliş 300
 Buruk, Kurtuluş 248
 Bükülmez, Aysegül 317

C-Ç

Carlı, Kamil Tayfun 273, 274, 275, 331
 Ceyhan, İsmail 262
 Coşkun, Aslıhan 202
 Çağatay, Mustafa 310
 Çakmak, Ertan 313
 Çalış, İbrahim Uğur 299
 Çalışkan, Ahmet 207
 Çalış, Uğur 203
 Çavuşoğlu, Cengiz 261
 Çaycı, Yeliz Tanrıverdi 220
 Çetin, Emel Sesli 212, 213
 Çetin, Mevlüt 302
 Çıkman, Aytekin 225, 226, 249, 330
 Cırak, Meltem Yalınay 194, 196, 222
 Çiçek, Aysegül Çopur 207, 255, 316
 Çiftci, Alper 276
 Çiftci, İhsan Hakkı 229, 232, 309
 Çiftçi, Çağla 311
 Çiftçi, Ergin 321
 Çiftçi, İhsan Hakkı 212
 Çizmeci, Zeynep 207, 255
 Çoban, Ahmet Yılmaz 220
 Çoban, Cevayir 286
 Çobanoğlu, Naz 305, 306
 Çolak, Dilek 314, 318
 Çöl, Bekir 270, 271
 Çöven, Fethiye 331
 Çulha, Gülnaz 201

D

Dağı, Hatice Türk 247
 Dalgıç, Buket 203
 Dansuk, Zeynep 310
 Delialioğlu, Nuran 223, 253
 Demiray, Tayfur 229
 Demircili, Mehmet Emin 322
 Demiröz, Ali Pekcan 235
 Dibek, Esra 270
 Diker, Kadir Serdar 272, 276
 Dinç, Bedia 203, 296
 Divanoğlu, Yörük 272

Dolapçı, İhtar 321
Dolapçıoğlu, Kenan 293
Doni, Nebiye 286
Döğen, Aylin 320
Duran, Alev 311
Duran, Gülay Gülbol 293
Duran, Nizami 293, 303
Durmaz, Rıza 198, 202, 245, 250, 255,
262, 316, 332
Durmaz, Süleyman 210, 211
Durmüşlu, Ayça Özer 299
Dursun, Ayşe 299
Durupınar, Belma 237

E
Eken, Evren 284
Ekinci, Özgür 299
Ekizoğlu, Melike 193, 218
Elmas, Çiğdem 194
Emekdaş, Gürol 217, 223, 253, 307, 320
Emir, Dilek 227
Eraz, Vesile Tuba Balaban 259, 260
Erdem, Ümmü Gül 257, 310
Erfan, Gamze 282
Ergin, Çağrı 278, 281
Ergünay, Koray 304
Er, Halil 229, 317
Erköse, Evren 273, 274
Eroğlu, Cafer 227
Erol, Meral 310
Erpek, Gökhan 302
Ersöz, Gülden 217
Ertaabklar, Hatice 201, 288, 289, 290,
291
Ertek, Mustafa 198, 202, 245
Ertuğ, Sema 288, 289, 290, 291
Eryeğin, Kübra 317
Eryılmaz, Naciye 293, 303
Eskin, Zeynep 247
Eygör, Ayşegül 273, 274, 331

F
Feyzioğlu, Bahadır 297, 322, 323
Fındık, Duygu 247
Fırat, Mehmet 207
Fırıncı, Fatih 221
Fidanboyu, Aynur 224
Fidan, Işıl 326, 329

G
Gazi, Hürri 259, 260
Göktepe, Jale 244
Gözalın, Ayşegül 245
Güdücüoğlu, Hüseyin 249, 254, 328
Gülbudak, Harun 217
Güldemir, Dilek 198, 202, 245, 255
Güleç, Ümrân Küçüköz 280
Gülmez, Dolunay 218
Gül, Mustafa 212, 295
Gülseren, Yasemin Derya 277
Gültekin, Meral 314
Gültepe, Bilge 254, 328
Gümrâl, Ramazan 280
Günaydın, Murat 220, 227
Günaydın, Münevver 210, 211
Gündem, Nadire Seval 225, 226
Gündüz, Cumhur 201
Güneş, Hatice 270
Güney, Akif Koray 227, 237
Güngören, Arif 303
Gürbüz, Oğuz Alp 310
Güriz, Haluk 316
Güvenli, Abdullah 308
Güvenman, Selda 209, 219
Güzel, Ahmet Barış 280

H-I-I
Hasçelik, Gülşen 195, 235, 304
Hasdemir, M. Ufuk 215
Haznedaroğlu, Tunçer 239, 241
Horasan, Elif Şahin 253
Horii, Toshihiro 286
Hoşbul, Tuğrul 239, 241
İça, Tuba 276
İlkit, Macit 280
İnce, Erdal 316, 321
İnci, Melek 264, 303
İşlek, Rukiye 248

K-L
Kahya, Seran 274
Kahya, Serpil 273, 275, 331
Kaklıkkaya, Neşe 248
Kalaycıoğlu, Atilla Taner 202, 316
Kalaycıoğlu, Handan 284
Kalkancı, Ayşe 279, 280
Kaplan, Engin 307, 320
Karacalı, Ayşe 264, 265

Karadağ, Adil 227
Karadam, Senem Yaman 290
Karamemirtok, Hülya 316
Karadenizli, Aynur 278
Karagöz, Alper 250, 262, 332
Karahana, Zeynep Ceren 321
Karakaya, Bülent 320
Karakaya, Ramazan 271
Karakeçe, Engin 229, 232, 283, 309
Karakoç, Ayşe Esra 257
Karaman, Meral 221
Karaman, Özkan 221
Kara, Selçuk 309
Karbuş, Adem 321
Kartal, Tuğba 281
Kart, Didem 218
Kaya, Ayşe Demet 282
Kaya, Özgül 311
Kaya, Özlem Aycan 265
Kaya, Selçuk 213
Kaya, Şule 282
Kayman, Tuba 233, 311
Kılıç, Selçuk 249
Kılınç, Osman 213
Kınıklı, Sami 235
Kırdar, Sevin 302
Kızılkaya, Latife Sütcü 297
Kocabaş, Bilge Aldemir 316, 321
Koçoğlu, Esra 212, 327
Koçtürk, Sümeyra Alkış 295
Koike, Satoshi 193
Koopmans, Marion 317
Korten, Volkan 200
Korukluoğlu, Gülay 202, 316, 324
Kostul, Hande 253
Koydemir, Hatice Ceylan 195
Kozan, Ahmet 308
Köksal, Fatih 264, 265
Köz, Fethiye Ferda Yılmaz 261
Krapac, Ivan G 193
Kurtoğlu, Muhammed Güzel 212
Kurul, Mehmet 293
Kurultay, Nühket 298
Kurutepe, Semra 259, 260
Kuştımur, Semra 279, 292
Kuyucu, Necdet 253
Külâh, Haluk 195
Külekçi, Güven 266, 268
Laleli, Yahya 300
Lale, Zübeyde 326, 329

Leventoğlu, Sezai 299
Limoncu, Mine Hoşgör 261

M

Mackie, Roderick I 193
Meral, Melda 203
Merdan, Deniz Güneşer 215
Meteoğlu, İbrahim 302
Mumcuoğlu, İpek 292
Mutlu, Derya 314, 318
Mutlu, Esvet 233
Müştak, Hamit Kaan 272, 276

O-Ö

Oğuz, İlkiz 292
Oryaşın, Erman 247
Otkun, Müşerref Tatman 278
Öcal, Hamdiye Yeşim 263
Öğünç, Dilara 314, 318
Öksüz, Lütfiye 212
Öksüz, Zehra 320
Öktem, Mehmet Ali 213
Önde, Ufuk 257
Öngüt, Gözde 314, 318
Ötgün, Selin 198, 245
Özalp, Meral 218
Özarslan, Şeyda 303
Özbel, Yusuf 201
Özçalpan, Olcay 259, 260
Özdemir, Mehmet 212, 297, 322, 323
Özdemir, Metin 308
Özdemir, Tülay 308
Özer, Burçin 303
Özgen, Canan 195
Özgümmüş, Osman Birol 207
Özin5, Yasemin 296
Özkan, Ayşegül Taylan 284
Özkan, Seçil 296, 299
Özkul, Ceren 218
Özlem, Serçin 288, 289, 291
Özseven, Ayşe Gül 213
Özsoy, Şeyda 327
Öztürk, Candan 223, 253
Özyurt, Mustafa 233, 239, 241

P-R

Pagès, Jean Marie 215
Palacpac, Nirianne 286
Parlak, Mehmet 230, 249, 330

Perçin, Duygu 210, 211
Rota, Seyyaz 326, 329
Ruh, Emrah 263

S-Ş

Saban, Eyüp 293
Sağlık, İmran 314, 318
Sancaktar, Metin 207
Saribaş, Zeynep 263
Sarı, Fatma 207
Sarıtış, Zübeyde Eres 318
Satılmış, Özgün Kiriş 278
Sayiner, Arzu 311
Sercan, Zeynep 313
Serin, Mehmet Sami 223, 307, 320
Seyrek, Adnan 212
Sezen, Figen 262
Sezer, Merve 270
Söyletir, Güner 200, 215, 252
Sucak, Gülsan 326
Sultan, Nedim 193
Şahan, Özlem 272
Şahin, Hünkar 257
Şener, Burçin 235, 304
Şengül, Mustafa 281
Şimşek, Halis 304
Şimşek, Hülya 262

T

Tachibana, Shin Ichiro 286
Tamer, Lulufur 307
Tanabe, Kazuyuki 286
Taner, Abbas 332
Tanrıseven, Aslı 271
Tanyel, Tutku Taşkınoğlu 300
Tarhan, Gülnur 262
Taşlı, Hüseyin 224, 261
Taş, Tekin 327
Tatar, Gonca 304
Tekeli, Alper 321
Temelli, Seran 273, 274, 331
Tezcan, Seda 217, 320
Tınaz, Gülgün Boşgelmez 252
Tiftik, Naci 320
Topcuoğlu, Nursen 266, 268
Toptan, Hande 306
Torun, Ebru 272
Torunoğlu, Mehmet Ali 202
Tosun, İlknur 248
Töz, Hüseyin 319

Töz, Seray Özensoy 201
Tuğ, Burcu 275
Tuncer, İnci 247
Tunçcan, Özlem Güzel 279
Tunçtan, Bahar 320
Turhan, Ajda 319
Turhan, Nesrin 296

U-Ü

Usluca, Selma 284
Utkun, Ergül 319
Uzuner, Hüseyin 278
Uzuner, Nevin 221
Ülger, Mahmut 217
Ülger, Nurver Toprak 252
Ülger_Toprak, Nurver 200
Ünalı, Özlem 196, 245, 250

V-Y-Z

Vardarlı, Aslı Tetik 201
Veer, Bas Van Der 317
Yağcı, Server 212, 235
Yağmur, Gülhan 207
Yalçın, Atilla 320
Yalçın, Zeliha Gültür 283
Yanık, Kerametdin 227, 315
Yaşar, Ekrem 316
Yazıcı, Vesile 233
Yıldırım, Berna Erdal 194, 222
Yıldırım, Tuba 237
Yıldız, Fatih 332
Yıldız, Nazan 207
Yıldız, Selin 266, 268
Yılmaz, Ebru Şebnem 243
Yiğit, Seyran 298
Yolbakan, Sultan 324
Yoldaş, Yasin 317
Yula, Erkan 210, 211, 264, 265, 303
Yurdakul, Pınar 263
Yurtsever, Süreyya Gül 298
Yücel, Mıhriban 277
Yüksel, Fehmi 286
Zeyrek, Fadile Yıldız 201, 286
Zeytinli, Ülkü Oral 264, 265
Zeytinioğlu, Ayşin 319

KONGREYE DESTEK VEREN KURULUŞLAR

Teşekkürü borç biliriz..

Roche Diagnostics Sistemleri Tic. A.Ş

Becton Dickinson İthalat İhracat Ltd. Şti.

Terra Analiz ve Ölçüm Cihazları Tic. A.Ş

Özmen Tıbbi Lab.Tesh. A.Ş (Euroimmun Türkiye)

ATQ Biyoteknoloji İç ve Dış Tic.Ltd. Şti.

Abbott Laboratuarları

Pera Medikal

Moleküler Bizim Medikal Tic. Ltd. Şti.

Karca Medikal Sistemler San. Tic. Ltd. Şti.

BioDPC Teşhis Sistemleri San ve Tic. A.Ş

Salubris A.Ş.