



ANKARA  
MİKROBİYOLOJİ  
DERNEĞİ



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

# 6. ULUSAL TANISAL VE MOLEKÜLER MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

15-19 Haziran 2010  
ODTÜ Kültür ve Kongre Merkezi,  
Ankara



**BİLİMSEL PROGRAM**

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

15 – 19 Haziran 2010  
ODTÜ Kültür ve Kongre Merkezi  
Ankara

**PROGRAM VE BİLDİRİ ÖZET KİTABI**

Editör  
Prof. Dr. Dürdal US



**“Asıl uğraşmaya mecbur olduğumuz şey, yüksek kültürde ve fazilette dünya birinciliğini tutmaktır. Kültür zeminle orantılıdır. O zemin milletin seciyesidir. Kültür, okumak, anlamak, görebilmek, görebildiğinden anlam çıkarmak, ders almak, düşünmek ve zekayı geliştirmektir..”**

*K. Atatürk*

Kurullar .....	4
Genel Bilgiler .....	5
Kurs Programı .....	7
Kongre Programı .....	8
<b>KONFERANSLAR</b>	
1. İnsan Mikrobiyom Projesi .....	15
2. siRNA: Yeni Bir Tedavi Çağı mı Başlıyor? .....	18
3. Laboratuvarı Bir Yongaya Sığdırmak: Mikrodiziler (Microarray) .....	21
<b>MİNİ KONFERANSLAR</b>	
1. Tanısal Mikrobiyolojide “Fourier Transform Infrared Spektroskopi” Kullanımı ve Değerlendirilmesi .....	23
2. Mantarlarda Genetik Madde Aktarımı .....	26
3. Kan Bankacılığında Moleküler Yöntemler: Güncel Durum .....	29
<b>PANELLER</b>	
1. Polimeraz Zincirleme Tepkimesi .....	33
2. <i>Clostridium difficile</i> Enfeksiyonlarında Son Durum .....	42
3. Parazitolojik Tanıda Rutinde Kullanılan ve Geliştirilmekte Olan Moleküler Testler .....	45
4. Hastane Enfeksiyonu Etkeni Olan Dirençli Bakterilerin Rutin Tanısı: Dünyada ve Ülkemizde Son Durum .....	57
5. Dünyada ve Ülkemizde 2009-2010 “Top-10” Yayınlar .....	70
6. İnsan Papillomavirus Enfeksiyonlarında Güncel Durum .....	71
7. Genomik ve Proteomik Katkılarıyla Fungal Enfeksiyonlar İçin Tanımlanan Yeni ve Potansiyel Tanı Belirteçleri .....	84
<b>MİNİ PANEL</b>	
Parazitolojik Tanı: Hangi Yöntem Ne Zaman Kullanılmalı? .....	94
<b>BİRLİKTE TARTIŞALIM</b>	
Tanısal Mikrobiyolojide Yanıt Arayan Sorular .....	101
<b>PROF. DR. ŞEMSETTİN USTAÇELEBİ ANMA TOPLANTISI</b>	
Solunum Yolu Enfeksiyonlarında İmmünopatogenez .....	107
Pandemik İnfluenza A(H1N1) Virusunun Tanısı: Referans Laboratuvarın Deneyimleri .....	110
Hepatit Tanısında Karşılaşılan Sorunlar .....	114
Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Enfeksiyonlarının Tanısı .....	127
<b>POSTER BİLDİRİLER</b>	
P01-01 – P01-22 .....	136 - 157
P02-01 – P02-19 .....	158 - 176
P03-01 – P03-19 .....	177 -195
<b>YAZAR İNDEKSİ</b> .....	199
<b>KONGREYE DESTEK VEREN KURULUŞLAR</b> .....	200

**DÜZENLEME KURULU**

Onursal Başkan:	Ayfer Günalp
Başkan:	Gülşen Hasçelik
Genel Sekreter:	Dürdal Us
Üyeler:	Sibel Ergüven
	Burçin Şener
	Ahmet Pınar
	Banu Sancak

**BİLİMSEL KURUL**

Hakan Abacıoğlu  
Yurdanur Akgün  
Yakut Akyön Yılmaz  
Alpaslan Alp  
Sevtap Arıkan Akdağlı  
Hande Arslan  
Selim Badur  
Rıza Durmaz  
Birsal Erdem  
Selda Erensoy  
Koray Ergünay  
Berrin Esen  
Özgen Eser  
Suna Gedikoğlu  
Meral Gültekin  
Tanıl Kocagöz  
Metin Korkmaz  
Ayhan Kubar  
Cumhur Özkuyumcu  
Seyyal Rota  
Mehmet Ali Saraçlı  
Zeynep Sarıbaş  
Arzu Sayıner  
Güner Söyletir  
Mehmet Tanyüksel  
Alper Tekeli  
Ferda Tunçkanat  
Serhat Ünal

**Kurs ve Tarihi:**

“Klinik Örneklerde Gram Boyama: Değerlendirme ve Yorumlama” Kursu - 14 Haziran 2010

**Kurs Merkezi**

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

**Kongre Tarihi**

15-19 Haziran 2010

**Kongre Merkezi**

ODTÜ Kültür ve Kongre Merkezi  
Orta Doğu Teknik Üniversitesi Kampüsü  
İnönü Bulvarı, 06531-Ankara  
Tel : 0 312 210 41 51  
www.kkm.odtu.edu.tr

**Kongre Dili**

Kongre resmi dili Türkçe'dir.

**Kongrenin Web Adresi**

www.tanisalmolekulermikro2010.org

**Kredilendirme**

6. Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongremiz, Türk Tabipler Birliği “Sürekli Tıp Eğitimi (STE)” Kredilendirme Kurulu tarafından “23” TTB-STE kredi puanı ile kredilendirilmiştir. Bu krediler ile ilgili TTB-STE formlarını kongre çantası içerisinde bulabilirsiniz. Formlar doldurulduktan sonra kongre kayıt ve danışma masasında bulunan TTB-STE Kredilendirme kutusuna bırakılmalıdır.

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

**Kongre Danışma ve Kayıt Masası Çalışma Saatleri**

15 Haziran 2010 Salı	08:30-18:00
16 Haziran 2010 Çarşamba	08:30-18:00
17 Haziran 2010 Perşembe	08:30-18:00
18 Haziran 2010 Cuma	08:30-18:30
19 Haziran 2010 Cumartesi	08:30-13:00

**Sergi Alanları**

Sergi alanı, 15 Haziran 2010 tarihi itibarı ile sabah 09:00 akşam 18:30 saatleri arasında ODTÜ Kültür ve Kongre Merkezi ana fuayesi'nde açık olacaktır. Standlar 19 Haziran 2010 tarihi'nde saat 12.30'dan itibaren sökülecektir.

**Yaka Kartları**

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

**Katılım Sertifikası**

Tüm katılımcılara, kongre katılım sertifikaları 17 Haziran 2010 tarihinden itibaren kongre kayıt masasından dağıtılmaya başlanacaktır. Bu tarihten önce ayrılacakların, posta adreslerini kayıt masasına bildirmeleri ya da bir başkasının alabilmesi için yazılı yetki vermeleri rica olunur.

**Ulaşım**

15 Haziran 2010 tarihinde öğlen 12:00'da, 16-19 Haziran 2010 tarihlerinde sabah 08:00'da Divan Hotel Moment ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Kampüs önünden ODTÜ Kültür ve Kongre Merkezi'ne servis kaldırılacaktır.

Ayrıca bilimsel program saatlerine göre Şehir Merkezi - ODTU ve ODTÜ - Şehir Merkezi arasında servis hizmeti de sağlanacaktır. Bu saatleri gösteren bilgilendirme panosunu toplantı salonu ana fuayesinde bulabilirsiniz.

**Teknik Destek**

Kongre süresince sunumlarınızın çalışmasında herhangi bir sıkıntı yaşamamanız için, bu sunumlarınızı taşınabilir belleklerinize ya da CD'ye "Microsoft Office" altında çalışan programlarda hazırlamanızı ve yedeklerini kongrede yanınızda bulundurmanızı rica ederiz.

Sunum sahiplerinin kongreye katıldıkları ilk gün sunumlarını taşınabilir belleklerinde ya da CD'de kongre merkezi'nde hazırlanacak olan "Sunum Kontrol Merkezi"ne kontrol ettirerek, teslimi rica olunur.

Sunumlarında kendilerine ait dizüstü bilgisayarını kullanmak isteyen konuklarımız sunum yapacakları salonda mutlaka önceden cihazlarını kontrol ettirmelidir. Kongre süresince salonlarda slayt makinesi ve tepegöz kullanılmayacak; tüm salonlarda diz üstü ve görüntüleme cihazları hazır olacaktır.

**Poster Bildiri ve Tartışmaları**

Kongremizde kabul edilen tüm bildirimler poster olarak sunulacaktır. Posterlerin tümü kongre süresince poster alanında asılı kalacaktır. Posterleri incelemek üzere, poster alanını 15 Haziran 2010 tarihinden itibaren ziyaret edebilirsiniz. Poster tartışmaları aşağıda sunulan gün ve saatlerde yapılacaktır.

**P01-01 ile P01-22 No. Arası Posterler için**

Tartışma günü ve saati : 16.06.2010 Çarşamba, 13.00 – 14.00

Konu : Bakteriyoloji

**P02-01 ile P02-19 No. Arası Posterler için**

Tartışma günü ve saati : 17.06.2010 Perşembe, 12.30 – 13.30

Konu : Bakteriyoloji, Mikoloji, Parazitoloji, Genel Mikrobiyoloji

**P03-01 ile P03-19 No. Arası Posterler için**

Tartışma günü ve saati : 18.06.2010 Cuma, 12.30 – 13.30

Konu : Viroloji

Poster sahibi katılımcılarımızın, kendilerine daha önce yazılı olarak bildirilen gün ve saatlerde, poster tartışmalarına katılmak üzere, poster alanında hazır olmasını önemle rica ederiz.

**14 HAZİRAN 2010 PAZARTESİ****KLİNİK ÖRNEKLERDE GRAM BOYAMA: DEĞERLENDİRME VE YORUMLAMA**

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

- 09.00 - 9.30** **Açılış, Giriş, Tanışma, Kursun Tanıtımı ve Amacı**  
*Prof. Dr. Gülşen HASÇELİK*
- 09.30 - 10.30** **Gram Boyama: Özellikleri, Uygulama Yöntemleri, Kullanım Amaçları, Sınırlamalar ve Standardizasyon.**  
*Prof. Dr. Özay ARIKAN AKAN*
- 10.30 - 11.00** **Kahve Arası**
- 11.00 - 11.30** **Solunum Yolu Örneklerinin İncelenmesi: Balgam, Bronkoalveoler lavaj ve Trakeal Aspiratlar.**  
*Prof. Dr. Özay ARIKAN AKAN*
- 11.30 - 12.00** **Steril vücut sıvılarının incelenmesi: BOS, Periton, Plevra ve Eklem Sıvıları.**  
*Dr. Dolunay GÜLMEZ*
- 12.00 – 13.00** **Yemek Arası**
- 13.00 – 14.00** **Gram Boyamada Otomasyon: Genel Bilgi ve Demonstrasyon.**  
*BIO-MERIEUX Firması*
- 14.00 - 14.30** **Yara Örneklerinin İncelenmesi: Derin ve Yüzeysel Yara Örnekleri.**  
*Prof. Dr. Özay ARIKAN AKAN*
- 14.30 - 15.00** **Genitoüriner Sistem Örneklerinin İncelenmesi: Vajinal ve Üretral Akıntılar.**  
*Dr. Dolunay GÜLMEZ*
- 15.00 – 15.30** **Kahve Arası**
- 15.30 – 16.00** **Günlük Çalışmalardan Seçilmiş Örnekler: Kursiyerlerin katılımıyla çeşitli klinik preparatların tartışılması.**  
*Prof. Dr. Özay ARIKAN AKAN*
- 16.00 – 16.30** **Görüş ve Temenniler, Kurs Sertifikalarının Dağıtılması, Kapanış.**  
*Prof. Dr. Gülşen HASÇELİK*



## 15 HAZİRAN 2010 SALI

14.00 – 14.30 **Açılış**

14.30 – 15.00 **Klasik Müzik Dinletisi**

15.00 – 16.00 **Konferans 1: İnsan Mikrobiyom Projesi**

*Oturum Başkanı: Gülşen HASÇELİK*

*Konuşmacı: Güner SÖYLETİR*

16.00 – 16.30 **Kahve Arası**

16.30 – 17.15 **Konferans 2: siRNA: Yeni Bir Tedavi Çağı mı Başlıyor?**

*Oturum Başkanı: Yurdanur AKGÜN*

*Konuşmacı: Tanıl KOCAGÖZ*

17.15 – 18.00 **Konferans 3: Laboratuvarı Bir Yongaya Sığdırmak: Mikrodiziler (Microarray)**

*Oturum Başkanı: Hakan ABACIOĞLU*

*Konuşmacı: Hüseyin Avni ÖKTEM*

18.30 – 20.30 **Açılış kokteyli (ROCHE katkılarıyla)**

## 16 HAZİRAN 2010 ÇARŞAMBA

**09.00 – 10.30 Panel 1: Polimeraz Zincirleme Tepkimesi**

*Oturum Başkanı: Tanıl KOCAGÖZ*

*Konuşmacılar:*

*Tanıl KOCAGÖZ – PZT ile ilgili 25 yılda neler öğrendik?*

*Sinem ÖKTEM – PZT’de kullanılan polimeraz; özellikleri ve kullanım amaçları*

*Nihan AYTEKİN – PZT ne kadar özgül? Özgüllük nasıl artırılır?*

**10.30 – 11.00 Kahve Arası****11.00 – 12.00 Birlikte Tartışalım 1: Tanısal Mikrobiyolojide Yanıt Arayan Sorular**

*Oturum Başkanı: Meral GÜLTEKİN*

*Konuşmacılar:*

*Özay ARIKAN AKAN – İdrar kültürü*

*Meral GÜLTEKİN – Dışkı kültürü*

**12.00 – 13.00 Panel 2: Clostridium difficile Enfeksiyonlarında Son Durum**

*Oturum Başkanı: Ferda TUNÇKANAT*

*Konuşmacılar:*

*Belkis LEVENT – Dünyada ve ülkemizde C.difficile enfeksiyonlarının önemi ve epidemiyolojisi*

*Melda SINIRTAŞ – C.difficile enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısında yenilikler*

**13.00 – 14.00 Yemek Arası****14.00 – 15.00 Konferans 4: Sepsis Tanısında Moleküler Yöntemler**

*Oturum Başkanı: Güner SÖYLETİR*

*Konuşmacı: ROCHE katkılarıyla*

**15.00 – 15.30 Mini Konferans 1: Tanısal Mikrobiyolojide “Fourier Transform Infrared Spektroskopisi” Kullanımı ve Değerlendirilmesi**

*Oturum Başkanı: Cumbur ÖZKUYUMCU*

*Konuşmacı: Çağrı ERGİN*

**15.30 – 16.00 Kahve Arası****16.00 – 17.30 Panel 3: Parazitolojik Tanıda Rutinde Kullanılan ve Geliştirilmekte Olan Moleküler Testler**

*Oturum Başkanı: Yüksel GÜRÜZ*

*Konuşmacılar:*

*Yüksel GÜRÜZ – Parazit hastalıklarında moleküler tanı: Dün, bugün, yarın; biz neredeyiz?*

*Mert DÖŞKAYA – Plasmodium spp. ve Echinococcus spp. tanısı ve tür ayırımı*

*Ayşe CANER – Toxoplasma gondii ve Pneumocystis jirovecii tanısı*

*Aysu DEĞİRMENCİ – Trichomonas vaginalis tanısı*

**17 HAZİRAN 2010 PERŞEMBE****09.00 – 10.30 Panel 4: Hastane Enfeksiyonu Etkeni Olan Dirençli Bakterilerin Rutin Tanısı: Dünyada ve Ülkemizde Son Durum**

*Oturum Başkanı: Yeşim ÇETİNKAYA ŞARDAN*

*Konuşmacılar:*

*Yeşim ÇETİNKAYA ŞARDAN* – Hasta ve hastane ortamı taramasının enfeksiyon kontrolü açısından önemi

*Zerrin AKTAŞ* – Vankomisine dirençli enterokoklar

*Zeynep Ceren KARAHAN* – Metisiline dirençli stafilokoklar

*Özgen ESER* – Karbapenemaz pozitif gram negatif basiller

**10.30 – 11.00 Kahve Arası****11.00 – 12.00 Konferans 5: Immunofluorescence Completely Automated in the Near Future?**

*Oturum Başkanı: Burçin ŞENER*

*Konuşmacı: Kai FECHNER (EUROIMMUN katkılarıyla)*

**12.00 – 12.30 Mini konferans 2: Mantarlarda Genetik Madde Aktarımı**

*Oturum Başkanı: Mine DOLUCA*

*Konuşmacı: Ayşe KALKANCI*

**12.30 – 13.30 Yemek Arası****13.30 – 14.30 Birlikte Tartışalım 2: Klinik Mikrobiyoloji Uygulamaları: Küçük Ayrıntılar- Büyük Farklılıklar**

*Oturum Başkanı: Yurdanur AKGÜN*

*Konuşmacılar:*

*Yurdanur AKGÜN*

*Gülşen HASÇELİK*

**14.30 – 15.30 Konferans 6: “Mass Spektrometre” nin Mikrobiyolojik Tanıdaki Yeri**

*Oturum Başkanı: Alpaslan ALP*

*Konuşmacı: ATA Diagnostik katkılarıyla*

**15.30 – 16.00 Kahve Arası****16.00 – 17.30 Paramedikal Konferans 1**

*Oturum Başkanı: Yakut AKYÖN YILMAZ*

*Konuşmacı: Murat ATAK (Devlet Tiyatrosu Sanatçısı)*

**17.30 - 18.30 Ek Konferans: Cost vs Value: The Medical Impact of Rapid Molecular Diagnostics**

*Oturum Başkanı: Banu SANCAK*

*Konuşmacı: Stephen WEBER (BIODPC katkılarıyla)*

**18 HAZİRAN 2010 CUMA**

- 09.00 – 09.45 Mini Panel: Parazitolojik Tanı: Hangi Yöntem Ne Zaman Kullanılmalı?**  
*Oturum Başkanı: Sibel ERGÜVEN*  
*Konuşmacılar:*  
*Ülgen Zeki OK – Dışkı incelemeleri*  
*Metin KORKMAZ - Serolojik incelemeler*
- 09.45 – 10.45 Konferans 7: New Level in Molecular Diagnostics - Complete Automated RealTime PCR Workflow**  
*Oturum Başkanı: Seyyal ROTA*  
*Konuşmacı: ATQ BİOTEKNOLOJİ katkılarıyla*
- 10.45 – 11.15 Kahve Arası**
- 11.15 – 12.30 Panel 5: Dünyada ve Ülkemizde 2009-2010 “Top-10” Yayınlar**  
*Oturum Başkanı: Arzu SAYINER*  
*Konuşmacılar:*  
*Füsun CAN*  
*Tijen ÖZACAR*
- 12.30 – 13.30 Yemek Arası**
- 13.30 – 17.30 Prof.Dr.Şemsettin Ustaçelebi Anma Toplantısı**  
*Oturum Başkanı: Dürdal US*
- 13.30 – 13.45 Değerli hocamızın ardından...**
- 13.45 – 14.30 Solunum yolu enfeksiyonlarında immünopatogenez**  
*Konuşmacı: Selim BADUR*
- 14.30 – 15.00 Pandemik influenza A(H1N1) virusunun tanısı: Referans laboratuvarın deneyimleri**  
*Konuşmacı: Meral AKÇAY CİBLAK*
- 15.00 – 15.30 Kahve Arası**
- 15.30 – 16.30 Hepatit tanısında karşılaşılan sorunlar**  
*Konuşmacılar:*  
*Hakan ABACIOĞLU*  
*Selda ERENŞOY*  
*Arzu SAYINER*
- 16.30 – 17.15 Kırım-Kongo kanamalı ateşi enfeksiyonlarının tanısı ve takibi**  
*Konuşmacılar:*  
*Aykut ÖZKUL*  
*Ayhan KUBAR*
- 17.30 - 18.30 Paramedikal Konferans 2**  
*Konuşmacı: Oğul TÜRKKAN (Keyif - Shop)*
- 18.30 Şarap – Peynir ikramı**

**19 HAZİRAN 2010 CUMARTESİ****09.00 – 10.30 Panel 6: İnsan Papillomavirus Enfeksiyonlarında Güncel Durum**

*Oturum Başkanı: Ahmet PINAR*

*Konuşmacılar:*

*Gülendam BOZDAYI – Virus yapısı, immünolojisi ve ülkemizdeki epidemiyolojisi*

*Yasemin BULUT – HPV tanı ve tiplendirmesinde moleküler yöntemler*

*Alp USUBÜTÜN – HPV’de patolojik, sitopatolojik tanı yaklaşımı*

**10.30 – 11.00 Kahve Arası****11.00 – 12.00 Panel 7: Genomik ve Proteomik Katkılarıyla Fungal Enfeksiyonlar İçin Tanımlanan Yeni ve Potansiyel Tanı Belirteçleri**

*Oturum Başkanı: Sevtap ARIKAN AKDAĞLI*

*Konuşmacılar:*

*Meltem YALINAY ÇIRAK - Genomik ve proteomik çalışmalarında kullanılan yöntemler*

*Mine DOLUCA - Genomik, proteomik ve Candida enfeksiyonlarının tanısı*

*Beyza ENER - Genomik, proteomik ve Aspergillus hastalıklarının tanısı*

**12.00 – 12.30 Mini konferans 3: Kan Bankacılığında Moleküler Yöntemler: Güncel Durum**

*Oturum Başkanı: Selda ERENŞOY*

*Konuşmacı: Rüçhan SERTÖZ*

**12.30 – 13.00 Kapanış**

# KONFERANSLAR



## KONFERANS 1

**İNSAN MİKROBİYOM PROJESİ: SAĞLIKTA VE HASTALIKTA MİKROPLARIMIZ**

Prof. Dr. Güner Söyletir

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

İnsan Genom Projesinin tamamlanması bilim dünyasında yeni ufukların açılmasını sağlamış ve bu sayede genetik epidemiyolojik çalışmalar hız kazanmıştır. Ancak insanın kaçınılmaz bir şekilde birlikte yaşadığı mikroplarla nasıl bir etkileşim içinde olduğu ortaya konulmadığı sürece, tıbbın bu olağanüstü başarısı eksik kalacaktır. İnsan Genom Projesinin bu eksikliğini gidermek üzere İnsan Mikrobiyom Projesi 2008 yılında başlatılmıştır.

İnsan Mikrobiyom Projesi sayesinde, vücudun iç ve dış yüzeylerinde bulunan mikroorganizmaların, insan genetiği ile ne türde etkileşimler sonucunda sağlığa ve hastalığa nasıl katkıda bulunduğu ya da bulunabileceğinin anlaşılması hedeflenmektedir. Böylece aynı ortamda bulunan iki farklı genomun karşılıklı alışverişleri ortaya konmuş olacaktır.

Mikroorganizmalar, sağlıklı bir insanın vücut kitlesinin sadece %1-2'sini oluşturur; ancak insan vücudundaki mikrobiyal hücre sayısının insan hücresinin 10 katı, mikrobiyal genlerin (Mikrobiyom) ise toplam insan geninin 100 katı olduğu tahmin edilmektedir. Mikroorganizmaların sağlıklı bir vücudun idamesinde önemli rolleri olduğu, bazen de enfeksiyon hastalığı etkeni olarak karşımıza çıktıkları bilinse de, mikrop topluluklarının sağlıkta ve enfeksiyon dışı hastalıklardaki rollerine dair bilgilerimiz oldukça kısıtlıdır.

Tıbbi mikrobiyoloji, klasik olarak, patojenler başta olmak üzere laboratuvar ortamında üretebildiği belirli türler üzerinde çalışmalarını yoğunlaştırmıştır. Oysa insan vücudunda üretilenlerin sayısının çok üstünde, henüz üretilmemiş, hatta henüz tanımlanamamış çok sayıda kolonize mikrop türü olduğu; vücuttaki toplam mikroorganizmalar açısından bu oranın %20-60 arasında olduğu öngörülmektedir.

İnsanda kolonize olan mikroorganizmaların büyük çoğunluğu barsağın distal kısmında yaşar, dolayısıyla barsak, mikrop topluluklarının oluşturduğu karmaşık bir ekosistemdir. DNA dizileme teknolojileri ve diğer moleküler tekniklerdeki gelişmeler sayesinde yapılan çalışmalar göstermiştir ki; barsak bakterilerinin %80'den fazlası laboratuvar koşullarında üretilmeyen türlerdir ve barsakta 500-1000 arasında farklı tür ile en az 7000 farklı köken olduğu tahmin edilmektedir.

Barsak florasının, insan vücudunun gelişmesi, fizyolojisi, beslenmesi üzerindeki önemli etkilerinin yanı sıra koruyucu etkileri de vardır. Flora bakterileri, bir taraftan kısa zincirli yağ asitleri, vitamin ve enerji üretirken, diğer yandan barsak epitelinin gelişmesi ve farklılaşmasında da rol oynar. Barsak florası, bağışıklık sisteminin olgunlaşmasına önemli katkıda bulunarak konağı patojenlerin invazyonundan korur ve karsinogenlerin yapısal transformasyonunu sağlar.

Bugüne kadar elde edilen veriler, bazı hastalıklar açısından gastrointestinal bakterilerin önemli rolü olduğunu düşündürmektedir. *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun neden olduğu kronik inflamasyon, mide kanseri için risk faktörü olarak karşımıza çıkarken, barsağın kommensal bakterilerine karşı oluşan kontrolsüz immün yanıtı bağlı kronik inflamasyon da inflamatuvar barsak hastalığı (İBH) için risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Aslında barsak bakterilerini sadece gastrointestinal hastalıklarla ilişkilendirmek doğru değildir, çünkü bunların inflamasyon dahil vücuttaki birçok yolağı sistemik olarak etkileme kapasiteleri söz konusudur. Barsak bakterileri bu fonksiyonlarını, insanın normalde erişemeyeceği ürünleri veya enerji kaynaklarını besin ya da ilaç, zararlı kimyasal gibi ksenobiyotikleri metabolize etmek suretiyle sağlayarak, barsak epitelinin yenilenmesinde rol alarak ya da immün sistemin gelişmesine ve aktivasyonuna katkı vererek yerine getirirler.



Barsak florasının gelişimi ve kompozisyonu, bebeklik döneminde başlar, ancak doğum (vajinal/sezaryen) ve beslenme (anne sütü/ mama) şekline bağlı olarak belirgin farklılıklar gösterir. Yaş ilerledikçe bu kompozisyondaki farklılıklar azalır ve daha çok birbirine benzemeye başlar. 16S rRNA gen analizleri barsakta iki büyük bakteri grubunun hakim olduğunu ortaya koymuştur: Bacteroidetes ve Firmicutes. Bu iki bakteri grubu barsak florasının %90'ından fazlasını oluşturur. 16S rRNA gen dizilemeleri, barsakta bulunan bakteri profilinin sadece bebekken değil, erişkin yaşta da kişiden kişiye değişiklik gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu farklılığın nedenleri arasında konağın fizyolojisi, yaşam tarzı ve çevresel faktörler sayılabilir. Bu farklılık bazen masum bir durum olmayıp patolojik sonuçları da doğurabilmektedir. Örneğin; bebekken barsağa yerleşen mikroorganizma kompozisyonu ile çocukluk yaşında gelişen atopik hastalıklar ve obezite arasında ilişki olduğu belirlenmiştir (Tablo 1). Erişkinlerde de barsakta Firmicutes takımına ait bakterilerin daha fazla bulunması ve Bacteroidetes bakterilerinin az sayıda yer alması, enerji depolanmasının artması ve obezite ile ilişkilendirilm

**Tablo 1.** Bebeklerde barsak florası ile atopik hastalıklar ve obezite arası ilişki

Hastalık	Kolonizan bakteri	
	Hastalık riskini artıranlar	Koruyucu olanlar
Atopik dermatit	<i>Enterobacteriaceae (E.coli)</i> <i>Clostridium (C.difficile)</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Bacteroides</i>	<i>Bifidobacterium</i> <i>LactoBacillus</i>
Astım	<i>C.difficile</i> <i>Bacteroides fragilis</i> grup	
Obezite	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacteroides</i>	<i>Bifidobacterium</i>

Obezite ve İBH'nin yanı sıra mikrobiyal ekosistem (özellikle barsaktaki) ile diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi önemli halk sağlığı sorunu olan çeşitli hastalıklarla ilişki konusundaki veriler de giderek artmaktadır. Ancak, mikroorganizmaların bu hastalıkların patogeneğinde nasıl yer aldıklarına dair aydınlatıcı çalışmalar henüz başlangıç aşamasındadır ve flora kompozisyonunu saptamaya yönelik kullanılan yöntemler her laboratuvarında farklılık göstermektedir ki, bu da çalışma sonuçlarının kıyaslanmasını zorlaştırmaktadır. Mevcut yöntemlerle, barsak florasına ve vücut ile etkileşimlerine müdahale edip hastalığı önlemek ve sağlığa katkıda bulunmak çok daha zor görünmektedir. İnsan Mikrobiyom Projesi işte bu zorlukların üstesinden gelmek üzere planlanmış 5 yıl süreli ve 150 milyon dolar bütçeli bir projedir. Proje sayesinde en az 250 normal gönüllünün çeşitli vücut bölgelerinden alınan örneklerdeki mikrobiyom ortaya konacaktır.

Projenin hedefleri; insan mikrobiyomunda, genotip, yaş, beslenme, hastalık, ilaç kullanımı ve çevresel faktörlere bağlı varyasyonları belirlemek, bunu yaparken metagenomik dizileme gibi yüksek kapasiteli yeni teknolojileri kullanarak standardize veri kaynakları oluşturmaktır. Projenin nihai temel amacı ise, insan mikrobiyomunu yakından takip edip müdahale ederek insan sağlığını geliştirmek için geniş olanaklar yaratmak olarak özetlenebilir.

Sonuç olarak, insan vücudu hem kendi genomunu hem de birlikte yaşadığı mikrop topluluğuna ait genomu barındıran metagenomik bir yapıdır. Bu yapının ve kendi aralarındaki etkileşimin, İnsan Mikrobiyom Projesi sayesinde aydınlatılması, mikrobiyomun sağlıkta ve hastalıkta, hatta hastalık etiolojisindeki yerinin belirlenmesinde önemli katkılar sağlayacağı açıktır.

## KAYNAKLAR

1. Peterson J, Garges S, Giovanni M, et al.; NIH HMP Working Group. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res* 2009; 19: 2317-23.
2. Human Microbiome Project (HMP). <http://nihroadmap.nih.gov/hmp/>
3. Bäckhed F. 99th Dahlem Conference on Infection, Inflammation and Chronic Inflammatory Disorders: The normal gut microbiota in health and disease. *Clin Exp Immunol* 2010; 160: 80-4.
4. Lampe JW. The Human Microbiome Project: getting to the guts of the matter in cancer epidemiology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 2523-4.
5. Vael C, Desager K. The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Curr Opin Pediatr* 2009; 21:794-800.
6. Ley RE. Obesity and the human microbiome. *Curr Opin Gastroenterol* 2010; 26:5-11.
7. Hattori M, Taylor TD. The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Res* 2009; 16:1-12.
8. Musso G, Gambino R, Cassader M. Gut microbiota as a regulator of energy homeostasis and ectopic fat deposition: mechanisms and implications for disorders. *Curr Opin Lipidol* 2010; 21:76-83.

## KONFERANS 2

**siRNA: YENİ BİR TEDAVİ ÇAĞI MI BAŞLIYOR?**

Prof. Dr. Tanıl Kocagöz

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

Son yılların en büyük bilimsel sürprizlerinden birisi, belki de insan hücresindeki gen sayısının bir tırtılınki ile yaklaşık aynı sayıda olması idi. İnsan genom projesi ilerledikçe hem bu çarpıcı durum ortaya çıktı hem de insanda proteine dönüşmeyen birçok DNA bölgesinin bulunduğu anlaşıldı. Önce gereksiz, anlamsız diye düşünülen bu DNA'nın önemli bir kısmının RNA'ya çevrildiği ancak bu RNA'lardan protein yapılmadığı anlaşıldı. Bu RNA moleküllerinin büyük çoğunluğu çok küçük RNA molekülleri olduğundan bunlara mikro RNA (miRNA) adı verildi.

Bu konudaki ilk gözlemler 1990'ların başında transgenik bitkilerde başladı. Araştırmacılar, boru çiçeklerinde daha canlı renkler elde etmek için, pempe-mor pigment yapımını sağlayan şalkon sentaz enziminin çok sayıda kopyasını hücrelere yerleştirdiler. Çiçeklerde rengin artacağı beklenirken, renksiz bölgelerin ortaya çıktığı gözlemlendi. Yapılan incelemelerde, pigment RNA'sının hücrede yapıldığı ancak proteine dönüşmeden hızla parçalandığı saptandı. Daha sonra bitki virologları, antiviral proteinler ile çalışırken, proteine dönüşmeyen küçük RNA parçalarının da antiviral etki gösterdiğini gözlemlədiler. Viruslara bitki genlerinin küçük bir kısmı klonlanıp, bitki bu virus ile enfekte edildiğinde, ilgili genin susturulduğu görüldü. Buna virüsle indüklenen gen susturulması (VİGS) adı verildi<sup>1</sup>. Craig Mello ve Andrew Fire 1998 yılında yayınladıkları makalede, araştırmalarda sıkça kullanılan bir nematot olan *Caenorhabditis elegans*'a çift zincirli RNA enjekte edilmesinin kas proteininin yapımını önemli ölçüde azalttığını bildirdiler. Buna RNA engellemesi (RNA interference –RNAi–) adını verdiler. Bu alanda yaptıkları çalışmalar 2006 yılında kendilerine Nobel ödülü kazandırdı<sup>2</sup>.

RNA engellemesinin, memeli hücreleri dahil çok sayıda canlıda yaygın olarak işleyen bir mekanizma olduğu anlaşıldı. RNA engellemesinde iki çeşit küçük RNA molekülü anahtar rol oynamaktadır. Hücre dışından kaynaklanan çift zincirli RNA'lardan oluşan küçük baskılayıcı RNA'lara siRNA (small inhibitory RNA) adı verilmektedir. Bu mekanizma doğada en fazla bitkiler tarafından, bitki çift zincirli RNA viruslarından korunma amacı ile kullanılmaktadır. Birçok hücre kendisi de genlerin çalışmasını ayarlamak için küçük çift zincirli RNA'lar üretmektedir. Bunlara miRNA (mikro RNA) adı verilmiştir. Bunlara ait DNA dizileri hücre kromozomunda yer alır. Buradan üretilen tek zincirli RNA'lar, kendi içlerindeki uygun diziler dolayısıyla kendi üzerlerine katlanarak çift zincirli RNA'ları oluştururlar<sup>1,3</sup>.

İster çift zincirli RNA'dan siRNA yapılacak olsun, isterse kromozomal kökenli RNA'dan miRNA yapılacak olsun, bu moleküllerin oluşmasını ve bunlar aracılığı ile RNA susturulmasını başaran sistem, bazı proteinlerden oluşan bir bileşkedir. Buna "RNA ile uyarılan susturucu kompleks" (RNA induced silencing complex; RISC) adı verilmiştir. Bu komplekse bağlanan çift zincirli RNA, 21-28 nükleotit olacak şekilde iki ucunda 2-3 nükleotit çıkıntılar bırakacak şekilde argonot (eskiden gemilerin iki ucunda savaşılan kılıçlı denizciler) proteinleri tarafından kesilir. Daha sonra bu kompleks iki zinciri birbirinden ayırır. Zincirlerden bir tanesi hedef mRNA'ya bağlanır. Bağlantı bölgesinden mRNA RISC tarafından kesilerek işlevsiz hale getirilir. Kesilme, bağlantı bölgesinin ortasında gerçekleşir ve hedef RNA kesilirken RISC'teki küçük siRNA korunur. Bileşik, çok sayıda, dizisini tanıdığı RNA'yı keserek inaktive edebilir. RNA susturmak için miRNA kullanıldığında hedef RNA kesilmeyebilir ancak yine de RISC bağlanması ile mRNA'dan protein yapımı durur<sup>1</sup>.

Küçük RNA'lar ile genlerin susturulabilmesi, günümüzde kesin tedavisi olmayan birçok hastalığın bu yolla tedavi edilebileceği düşüncesini gündeme getirmiştir. Bu hastalıklar arasında en başta kanserler, HIV, hepatit enfeksiyonları gibi enfeksiyonlar, çeşitli metabolizma bozuklukları ve otoimmün hastalıklar yer almaktadır<sup>3</sup>.

Spinocerebellar ataksi ve Huntington hastalığında, serebellumda poliglutamin birikimine bağlı nörodejenerasyon olmaktadır. Benzer hastalığı taşıyan mutant farelerin beyinlerine mutant geni inhibe edecek siRNA dizilerini taşıyan AAV (“Adeno Associated Virus”) enjekte edildiğinde farelerin hastalığında önemli düzelme görülmüştür<sup>4</sup>.

Amyotrofik lateral sklerozun (ALS) ailevi olanlarında süperoksit dismutaz enzim geninde mutasyonlar görülmektedir. Bu hastalığı taşıyan mutant farelerde yapılan bir çalışmada, lentiviral vektörler kullanılarak süperoksit dismutaz enzimini susturan siRNA dizileri kas içerisine enjekte edildiğinde hastalık belirtileri %100 azalmış ve yaşam süresi %80 uzamıştır<sup>5</sup>.

Görme kaybına neden olan ıslak, yaşa bağlı maküler dejenerasyonun (wet age-related macular degeneration), vasküler endotelde aşırı büyüme ile ortaya çıkan damar tıkanıklığına bağlı olduğuna inanılmaktadır. Vasküler endotelial büyüme faktörünü susturan siRNA (Bevasiranib adlı ilaç) ile yapılan çalışmalar, faz 3 düzeyinde yeterli sonuç alınmadığı için durdurulmuş durumdadır.

Kanser tedavisi amacıyla öncelikle Bcl-2, H-Ras, c-Myc, mutant p53 gibi onkogenler hedef alınmıştır. Ayrıca hücre çoğalmasını kontrol eden VEGF (vascular endothelial growth factor) gibi sitokinler de susturulmaya çalışılmıştır. Ayrıca ribonükleotid redüktaz, DNA metil transferaz gibi enzimler de hedefler arasında yer almıştır. Bu alanda çok sayıda çalışma yapılmış, çok başarısız sonuçların yanında başarılı sonuçlar da alınmıştır<sup>3,6</sup>.

Virus enfeksiyonlarının tedavisinde de küçük RNA'larla gen susturma stratejisi çok umut vericidir. Bugüne dek çok sayıda hem DNA, hem de RNA virusları hedef alınmıştır. Bunlar arasında; Epstein-Barr virus (EBV), ayak ve ağız hastalığı virusu (foot and mouth disease virus; FMDV), hepatit B virusu (HBV), hepatit C virusu (HCV), insan bağışıklık yetmezliği virusu tip 1 (human immunodeficiency virus type 1; HIV-1), insan papilloma virusu (human papilloma virus; HPV), influenza tip A virusu, Marburg virusu, insan parainfluenza virusu (human parainfluenza virus; PIV), poliovirus, rotavirus, RSV, SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome – associated coronavirus), veziküler stomatit virusu (VSV) ve Batı Nil virusu (West Nile virus; WNV) yer almaktadır. siRNA ile antiviral tedavinin diğer tedavilere göre önemli avantajları vardır. Öncelikle viral hedef, konak hücre genlerinden özgül olarak ayırt edilebilmektedir. Günümüzdeki antiviral ilaçlar, ters transkriptaz ya da proteaz gibi az sayıda hedefin aktif bölgelerine karşı hazırlanmaktadır. siRNA ise kısa viral nükleik asit dizilerine karşı da hazırlandığında çok sayıda hedef bölge bulunabilmektedir. Aktif bölgeye karşı ilaç tasarımı ve geliştirilmesi yıllar süren bir süreçtir. Oysa viral nükleik asit dizileri saptanır saptanmaz siRNA molekülleri hazırlanıp denemelere başlanabilmektedir. Bitkilerde önemli bir antiviral mekanizma olan RNA susturulması, memeli hücreleri için de önemli bir doğala özdeş korunma mekanizması haline gelebilir<sup>7,8</sup>. Örneğin, HBV ile enfekte hücre kültürleri ve farelerde yapılan bir çalışmada siRNA ile HBs antijeninde %85, HBc antijeninde %99 azalma sağlanmıştır<sup>9</sup>. Fareler üzerinde yapılan bir başka çalışmada, RSV (Respiratory Syncytial Virus) ve parainfluenza virus enfeksiyonları, burun içerisine püskürtülen siRNA'lar ile engellenebilmiştir<sup>10</sup>.

Tüm bu avantajlarına karşın, antiviral amaçlı RNA susturulmasının, aşılması gereken sorunları vardır. Viruslar çok hızlı çoğalırlar ve genlerinde mutasyonlar, küçük delesyonlar oluşturarak siRNA moleküllerine dirençli hale gelebilirler. Birçok virusun, RNAi'den korunmak için bu mekanizmayı etkisiz kılan proteinler ürettiği de anlaşılmıştır. Örneğin, vaccinia virusunun E3L, influenza virusunun NS1 ve HIV'in TAT genlerinin RNAi'yi engellediği anlaşılmıştır. TAT'ın doğrudan RNA'yı kesen enzimin (“Dicer”; dilimleyici) işlevini engellediği belirlenmiştir<sup>8</sup>.

Şu anda RNAi tedavisi hala emekleme çağındadır. Çeşitli yan etkileri ortaya çıkartabilecek mekanizmalar şimdiden düşünülebilmektedir. Örneğin, kullanılan RNA molekülleri çok kısa diziler olduğu için hedef dışı birçok gen dizisi ile etkileşebilme olasılığı vardır. Biyoinformatik incelemeler ile bu etkileşimler öngörülmeye çalışılsa da, in vitro ve in vivo ortamda denenmeden hiçbir siRNA molekülünün etkisini kestirmek olanaklı değildir. Şu anda deneylerde siRNA etkileri daha çok mRNA düzeylerine bakarak

izlenmektedir. Ancak mRNA düzeyi her zaman protein miktarını yansıtmayabilmektedir. Bu nedenle mRNA düzeyi ile etki gösterildikten sonra protein düzeylerinin saptanması da çok önemlidir. siRNA için farmakokinetik çalışmalar henüz yapılmamıştır; siRNA moleküllerinin farmakokinetik özellikleri bilinmemektedir. Bir başka çözüm bekleyen konu, halen büyük miktarlarda siRNA üretiminin kısıtlı olması ve bu molekülleri tam saf olarak elde etmekte sorun yaşanmasıdır. Şu andaki en önemli teknik sorun, siRNA moleküllerini hücre içerisine gönderebilmektir. Bunu başarabilmek için nanoteknolojiden yararlanılmaktadır<sup>11</sup>. Tüm bu eksikliklere karşın RNAi, özellikle bugüne kadarki tedavi yaklaşımları ile tedavi edilemeyen kanser, dejeneratif hastalıklar, otoimmün hastalıklar ve enfeksiyon hastalıklarının tedavisi alanlarında yeni bir çığır açacak gibi görünmektedir. RNAi kontrolü öğrenildikçe, organogenez daha iyi anlaşılabilir, suni organ yapımı ve vücutta bozulan organların onarımı alanında önemli adımlar atılabilecektir.

## KAYNAKLAR

1. Zachte E. RNA interference. [http://en.wikipedia.org/wiki/RNA\\_interference](http://en.wikipedia.org/wiki/RNA_interference)
2. Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S, Mello C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391:806-11.
3. Rayburn ER, Zhang R. Antisense, RNAi, and gene silencing strategies for therapy: mission possible or impossible. *Drug Discov Today* 2008; 13:513-21.
4. Xia H, Mao Q, Eliason SL, *et al.* RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 2004; 10:816-20.
5. Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, *et al.* Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 2005; 11:429-33.
6. Pai SI, Lin YY, Macaes B, Meneshian A, Hung CF, Wu TC. Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther* 2006; 13:464-77.
7. Pantaleo V, Szitty G, Burgyán J. Molecular bases of viral RNA targeting by viral siRNA programmed RISC. *J Virol* 2007; 81:3797-806.
8. Leonard JN, Schaffer DV. Antiviral RNAi therapy: emerging approaches for hitting a moving target. *Gene Ther* 2006; 13:532-40.
9. McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, *et al.* Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* 2003; 21:639-44.
10. Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* 2005; 11:50-5.
11. Li SD, Chen YC, Hackett MJ, Huang L. Tumor-targeted delivery of siRNA by self-assembled nanoparticles. *Mol Ther* 2008; 16:163-9.

## KONFERANS 3

**LABORATUVARI BİR YONGAYA SİĞDİRMEK: MİKRODİZİLER VE MİKRO TOTAL ANALİZ SİSTEMLERİ**

Prof. Dr. Hüseyin Avni Öktem

*ODTÜ, Biyolojik Bilimler Bölümü; Nanobiz NanoBiyoteknolojik Sistemler Ar-Ge Ltd. Şti, ODTÜ Teknokent, Ankara.*

Moleküler biyoloji, biyoteknoloji ve özellikle nanoteknolojide son yıllarda kaydedilen gelişmeler hem bilimsel araştırmalar hem de teknolojik anlamda yeni araç ve yöntemler ortaya koymuştur. Hibridizasyona dayalı DNA yongaları (çipleri), nükleik asit/protein mikro/makro dizileri, biyosensörler ve üçüncül yapıları ile yüksek etkinlikte bağlanma sağlayan aptamerler ve bunların çeşitli sinyal tesbit ve iletim sistemleriyle bir araya getirilmesi ile oluşturulan mikrototal analiz sistemleri, bahsedilen araç ve yöntemlerden en önemlileridir. Bu araçlar, tıp ve moleküler biyolojinin yanı sıra çevre bilimleri, tarım-gıda teknolojileri, kriminoloji ve savunma sanayi gibi birçok alanda uygulama bulmuştur.

Geleneksel moleküler biyoloji yaklaşımlarında bir gen ya da gen ürünü (RNA/protein) ile bir deney yapılmakta iken yeni nesil teknolojiler ile bütün resmin görülebileceği yüksek yoğunluklu, mikrofabrikasyon ile küçültülmüş deney formatları ya da yongalar (çipler) oluşmuştur. Son yıllarda çeşitli organizmalara ve insana ait genom DNA baz dizileri belirlenmiş, bu bulgular önemli bilgi kaynakları olan veri tabanlarında kullanıcılara açılmış ve genom düzeyinde fonksiyonel analizler için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden birisi olan mikrodizi teknolojisi öncelikle gen ifade seviyesi analizlerinde kullanılmış ancak geliştirilen teknolojiler ve yeni yaklaşımlar ile genotiplendirme, tek nükleotit değişim analizleri (single nucleotide polymorphism SNP), mutasyon analizleri, gen regülasyon araştırmaları ile çeşitli tanısal uygulamalarda da kullanım alanları bulmuştur.

Nükleotit bazları arasındaki hibridizasyona dayalı olan mikrodizi tekniği, aynı anda bir genomda bulunan tüm genler ve bunların ifade edilmiş ürünleri olan RNA seviyelerinin analizine izin verir. Katı bir yüzey üzerine sabitlenmiş, prob olarak adlandırılan nükleotit dizileri ve işaretlenmiş, solüsyon içindeki hedef diziler arasındaki hibridizasyon, floresan boyalar, nanoparçacıklar ya da enzim reaksiyonları gibi çeşitli tekniklerle sayısallaştırılır.

Bir mikrodizi platformunun tasarımında, çipin üretiminden mikroarray deneyinin gerçekleştirilmesine ve sonuçların analizine kadar geçilen temel aşamalar ve bunlar ile ilgili iyileştirme ve etkinleştirme çalışmaları bir bütün halinde düşünülmelidir. Çipin tasarım ve üretimi ile ilgili bahsedilen temel aşamalardan bazıları yüzey seçimi, prob seçimi, bu probun sentezlenmesinde ve yüzeye sabitlenmesinde kullanılacak yöntemler ve ilgili iyileştirmelerdir. Platform tasarımında hedefin işaretlenmesi, kullanılacak sinyal molekül ya da molekülleri, sinyal iletim mekanizmaları ve hedef ile prob arasındaki etkileşim mekanizmaları çip üretimi ile birlikte düşünülmeli gereken diğer önemli noktalardır. Üretilen çip ve platform ile gerçekleştirilecek dizi deneyleri sırasında kullanılacak örnek, örnek hazırlığı ve işaretleme yöntemleri, çip görüntüleme, çıktılarının toplanması ve ölçülmesi, sonuçların değerlendirilme, analiz ve yorumlanması ve ilgili iyileştirmeler de, platform tasarımı sırasında düşünülmeli gerekenler arasındadır.

Son yıllarda mikro ya da nano boyutlarda kolaylıkla tasarlanan ve üretilen çipler ve sensörler ya da daha geniş tanımla mikro-elektro-mekanik sistemlerin (microelectromechanic systems, MEMS) mikroakışkan uygulamalar ile birleştirilmesi özellikle genetik mühendisliği, tıp, biyoteknoloji, çevre, gıda ve tarım sektöründeki ihtiyaçlar doğrultusunda yeni mikrosistemlerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Mikropompalar, mikrokapakçıklar ve mikrokariştiriciler gibi elemanları olan mikrototalanaliz sistemleri (micro total analysis systems,  $\mu$ TAS), kimyasal veya biyolojik analiz mikro-laboratuvarları (lab-on-a-chip) ve mikro-plastik kart sistemleri bu mikroakışkan sistemlerinden bazılarıdır. Nükleik asit ve protein gibi

biyomoleküllerin analizleri için mikroakışkan cihazların tasarımı en yeni örneklerdendir. Bu sistemler hastalık teşhislerinde, DNA, RNA ve proteinlerin ayırımı ve analizinde, hücre kültüründe ve etkin madde salımını içeren bir çok potansiyel uygulamalarda kullanım alanı bulmaktadır. Mikro-laboratuvarların üstünlükleri düşük sıvı hacimleri kullanmaları, hızlı sonuç vermeleri, yüksek yüzey-hacim oranlarına sahip olmaları, etkin süreç kontrolü sağlamaları, düşük maliyetler ile üretiliyor olmaları ve aynı anda yüksek sayılarda veri üretmelerinden kaynaklanmaktadır.

Araştırmalarımız kapsamında geliştirilmiş olan makrodizi platformu; sabitlenmiş bir prob, hedef yapı ve işaretli ikincil bir prob kullanmaktadır. Ar-Ge çalışmaları devam eden platform, çeşitli yüzey (cam, naylon membran, kağıt, vb) ve yüzeye sabitleme yöntemlerini ve de çeşitli sinyal molekülleri (florasan, altın nanoparçacıkları, quantum noktacıkları, vb) ve iletim mekanizmalarını birleştirebilecek potansiyele sahiptir. Platformun en önemli özelliklerinden biri PZR ürünlerinin herhangi bir işaretleme işlemi olmaksızın kullanılabilmesini olası kılmasıdır. Genetik hastalık teşhisinden, patojen varlığı tesbitine ya da genetiği değiştirilmiş organizma kaynaklı ürünlerin varlığının belirlenmesine kadar birçok amaç için kullanılacak platform, ilk aşamada oligonükleotit tabanlı olarak geliştirilmiştir. Ayrıca sandviç hibridizasyon esaslı bu platformu, katı yüzeye sabitlenen probun yüksek özgünlükte bağlanma gösteren aptamerler ile değiştirilmesiyle aptamer tabanlı bir sisteme adapte edilmiştir. Böylece geliştirilen platform nükleik asit dizilerinin yanı sıra protein ve hücrelerin belirlenmesinde de kullanılacak potansiyeldedir. Sonuç olarak güvenilir, hassas, düşük maliyetli, taşınabilir ve pratik bir ürüne dönüşme potansiyeline sahip çip formatında nükleik asit ve aptamer tabanlı bir biyosensör platformu oluşturulmuş olup sistemin ürünleştirme çalışmaları devam etmektedir.

Biyoteknoloji ve nanoteknolojide son yıllarda sıkça kullanılan DNA çipleri, biyosensörler, aptamerler ve taşınabilir algılama sistemleri önümüzdeki yıllarda da geliştirilmeye devam edecek ve sağlık bilimleri, çevre, tarım, anayurt güvenliği gibi birçok alanda yeni kullanım sahaları bulacaktır.

## MINİ KONFERANS 1

**TANISAL MİKROBİYOLOJİDE “FOURIER TRANSFORM INFRARED” SPEKTROSKOPİ: KULLANIMI VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Doç. Dr. Çağrı Ergin

*Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.*

“Fourier transform infrared” (Fourier dönüşümlü-kızılötesi; FT-IR) spektroskopi tekniği 20.yüzyılın başlarından itibaren biyolojik bilimlerde kullanılmaktadır. Mikrobiyolojide polipeptidlerin ve proteinlerin yapısal analizlerinin FT-IR spektroskopik incelemesi 1950’lerde başlamıştır. Günümüzde kızılötesi spektroskopi uygulamalarının teknik olarak ilerlemesi ile birlikte nükleik asitler, lipidler ve karbohidratlar da incelenebilmektedir.

FT-IR spektroskopinin tanisal mikrobiyolojide sıklıkla kullanım amacı mikroorganizmaların tanımlanması ve sınıflandırılmasıdır. Aynı zamanda mikrobiyal ürünlerin ve antimikrobiyal maddelerin tanınmasında da kullanılmaktadır. Kızıl ötesi bölgesindeki absorpsiyon (soğurma), moleküllerin titreşme ve dönem düzeylerini uyarır. Teknik, bu uyarımının ölçümü esasına dayanır. Kızılötesi ışının absorpsiyonu, çeşitli titreşim ve dönme halleri arasındaki enerji farklarının küçük olması nedeniyle çoğunlukla moleküler yapılarla sınırlıdır. Dalga sayısı hem enerji hem de frekans ile doğru orantılı olduğundan FT-IR incelemelerinde dalga sayısı ölçek olarak kullanılır. Mikrobiyolojik analizlerde orta (2.5-25 mm) kızılötesi ışığı ile  $4000\text{ cm}^{-1}$  ve  $400\text{ cm}^{-1}$  arasında kalan bölge incelenir<sup>1-5</sup>.

İncelenecek olan mikrobiyal örnek, salin veya distile su içinde süspansiyon edildikten sonra liyofilize hale getirilir. Kızılötesi inceleme için liyofilize materyal absorpsiyon göstermeyen, transparan, taşıyıcı bir madde ile karıştırılır. Biyolojik örnekler için bu transparan taşıyıcı madde çoğunlukla ZnSe, BaF<sub>2</sub> ve CaF<sub>2</sub>’dir. Kaynaktan gelen kızılötesi ışın hareketli aynalar yardımı ile farklı uzaklıklardan yansıtılır. Elde edilen dalgaboyu-absorpsiyon verileri ortamda bulunan moleküllerin saptanmasında kullanılır. Farklı absorpsiyon yükselticilerinin bulunduğu bölgeler ortamdaki farklı yapıları göstermektedir. Bunlar;  $900-1200\text{ cm}^{-1}$  arasında çeşitli polisakkaritler,  $1200-1250\text{ cm}^{-1}$  arasında nükleik asit kaynaklı PO<sub>2</sub> yapılar;  $1500-1700\text{ cm}^{-1}$  arasında proteinlerden C=O ve N-H yapılar;  $1720-1750$  arasında lipid esterlerinden C=O yapılar;  $2800-3000\text{ cm}^{-1}$  arasında protein ve lipidlerden CH yapılar ve  $3200-3100$  arasında proteinlerden NH yapılarıdır. Bakteriye ve mikolojik analizler için değerlendirmelerin yapıldığı bölgeler  $1700-600\text{ cm}^{-1}$  aralığıdır. Bu bölge içinde her mikroorganizmaya özgül bir “parmakizi” bölgesinin varlığı araştırılmaktadır. Parmakizi bölgesi olarak en sık incelenen bölge  $\sim 900-600\text{ cm}^{-1}$  spektral aralıktır<sup>2-6</sup>.

FT-IR spektroskopi ile tek bir örnek dakikalar içinde test edilmektedir. Ancak parçalanmamış mikrobiyal yapı, FT-IR spektroskopi ile inceleme aşamasında kompleks yapılara sahiptir<sup>3-5</sup>. Moleküler onayı yapılmış kökenlerin, değişmeyen FT-IR parmakizi bölgelerinin saptanması amacıyla çok sayıda araştırma sürdürülmektedir. Aynı tür içinde değişmeyen bölgelerin bulunması, türler arasında ayırım yaratan parmakizi bölgelerinin saptanması gereklidir. Elde edilen spektral analizler bölümler halinde basamaklı korelasyon analizleri ile incelenir ve benzer spektruma sahip olanlar dendrogram ile sınıflandırılır<sup>2-6</sup>. Bakteri ya da mantarların parmakizi bölgelerinin saptanması, klinik örneklerden hızlı ve ucuz tanının yapılmasına imkan sağlamaktadır.

Mikroorganizmaların yapılarının üreme dönemlerine ve ortamın fizyolojik farklılıklarına göre değişimler göstermesi, FT-IR spektroskopisi ve benzeri analizler için önemli bir sorun oluşturmaktadır<sup>4-8</sup>. Buna rağmen FT-IR spektroskopi sonuçlarına göre rutin mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılacak bakterileri tanımlayıcı akım şemaları oluşturulabilmektedir<sup>9</sup>. Gram-negatif enterik bakteriler<sup>7-9</sup>, nonfermentatif bakteriler<sup>9-11</sup>, *Candida* cinsi maya mantarları<sup>6,9,12</sup>, *Staphylococcus*<sup>8,9,13,14</sup> ve *Enterococcus*<sup>9,15</sup> türlerinin tanımlanmasında FT-IR spektroskopi gibi vibrasyonel tekniklerin uygulamalarına ait raporlar gide-



rek artan sayıda yayınlanmaktadır. Aynı zamanda bu teknikler aynı kökenler ile ortaya çıkan salgınların epidemiyolojik incelenmesinde de kullanılabilirlerdir<sup>6,11,15</sup>.

FT-IR spektroskopi analizinin bir diğer kullanım alanı, ortam havasında bulunan filamentöz küfleri tür düzeyinde tanımlayan araştırmalardır<sup>16</sup>. Moleküler yöntemlerin ortamdaki alerjen ve mikotoksijenik küflerin araştırılmasında pahalı olması, vibrasyonel analizlerin hızlı ve ucuz olmakla birlikte aynı zamanda da güvenilir sınırlar içinde bulunması, çevresel araştırmalarda da FT-IR analizi ile mikolojik tanımlamayı gündeme getirmiştir.

FT-IR spektroskopi ile doğrudan mikroorganizmaların saptanmasına yönelik çalışmalar ile birlikte, bakterilerin ortama saldıkları artıklar da mikrobiyolojik analizlerde kullanılabilirlerdir. "Metabolik parmakızı" olarak tanımlanan bu işlem, mikroskopik veya fizyolojik testler ile ayıramayacak olan tür içi değişimlerin ve/veya karışımların moleküler yöntemlere göre hızlı ve ucuz saptanmasını sağlamıştır<sup>17</sup>. Aynı zamanda mikroorganizmaların farklı kimyasallar karşısındaki davranışları ve duyarlılıkları da FT-IR ile test edilebilirlerdir. Bu analizlerin sonucunda FT-IR'ın, farklı kimyasal yapıların biyolojik maddeler üzerine etkilerinin incelenmesinde kullanılabilirliğini bildirilmiştir<sup>18</sup>.

Günümüzde FT-IR spektroskopinin mikrobiyolojideki uygulama alanlarını sınırlayan en önemli parametre, incelenecek olan mikrobiyal materyalin bir saf kimyasal/bileşik olmayıp, bir organizma olması, komplike moleküler yapıları bulundurmasıdır. Doğal yapısındaki organizma, gelişme sürecinin evrelerine göre yapısında farklı kimyasallar oluşturmakta (hücre duvarı, spor, kapsül, vb), aynı zamanda da ortama farklı metabolik atıklar çıkartmaktadır. Bu durum ise moleküler bağ yapısının incelenmesini esas alan spektroskopi esaslı ölçümlerin yorumlanmasını ve kullanılabilirliğini zorlaştırmaktadır. Ancak yapılan çalışmalar, hızlı ve ucuz olan spektroskopik analizlerin, mikrobiyoloji araştırmalarında, hatta rutin uygulamalarda da kullanılabilirliğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

1. Erdik E. Kırmızı ötesi (İnfrared) spektroskopisi, s: 82-182. Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler. 1993, Gazi Büro Kitabevi, Ankara.
2. Quintero Rodríguez MP. Fourier transform infrared technology for the identification of organisms. Clin Microbiol Newslett 2000; 22: 57-61.
3. Yalçın Duygu D, Baykal T, Açıkgöz İ, Yıldız K. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy for biological studies. G U J Sci 2009; 22: 117-21.
4. Beekes M, Lasch P, Naumann D. Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. Vet Microbiol 2007; 123: 305-19.
5. Naumann D. FT-Infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research. Appl Spect Rev 2001; 36: 239-98.
6. Toubas D, Essendoubi M, Adt I, Pinon JM, Manfait M, Sockalingum GD. FTIR spectroscopy in medical mycology: applications to the differentiation and typing of *Candida*. Anal Bioanal Chem 2007; 387: 1729-37.
7. Al-Holy M, Lin M, Al-Qadiri H, Cavinato AG, Rasco BA. Classification of foodborne pathogens by fourier transform infrared spectroscopy and pattern recognition techniques. J Rapid Method Auto Microbiol 2006; 14: 189-200.
8. Whittaker P, Mossoba MM, Al-Khaldi S, et al. Identification of foodborne bacteria by infrared spectroscopy using cellular fatty acid methyl esters. J Microbiol Methods 2003; 55: 709-16.
9. Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, et al. Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. J Clin Microbiol 2003; 41: 324-9.
10. Bosch A, Miñán A, Vescina C, et al. Fourier transform infrared spectroscopy for rapid identification of nonfermenting Gram-negative bacteria isolated from sputum samples from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 2008; 46: 2535-46.
11. Coutinho CP, Sá-Correia I, Lopes JA. Use of Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics to discriminate clinical isolates of bacteria of the Burkholderia cepacia complex from different species and ribopatterns. Anal Bioanal Chem 2009; 394: 2161-71.

12. Sandt C, Sockalingum GD, Aubert D, et al. Use of Fourier transform infrared spectroscopy for typing of *Candida albicans* strains isolated in intensive care units. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 954-9.
13. Lamprell H, Mazerolles G, Kodjo A, Chamba JF, Noël Y, Beuvier E. Discrimination of *Staphylococcus aureus* strains from different species of *Staphylococcus* using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Int J Food Microbiol* 2006; 108: 125-9.
14. Becker K, Laham NA, Fegeler W, Proctor RA, Peters G, von Eiff C. Fourier-transform infrared spectroscopic analysis is a powerful tool for studying the dynamic changes in *Staphylococcus aureus* small-colony variants. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3274-8.
15. Kirschner C, Maquelin K, Pina P, et al. Classification and identification of Enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1763-70.
16. Fischer G, Braun S, Thissen R, Dott W. FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *J Microb Method* 2006; 64: 63-77.
17. Rellini P, Roscini L, Fatichenti F, Morini P, Cardinali G. Direct spectroscopic (FTIR) detection of intraspecific binary contaminations in yeast cultures. *FEMS Yeast Res* 2009; 9: 460-7.
18. Corte L, Rellini P, Roscini L, Fatichenti F, Cardinali G. Development of a novel, FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) based, yeast bioassay for toxicity testing and stress response study. *Anal Chim Acta* 2010; 659: 258-65.

**MINİ KONFERANS 2****MANTARLARDA GENETİK MADDE AKTARIMI**

Doç. Dr. Ayşe Kalkancı

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

**Giriş ve Tarihçe**

Genetik olarak bakterilerin değiştirilmesi ilk defa 1928'de İngiliz bakteriyolog Frederick Griffith tarafından uygulanmıştır. Griffith, *Streptococcus pneumoniae*'nin ısıtıldığında virülansının değiştiğini göstermiştir. Virülan olmayan bakteri ile virülan bakteri bir arada bekletildiğinde, zararsız bakterinin virülan hale dönüştüğünü göstermiştir. 1944'te bu dönüştürücü faktörün DNA olduğu gösterilmiştir. DNA'nın bakterilerin içine alınması ve onunla bütünleşmesine "transformasyon" adını vermişlerdir.

Mantarlarda transformasyon ilk defa 1973'de Tatum isimli araştırmacının laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde, *Neurospora crassa* türü mantardan *Saccharomyces cerevisiae* türü maya mantarına inositol geni aktarılmıştır. Hutchinson ve Hartwell tarafından geliştirilen yöntem ile *S.cerevisiae* hücre duvarları eritilmiş ve sferoplastlar oluşturulmuştur. *S.cerevisiae* genomik DNA'sı, transformasyon ile kolay ve özgül bir şekilde değiştirilebilmektedir. Aktarılmak istenen genlerin seçilmiş bir vektöre entegrasyonu yapıldıktan sonra *Escherichia coli* hücrelerinde çoğalmaları gerçekleştirilmektedir. Bu çoğaltılan bölge maya kromozomuna rekombinasyon ile entegre edilmektedir. Aktarılan DNA, rekombinasyona uygun özelliktedir. Genelde aktarılması istenilen geni taşıyan vektör olarak Col E1 plazmidi kullanılmaktadır. Bu plazmid maya kromozomuna entegre olmaktadır. Beggs tarafından ilk defa *S.cerevisiae* - *E.coli* arasında vektör denenmiştir. İki replikasyon ucuna sahip olan kimerik plazmid elde edilmiştir. Biri *E.coli* bakterisine ait olan Col E1 plazmidi diğeri ise *S.cerevisiae* mantar hücresine ait olan 2 µm plazmidi kullanılmıştır.

**Mantarlarda Kullanılan Transformasyon Yöntemleri**

Mantarlarda gen aktarımı çalışmaları için en çok *S.cerevisiae* türü mayalar kullanılmaktadır. Başarılı bir gen aktarımı için transformasyon yönteminin, aktarılan DNA üzerinde bir belirteçin, *E.coli* ve mayalarda klonlanmış DNA'nın çoğalmasını sağlayan bir vektörün seçilmesi gerekmektedir.

Mantarlarda transformasyon için ilk olarak uygulanan gen aktarım yönteminde polietilen glikol (PEG) ve kalsiyum klorür ( $CaCl_2$ ) bulunan bir ortamda, sferoplast hücrelerin aktarılması istenen DNA bölgesi ile birlikte inkübe edilmesi sağlanmıştır. İkinci sırada geliştirilen yöntem daha çok kullanılan yöntemdir. Hücreleri alkali tuz ve lityum asetat içinde bekletip, DNA ile PEG'ün inkübe edilmesi sağlanmaktadır. Bu alanda deneyimler devam ettikçe yeni ve farklı yöntemler tasarlanmıştır. Yüksek yoğunlukta lityum iyonları kullanılarak mantarların hücre duvar geçirgenliği artırıldığında DNA parçalarını almaları sağlanmaktadır. Mantarlarda gen aktarımı için yüksek yoğunlukta PEG gerekir. PEG hücrelerin kümeleşmesi ne neden olup, DNA parçalarının yakalanmasına yardım etmektedir.

Son zamanlarda geliştirilen ve daha başarılı olduğu bildirilen üçüncü yöntemde, elektrik akımı kullanılarak hücre duvarının geçirgenliği artırılmış ve DNA'nın daha kolay alınması sağlanmıştır. Bu yöntem elektroporasyon denmektedir. Elektroporasyon, bakterilerde olduğu gibi bütün hücrelerde delik açmanın ve gen aktarımının en etkili yoludur. Bu yöntemde hücreler kısa süreli bir elektrik alanı (10-20 kV/cm) içinde şok edilirler. Plazmid DNA'sı bu deliklerden hücre içine girer. Doğal membran tamir mekanizmaları şokun ardından bu delikleri kısa sürede onarmaktadır. Bir plazmid DNA'sının hücre içinde varlığını sürdürebilmesi için plazmid DNA'sında bir "ikilenme (çoğalma) merkezi" bulunması gerekmektedir. Bu sayede plazmid, kromozomdan bağımsız olarak çoğalmaktadır. Laboratuvarında oluşturulan deneysel transformasyon işlemi sonucunda çok sayıda transforme olmamış hücre arasında az sayıda transforme ol-

muş hücre oluşmaktadır. Plazmidi kazanmış hücrelerin tanınması için bir yöntem gerekmektedir. Transformasyon deneylerinde kullanılan bakteri plazmidleri genellikle bir antibiyotik direnç geni taşımaktadır. Plazmidi bulunmayan bakteriler ise bu plazmide duyarlıdır. Dolayısıyla, bu antibiyotik bulunan bir ortamda üreyebilen hücrelerin bu plazmid ile transformasyona uğramış oldukları anlaşılmaktadır.

### Horizontal Gen Transferi (HGT) veya Yatay Gen Aktarımı (YGA)

Yaklaşık 50 yıl önce keşfedilmiştir. Son zamanlarda genom bilgisinin artması ile birlikte gen aktarımı konusunda da yeni çalışmalar yapılmaktadır. Prokaryotlarda YGA kesin olarak tanımlanmış ancak, ökaryotlarda henüz tartışmalı bir konu olmaya devam etmektedir. Bakteriler gibi mantarların bazıları da saprofitik veya simbiyotik yaşam tarzı göstermektedir. “Germ line” veya “soma” gibi YGA’ni engelleyen klasik bariyerleri olmayan mantar hücreleri teorik olarak gen aktarımı için iyi birer örnek olarak kabul edilmektedir. Mantar genomunda prokaryotlara ait genler bulunmuştur. Türler arasında genetik bilgilerin aktarımı yoluyla genlerin kazanılması Darwin’in evrim teorisine göre daha hızlı bir gelişme sağlamaktadır. Bakteriler arasında antibiyotik direnç genlerinin aktarılması, çoklu dirençli bakterilerin oluşumuna neden olmuştur. Ancak, ökaryotlar için böyle bir etki tanımlanmamıştır. Ökaryotların gen aktarımı yolu ile bakterilerden yeni proteinler kazandıkları ve bunların yeni ilaç hedefleri olabilecekleri düşünülmektedir. Mantarlarda yapılan filogenetik araştırmalar sonucunda prokaryotlardan kazanılmış 713 gen saptanmıştır.

Mantarlar arasında YGA ile sekonder metabolit genlerinin aktarıldığı gösterilmiştir. Örneğin *S.cerevisiae* türünde nitrojen metabolizmasından sorumlu olan DAL gen salkımı diğer mantarlarda da bulunmuştur. Dokuya invazyonda rol oynadığı gösterilen ACE1 gen salkımının *Magnopithe grisea* ile *Aspergillus clavatus* arasında yatay olarak aktarıldığı gösterilmiştir. *S.nodorum* ve *Pyrenophora tritici-repensis* türleri arasında virülanstan sorumlu genlerin ortak olduğu gösterilmiştir.

Gen aktarımı yoluyla genom içine homolog veya heterolog genler yerleşebilir. *C.parapsilosis*'de bulunan prolin rasemaz enzimini kodlayan gen aslında bakterilerden kazanılmıştır. *S.cerevisiae*'de biotin sentezinden sorumlu olan 6 genden 5 tanesi horizontal olarak kazanılmış genlerdir. Moens ve arkadaşları, sitozolik gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz enzimini kodlayan genin ökaryotlardan prokaryotlara, aldolaz tip 2 enzimini kodlayan genin prokaryotlardan ökaryotlara dikey olarak aktarıldığını göstermişlerdir. Her iki gen dizisi de hem *E. coli*'de hem de mayalarda küme halinde bulunmaktadır.

### Lateral Gen Transferi (LGT) veya Dikey Gen Aktarımı (DGA)

Bu tür gen aktarımı bütün organizmalar arasında intergenomik olarak görülmektedir. Bir bakteriden diğer bakteriye veya arkeler arasında hatta ökaryotlar arasında da saptanabilmektedir. Microsporidia ailesinden *Nosema locustae* türünde bakterilere ait katalazların bulunması gen aktarımını kanıtlamaktadır. Bitki patojeni olan Dothideomycetes'lerden *Stagonospora nodorum* ve *Mycosphaerella fijiensis* ve Leotiomycetes'den *Botrytis cinerea* türlerinde de bakterilerden kazanılmış genler gösterilmiştir.

### Gen Aktarımının Gösterilmesi

Yatay veya dikey olarak aktarılan genler çeşitli yöntemler ile gösterilmektedir. Kodon'a bağlı yaklaşımda her organizmanın belli G+C içeriği ve kodon kullanım şekli olmasından yararlanılmaktadır. İkinci yaklaşım BLAST'a bağlı yaklaşımdır. Hızlı ve kolay bir yöntemdir. Gen aktarımı açısından şüpheli proteinin karşılaştırılan proteinlerden hangisine daha çok benzediğinin bulunması esasına dayanmaktadır. Genom projelerinde genlerin kaynağını belirtmek için bu yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntem ile bakteri ve insan genomlarının arasında 113 genin ortak olduğu gösterilmiş ancak filogenetik çalışmalar bu ortaklığı doğrulamamıştır. Gen dağılımına bağlı yaklaşım, yakın türler arasında düzensiz dağılım gösteren genlerin tanımlamasına dayanmaktadır. Bu yaklaşım ile sadece genom dizisi tamamen belirlenmiş olan türlerin içinde yer alan yabancı genlerin saptanması mümkün olabilir. Filogenetik yaklaşım en kapsamlı yöntemdir. Bir türün filogenetik tarihçesini anlamak için tek bir gene dayalı evrimsel ağaçlar oluşturmak yeterli

değildir. Yatay gen aktarımını göstermek için tekil filogenetik belirteç (marker) kullanarak organizmaların filogenisini belirlemek zordur. Ortak bir atadan gelen “klad”ların oluşması modeli ile YGA sonuçları birleşince, günümüzde mevcut üç üst alem arasında paylaşılan genlerin hepsine sahip olan bir ortak atanın olmayacağı anlaşılmaktadır. Her bir molekülün kendine ait bir geçmişi ve atası bulunmaktadır. Her molekül ata muhtemelen farklı zamanlarda farklı organizmalarda bulunmaktaydılar.

### Gen Aktarımın Uygulamaları

Genlerin fonksiyonlarını araştırmak için deneysel gen aktarım modelleri kullanılmaktadır. Gen klonlama teknikleriyle birçok genin işlevi analiz edilebilir. Genel olarak, hedeflenen proteini kodlayan gen taşıyıcı plazmid üzerine aktarılır, sonra promotör ve transkripsiyonal aktivatör ile bağlanır. Her ikisinin de mantar hücresinde hedeflenen görevi yapma yeteneğine sahip olmaları gerekmektedir. Bu alanda en iyi örnek uygulama, *S.cerevisiae* türlerini kullanarak insan interlökin-1 $\beta$  üretimidir. *S.cerevisiae*'nin IL-1 $\beta$  salgılaması için plazmid *E.coli* ve *S.cerevisiae*'ye ait olan iki replikasyon kaynağı içermektedir.

### KAYNAKLAR

1. Fincham JRS. Transformation in fungi. Microbiol Rev 1989; 53: 148-70.
2. Fitzpatrick DA, Logue ME, Butler G. Evidence of recent interkingdom horizontal gene transfer between bacteria and *Candida parapsilosis*. BMC Evol Biol 2008; 8: 181.
3. Hall C, Dietrich FS. The reacquisition of biotin prototrophy in *Saccharomyces cerevisiae* involved horizontal gene transfer, gene duplication and gene cluster. Genetics 2007; 177: 2293-307.
4. Khaldi N, Collemare J, Lebrun MH, Wolfe KH. Evidence for horizontal transfer of a secondary metabolite gene cluster between fungi. Genom Biol 2008; 9: R18.
5. Marcet-Houben M, Gabaldon T. Acquisition of prokaryotic genes by fungal genomes. Trends Genet 2010; 26: 5-8.
6. Moens L, Vanfleteren J, Van de Peer Y, et al. Globins in Novertebrate Species: Dispersal by horizontal gene transfer and evolution of the structure-function relationships. Mol Bio Evol 1996; 13: 324-33.
7. Whitaker JW, Mc Conkey GA, Westhead DR. Prediction of horizontal gene transfers in eukaryotes: approaches and challenges. Biochem Soc Trans 2009; 37: 792-5.

**MINİ KONFERANS 3****KAN BANKACILIĞINDA MOLEKÜLER YÖNTEMLER: GÜNCEL DURUM**

Doç. Dr. Rüçhan Yazan Sertöz

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

Transfüzyon ile bulaşan pek çok virus, bakteri, parazit, riketsiya, mantar, prion gibi enfeksiyon etkenleri vardır. Bunların içinde; latent enfeksiyon oluşturma, asemptomatik seyir, taşıyıcılık, pencere dönemi, kan ve ürünlerinin saklanması sırasında canlılığını sürdürmesi gibi özellikleri ile virusların ayrı bir yeri vardır.

Transfüzyon ile bulaşı engellemek için, kan vericiler bir form aracılığı ile sorgulanmakta ve zorunlu tarama testleri uygulanmaktadır. Her ülke, epidemiyolojik veriler, hastalığın önemi, tedavi edilebilirliği, ülkenin ekonomik durumu ve bununla ilişkili olarak maliyet-etkinlik analizleri sonuçlarına göre zorunlu tarama testleri uygulamaktadır. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı genelgesi ile güncellenen, kan merkezlerinde uygulanması gereken zorunlu tarama testleri HBsAg, anti-HCV, anti-HIV ve sifiliz (Sy) testleridir.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) güvenli kanın tanımını; “verildiği kişide herhangi bir tehlike ya da hastalık oluşturmeyen, enfeksiyon etkenlerini veya zararlı yabancı maddeleri içermeyen kan” olarak yapmaktadır.

Kan, tek kaynağı insan olan yaşamsal bir ilaçtır. Ancak tüm tarama testlerine rağmen enfeksiyon etkenleri açısından %100 güvenli kan yoktur. Tüm taramalara rağmen Schreiber ve arkadaşları, transfüzyona bağlı HBV geçişinin 63.000 ünite kanda bir olduğunu bildirmişlerdir.

Erken akut enfeksiyon, iyileşmekte olan enfeksiyon, gizli hepatit B ve atipik varyantlar, rutin HBV tarama testleri ile atlanmaktadır. Transfüzyonla virus bulaşma riski hesaplamalarında, HBV için bulaşma riskinin %90'ının, serokonversiyon öncesindeki kan transfüzyonundan (tanısal pencere dönemi) kaynaklandığı bilinmektedir.

Tek tek nükleik asit amplifikasyon teknikleri (NAT) veya 8-24'lü küçük havuzlar, yüksek duyarlı protokoller ile tanısal pencere dönemlerini kısaltmaktadır. Schreiber ve arkadaşları, NAT uygulaması ile HBV geçişinin 1/110.000'e düştüğünü (%42 azalma) bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, transfüzyona bağlı HCV geçişinin ise 103.000 ünite kanda bir olduğunu ifade etmişlerdir. Bunun da başlıca nedeni serokonversiyon öncesi dönemdir. HCV için NAT uygulanmasıyla, pencere dönemi 59 gün kısaltılarak 11 güne kadar inmektedir. Avrupa'da idari ve denetleyici kuruluşlar (EMEA – European Agency for the Evaluation of Medicinal Products), 1 Ocak 1999 tarihinden itibaren plazmadan elde edilen ürünlerde HCV-NAT testinin negatif olma koşulunu getirmiştir. Alman Kızılhaçı 1 Nisan 1999 tarihinden itibaren HCV için NAT uygulamaktadır. Birçok ülkede HBV-NAT zorunlu testler içinde yer almaktadır. HBV ve HIV NAT'ın zorunlu testler içinde yer almasını planlayan daha pek çok ülke vardır.

Günümüzde kullanılan teknolojilerin etkinliği, havuzlama yöntemi kullanılıyorsa havuzdaki örnek sayısı, viral yük, testin duyarlılığı gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Duyarlılık ve özgüllük için kabul edilebilir sınırların belirlenmesi ve referans standartlar ile çalışılması gerekmektedir. Bu sunumda zorunlu tarama testi olarak NAT uygulayan ülkeler, yöntemler, algoritmaları; NAT planlayan ülkelerde yapılan çalışmalar; NAT uygulamayan ülkelerdeki veriler ve ülkemizdeki durum tartışılacaktır.

**KAYNAKLAR**

1. Dodd RY. Current viral risk of blood and blood products. *Ann Med* 2000; 32:469-74.
2. Otağ F. Destekleyici Testler ve Moleküler Tanı Yöntemleri. I.Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbi Kongresi, 24-29 Eylül 2000, Kapadokya. Kongre Kitabı, s: 131-5.

3. Roth WK, Weber M, Seifried E. Feasibility and efficacy of routine PCR screening of blood donations for hepatitis C virus, hepatitis B virus, and HIV-1 in a blood-bank setting. *Lancet* 1999; 353: 359-63.
4. Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N Engl J Med* 1996; 334:1685-90.
5. Weber B, Mühlbacher A, Melchior W. Detection of an acute asymptomatic HBsAg negative hepatitis B virus infection in a blood donor by HBV DNA testing. *J Clin Virol* 2005; 32: 67-70.
6. World Health Organization. Blood Transfusion Safety Team of the Department of Blood Safety and Clinical Technology, p: 1-6, WHO, Geneva. WHO/BTS/01.1 (2001). [www.who.int/bct](http://www.who.int/bct)
7. Yazan Sertöz R., Erensoy S, Göksel S, Özkalay N, Bilgiç A. Kan bankacılığında havuz yöntemiyle HCV-RNA PCR tarama testlerinin değerlendirilmesi. *Viral Hepatit Derg* 2002; 8: 529-31.
8. Yazan Sertöz, R, Yaygın E, Karadoğan A, Aydınok Y, Erensoy S. HBsAg negatif kan donörlerinin Cobas Amplicor HBV test v2.0 ve Robogene HBV kantitasyon kiti ile küçük havuzlarda nükleik asit teknolojisi ile taranması. *İnfeksiyon Derg* 2005; 19: 385-8.

**PANELLER**





## PZT İLE İLGİLİ 25 YILDA NELER ÖĞRENDİK?

Prof. Dr. Tanıl Kocagöz

*Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.*

Karry Mullis, DNA'yı çoğaltmak için Polimeraz Zincirleme Tepkimesini (PZT) tanımlayalı 25 yılı geçti. Bu 25 yıl süresince PZT sürekli gelişti, yaygınlaştı ve yeni uygulama alanlarına girdi. PZT'den esinlenerek başka birçok nükleik asit çoğaltma yöntemi geliştirilmesine karşın, hiçbiri PZT'nin yerini alacak duruma gelmedi. PZT konusunda ise hala yeni şeyler öğrenmeye devam ediyoruz<sup>1-3</sup>.

Karry Mullis PZT'nin ilk denemesini yaparken sıcaklığa dayanıklı bir DNA polimeraz enzimi yoktu. İlk PZT'yi 37°C'de çalışan *E.coli* polimerazı ile gerçekleştirdi. Doğal olarak, bu enzim denatürasyon basamağı olan 95°C'de bozulduğu için her döngüde tüpünün kapağını açıp polimeraz enzimi eklemesi gerekti. Yani daha ilk uygulamada sıcaklığa dayanıklı bir polimerazın gerekliliği anlaşılmıştı. Sıcaklığa dayanıklı bir polimerazın, sıcakta yaşayan bir mikroorganizmada bulunabileceği düşünülerek, kültür koleksiyonundan daha önce "Yellow Stone" sıcak su kaynağından elde edilen *Thermus aquaticus* bu amaçla kullanıldı. *Thermus aquaticus*'un *E.coli*'ye klonlanarak elde edilen DNA polimerazına Taq polimeraz adı verildi<sup>4,5</sup>. Taq polimerazdan sonra, sıcaklığa dayanıklı birçok polimeraz enzimi PZT için kullanılmışsa da, Taq polimeraz hala en yaygın olarak kullanılmaya devam eden enzimdir. Taq polimerazın özellikleri hakkında yıllar içerisinde birçok şey öğrenilmiştir. Taq polimerazın çoğalttığı ürünler klonlanıp DNA dizi incelemesi yapıldığında, enzimin çoğalttığı ürünlerin uçlarına bir deoksiadenozin eklediği anlaşılmıştır. Enzim böylece "A" çıkıntılı uçlar yaratmaktadır. Enzimin kalıptan bağımsız olarak uçlara nükleotit ekleme özelliği, T-klonlama plazmid vektörlerin hazırlanmasını sağlamıştır. Künt uçlar oluşturarak kesim yapan bir enzim ile kesilmiş klonlama vektörü, timidin nükleotitleri ve Taq polimeraz ile inkübe edilirse, enzim ortamda deoksiadenozin bulunmadığı için uçlara deoksitimidin ekler ve klonlama bölgesinde "T" çıkıntılı uçlar oluşturur. Bu şekilde hazırlanmış "T" klonlama vektörlerine, Taq polimeraz ile çoğaltılmış "A" çıkıntılı PZT ürünleri kolayca bağlanabilmektedir. Bu nedenle PZT ürünlerinin kolayca klonlanması için "T" klonlama vektörleri en çok tercih edilen vektörler haline gelmiştir<sup>6-8</sup>.

PZT'de kullanılan primerlerin 3' ucunun kalıp DNA'ya bağlanması, polimerizasyonun başlatılması için yeterlidir. Bu durum, primerlerin 5' ucunda çeşitli değişiklikler yapılmasına izin vermektedir. Örneğin primerlerin 5' ucuna biyotin bağlanarak, çoğaltma ürünlerinin avidin bağlı enzimatik tepkimelerle saptanması, avidin bağlı reçine, kağıt gibi katı yüzeylerde yakalanması sağlanabilmektedir. Primerlerin 5' ucuna çeşitli restriksiyon enzim bölgeleri eklenebilmekte, çoğaltılan ürünler bu enzimlerle kesilerek klonlama vektörlerine doğru yönde ve kolayca bağlanabilecek çıkıntılı uçlar oluşturulabilmektedir<sup>6</sup>.

Taq polimeraz enzimi, diğer polimerazlarda olduğu gibi, polimerizasyon sırasında kalıp üzerinde bir süre ilerledikten sonra düşer. Bu nedenle, çoğaltılabilecek PZT ürününün boyu sınırlıdır. Taq polimeraz enziminin aminoasitleri değiştirilerek, polimerizasyon sırasında kalıp DNA'ya daha sıkı bağlanan ve bu sayede daha uzun çoğaltma ürünleri sentezleyebilen Taq polimeraz türevleri elde edilmiştir. Benzer şekilde kalıp DNA'ya gevşek bağlanan türevler elde edilerek, polimerizasyon başlatma özgülüğü artırılmış, istenmeyen PZT ürünleri engellenmiştir. Kalıp olarak RNA kullanılarak nükleik asit dizileri çoğaltılmak istenirse, önce ters transkriptaz (reverse transcriptase; RT) enzimi ile tek zincirli DNA oluşturulup sonra PZT ile bu çoğaltılabilmektedir. Kullanımdaki RT enzimleri yüksek sıcaklığa dayanıklı olmadığından iki aşamalı bir çoğaltma uygulanması gerekmektedir. RT özelliği olan sıcaklığa dayanıklı Tth polimeraz enziminin kullanılması, tek aşamada PZT ile doğrudan RNA'dan çoğaltma yapılmasını sağlamıştır<sup>9</sup>.

PZT'nin özgülüğü, temel olarak primerlerin sadece kendilerine özgül DNA dizisine bağlanması ve polimerizasyonu buradan başlatması ile sağlanmaktadır. Özgül olmayan, istenmeyen bölgelere bağlan-

malar, istenmeyen çoğaltma ürünlerinin ortaya çıkmasına neden olur. Özgül olmayan bağlanmalar,  $Mg^{++}$  derişiminin gereğinden daha yüksek olması, primerlerin birden fazla bağlanma bölgesi bulunması, primer bağlanma derecesinin olması gerekenden düşük tutulması gibi nedenlerle olabilmektedir. Her ne kadar primer bağlanma derecesi, primerdeki 4GC+2AT (primerdeki G ve C'lerin toplam sayısının 4 ile çarpımı ve A ve T'lerin toplam sayısının iki ile çarpılması ile elde edilen sayıların toplamı) formülü ile hesaplanabilse de, PZT ilk kez gerçekleştirileceği zaman en uygun bağlanma sıcaklığını bulmak için farklı sıcaklıklarda deneme yapmak gerekebilir. Özgül ve etkin bir çoğaltma için primer bağlanma sıcaklıklarının birbirine yakın olması gerekmektedir. Farklı olduğu durumda, bağlanmayı garanti edebilmek için, döngülerde, bağlanma sıcaklığı düşük olan primere uygun sıcaklık kullanılmalıdır<sup>1-3,5</sup>.

$Mg^{++}$  hem primerlerin bağlanması hem de polimerazın kofaktörü olarak çalışması nedeniyle, hangi derişimde  $Mg^{++}$  kullanıldığında iyi sonuç alınacağını kestirmek güçtür. Bu nedenle bir bölge için ilk defa PZT yapılacak ise farklı  $Mg^{++}$  derişimlerinde deneme yapılması mutlaka gereklidir. Biz çalışmalarımızda bu iki farklı etkiye bağlı olarak genelde iki farklı derişimde en iyi çoğaltmanın gerçekleştiğini gözlemlemekte, bunlardan bir tanesini çoğaltma için seçmekteyiz.

PZT'nin tanımlanmasından sonra 25 yılı aşkın sürede milyonlarca uygulama yapılmasına karşın, yeni deneyimler ve geliştirilen yeni enzimler, daha birçok yeni uygulamanın kapısını açacak gibi görünmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology 1986; 51:263-73.
2. Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich, H. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230:1350-4.
3. Mullis K, Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 1987; 155: 335-50.
4. Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988; 239:487-91.
5. Mullis K. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American 1990; 4:56-65.
6. Erlich HA, Gelfand DH, Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. Science 1991; 252:1643-5.
7. Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. Crit Rev Biochem Mol Biol 1991; 26:301-34.
8. Lawyer F, Stoffer S, Saiki R, et al. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. PCR Methods Appl 1993; 2: 275-87.
9. Mulder J, McKinney N, Christopherson C, Sninsky J, Greenfield L, Kwok S. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: application to acute retroviral infection. J Clin Microbiol 1994; 32:292-300.

## PZT'DE KULLANILAN POLİMERAZ; ÖZELLİKLERİ VE KULLANIM AMAÇLARI

Uzm. Bio. Sinem Öktem

*Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.*

Kary Mullis tarafından 1980'li yıllarda geliştirilen Polimeraz Zincirleme Tepkimesi (PZT) genetik çalışmaların ivmesini artıran en önemli tekniklerden biridir. PZT bir çeşit in vitro klonlamadır. PZT ile bir hedef DNA parçasından milyonlarca DNA molekülü çoğaltmak mümkündür. Bir PZT döngüsü için gerekli olan beş ana madde vardır: (1) DNA örneği, genelde genomik DNA; (2) çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer; (3) deoksi-nükleotit-trifosfatlar (dNTP); (4) yüksek sıcaklığa dayanıklı DNA polimeraz enzimi; (5) uygun pH ve iyon koşullarını sağlayan tampon çözelti ve magnezyum iyonları ( $Mg^{+2}$ ). Bu beş ana madde içerisinde yer alan polimeraz enzimlerinin görevi, var olan DNA zincirlerinin her birini tek tek kalıp olarak kullanıp, primere yeni bazların eklemesini katalizleyip kontrol ederek yeni oluşacak DNA zincirlerini sentezlemektir. PZT için çoğu zaman DNA polimerazlar kullanılır. Bu amaç için kullanılan polimerazların yüksek sıcaklığa dayanıklı olması ve hata düzeltme işlevinin olması gereklidir. Bu yüzden *Thermus aquaticus* gibi yüksek sıcaklıkta yaşayabilen canlıların DNA polimerazı veya onun yapay türevleri kullanılır. DNA polimerazlar birbirlerinden nükleotit ekleme hızları, yarılanma ömürleri, sıcaklık tolerans farklılıkları, ekzonükleaz özelliklerinin olup olmaması gibi yönleriyle ayrılırlar. "Hot-start" (ilk ısıtmadan sonra çalışmaya başlayan) DNA polimeraz enzimleri, özgül olmayan ürün oluşumunu engellemesi, yüksek sıcaklıklara dayanabilmesi, düşük birleşme sıcaklıklarında da çalışabilmesi gibi nedenlerle tercih edilmektedir. Enzim türünün seçimini, yapılacak çoğaltma koşulları belirler. PZT'de bir tek enzim kullanıldığı gibi kombinasyon da oluşturulabilir.

### DNA Polimeraz Enzimleri

Holoenzim yapısında (birden çok protein alt birimden oluşmuş enzim) olan DNA polimeraz enzimleri tek iplikçikli bir DNA'ya bağlanarak DNA ikileşmesini başlatır. DNA polimeraz, yeni uzayan bir iplikçiğin sadece 3' ucuna serbest nükleotitler bağlayabilir. Bunun sonucu olarak yeni iplikçiğin uzaması 5' - 3' yönünde olur. Bilinen DNA polimerazlar arasında, yeni bir zinciri tamamen başlangıçtan oluşturma yeteneği olan yoktur. DNA polimeraz sadece mevcut bir 3'-OH grubuna bir nükleotit ekleyebilir, ve dolayısıyla ilk nükleotidi ekleyebileceği bir başlatıcıya ("primer")e gerek duyar. Primerler RNA ve DNA bazlarından oluşabilir. Hücre içindeki primer RNA'dır, ve primaz adlı bir enzim tarafından üretilir. Helikaz adı verilen bir enzim ise, çoğalma sırasında DNA'nın ikili sarmalını ters yönde burarak gevşetir ve onun tek iplikçikli bir şekil almasını sağlar. Böylece DNA, yarı saklı ikileşmeye hazır hale gelir. Hata onarımı, bazı polimerazların bir özelliği olmakla beraber hepsinde görülmez. Bu süreç, yeni sentezlenen DNA'daki hataları düzeltir. Hatalı bir baz çifti farkedilince, DNA polimeraz yönünü değiştirip bir baz çifti geriye gider. Enzimin 3' - 5' yönde ekzonükleaz aktivitesi hatalı bazların kesilip çıkartılmasını sağlar. Bazın çıkartılmasından sonra polimeraz doğru bazı uzayan zincire ekler ve ikileşme devam eder.

### Taq DNA Polimeraz

Taq polimeraz, *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen DNA polimeraz enzimidir. *T.aquaticus*, termofilik bir bakteridir. Kaplıca ya da jeotermal bölgelerde yaşar. Taq polimeraz enzimi, PZT'de kullanılan, yüksek sıcaklıklara (94°C) dayanabilen bir enzimidir. Bu enzim, 5' → 3' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir; 3' → 5' ekzonükleaz aktivitesi yoktur.

DNA polimeraz enzimleri bir DNA sentezleyebilmek için komplementlerini sentezleyeceği bir kalıp DNA molekülüne, substrat olarak dNTP'lere ve kalıp zincirine eşleşmiş primerin 3' OH grubuna gereksinim duyarlar. Enzim bu bileşenlerin bir araya geldiği uygun tampon sisteminde sentezi 5' uçtan 3' uca doğru başlatır. Primerlerin serbest 3' hidroksil grubuna ortamdaki dNTPlerin nükleofilik etkileri nedeniyle fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır. Yüksek derişimlerde enzim kullanımı, özgül olmayan bağlanmalara yol açabileceği gibi, düşük derişimler de enzimin

çalışma aktivitesini düşerebilmektedir. Taq polimeraz 72°C'de 10 saniye içerisinde 1000 baz çiftlik bir kalıp DNA'yı çoğaltabilmektedir. Taq polimerazın hata payının 9000 nükleotitte 1 oranında olduğu çalışmalar ile gösterilmiştir.

### Taq Polimeraz Türevleri

Rekombinant DNA teknolojisi ile değişiklik yapılarak Taq polimeraz enziminin bir iki aminoasit değişikliği gösteren farklı türevleri elde edilmiştir. Bu enzimlerin Taq polimeraza göre bazı üstünlükleri bulunmaktadır.

### Yüksek Güvenirlikli Taq DNA Polimeraz

Yüksek güvenilirlikli (Dream Taq DNA polimeraz, Fermentas, gibi) enzimler, tüm standart PZT uygulamaları için Taq DNA polimeraz enziminden geliştirilerek optimize edilmiş DNA polimeraz enzimleridir. Taq polimeraza göre daha duyarlı ve daha büyük DNA parçalarının (6 kilobaza kadar genomik DNA, 20 kilobaza kadar viral DNA) sentezlenmesini sağlamaktadırlar. Dream Taq kullanılan PZT'lerde, tepkime koşullarının optimizasyonuna gerek duyulmaz. Dream Taq ile beraber kullanılan Dream Taq tamponu, PZT karışımında 2mM MgCl<sub>2</sub> olacak şekilde optimize edilmiştir. Kendi deneyimlerimiz, bu derişimde Mg<sup>++</sup> ile kalıp DNA'nın türüne bağlı olmaksızın çoğaltmanın iyi gerçekleştiğini göstermiştir. Enzim, 3'OH ucunda Adenin uzantısı bulunan ve dUTP ile birleşmeyen PZT ürünleri oluşturur.

### Herculase® DNA Polimeraz

Herculase® (Stratagene, ABD) DNA polimeraz, uzun ya da GC'den zengin DNA dizilerini çoğaltmak için tasarlanmıştır. Herculase® DNA polimeraz; "Herculase® gelişmiş" ve "Herculase® Hotstart" DNA polimeraz olmak üzere iki biçimde bulunmaktadır. Bu her iki tür de, yüksek güvenilirlikli Pfu DNA polimeraz, Taq DNA polimeraz ve bir arkebakterinin polimeraz güçlendirme ("ArchaeMaxx®-enhancing") faktörünün kombinasyonu ile elde edilmiştir. Bu kombinasyon ile ortaya çıkan ürün 0.1 – 48 kilobaz büyüklüğündeki DNA parçalarını çoğaltmak için kullanılmaktadır. Çok büyük ve GC'den zengin DNA parçalarının çoğaltılması, bu enzimle oldukça başarılı olarak gerçekleştirilmiştir.

### SureStart Taq DNA Polimeraz

SureStart Taq DNA polimeraz (Stratagene, ABD), Taq DNA polimerazın rekombinant formu olan bir "hot start" polimerazdır. SureStart Taq DNA polimeraz, PZT ürünlerinde yaşanan arka-alan kirliliğini önleyip ürünlerin çoğaltmasını kuvvetlendirmektedir. SureStart Taq DNA Polimeraz, ilk kez 92–95°C'ye ısıtılana dek aktivite göstermemektedir. PZT döngülerine, 92–95°C'de 9–12 dakika bir başlangıç döngüsü eklenerek SureStart Taq DNA polimeraz aktif hale getirilmektedir. 100 ile 2000 bazçifti boyları arasındaki DNA parçalarını çoğaltmak için kullanılabilir.

### Pfu DNA Polimeraz

Pfu DNA polimeraz, hipertermofilik bir arkea olan *Pyrococcus furiosus*'dan elde edilmektedir. Taq polimeraz ile aynı göreve sahip, ancak sahip olduğu kopya doğrulama (proof-reading) özelliği sayesinde ondan bir adım önde olan bir polimeraz enzimidir. Taq polimeraz bu tür bir kontrol işlemi içermediğinden DNA'nın kopyalanması sırasında yapılan yanlışlıklar düzeltilmez ve bu hatalar sonradan oluşturulacak klon DNA'lara aktarılabilir. Pfu polimeraz, 3' - 5' ekzonükleaz aktivitesi ile kopyalama sırasında meydana gelecek yanlışlıkları geri dönüp düzeltebilir. Sahip olduğu bu kontrol özelliği ile Taq polimeraza göre daha güvenilir sonuçlar verir. Pfu polimeraz'ın 1.3 milyon bazda 1 hata yaptığı varsayılmaktadır. (Kıyaslama için: En küçük otozomal kromozom olan 21. kromozomda 47 milyon baz bulunur.) Ancak bu özelliği aynı zamanda kopyalama işlemlerinin daha yavaş işlemesine neden olmaktadır. DNA kopyalanmasında her bir döngü (cycle) için 72°C'de 1-2 dakika bekletme gerekmektedir. Ayrıca künt uçlu (blunt) DNA ürünlerinin oluşmasına neden olur. Deneysel çalışmalarda Taq polimeraz ile birlikte kullanılabilir. Bu sayede Taq polimeraz'ın hızı kullanılırken, Pfu polimeraz ile düşük hatalı ürünler elde edilebilir. En-

zim, arkea kaynaklı olduğu için yüksek sıcaklıklara dayanabilmektedir. Nitekim enzimi üreten *Pyrococcus furiosus*'un optimum yaşam sıcaklığı 100°C civarındır.

### Tsp DNA Polimeraz

Tsp DNA polimeraz (Platinum® GenotypeTsp DNA polimeraz, İnvitrogen), genetik olarak tasarlanmış, “Hot Start” PZT’de kullanılmak üzere anti-Tsp antikorları ile birleştirilmiş bir sıcaklığa dayanıklı polimeraz enzimidir. Genotip saptama tepkimelerinde, tekrarlayan dinükleotid bölgelerinde çoğalma için özellikle tasarlanmıştır ve işlevsel olarak da test edilmiştir. 3’ ve 5’ ekzonükleaz aktivitesi yoktur. Standart Taq polimeraz enzimlerinin kullanıldığı PZT koşullarına uygun olarak tasarlandığından bu tepkimeler için kullanılabilir. GenotypeTsp DNA polimerazın kalıp DNA’ya tam uyumlu olmayan bölgelere ekleme yapması, Taq polimeraza kıyasla önemli ölçüde azaltılmıştır. Taq polimerazın, uygunluk göstermeyen nükleotitleri PZT ürünlerine ekleme eğilimi bulunmaktadır. Fazladan nükleotit ekleme özelliği, Tsp DNA polimerazda %90 oranında azaltılmıştır. Tsp DNA polimerazın 500 baz çiftinden büyük DNA parçalarını çoğaltmak için uygun olmaması dezavantajlarından birisidir.

Tth polimeraz, *Thermus thermophilus*’dan izole edilmiş bir polimeraz enzimidir. Tth polimeraz da çok özgül olup, DNA’ya bağımlı DNA polimeraz aktivitesinin yanı sıra, RNA’ya bağımlı DNA polimeraz aktivitesi de (tersine transkriptaz) göstermektedir. Bu yönden Tth polimerazın Taq polimeraza üstünlüğü bulunmaktadır. Tersine transkriptaz aktivitesi manganez iyonları varlığında en hızlı 70°C’de gerçekleşirken, DNA polimeraz aktivitesi magnezyum iyonları yardımı ile 74°C’de ortaya çıkmaktadır.

### Klenow Parçası

Klenow parçası, *E.coli*’den elde edilen DNA polimeraz I’in, *Bacillus subtilis*’den edilen subtilisin proteazı ile enzimatik olarak kesilmesi sonucunda elde edilen büyük bir protein parçasıdır. *E.coli*’den elde edilen DNA polimeraz I’in 5’ → 3’ ekzonükleaz aktivitesi bazı uygulamalar için uygun olmayabilmektedir. Bu gibi uygulamalarda tercih edilen Klenow parçasının ise 3’→5’ ekzonükleaz aktivitesi bulunmamaktadır. Bu özelliğinden dolayı tek zincirli kalıp DNA’dan çift zincirli DNA sentezleme, DNA dizi analizi, radyoaktif DNA propları hazırlama ve künt uçlu kalıp DNA oluşturma gibi uygulamalarda kullanılmaktadır.

### KAYNAKLAR

1. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemie. 2003. Springer, Heidelberg/Berlin.
2. <http://genotyping.wordpress.com/2007/03/07/polimeraz-zincir-reaksiyonu-pcr-cok-guclu-bir-teknik/>
3. <http://www.biocompare.com/Articles/ProductReview/797/Herculase-From-Stratagene.html>
4. <http://www.fermentas.com>
5. <http://www.genetiklab.com>
6. Hubscher U, Maga G, Spadari S. Eukaryotic DNA polymerases. Ann Rev Biochem 2002; 71: 133.
7. Klenow H, Henningsen I. Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. Proc Natl Acad Sci USA 1970; 65:168-75.
8. McCulloch SD, Kunkel TA. The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. Cell Res 2008; 18: 148.
9. Prakash S, Johnson RE, Prakash L. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. Ann Rev Biochem 2005; 74: 317.
10. Pursell ZF, Isoz I, Lundström EB, Johansson E, Kunkel TA. Yeast DNA polymerase epsilon participates in leading-strand DNA replication. Science 2007; 317: 127-30.

## PZT'DE ÇOĞALTMA ÖZGÜLLÜĞÜNÜN SAĞLANMASI

Bio. Nihan Aytekin

*Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.*

Polimeraz Zincirleme Tepkimesi (PZT), DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimedir. Yöntem basit olarak, tüp içerisinde nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılmasını sağlar. Bir çeşit “in vitro klonlama” olarak da tanımlanan PZT, 94-98°C aralığında gerçekleştirilen ayrılma (denaturation), 37-65°C aralığında gerçekleştirilen birleşme (annealing) ve 72°C’de gerçekleştirilen uzama (polymerization) aşamalarından oluşur ve bu döngülerin belirli sayıda tekrarlanması ile DNA çoğaltması sağlanır.

Polimeraz zincirleme tepkimesi özgül bir reaksiyon olmakla birlikte, zaman zaman beklenmeyen çoğaltma ürünleri ortaya çıkmaktadır. Bunun nedenleri arasında; genellikle primerlerin özgül olmayan birleşmeleri, tam uyumlu olmadan polimerizasyonu başlatmaları, polimeraz enziminin performansını etkileyen magnezyum iyon derişimi ve primerlerin uygun DNA bölgesine bağlanmalarını sağlayan sıcaklık döngüleri sayılabilir. Özgüllük, alel özgül PZT gibi uygulamalar için önemlidir. Bu yazıda, PZT’nin özgüllüğünün sağlanması için kendi çalışmalarımızla değerlendirdiğimiz koşullar özetlenmektedir.

### Farklı Taq Polimerazların Özgüllüğünün Araştırılması

Polimeraz zincir tepkimesinde en yaygın olarak Taq polimeraz kullanılmaktadır. Bizim çalışmalarımızda Taq polimeraz kullanıldığında, bu enzimin primerlerin 3’ ucunda tek ve hatta iki nükleotit eşleşme bozukluğu olsa da polimerizasyonu başlatabildiği ve o bölgeden çoğaltma ürünü olduğu gözlemlenmiştir. Kuramsal olarak, enzimin bu hatayı bir döngüde milyonlarca kopya kalıp DNA üzerinde bir kez yapması, bu çoğaltma için yeterli olmaktadır. Çünkü bir kez oluşturulan bu hatalı ürün sonraki döngülerde özgül üründen farksız olarak PZT ile çoğaltılacaktır. Özgüllüğü sağlayabilmek için farklı özellikleri olan polimeraz enzimleri denenmiştir. Bu denemelerde öncelikle Herculase® (Stratagene, ABD) DNA polimeraz kullanılmıştır. Herculase®, uzun ya da GC’den zengin DNA dizilerini çoğaltmak için tasarlanmış olup, 0.1-48 kilobaz büyüklüğündeki DNA parçalarını çoğaltmak için kullanılmaktadır. Herculase® ile yapılan çeşitli denemeler sonucunda, bu enzimin özgüllüğü artırmadığı, farklı denemeler sonucunda istenmeyen birçok yerde özgül olmayan çoğaltmaların gerçekleştiği görülmüştür. İstenilen DNA dizileri, hem uzun hem de kısa olduğu halde, bilinenin aksine bu enzim ile uzun dizili DNA bölgesinde bile özgüllük elde edilememiştir. Bunun üzerine Pfu DNA polimeraz (Stratagene, ABD) enzimi ile farklı denemeler yapılmış ve tepkimizde istenilen özgüllüğün sağlanmasına çalışılmıştır. Bu enzim hipertermofilik bir arkea olan *Pyrococcus furiosus*’dan elde edilmektedir. Pfu DNA polimeraz, Taq polimeraz ile aynı göreve sahip, ancak “proof-reading” (kopyalama kontrol) özelliği sayesinde ondan bir adım önde olan bir polimeraz enzimidir. Taq polimeraz bu tür bir kontrol işlemi içermediğinden DNA’nın kopyalanması sırasında yapılan yanlışlıklar düzeltilmez ve bu hatalar sonraki döngülerde çoğaltılan DNA moleküllerine aktarılabilir. Buradaki amacımız, enzimin kopyalanan bölgeyi kontrol etmesinden yararlanıp uygun olmayan bağlanmaların engellemesidir. Ancak Pfu DNA polimeraz ile de istenilen özgüllüğe ulaşamamıştır. Çalışmamıza Platinum® GenotypeTsp DNA polimeraz (Invitrogen) ile devam edilmiştir. Platinum® GenotypeTsp DNA polimeraz genetik olarak tasarlanmış, ilk ısıtmadan sonra başlayan “Hot Start” PZT’de kullanılmak üzere anti-Tsp antikorları ile bağlanmış bir enzimidir. 3’ ve 5’ ekzonükleaz aktivitesi yoktur. Platinum® GenotypeTsp DNA polimerazın 500 baz çiftinden büyük DNA parçalarını çoğaltmak için uygun olmaması dezavantajlarından birisidir. Bu enzimin, birleştirilmiş sıcaklıkta başlama özelliğinin, hatalı başlatmaları engelleyebileceği düşünülmüştür. Ancak yaptığımız çalışmalarda istenilen düzeyde özgüllük elde edilememiştir. Çalışmalarımız, Dream Taq polimeraz (Fermentas)’ın denenmesiyle devam etmiştir. Bu enzim, Taq polimerazın amino asit dizileri değiştirilerek elde edilmiş bir türevidir. Polimerazasyon bölgesine bağlanması zayıflatılarak özgüllüğünün artırıldığı düşünülmektedir. Yaptığımız çalışmalar, bu enzimin sıcaklığa dayanıklı polimerazlar içerisinde özgüllüğü en iyi sağlayan enzim olduğunu göstermiştir.

## PZT Tepkimelerinde Magnezyum Derişiminin Optimizasyonu

PZT tepkimelerinde magnezyum iyonu ( $Mg^{++}$ ) derişimi çok önemlidir.  $Mg^{++}$  derişimi arttıkça primerlerin kalıp DNA'ya bağlanması kolaylaşır, DNA zincirlerinin birbirinden ayrılması ise zorlaşır.  $Mg^{++}$ , DNA polimeraz enziminin de kofaktörüdür. Enzimin iyi çalışabilmesi için magnezyum derişiminin uygun bir aralıkta olması gerekir.  $Mg^{++}$  derişimi uygun olmayan PZT karışımlarında, DNA çoğalması sağlanmadığı gibi, primerlerin özgül olmayan bölgelere bağlanarak istenmeyen çoğaltma ürünlerini ortaya çıkarması da söz konusu olabilmektedir. Yapmış olduğumuz çalışmalarda, farklı enzimler, farklı PZT koşulları ve farklı tasarımdaki primerler ile farklı derişimlerde  $Mg^{++}$  düzeyinin optimizasyonu denmiştir. Çalışmalarımızda,  $Mg^{++}$  derişiminin PZT üzerindeki etkisinin her koşulda farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. Ancak Dream Taq polimeraz enzimi dışındaki diğer enzimler ile yapılan çalışmaların bir çoğunda özgüllük sağlanamamıştır. Koşulların farklılığına göre  $Mg^{++}$  konsantrasyonu arttıkça ya da azaldıkça tepkime sonucunda oluşan ürünler azalmış, bazı durumlarda herhangi bir değişiklik olmamış ya da çoğalması istenen bölge özgül olmayan bir şekilde çoğalmıştır. Sonuç olarak,  $Mg^{++}$  derişiminin optimize edilmesinin, çoğaltma etkinliğini değiştirmekle birlikte, özgüllüğün sağlanmasında tek başına yeterli olmadığı düşünülmüştür.

## Sıcaklık Döngülerinin Değiştirilmesi

PZT'nin gerçekleştirilebilmesi için klasik olarak deney tüplerine üç farklı sıcaklıktan oluşan, sıcaklık döngüleri uygulanır: (1) Kalıp DNA'nın zincirlerinin birbirinden ayrılması için  $95^{\circ}C$ , (2) primerlerin kalıp DNA'ya bağlanması için, primerin GC/AT oranına ve uzunluğuna göre değişen  $48-72^{\circ}C$ , (3) DNA polimerizasyonu için Taq polimerazın en hızlı çalıştığı sıcaklık olan  $72^{\circ}C$ . Yaptığımız çalışmalarda, polimerizasyonun gerçekleştiği  $72^{\circ}C$ 'lik sıcaklık basamağının ortadan kaldırılmasının, PZT'nin özgüllüğünü önemli ölçüde artırdığı gözlemlenmiştir. Tepkimelerin  $64^{\circ}C$  ve  $95^{\circ}C$  gibi iki sıcaklıklı döngüler şeklinde uygulanmasının, özgül olmayan primer bağlanmalarından kaynaklanan çoğalmaları ortadan kaldırdığı belirlenmiştir. Bu durum, enzimin en hızlı çalıştığı  $72^{\circ}C$ 'de primer kalıp DNA'ya tam uymasa da polimerizasyonu başlattığını düşündürmüştür.

## dNTP Düzeyinin Optimizasyonu

Polimeraz enziminin polimerizasyonu başlatma etkinliğinin, ortamdaki dNTP derişimine bağlı olabileceği düşüncesiyle, çalışmalarımızda farklı dNTP derişimlerinde PZT'nin özgüllüğü araştırılmıştır. Normalde PZT karışımında 2mM olarak kullanılan dNTP derişimini, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 ve 4 mM düzeyinde kullanarak denemeler yapılmış ve dNTP derişiminin artırılması ya da azaltılmasının çoğaltmayı bozduğu, buna karşın özgüllüğü sağlamadığı belirlenmiştir.

## Primer Derişimlerinin Azaltılması

Primer derişiminin yüksek olması zaman zaman özgül olmayan çoğaltma ürünlerinin ortaya çıkmasına neden olabildiğinden, çalışmalarımızda, primer derişimi azaltılarak DNA çoğaltması bozulmadan istenmeyen ürünlerin ortadan kaldırılıp kaldırılmadığı araştırılmıştır. Primer derişimleri 20, 10, 5, 2.5 ve 1.25  $\mu M$  olacak şekilde hazırlanarak denemeler yapılmış ve normal primer derişimi ile özgül ürün elde edilirken, primer derişimi düşüktüçe çoğaltma ürününün de azaldığı ve ortadan kalktığı tespit edilmiştir. Bu deney sonucunda, primer derişimini azaltmanın, özgül olmayan çoğaltma sorununu çözmediği kanısına varılmıştır.

## Primer Tasarımı ve Optimizasyonu

Bilindiği gibi primerler, özgül gen bölgelerine göre tasarlanan, PZT'de istenilen gen bölgesinin çoğalmasını sağlayan, sentetik olarak üretilmiş kısa, tek iplikli nükleotit polimerleridir. Yapmış olduğumuz çalışmalarda tek nükleotit farklılıklarına göre her tepkime için ayrı primerler sentezlenmiş ve her bir tepkime sonucunda, primer bölgeye tam uyumluluk gösteriyor ise çoğalma olması beklenmiştir. Ancak



PZT'den elde edilen ürünler jel elektroforezi ile incelendiğinde, beklenmeyen çoğalmaların ortaya çıktığı görülmüştür. Primerler özgül çoğaltma yapacak şekilde yeniden tasarlanmaya çalışılmıştır. İlk olarak tasarlanan primerler saflaştırılmış olarak tekrar sentezletirilmiştir. Uygulanan farklı PZT koşulları sonucunda, saflaştırılmış primerler ile de PZT'de istenilen özgüllük elde edilememiştir. İkinci aşamada primerlerin 3' ucuna yakın bölgelerinde normal nükleotitler 5 adet inozin ile değiştirilmiştir. Bilindiği gibi inozin, normal nükleotit yapısında olan ancak hidrojen bağı yapacak yan grupları bulunmayan bir nükleotittir. İnozinlerin eklenmesindeki amaç, primerin 3' ucunun bağlanmasını zayıflatmak ve DNA dizi uygunsuzluğu olursa, primerin buradan ayrılması ile istenmeyen çoğalmaları engellemektir. Primerlerin bu şekilde düzenlenmesi, bazı istenmeyen çoğalmaları ortadan kaldırmasına rağmen, yine de birçok tepkime karışımında istenmeyen çoğaltmaların sürmesini engelleyememiştir. Bunun üzerine, bir tepkime karışımı için farklı primer modelleri denenmesine karar verilmiştir. Farklı bölgelere farklı sayılarda inozinler yerleştirilerek çok sayıda primer tasarlanmıştır. Bu primerler farklı PZT koşullarında denenmiş ve bir çoğunun istenilen özgüllüğü sağlayamadığı görülmüştür. Primerler içerisinde, 3' ucundaki özgül nükleotit sayısı 7, bunun gerisinde 6 inozin bulunan primerlerin, özgüllüğü en iyi sağladığı belirlenmiştir (Örn. 5'- A GTG GCG AAC GGG TGA GII III IGT GGG TG -3'). Bu primerler ile dizisi tam uygunluk gösteren suşların hepsi çoğaltma ürünü oluştururken, primerin 3' ucunda 1 veya 2 nükleotit uyumsuzluk göstermesi, çoğaltma ürünü oluşumunu tamamen ortadan kaldırmıştır. Tüm bu deneyler sonucunda özgül çoğaltma ürünü oluşturan primerlerin 3' ucunda 7 özgül nükleotit bulunması, bunların yanında 6 inozin bulunması, 5' ucunda ise inozinlere komşu özgül 20-25 kadar nükleotit bulunması gerektiği anlaşılmıştır.

### **Çoğalma Kontrolünün Özgüllük Üzerine Etkisi**

PZT reaksiyonlarında, ortamda primerlere uygun DNA bulunmaması, özgül olmayan ürünlerin çoğalmasına yol açabilmektedir. Bu düşünceden yola çıkarak, çoğalma kontrolü eklenmesinin, tepkimelerin özgüllüğü üzerine etkisi araştırılmıştır. Yaptığımız çalışmalar sonucunda, çoğalma kontrolünün, asıl hedef bölgede primer uyumsuzluğu olması durumunda, bu bölgeden çoğalmayı engellediği, böylece hedef bölgeden çoğalma özgüllüğünü artırdığı saptanmıştır.

### **Tek Nükleotit Farklılıkları Ayrabilen Özgül PZT**

Çalışmalarımızda elde edilen verilere göre, tek nükleotit farklılıkları ayırt edebilen PZT için önerilen uygulama ve koşullar aşağıda özetlenmiştir.

Primerlerin 3' ucundaki nükleotit, kalıp DNA'da tek nükleotit dizi farklılığı araştırılan nükleotide karşılık gelecek şekilde tasarlanmalıdır.

Primerin 3' ucunda kalıp DNA'ya uygun 7 nükleotit, bunun gerisinde özgül bağlanmayı kontrol eden 6 inozin, bunun da gerisinde 5' uca doğru özgül bağlanan yaklaşık 20-25 nükleotit bulunmalıdır.

PZT karışımlarındaki en uygun magnezyum derişiminin, özgül çoğaltmayı sağlayan derişim olması için, farklı derişimlerde denemeler yapılarak bu saptanmalıdır.

PZT tepkimelerinde yüksek güvenilirlikli (high fidelity) polimerazlar kullanılmalıdır.

Polimerizasyon sıcaklığı 72°C'den düşük olmalı, en iyi ve en özgül çoğaltmayı gerçekleştiren polimerizasyon sıcaklığı deneylerle belirlenmelidir.

Tepkimelerde çoğaltma kontrolü kullanılmalıdır. Bu, hem tepkimenin çalıştığını gösterir hem de özgül olmayan çoğaltmaları engeller.

## KAYNAKLAR

1. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemie. 2003. Springer, Heidelberg/Berlin.
2. <http://genotyping.wordpress.com/2007/03/07/polimeraz-zincir-reaksiyonu-pcr-cok-guclu-bir-teknik>
3. [http://tr.wikipedia.org/wiki/Polimeraz\\_zincir\\_tepkimesi](http://tr.wikipedia.org/wiki/Polimeraz_zincir_tepkimesi)
4. <http://www.fermentas.com>
5. <http://www.genetiklab.com>
6. Hubscher U, Maga G, Spadari S. Eukaryotic DNA polymerases. Ann Rev Biochem 2002; 71: 133.
7. Lantz PG, Abu al-Soud W, Knutsson R, Hahn-Hägerdal B, Rådström P. Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples. Biotechnol Annu Rev 2000; 5:87-130.
8. Pounder JI, Anderson CM, Voelkerding KV, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation by genomic deletion patterns with multiplex polymerase chain reaction and melting analysis. Diagn Microbiol Infect Dis 2010; 67:101-5.
9. Prakash S, Johnson RE, Prakash L. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. Ann Rev Biochem 2005; 74: 317.
10. Pursell ZF, Isoz I, Lundström EB, Johansson E, Kunkel TA. Yeast DNA polymerase epsilon participates in leading-strand DNA replication. Science 2007; 317: 127-30.

## C. DIFFICILE ENFEKSİYONLARININ MİKROBİYOLOJİK TANISINDA YENİLİKLER

Yard. Doç. Dr. Melda Sınırtaş

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

Antibiyotiğe bağlı pseudomembranöz kolit ve hastane kaynaklı diyarelerin en sık rastlanan etkenlerinden olan *Clostridium difficile*'nin hızlı ve doğru tanısı; hasta bakımı, enfeksiyon kontrolü ve etkin bir süreyans için çok önemlidir.

*C.difficile* enfeksiyonlarında doğru bir mikrobiyolojik tanı için öncelikle doğru örnek kullanılmalıdır. *C.difficile* ile ilişkili hastalıkların tanısında, yeni alınmış sulu dışkı örneği tercih edilmeli, sürüntü örnekleri kullanılmamalıdır. Örnekler ağız sıkıca kapanan, sızdırmayan ve dışarıdan oksijen almayan taşıma kapları ile laboratuvara gönderilmelidir. Bakterinin vegetatif formu ve sporları, transport ve saklama koşullarından çok fazla etkilenmezken; özellikle toksin araştırmasına yönelik tanı testlerinde ortam ısı ve bekleme süresinin test sonuçlarını etkileyebileceği unutulmamalıdır. *C.difficile* tanısında aynı günde birden fazla örnek ile test tekrarının maliyeti artırmak dışında faydası bulunmadığından, gün içinde gelen birden fazla örnek laboratuvar tarafından kabul edilmemelidir. *C.difficile* tanısı alan hastalarda iyileşmenin takibi klinik değerlendirme ile yapılmalıdır.

*C. difficile* ve toksinlerinin saptanmasına yönelik çeşitli testler geliştirilmiştir (Tablo 1).

**Tablo 1.** *C.difficile* hastalıklarının tanısında sıklıkla kullanılan testler (Kaynak 1'den uyarlanmıştır)

Test edilen	Yöntem	Avantajları	Dezavantajları
Organizma	Toksijenik kültür	Duyarlı, özgül	Uzun zaman alır. Etkinliği laboratuvarlar arasında değişkendir. Üretilen suşların toksin üretip üretmedikleri mutlaka değerlendirilmelidir.
GDH	Lateks aglütinasyon	Hızlı, basit	Duyarlılığı düşüktür. Toksin üreten ve üretmeyen suşları ayıramaz.
	Membran EIA	Hızlı, basit	Duyarlılığı yüksektir. Toksin üreten ve üretmeyen suşları ayıramaz.
Toksine B	Hücre kültürü	Duyarlı, özgül	24-48 saat sonra sonuç verir; toksin B inaktive olabilir. Yanlış negatif sonuçlar alınabilir.
	Real-time PZR	Duyarlı, özgül, hızlı	Maliyeti yüksektir.
Toksine A	EIA	Hızlı, basit	Duyarlılık ve özgüllüğü değişkendir. A/B <sup>+</sup> izolatları tanımlamaz.
	Membran EIA	Hızlı, basit	Duyarlılık ve özgüllüğü değişkendir. A/B <sup>+</sup> izolatları tanımlamaz.
	Optik immünoassay	Hızlı, basit	EIA'ya göre duyarlılığı düşüktür.
Toksine A ve B	EIA	Hızlı, basit	Duyarlılık ve özgüllüğü değişkendir. A/B <sup>+</sup> izolatları saptar.
	Membran EIA	Hızlı, basit	Duyarlılık ve özgüllüğü değişkendir. A/B <sup>+</sup> izolatları saptar.
Toksine A, B ve GDH	Membran EIA	Hızlı, basit	Duyarlılığı yüksektir. A/B <sup>+</sup> izolatları saptar.

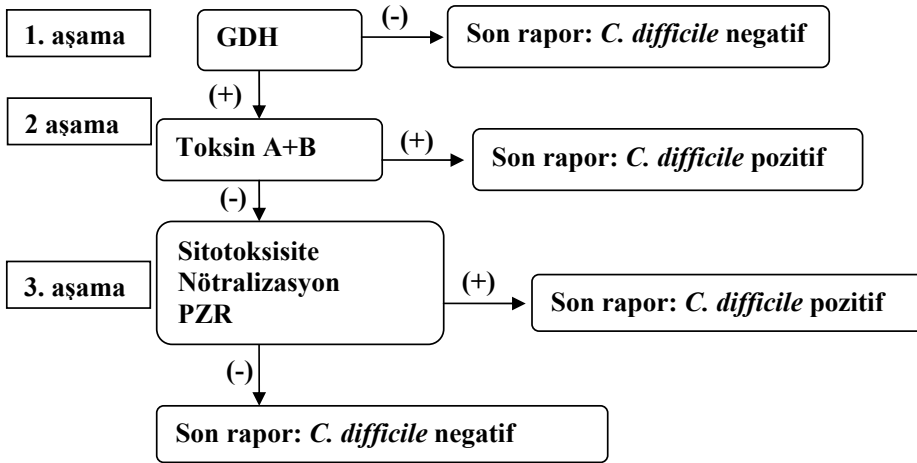
GDH: Glutamat dehidrogenaz; EIA: Enzim immünoassay; PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

Laboratuvar tanıda altın standart, dışkıdan *C.difficile*'nin kültür ile izolasyonu ve üretilen etkenin toksijenik olup olmadığının araştırılması prensibine dayanan sitotoksijenik kültür yöntemidir. Laboratuvar uygulamasındaki zorluklar ve testin sonuçlanma süresinin uzun olması, bu yöntemin rutin laboratuvar çalışmalarında kullanımını sınırlamaktadır. Günümüzde toksin A, toksin A+B ve glutamat dehidrogenaz (GDH)'ın bakıldığı enzim immünoassay (EIA) yöntemleri; toksin A+B, GDH, toksin A+B+GDH'in bakılabildiği immunokromotografik yöntemler; uygulamalarının kolay olması ve kısa sürede sonuçlanmaları nedeniyle daha çok tercih edilmektedir.

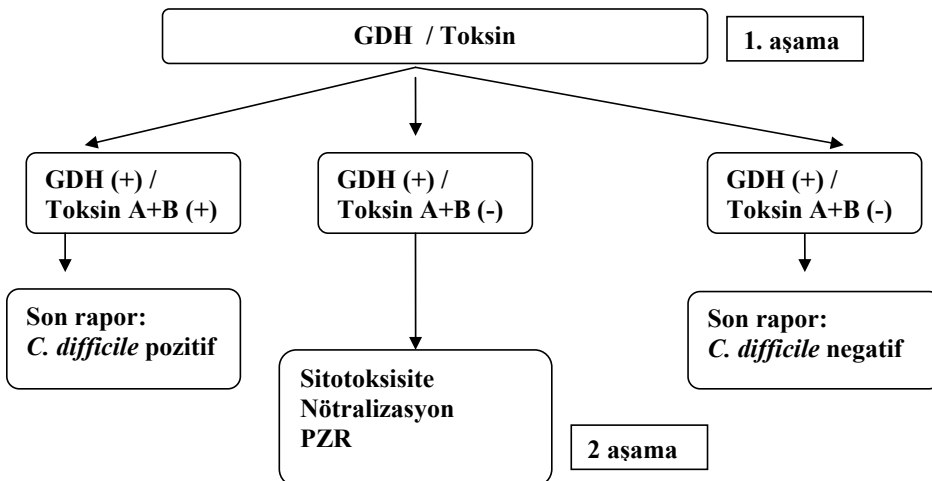
Amerika'da *C. difficile* tanısında, 2004 yılında laboratuvarların %42'sinde EIA yöntemi ile toksin A ve B'nin bakıldığını; %26'sında ise hızlı immunokromotografik testler ile toksin A/B ve/veya GDH bakıldığını görmekteyiz. 2008 yılında ise hızlı immunokromotografik testlerdeki gelişmelere paralel olarak, bu yöntemin kullanılma oranları %46'lara çıkmıştır. Her iki dönemde de sitotoksin nötralizasyon testlerinin çok sık kullanılmadığı; 2004 yılında % 5 olan kullanılma oranların 2008 yılında %1'e kadar düştüğü görülmüştür<sup>2-3</sup>. Ülkemizde yapılan değişik araştırmalarda %3-16 arasında değişen *C. difficile* pozitifliğinin EIA yöntemleri ile saptandığı görülmektedir<sup>4-8</sup>.

Son yıllarda *C. difficile* enfeksiyonlarının sayısında görülen artışlar bu enfeksiyonların laboratuvar tanısında kullanılan testlerin yeniden gözden geçirilmesine neden olmuştur. Tanıda kullanılan yöntemlerin avantaj ve dezavantajları bir arada değerlendirildiğinde, duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olan, hızlı ve kolay uygulanabilir tek bir test ile sonuç vermenin çok da mümkün olmadığı görülmektedir. Bu nedenle enfeksiyon hastalıklarının pek çoğunda uygulanan tanı algoritmaları *C. difficile* ile ilişkili enfeksiyonların tanısında da kullanılmaktadır. Algoritmalar, hızlı, kolay uygulanabilen, duyarlılığı yüksek fakat özgüllüğü biraz düşük olan bir yöntem ile özgüllüğü yüksek bir yöntemin kombinasyonu şeklinde hazırlanmaktadır<sup>9-11</sup>.

*C. difficile* ile ilişkili enfeksiyonların tanısında 2'li ya da 3'lü tanı algoritmaları kullanılabilir (Şekil 1, 2). *C. difficile* tanısında gerçek zamanlı (real-time) PZR yönteminin duyarlılığı %83.6-93.4, özgüllüğü %93.9-98.2 olarak bildirilmekte; bu yöntemin tanı algoritmalarında sitotoksijenik kültür ile sitotoksin nötralizasyon yöntemlerinin yerini alabileceği ifade edilmektedir<sup>12-14</sup>.



Şekil 1. *C. difficile* tanısında üç aşamalı algoritma



Şekil 2. *C. difficile* tanısında 2 aşamalı algoritma

Nozokomiyal *C.difficile* enfeksiyonlarında, etkenin yayılımını önlemek ve izolasyon önlemlerini erken dönemde başlatabilmek önemlidir. Son yıllarda pahalı olması nedeniyle rutin hizmette çok fazla tercih edilmeyen moleküler yöntemlerin, algoritmalarda onaylayıcı test olarak değil de, ilk ve tek test olarak kullanılması gündeme gelmiştir. Günümüzde pek çok hastalığın tanısında kullanılmaya başlayan bu yöntemlerin *C.difficile* tanısındaki en önemli sorunu ise toksinin değil, her zaman mutasyon ile değişebilecek toksin yapan genlerin araştırılıyor olmasıdır.

*C.difficile*, antibiyotiklerin neden olduğu ve tedavisinde yine antibiyotiklerin kullanıldığı, adı ile uyumlu bir şekilde tanısında hala zorlandığımız ve artık sadece hastane kaynaklı değil, toplum kaynaklı izolatları ile de gündemdeki yerini güçlendiren bir mikroorganizma olarak, daha çok tartışılacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Alaçam R, Çakar A. Clostridium, s: 889-910. Başustaoglu A, Kubar A, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M (Çeviri Editörleri). Klinik Mikrobiyoloji (Manual of Clinical Microbiology). 2009, Atlas Kitapçılık, Ankara.
2. College of American Pathology. D-B bacteriology: sample D-13. Northfield, IL:College of American Pathology. 2004, p: 9.
3. College of American Pathology. D-B bacteriology: sample D-13. Northfield, IL:College of American Pathology. 2008, p: 9.
4. Aygün G, Aslan M, Yaşar H, Atlaş K. Hastanede yatarken gelişen ishal olgularında *Clostridium difficile* toksin A+B araştırılması. ANKEM Derg 2002;16: 82-4.
5. Büyükbaba Boral Ö. *Clostridium difficile* enfeksiyonu ön tanılı hastaların dışkı örneklerinde toksin A ve B'nin belirlenme sıklığı. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2002; 32:220-4.
6. Ercis S, Ergin A, Hasçelik G. Six years evaluation of *Clostridium difficile* associated diarrhea. Mikrobiyol Bul 2004; 38: 45-50.
7. Büyükbaba Ö, Özkan E, Büğet E. Uzun süreli antibiyotik tedavisi gören ishalleri çocukların dışkılarında *Clostridium difficile* araştırılması. Klimik Derg 1994; 7:105-7.
8. Kocazeybek B. Özel bir hastanede akut gastrointestinal enfeksiyon etkeni mikroorganizmaların prevalansının araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2001; 31:69-72.
9. Swindells J, Brenwald N, Reading N, Oppenheim B. Evaluation of diagnostic test for *Clostridium difficile* infection. J Clin Microbiol 2010; 48:606-8.
10. Schmidt ML, Gilligan PH. *Clostridium difficile* testing algorithms: what is practical and feasible? Anaerobe 2009; 15:270-3.
11. Quinn CD, Sefers SE, Babiker W, et al. C.Diff Quik Chek Complete Enzyme Immunoassay Provides a Reliable First-Line Method for Detection of *Clostridium difficile* in Stool Specimens. J Clin Microbiol 2010; 48:603-5.
12. Larson AM, Fung AM, Fang FC. Evaluation of tcd B real-time PCR in a three-step diagnostic algorithm for detection of toxigenic *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2010; 48:124-30.
13. Stamper PD, Babiker W, Alcabasa R, et al. Evaluation of a new commercial TaqMan PCR assay for direct detection of the *Clostridium difficile* toxin B gene in clinical stool specimens. J Clin Microbiol 2010; 47:3846-50.
14. Kvach EJ, Ferguson D, Riska PF, Landry ML. Comparison of BD GeneOhm real-time PCR assay with a two-step algorithm and a toxin A/B enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of toxigenic *Clostridium difficile* infection. J Clin Microbiol 2010; 48:109-11.

**PANEL 3 PARAZİTOLOJİK TANIDA RUTİNDE KULLANILAN VE GELİŞTİRİLMekte OLAN MOLEKÜLER TESTLER****MOLEKÜLER PARAZİTOLOJİNİN GELECEĞİ**

Prof. Dr. A. Yüksel Gürüz

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

Moleküler biyoloji alanındaki hızlı gelişim, pek çok hastalık tanısında olduğu gibi parazit hastalıkları konusunda da yeni tekniklerin gündeme girmesini sağlamıştır. Bu yöntemler vasıtasıyla parazit epidemiyolojisi ile bilgiler güncellenmiş, daha duyarlı ve özgün tanı alternatifleri geliştirilmiş ve aşı çalışmalarında dev adımlar atılmıştır. Moleküler tekniklerin parazitoloji alanına girdiği dönemlerden itibaren DNA problemleri; sınıflandırmada, tanıda, patogenezi ve epidemiyolojik araştırmalarda kullanılmaktadır. Yüksek duyarlılık ve özgünlüğü nedeniyle çok az miktardaki örneklerde bile etkeni gösterebilen, seroloji gibi gölgeyi değil, gerçek suçluyu görüntüleyen bu yöntemlere ilgi oldukça popülerdir. Hedeflenen parazitin yüzey antijenleri evrelere göre değişkenlik göstermekte, fakat DNA yapısı hangi evrede olursa olsun sabit kalmaktadır. Yani DNA'dan yola çıkarak yapılan epidemiyolojik çalışmalar, vektördeki enfektif evreyi saptamakta, tür ve alt tür tayininde başarı ile kullanılabilir. Kısaca, parazitin türünü, suşunu, salgınların kökenini (su/sebze-meyve mi, et mi?) belirlemek olasıdır. Türlerin, hatta suşların arasındaki farklar, klinik tabloda da çeşitliliğe yol açabilmekte, tedavi yaklaşımları farklı olabilmektedir. Böyle bir ayrımın yapılması (*E. dispar* – *E. histolytica*), gereksiz tedavileri ve hastaya yaklaşımda zaman kaybını ortadan kaldıracak, gereksiz kürtajı (konjenital toxoplasmosis?) engelleyecek ve erken etkin tedavinin de önünü açacaktır.

Bir diğer moleküler uygulama da, gen klonlamasıyla hedef parazit antijenlerinin in vitro üretimidir. Monoklonal antikorlar kullanılarak serolojik testler geliştirilmekte, hatta parazitin evrelerine ait (*Toxoplasma gondii*; BAG1, SporSAG gibi) antijenlerle bulaş kaynağını ortaya koyabilecek RecELISA yapılabilmektedir. Bu yolla hazırlanan testlerin duyarlılık ve özgünlüğü çok yüksek oranlara çıkabilmekte, konağın doku sıvılarında veya çıkartılarında bile anlamlı sonuçlar elde edilmektedir. Bazı durumlarda klinik örneklerin mikrolitre düzeyinde elde edilebilmesi (humor aköz, vitreus sıvısı gibi), araştırmacıları bu örneklerde de tanı koyabilecek yöntemleri geliştirmeye zorlamış ve PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), kullanıma kazandırılmıştır. Artık pek çok tam teşekküllü laboratuvar, bu yöntemi hekimlere ve araştırmacılara yol göstermek için kullanıma sokmuş ve daha hızlı, daha kolay hale getirmek için çalışmalarını hızlandırmıştır.

Pek çok parazit moleküler biyolojik yöntemlerin hedefi olmasına rağmen Sıtma, *Toxoplasma* ve *Leishmania* biraz daha öne çıkmış gibi durmaktadır. Bu gün PZR uygulamalarında kullanılan Thermal Cycler cihazları ilk örneklerinden çok farklılaşmış ve ucuzlamıştır. Tanıda zamanın değeri konvansiyonel PZR'de yaklaşık 2 gün süren uygulamaları artık "Real-Time Light Cycler" ile saatlerle ifade edilecek kadar kısaltmıştır. İlerleme sadece bununla sınırlı kalmamış, geliştirilen "dipstick" testler, saha çalışmalarına ve tarama amaçlı çalışmalara büyük bir ivme kazandırmıştır. *Pfalciparum* için hazırlanan ParaSight-F testi gibi pek çok dipstick testinin yakın bir gelecekte kullanıma gireceği kesindir.

Moleküler parazitolojideki gelişmeler, aşı çalışmalarında potansiyel antijenlerin belirlenmesi için de önemli dönüm noktası olmuştur. Parazitlerin değişik evrelerine ait antijenler klonlanmış, sekans analizleri yapılmış ve aşı çalışmalarında denenmiştir. Bu tekniklerin yaygın kullanımı ile bu gün milyarlarca insanı ürküten, halsiz bırakan parazit hastalıklarının önlenmesinde, yüksek duyarlılık ve özgünlükte tanı konulmasında pek çok şüphe geride kalacaktır.

Son 10 yılda, parazitlerin tanınmasında, tür ayrımında moleküler yaklaşımlar oldukça başvurulan yöntemlerden olmuştur. Trematodlar için ribozomal DNA dahili tanımlanmış ayraç bölgesi (internal transcribed spacer = ITS rDNA) oldukça önem kazanmıştır. Digenea türlerinde (19 aileden 155 tür) ITS

rDNA sekansları 63 ayrı çalışmada farklılıklar açısından araştırılmıştır. ITS dizinlerinin tümü veya *ITS1* veya *ITS2* tek başlarına trematod türlerinin ayırımında mükemmel sonuçlar vermektedir. Bunun dışında muğlak sonuçlar veren bileşimleri bile ayırt edebilmektedir. Çok yakın türlerde bile birkaç baz farkı saptanabilmektedir. Bazen *ITS1*'in, *ITS2*'den daha iyi sonuç vermesi değişken tekrarlayan ünitelerin *ITS2*'de bulunmamasına bağlanmaktadır. Moleküler yöntemleri kullanarak parazitlerin evrim basamağındaki atalarını bulmak ve değişimini izlemek de olasıdır.

Bazı parazitologlar, türlerin tanımlanmasında ve ayrıştırılmasında moleküler verilerin kullanılmasını kuşkuyla karşılamaktadır. Gelişen teknoloji sayesinde sorulara yol açan konuların çoğu çözüme kavuşmuştur. Moleküler yöntemlerin parazitlerin tanımlanmasında kullanılması, kafa karıştıran sorunları (yaş, konak, coğrafi farklılıktan kaynaklanan değişiklik) ortadan kaldırmıştır. Hala devam eden sorunlar arasında, “sonuçların karşılaştırılmasında en uygun yöntem hangisidir” veya “sahada kullanılacak yöntem ne olmalıdır” sayılabilir.

Tür ayırımında morfoloji, epidemiyoloji, davranış karakterleri, konak ve coğrafi dağılım, çapraz üreme, fizyoloji ve biyokimyasal çalışmalar dahil tüm olanaklar kullanılmaktadır. Digenea'ların çoğu erişkin morfolojisi, konakları ve coğrafi dağılım göz önüne alınarak sınıflanmıştır. Tek başına morfoloji pek çok türün ayırımında yetersiz kalır. Erişkin evrenin küçük olması, taksonomik karakterlerin yetersizliği veya bu karakterlerin yeterince kesin olmaması söz konusu olabilir. Türler arası çok aşırı benzerlik, fenotipik elastisite, korunmuş veya sert kısımların eksikliği, genetik türleme ile morfolojik fark arasındaki geçen zaman, cercaria veya metacercaria dönemlerinde olduğu gibi pek çok türde hiçbir morfolojik fark olmaması, genç evrelerin erişkin evrelerle bağlantısını sağlayacak morfolojik ayrıçaların bulunmayışı moleküler tekniklerin kullanımını haklı çıkarmaktadır.

Morfolojik olarak çok benzeşen türlerde bile, DNA bazlı yöntemler sadece daha kesin değil aynı zamanda daha da hızlı sonuç vermektedir. PZR gibi yöntemlerin kullanıma girmesiyle, geleneksel yöntemlerle tür ayırımı sırasında kafalarda oluşan hipotezleri test etme şansı yakalanmıştır. Parazitlerin yaşam döngüleri ile ilgili daha kesin verilere ulaşılmıştır. Özellikle primer dizi analizleriyle nükleotid düzeyindeki genetik farklılıklar ortaya konulmuş, gizemli türlerin yaşam döngüleri, türe ait karmaşık yapıları, filoçoğrafik genetik yapıları çözümlenmeye başlanmıştır.

Sistematik çalışmalarda moleküler tekniklerin kullanımı 4 avantaj sağlamaktadır.

Değişik genler veya aynı gendeki değişik bölgeler farklı hızla evrimleşmektedir. Pek çok taksonomik soruya filogenetik açıdan cevap bulunabilir.

Genomdaki tekrarlanmayan nükleotid pozisyonları sistematik farkı ortaya koyacak potansiyel karakterleri sınırlar.

DNA'nın yapısı herediter olarak geçmeyen (fenotipik) varyasyonların bir sorun olmasının önüne geçer.

Moleküler teknikler hızlı, nispi olarak ucuz ve güvenilirdir.

Moleküler yöntemlerin bu avantajlarının yanı sıra eksikleri de mevcuttur. Laboratuvar kontaminasyonu, yetersiz örnekleme, geniş coğrafi dağılımda örnekleme zorluğu, hatalı tanımlamalar, sekanslama hataları bunlardan bazılarıdır. Ayrıca, geleneksel yöntemlerle elde edilmiş pek çok verinin moleküler yöntemlerle sağlanamayacağı da bilinmesi yerinde olacaktır.

**PLASMODIUM SPP. VE ECHINOCOCCUS SPP. TANISI VE TÜR AYIRIMI**

Dr. Mert Döşkaya

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

Sıtma, dişi anofel sivrisineklerinden insanlara geçen *Plasmodium* türü hücre içi parazitlerle oluşmaktadır. Sıtma hastalığının insanlardaki etkenleri *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malarie* ve *Plasmodium knowlesi*'dir. *P.falciparum*, mortaliteye sebep olan türdür. Dünya Sağlık Örgütü 2009 raporuna göre dünyanın yarısı sıtma riski altında olup, 2008 yılında saptanan 243 milyon sıtma vakasının 863 bini ölümlle sonuçlanmıştır<sup>1</sup>. Türkiye'de en sık görülen tür *P.vivax*'tır. T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanan 2005 yılı raporunda sıtmalı hasta sayısı toplam 2084 (48 ithal ve 2036 yerli olgu) iken, 2008 yılında bu sayı toplam 215'e (49 ithal ve 166 yerli olgu) düşmüştür<sup>2</sup>.

Sıtma tanısında ışık mikroskopi, antijen tayini ve moleküler yöntemler rutinde kullanılmaktadır. Yeni geliştirilen teknikler, zaman alıcı ve tecrübeli teknisyen gerektiren ışık mikroskopinin yerini almaktadır. Antijen tayini yapan testler, sahada kolaylıkla kullanılabilir ve daha ucuz maliyetli olmaktadır. Moleküler teknikler içinde rutinde polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılmakta olup, deneysel olarak kitlerle taramalarına uygun akış sitometrisi ve kütle spektrometrisi geliştirilmektedir. PZR yüksek duyarlılığı sebebiyle tanı ve tür ayırımı için, gelişmiş ülkelerde sıklıkla ışık mikroskopiye tercih edilmektedir<sup>3</sup>. Sıtma tanısında; 20–50 parazit/µl düzeyindeki enfeksiyonları saptayabilen, en sık kullanılan ve altın standart kabul edilen yöntem ise ince yayma-kalın damla preparatların ışık mikroskopi ile incelenmesidir<sup>4,5</sup>. Işık mikroskopinin güvenilirliği, parazit sayısı 20<sup>3</sup>'nin altına düştüğünde hızla azalmaktadır. Ucuz ve deneyim gerektirmeyen hızlı testler ile parazit antijen tarama testlerinin güvenilirliği ise, parazit sayısı mikrolitrede 100'ün altına düştüğünde hızla azalmaktadır. Klinik bulgu vermeyen sıtma hastalarında genelde parazit sayısı 20'nin altında seyretmektedir. *Plasmodium* DNA'sını mikrolitrede 0.004 parazit olduğunda bile saptayabilecek hassasiyetteki PZR yönteminin, ince yayma-kalın damla tekniğinden daha güvenilir olduğu gösterilmiştir<sup>5-9</sup>.

Ekinokokkozis etkenleri içinde, toplum sağlığı açısından önemli olanlar *Echinococcus granulosus*, *E.multilocularis*, *E.vogeli* ve *E.oligarthrus*'dur. İnsanlarda *E.granulosus*, kistik ekinokokkozise (KE), *E.multilocularis* ise alveoler ekinokokkozise (AE) neden olmaktadır. KE sıklıkla karaciğer, akciğer, böbrek ve dalakta yerleşmekte, daha nadir olarak diğer organlarda saptanmaktadır. AE ise çoğunlukla karaciğer, akciğer ve beyinde gelişmekte ve ileri dönemde diğer organlara metastaz yaparak ölümcül hale gelmektedir. İnsanlar, köpek ve tilki dışısında bulunan yumurtaların ağız yolu ile alınması ile enfekte olmaktadır. *E.vogeli* ve *E.oligarthrus*'un da polikistik ekinokokkozise sebep olduğu gösterilmiştir<sup>10</sup>. Mitokondrial DNA çalışmaları sonucunda *E.granulosus*'un 10 (G1-G10) farklı genetik türü saptanmıştır. Koyunlarda saptanan G1 suşu, tüm dünyada en sık saptanan form olup, genelde insan enfeksiyonları ile ilişkilidir. Kistik ekinokokkoziste karaciğer dışı primer enfeksiyon sık görülmesine rağmen, alveoler ekinokokkozis hastalarında bu çok nadirdir. Kistik ekinokokkozis ve primer karaciğer dışı yerleşimli alveoler ekinokokkozis hastalarının, serolojik olarak ayırt edilemediği durumlarda, biopsi ve drenaj örneklerinden *E.multilocularis* ve *E.granulosus* DNA'sını saptayabilecek PZR teknikleri geliştirilmiş ve bu yöntemlerin tür ayırımında da başarılı sonuçlar verdiği gösterilmiştir<sup>11-13</sup>.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Parazitoloji Laboratuvarında (MolParLab), *Plasmodium* spp. tanısı ve tür ayırımı nested PZR ve *Echinococcus* spp. tanısı ve tür ayırımı konvansiyonel PZR ile başarılı bir şekilde gerçekleştirilmektedir. *Plasmodium* spp. nested PZR sırasında, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI: National Center for Biotechnology Information) veri tabanında yer alan *P.falciparum* (GenBank No: AF145334), *P.vivax* (GenBank No: AF145335), *P.malariae* (GenBank No: AF145336) ve *P.ovale*'ye (GenBank No: AF145337) ait 18S alt ünite rRNA gen bölgeleri araştırılmaktadır<sup>14,15</sup>. Nested PZR birinci reaksiyon sırasında; 18S alt ünite rRNA geninde *Plasmodium* spp. için ortak bir bölge, 5'-TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG-3' (23 nt, rPLU6, forward primer) ve



5'-CTTGTTGTTGCCTTAAACTTC-3' (21 nt, rPLU5, reverse primer) primerleri ve Tablo 1'de hazırlanışı tarif edilen reaksiyon karışımı ile amplifiye edilmektedir. Birinci PZR amplifikasyon reaksiyonu termal döngü cihazında, 95°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonu sonrası, 60 saniye 94°C, 2 dakika 58°C ve 2 dakika 72°C'lik 25 döngü ve son uzama basamağında 5 dakika 72°C uygulanarak yürütülmektedir. Nested PZR ikinci reaksiyon sırasında; 18S alt ünite rRNA geninde her *Plasmodium* türüne özgü bölgeler özgün primerler ve Tablo 1'de tarif edilen reaksiyon karışımı ile amplifiye edilmektedir. *P.falciparum* için, 5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT-3' (30 nt, rFAL1, forward primer) ve 5'-GACGGGTAGTCATGATTGAGTTCATTGTGT-3' (30 nt, rFAL2, reverse primer), ile 206 bp uzunluktaki gen bölgesi; *P.vivax* için, 5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3' (30 nt, rVIV1, forward primer) ve 5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA-3' (30 nt, rVIV2, reverse primer), ile 121 bp uzunluktaki gen bölgesi; *P. malariae* için, 5'-ATAACAAAGTTGTACGTTAAGAATAAACGC-3' (30 nt, rMAL1, forward primer) ve 5'-TTTG TATAATTTTTTATGCATGGGAATTTT-3' (30 nt, rMAL2, reverse primer) ile 145 bp uzunluktaki gen bölgesi; *P. ovale* için, 5'-ATCTCTTTTGTCTATTTT TTAGTATTGGAGA-3' (30 nt, rOVA1, forward primer) ve 5'-CACTAGGATACAATTAATGTG TCCTTTTCC-3' (30 nt, rOVA2, reverse primer) ile 788 bp uzunluktaki gen bölgesi amplifiye edilmektedir. İkinci PZR amplifikasyon reaksiyonu, 95°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonu sonrası, 60 saniye 94°C, 2 dakika 58°C ve 2 dakika 72°C'lik 30 döngü ve son olarak uzama basamağında 5 dakika 72°C uygulanarak gerçekleştirilmektedir<sup>14,15</sup>. *Plasmodium* spp. nested PZR yöntemi ile laboratuvarımıza gelen örnekler içinde 26 hastada başarı ile tanı ve tür ayrımı sağlanmıştır.

**Tablo 1.** *Plasmodium* spp. nested PZR birinci ve ikinci reaksiyon karışımlarının hazırlanması

Birinci Reaksiyon		İkinci Reaksiyon	
Malzeme	Final Konsantrasyon	Malzeme	Final Konsantrasyon
Taq DNA polimeraz enzimi (5u/μl)	2 u	Taq DNA polimeraz enzimi (5u/μl)	2 u
10× GoTaq reaksiyon tamponu <sup>1</sup>	1x	10× Taq reaksiyon tamponu <sup>1</sup>	1x
10mM dNTP karışımı	0.125 mM	10mM dNTP karışımı	0.125 mM
rPLU6/P1F (20μM)	0.25 μM	Türe özgü primer 1 <sup>2</sup> (20μM)	0.25 μM
rPLU5/P2R (20μM)	0.25 μM	Türe özgü primer 2 <sup>2</sup> (20μM)	0.25 μM
25mM MgCl <sub>2</sub>	2 mM	25mM MgCl <sub>2</sub>	2 mM
Distile su	-	Distile su	-
Kalıp DNA <sup>2</sup>	-	Birinci PZR reaksiyonu ürünü <sup>3</sup>	-
Toplam hacim	100 μl	Toplam hacim	100 μl

<sup>1</sup>10× GoTaq reaksiyon tamponu 100 mM Tris-HCl (pH:8.8), 500 mM KCl içerir. <sup>2</sup>DNA ekstraksiyon materyalinden 5 μl kullanılmaktadır. <sup>3</sup> 5 μl birinci PZR ürünü kullanılmaktadır.

**Tablo 2.** *E.granulosus* ve *E.multilocularis* reaksiyon karışımlarının hazırlanması

<i>E. granulosus</i>		<i>E. multilocularis</i>	
Malzeme	Final Konsantrasyon	Malzeme	Final Konsantrasyon
GoTaq DNA polimeraz enzimi (5u/μl)	1.25 u	GoTaq DNA polimeraz enzimi (5u/μl)	1.25 u
5× GoTaq reaksiyon tamponu <sup>1</sup>	1x	5× GoTaq reaksiyon tamponu <sup>1</sup>	1x
10mM dNTP karışımı	0.2 mM	10mM dNTP karışımı	0.2 mM
Eg1f (20μM)	1 μM	EM-H15 (20μM)	1 μM
Eg1r (20μM)	1 μM	EM-H17 (20μM)	1 μM
Distile su	-	Distile su	-
Kalıp DNA <sup>2</sup>	-	Kalıp DNA <sup>2</sup>	-
Toplam hacim	50 μl	Toplam hacim	50 μl

<sup>1</sup>5× GoTaq reaksiyon tamponu 100 mM Tris-HCl (pH:8.5), 7.5 mM MgCl<sub>2</sub> içerir. <sup>2</sup>DNA ekstraksiyon materyalinden 10 μl kullanılmaktadır.

*E.granulosus* konvansiyonel PZR sırasında genotip 1 mitokondri, 12S rRNA (GenBank No: AF297617) genine ait 255 bp'lik gen parçası, 5'-CATTAATGTATTTTGTAAGTTG-3' (23 nt, Eg1f, forward primer) ve 5'-CACATCATCTTACAATAACACC-3' (22 nt, Eg1r, reverse primer) primerleri; *E.multilocularis* konvansiyonel PZR sırasında mitokondri DNA'sına (GenBank No: AB018440) ait 200 bp'lik gen parçası 5'-CCATATTACAACAATATTCCTATC-3' (24 nt, EM-H15, forward primer) ve 5'-GTGAGTGATTCTTGTAGGGGAAG-3' (24 nt, EM-H17, reverse primer) primerleri, Tablo 2'de hazırlanışı tarif edilen reaksiyon karışımları, 95°C'de 15 dakika başlangıç denatürasyonu sonrası, 30 saniye 95°C, 30 saniye 55°C ve 30 saniye 72°C'lik 40 döngü ve son uzama basamağında 72°C 5 dakika uygulanarak gerçekleştirilmektedir<sup>11,13</sup>. *Echinococcus* spp. konvansiyonel PZR yöntemi ile laboratuvarımıza gelen örnekler içinde 11 hastada başarı ile tanı ve tür ayırımı sağlanmıştır.

## KAYNAKLAR

1. World Malaria Report 2009, [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2009/en/index.html](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2009/en/index.html). Erişim: 19.04.2010
2. T.C. Sağlık Bakanlığı Sıtma Savaş Daire Başkanlığı Raporu. <http://www.saglik.gov.tr/SSDB/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFF404F9755767D76FFD46405743274FF07>. Erişim: 28.09.2009.
3. Hawkes M, Kain KC. Advances in malaria diagnosis. Expert Rev Anti Infect Ther 2007; 5:485-95.
4. Ali Oner, Y, Akin H, Kocazeybek B. Detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in blood donors: comparison of new method to the conventional one. Transfus Apher Sci 2004; 30:3-7.
5. Ochola LB, Vounatsou P, Smith T, Mabaso ML, Newton CR. The reliability of diagnostic techniques in the diagnosis and management of malaria in the absence of a gold standard. Lancet Infect Dis 2006; 6:582-8.
6. Benito A, Rubio JM. Usefulness of seminested polymerase chain reaction for screening blood donors at risk for malaria in Spain. Emerg Infect Dis 2001; 7:1068.
7. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 66-78.
8. Quintana M, Piper, R., Boling, H.L., et al. Malaria diagnosis by dipstick assay in a Honduran population with coendemic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. Am J Trop Med Hyg 1998; 59: 868-71.
9. Hanscheid T, Grobusch MP. How useful is PCR in the diagnosis of malaria? Trends Parasitol 2002; 18: 3958.
10. Moro P, Schantz PM. Echinococcosis: a review. Int J Infect Dis. 2009; 13:125-33.
11. Stefanić S, Shaikenov BS, Deplazes P, Dinkel A, Torgerson PR, Mathis A. 2004. Polymerase chain reaction for detection of patent infections of *Echinococcus granulosus* ("sheep strain") in naturally infected dogs. Parasitol Res 2004; 92:347-51.
12. Dinkel A, von Nickisch-Roseneck M, Bilger B, Merli M, Lucius R, Romig T. Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. J Clin Microbiol 1998; 36:1871-6.
13. Georges S, Villard O, Filisetti D, et al. Usefulness of PCR analysis for diagnosis of alveolar echinococcosis with unusual localizations: two case studies. J Clin Microbiol 2004; 42:5954-6.
14. Perandin F, Manca N, Calderaro A, et al. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. J Clin Microbiol 2004; 42:1214-9.
15. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol 1993; 61:315-20.

**TOXOPLASMA GONDII VE PNEUMOCYSTIS JIROVECII'NİN TANISI**

Dr. Ayşe Caner

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

Dünyada yaygın olarak bulunan *Toxoplasma gondii*, zoonotik karakterli hücre içi bir protozoondur<sup>1</sup>. *T.gondii* enfeksiyonlarının seroprevalansı ülkelere ve bölgelere göre değişkenlik göstermekte olup, dünyada 500 milyon insanın enfekte olduğu bildirilmiştir. Fransa'da gebe kadınların %80'inde, ABD ve İngiltere'de ise gebe kadınların %16-40'ında antikor pozitifliği olduğu bildirilmektedir<sup>1-3</sup>. Türkiye'de doğurgan yaştaki kadınların %30-60'ının enfekte olduğu saptanmıştır<sup>4</sup>. *T.gondii* enfeksiyonu, ookistli kedi dışkı ile kontamine yiyeceklerin, pişmemiş veya az pişmiş kistli etlerin yenmesi gibi yollarla bulaşmanın yanında, transfüzyon ve transplantasyon ile de bulaşabildiğinden önem taşımaktadır<sup>1,2</sup>.

Toksoplazmozis, immün sistemi sağlıklı bireylerde genelde belirgin bulgular göstermezken, hamile anneye bulaşması sonucu konjenital toksoplazmozis ve toksoplazmik retinokoroidit gibi ciddi klinik tablolara yol açmaktadır. Ayrıca immün sistem yetmezliği olan kişilerde ve transplantasyon hastalarında, primer enfeksiyondan daha sık olarak gelişen reaktivasyonlar nedeniyle, yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olabilmektedir. Klinik bulguları enfeksiyona özgül olmadığından, *T.gondii* enfeksiyonunun tanısı primer olarak anti-*Toxoplasma* antikorların gösterildiği serolojik testler ile sağlanmaktadır. Akut toksoplazmozis tanısı, IgM antikor pozitifliğinin yanında IgG antikorlarının aviditesinin ölçümü ile gerçekleştirilmektedir. IgM ve düşük aviditeli IgG antikorlarının, akut enfeksiyondan yıllar sonra kanda saptanması, testlerin sonuçlarının yanlış yorumlanmasına yol açmaktadır. İmmün sistemi baskılanmış hasta grubunda, serolojik testler risk grubunun belirlenmesi açısından değerli kabul edilmesine rağmen, azalan antikor miktarı sebebiyle duyarlılığı azalmaktadır. Bu nedenlerden dolayı, fetüs, organ nakli alıcıları, immün sistemi baskılanmış ve AIDS hastalarında kesin tanı için etkenin izolasyonu önde gelmektedir<sup>5-8</sup>. Bu amaçla özgünlüğü ve duyarlılığı yüksek bir moleküler yöntem olan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile parazit DNA'sı saptanmaya çalışılmaktadır<sup>9,10</sup>.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı'nda, çeşitli örneklerde *T.gondii*'nin DNA'sı araştırılması esasına dayanan moleküler toksoplazmozis tanısında, B1 geni (AF179871) kullanılmaktadır. Bu gen üzerindeki farklı bölgeler, nested PZR ve gerçek zamanlı PZR (RT-PZR) ile birlikte ve eş zamanlı olarak araştırılmaktadır. İki basamaklı olarak uygulanan nested PZR'in birinci reaksiyonunda, Oligo 1 ve Oligo 2 adlı primerler ile B1 geni içinde yer alan 287 bp'lik DNA parçası amplifiye edilmektedir (Tablo 1). İkinci PZR reaksiyonunda, N1 ve C1 primerler kullanılarak 194 bp'lik DNA parçasının amplifikasyonu sağlanmaktadır (Tablo 2). Elde edilen ürünler ve %2'lük agaroz jelde elektroforez sonrası, bantlar etidyum bromür ile boyanmaktadır<sup>11,12</sup>.

RT-PZR sırasında *T.gondii* DNA'sı B1 geninde bulunan 126 bp'lik kısım primer ve fluorescein ve LC-Red640 hibridizasyon problemleri kullanılarak araştırılmaktadır. Bu reaksiyon için LightCycler® Fast Start DNA Master HybProbe kiti ile primer ve prob karışımı içeren LightMix® kullanılmaktadır (Tablo 3). Standart eğri oluşturmak için, *T.gondii* DNA konsantrasyonu logaritmik olarak 10 kat artan altı pozitif kontrol kullanılmaktadır. Bu reaksiyon karışımının analizleri LightCycler cihazında Tablo 4'de tarif edilen preinkübasyon, kantitasyon amaçlı amplifikasyon ve erime eğrisi ile yapılmaktadır. Bu işlemlerin sonucunda gerçekleştirilen erime eğrisi (melting curve) analizi ile pozitif kontroller özgün erime noktası (Tm: melting point) olan 67.5°C civarında pik yapmaktadır<sup>12,13</sup>.

**Tablo 1.** Nested PZR ilk aşamasında her bir örnek için kullanılan reaksiyon karışımı

Malzeme	Son hacim	Son konsantrasyon
GoTaq DNA polimeraz enzimi (5 u/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l	1.25 u
5× GoTaq reaksiyon tamponu	10 $\mu$ l	1×
10 mM dNTP karışımı	1 $\mu$ l	0.2 mM
Oligo 1 (20 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ l	1 $\mu$ M
Oligo 2 (20 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ l	1 $\mu$ M
Distile su	8.75 $\mu$ l	-
Kalip DNA	25 $\mu$ l	-
Toplam	50 $\mu$ l	

**Tablo 2.** Nested PZR ikinci aşamasında her bir örnek için kullanılan reaksiyon karışımı

Malzeme	Son hacim	Son konsantrasyon
GoTaq DNA polimeraz enzimi (5 u/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l	1.25 u
5× GoTaq reaksiyon tamponu	10 $\mu$ l	1×
10 mM dNTP karışımı	1 $\mu$ l	0.2 mM
N 1 (20 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
C 1 (20 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
Distile su	36.25 $\mu$ l	-
Birinci PZR reaksiyonu	1 $\mu$ l	-
Toplam	50 $\mu$ l	

**Tablo 3.** Gerçek zamanlı PZR testinde her örnek için kullanılan reaksiyon karışımı

Malzeme	Son hacim	Son konsantrasyon
10× LightMix	4.0 $\mu$ l	1×
10× FastStart mix	2.0 $\mu$ l	1×
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2.4 $\mu$ l	4 mM
Distile su	6.6 $\mu$ l	-
Kalip DNA	5 $\mu$ l	-
Toplam	20 $\mu$ l	

**Tablo 4.** *T.gondii* gerçek zamanlı PZR testinde her bir örnek için kullanılan protokol

Analiz Modu	Döngü sayısı	Basamak	Hedef sıcaklık	Süre	Sıcaklık artış hızı (°C/sn)	Okuma modu
-	1	-	Preinkübasyon 95°C	10 dk	20	-
Kantitasyon	45	Ayrılma	95°C	10 sn	20	-
		Birleşme	60°C	5 sn	20	Tek
		Uzama	72°C	5 sn	20	-
Erime eğrisi	1	Ayrılma	95°C	20 sn	20	-
		Birleşme	40°C	20 sn	20	-
		Uzama	85°C	0 sn	0.2	Sürekli
-	1	-	Soğutma 40°C	30 sn	20	-

Solunum sisteminin fırsatçı bir patojeni olarak da tanımlanan *Pneumocystis jirovecii*, immün sistemi baskılanmış hastalarda, morbidite ve mortalitesi yüksek *Pneumocystis pnömonisi* (PCP)'nin etkenidir<sup>14-16</sup>. Primer olarak alınan enfeksiyon, immün baskılama ve yetersiz tedavi sonrasında reaktive ol-

maktadır. *P.jirovecii* reenfeksiyonlarının, reaktivasyondan daha sık görüldüğü bildirilmiştir. HIV/AIDS hastalarında PCP tekrarlayan episodlar halinde görülmektedir. Bazı kişilerde ise, solunum yollarında çok düşük miktarlarda kolonizasyon şeklinde bulunduğu gösterilmiştir. Kolonizasyonu olan kişilerde akut PCP gelişme riskinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir<sup>15-18</sup>.

*P.jirovecii*'nin in vitro ortamda üretilmemesi sebebiyle tanı testlerinin geliştirilmesinde zorluklar yaşanmaktadır. Mikroskopik teknikler, standart tanı testleri olup, ucuz fakat zaman alıcı ve tecrübeli personel gerektiren yöntemlerdir. Son yıllarda mikroskopik yöntemler ile benzer duyarlılığa sahip olan PZR yöntemleri, diğer tanı yöntemlerine alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır<sup>15-17,19,20</sup>. Mayo Klinik Tıp Fakültesinde klinik örneklerde *P.jirovecii* moleküler tanısı cdc2 genini araştıran bir gerçek zamanlı PZR (RT-PZR) tekniği ile gerçekleştirilmektedir. Bu testin duyarlılığı ve özgüllüğünün mikroskopik tanı teknikleri ile diğer PZR yöntemlerinden daha yüksek olduğu, bakteri ve mantarlarla çapraz reaksiyon vermediği gösterilmiştir<sup>21</sup>.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD Moleküler Parazitoloji Laboratuvarında, Mayo Klinik'te uygulanan RT-PZR yaklaşımı *P.jirovecii*'nin rutin moleküler tanısında kullanılmaktadır<sup>21,22</sup>. RT-PZR ile *P.jirovecii* cdc2 geni (AF026546) Light Cycler PZR platformu ve FRET mekanizması kullanılarak araştırılmaktadır (Tablo 5 ve 6). Standart eğri oluşturmak için *P.jirovecii* cdc2 genini içeren pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO plasmid konsantrasyonu 10<sup>1</sup>-10<sup>6</sup>/reaksiyon olan altı ayrı tüp pozitif kontrol olarak kullanılmaktadır. Erime eğrisi analizi ile pozitif kontrollerin özgün erime noktası olan 60.9°C civarında pik yaptığı gösterilmiştir<sup>12,13</sup>.

**Tablo 5.** Gerçek zamanlı PZR testinde her örnek için kullanılan reaksiyon karışımı

Malzeme	Son hacim	Son konsantrasyon
10× FastStart mix	2.0 µl	1×
Primer F	0.5 µl	0.5 µM
Primer R	0.5 µl	0.5 µM
Prob LC	0.4 µl	0.4 µM
Prob FL	0.2 µl	0.2 µM
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2.4 µl	4 mM
Distile su	9 µl	-
Kalıp DNA	5 µl	-
Toplam	20 µl	

**Tablo 6.** *P.jirovecii* gerçek zamanlı PZR testinde her bir örnek için kullanılan protokol

Analiz Modu	Döngü sayısı	Basamak	Hedef sıcaklık	Süre	Sıcaklık artış hızı (°C/sn)	Okuma modu
-	1	-	Preinkübasyon 95°C	10 dk	20	-
Kantitasyon	45	Ayrılma	95°C	10 sn	20	-
		Birleşme	55°C	5 sn	20	Tek
		Uzama	72°C	5 sn	20	-
Erime Eğrisi	1	Ayrılma	95°C	20 sn	20	-
		Birleşme	59°C	20 sn	20	-
		Uzama	45°C	0 sn	0.2	-
		Uzama	85°C	0 sn	0.2	Sürekli
-	1	-	Soğutma 40°C	30 sn	20	-

## KAYNAKLAR

1. Joynson DHM, Wreghitt TG. Toxoplasmosis. 2005. Cambridge University, Cambridge.
2. Montoya JG, Kovacs JA, Remington JS. *Toxoplasma gondii*, pp: 3170–98. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. 2005, 6th ed. Churchill Livingstone, UK.
3. Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. Int J Parasitol 2009; 39:1385-94.
4. Ertug S, Okyay P, Turkmen M, Yuksel H. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma* infection among pregnant women in Aydin province, Turkey. BMC Public Health 2005; 5: 66.
5. Chandrasekar PH, Momin F. Disseminated toxoplasmosis in marrow recipients: a report of three cases and a review of the literature. Bone Marrow Transplant Team. Bone Marrow Transplant 1997; 19: 685-9.
6. Roemer E, Blau IW, Basara N, et al. Toxoplasmosis, a severe complication in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: successful treatment strategies during a 5-year single-center experience. Clin Infect Dis 2001; 32:1-8.
7. Wendum D, Carbonell N, Svrcek, M, et al. Fatal disseminated toxoplasmosis in a *Toxoplasma* seropositive liver transplant recipient. J Clin Pathol 2002; 55: 637.
8. De Medeiros BC, De Medeiros CR, et al. Disseminated toxoplasmosis after bone marrow transplantation: report of 9 cases. Transpl Infect Dis 2001; 3: 24–8.
9. Costa JM, Pautas C, Ernault P, et al. Real Time PCR for diagnosis and follow-up of *Toxoplasma* reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. J Clin Microbiol 2000; 8: 2929–32.
10. Buchbinder S, Blatz R, Rodloff AC. Comparison of real time PCR detection methods for B1 and P30 genes of *Toxoplasma gondii*. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 45: 269–71.
11. NPHS Wales *Toxoplasma* Reference Laboratory. Standart Operating Procedures, SOP. 2003. Swansea, UK.
12. Caner A, Döşkaya M, Karasu Z, et al. Incidence and diagnosis of active *Toxoplasma* infection among liver transplant recipients in western Turkey. Liver Transpl 2008; 14: 1526-32.
13. PCR Applications Manual. 3rd ed. <http://www.roche-applied-science.com>.
14. Orhan V, Gülay Z, Kırdar S ve ark. İmmun sistemi baskılanmış hastalarda pnömoni etkeni olarak *P. carinii*'nin yeri. T Parazitol Derg 1995; 19: 48–55.
15. Pinlaor S, Mootsikapun P, Pinlaor P, et al. PCR diagnosis of *Pneumocystis carinii* on sputum and bronchoalveolar lavage samples in immunocompromised patients. Parasitol Res 2004; 94: 213–8.
16. Takahashi T, Goto M, Endo T, et al. *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompromised patients with and without human immunodeficiency virus infection. J Med Microbiol 2002; 51: 611–4.
17. Huang SN, Fischer SH, O'Shaughnessy E, et al. Development of a PCR assay for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia based on amplification of the multicopy major surface glycoprotein gene family. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 35: 27–32.
18. Larsen HH, Kovacs JA, Stock F, et al. Development of a rapid real-time PCR assay for quantitation of *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii*. J Clin Microbiol 2002; 40: 2989–93.
19. Olsson M, Strålin K, Holmberg H. Clinical significance of nested polymerase chain reaction and immunofluorescence for detection of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Clin Microbiol Infect 2001; 7:492–7.
20. Rohner P, Jacomo V, Studer R, et al. Detection of *Pneumocystis jirovecii* by two staining methods and two quantitative PCR assays. Infection 2009; 37: 261–5.
21. Arcenas RC, Uhl JR, Buckwalter SP, et al. A real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Pneumocystis carinii* from bronchoalveolar lavage fluid. Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 54:169-75.
22. Thomas CF, Anders RA, Gustafson MP, et al. *Pneumocystis carinii* contains a functional cell-division-cycle Cdc2 homologue. Am J Respir Cell Mol Biol 1998; 18: 297–30.

## TRICHOMONAS VAGINALIS TANISI

Dr. Aysu Değirmenci

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

Bir protozoon olan *Trichomonas vaginalis* seksüel yolla bulaşan hastalıklar içinde *trikomoniiazis* etkeni olup her yıl 170 milyondan fazla vakaya sebep olmaktadır<sup>1,2</sup>. *T.vaginalis* enfeksiyonunun en sık bulgusu sarı/yeşil köpüklü, pürülan akıntıdır<sup>3</sup>. Erkeklerde genelde asemptomatik seyretmekte olup, prostatit, üretrit ve epididimit sonucunda infertilite oluşturabilirken; kadınlarda vajinit, servisit, üretrit, infertilite, gebelik sırasında erken membran rüptürü ve düşük doğum ağırlıklı bebek doğumu ile sonuçlanmaktadır<sup>4-8</sup>. Kadın Hastalıkları ve Doğum uzmanları genelde klinik tabloyu tanı için yeterli bulmaktadırlar. Ancak bu durum tedaviyi bazen yanlış yönlendirebilmektedir; zira tipik klinik bulgular hastaların sadece %12'sinde ortaya çıkmaktadır<sup>1</sup>. Bu sebeple *trikomoniiazis* düşünülen vakalar ve diğer akıntısı olan vakalarda laboratuvar yöntemleri ile klinik tanı desteklenmelidir.

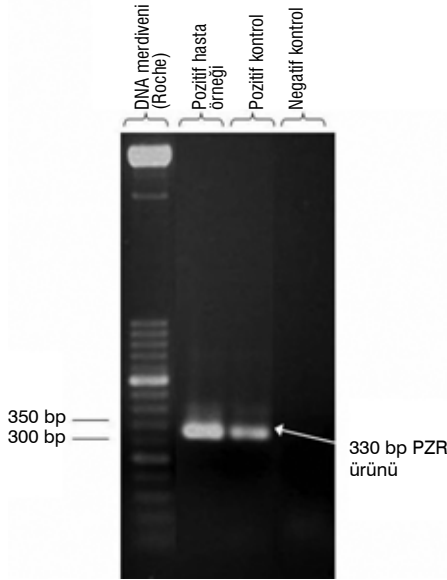
*Trikomoniiazis* tanısında direkt mikroskopik bakı, çeşitli boyama teknikleri (Giemsa, acridine orange floresan, Papanicolaou, Diff-Quik), kültür metotları, lateks aglütinasyon ve ELISA'nın yanı sıra, yakın zamanda polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılmaya başlanmıştır<sup>1,4</sup>. *Trikomoniiazis* tanısında genelde parazitoloji laboratuvarlarında kolay, ucuz ve hızlı sonuç veren bir yöntem olan direkt mikroskopi tercih edilmekle birlikte, az sayıda parazit içeren örneklerde ve/veya deformasyona uğramış parazitlerin tanınması gerektiği durumlarda etkinliği düşmektedir<sup>8,9</sup>. Bu nedenle uygun altyapısı olan laboratuvarlarda altın standart olarak kabul edilen kültür yöntemleri kullanılmaktadır. *T.vaginalis* kültür yöntemlerinin duyarlılığı yüksek olmakla birlikte sonuç için 2-7 gün zamana ihtiyaç duyulmaktadır<sup>9,10</sup>.

Moleküler yöntemler, *trikomoniiazis* tanısında 1990'lı yıllarda kullanılmaya başlanmış, *T.vaginalis* PZR'nin kültür ve direkt mikroskopik bakıya göre çok daha duyarlı olduğu gösterilmiştir<sup>4,11</sup>. PZR reaksiyonlarında *T.vaginalis* ferredoxin geni, beta-tubulin geni, çok tekrarlayan 2 kb DNA dizisi, tekrarlayan dizinin klonu (TV-E650), 18S ribozomal gen ve adezyon protein geni tanı amaçlı amplifiye edilmiştir<sup>11-17</sup>. Pek çok çalışmada konvansiyonel PZR özgüllüğü yüksek bir yöntem olarak ön plana çıksa da, kültür yöntemi tanıda hala pek çok laboratuvar tarafından altın standart olarak kabul edilmektedir. Bunun nedeni ise, PZR yöntemlerinin pahalı olmasının yanında özel ekipman ve eğitilmiş personel gerektirmesi sebebiyle rutin kullanımda yer bulamamasıdır<sup>8,16</sup>.

*Trikomoniiazis* tanısında çeşitli yanı yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, B-tubulin genine özgü konvansiyonel PZR yönteminin duyarlılığı, direkt bakı, Giemsa boyama, acridine orange boyama ve diamond kültürden daha yüksek bulunmuştur<sup>1</sup>. Yakın zamanda kontaminasyon sorununu en aza indiren, jel kullanımını ortadan kaldıran ve patojenin miktarını belirleyebilen gerçek zamanlı (RT)-PZR yöntemi *T.vaginalis* tanısında da kullanılmaya başlanmıştır. *T.vaginalis*'e özgün, sık tekrarlayan 2 kb baz dizisini hedefleyen RT-PZR yönteminin özgünlük ve duyarlılığı direkt bakı ve kültürden daha yüksek bulunmuştur<sup>4</sup>. Başka bir çalışmada *T.vaginalis* tanısında RT-PZR'in konvansiyonel PZR'a göre çok daha duyarlı, kısa sürede sonuç veren ve daha az çalışma süresi gerektiren bir yöntem olduğu bildirilmiştir<sup>18</sup>. İdrar örneklerinde *T.vaginalis*'in PZR ile araştırıldığı çalışmalarda da direk bakıya oranla başarılı sonuçlar elde edilmiştir<sup>19-21</sup>.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Moleküler Parazitoloji Laboratuvarında (MolParLab) 2007 yılından itibaren *T.vaginalis*'in PZR ile tanısına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Laboratuvarımızda *T.vaginalis*'e ait 648 baz çiftinden oluşan Tv-E650 geni hedeflenmektedir (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi, GENBANK No: M86488; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)<sup>22</sup>. PZR reaksiyonu sırasında Tv-E650 içinde yer alan 330 bp'lik (82-390 nükleotidler arası) DNA parçasına yönelik, P1: 5'-GAGTTAGGGTATAATGTTTGATGTG-3' (25 nt, Tv-E650-1, forward primer) ve P2: 5'-AGAATGTGATAGCGAAATGGG-3' (21 nt, Tv-E650-2, reverse primer) primerleri kullanılmaktadır<sup>14</sup>.

Adnan Menderes Üniversitesi Parazitoloji Anabilim Dalı ile ortaklaşa yürütülen ön çalışmada, vajinitli olguların kültürlerinden izole edilen 20 adet *T.vaginalis* suşu, Tv-E650 içinde yer alan 330 bp'lik DNA parçasını amplifiye eden PZR yönteminin rutin tanıda kullanabilmesi için optimize edilmesinde kullanılmıştır (Şekil 1). Bu ön çalışmada altın standart olarak kabul edilen kültür yöntemi ile direkt mikroskopinin duyarlılığı %60, özgüllüğü ise %100 olarak hesaplanmış, geliştirilen PZR yönteminin duyarlılığı %66.6, özgüllüğü ise % 97.95 olarak bulunmuştur. Bu yöntemin rutine oturtulması ile, kadın-doğum polikliniğine başvuran vajinit ön tanılı 52 hastada direkt bakı ile *T.vaginalis* saptanmazken, ikisinde PZR ile *T.vaginalis* DNA'sı pozitif bulunmuştur. Bu çalışmada PZR, hem direkt hem de kültürden elde edilen örneklerden çalışılmış, arada anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiş, bu nedenle *T.vaginalis* şüpheli hastaların akıntı örneklerine DNA ekstraksiyonu uygulanmış ve PZR'da kullanılmıştır. Moleküler Parazitoloji laboratuvarında *T.vaginalis* konvansiyonel PZR yöntemi rutin tanı teknikleri içine girmiş olup, gelecekte kontaminasyon sorununu azaltan, jel kullanılmayan ve patojenin miktarını belirleyebilen RT-PZR yönteminin kullanılması planlanmaktadır.



Şekil 1. *T.vaginalis* Tv-E650 gen bölgesine özgü primerlerle amplifiye edilen 330 bp PZR ürünü

#### KAYNAKLAR

1. Radonjic IV, Dzamic AM, Mitrovic SM, et al. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection: The sensitivities and specificities of microscopy, culture and PCR assay. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2006; 126: 116-20.
2. World Health Organization. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overviews and estimates. 2001. WHO/HIV-AIDS/2001,02.Geneva.
3. Smith KS, Tabrizi SN, Fethers KA, Knox JB, Pearce C, Garland SM. Comparison of conventional testing to polymerase chain reaction in detection of *Trichomonas vaginalis* in indigenous women living in remote areas. Int J STD AIDS 2005; 16: 811-5.
4. Schirm J, Bos PA, Roozeboom-Roelfsema IK, Luijt DS, Möller LV. *Trichomonas vaginalis* detection using real-time Taq-Man PCR. J Microbiol Methods 2007; 68: 243-7.
5. Lloyd GL, Case JR, De Frias D, Brannigan RE. *Trichomonas vaginalis* orchitis with associated severe oligoasthenoteratospermia and hypogonadism. J Urol 2003; 170: 924.
6. Laga M, Manoka A, Kivuvu M, et al. Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. AIDS 1993; 7: 95-102.
7. Sorvillo F, Kerndt P. *Trichomonas vaginalis* and amplification of HIV-1 transmission. Lancet 1998; 351: 213-4.
8. Soper D. *Trikomoniazis*: under control or undercontrolled? Am J Obstet Gynecol 2004; 190:281-90.



9. Schwebke JR, Burgess D. *Trichomoniasis*. Clin Microbiol Rev 2004; 17: 794-803.
10. Jeremias J, Draper D, Ziegert M, et al. Detection of *Trichomonas vaginalis* using the polymerase chain reaction in pregnant and non-pregnant women. Infect Dis Obstet Gynecol 1994; 2:16-9.
11. Riley DE, Roberts MC, Takayama T, Krieger JN. Development of a polymerase chain reaction-based diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 1992; 30: 465-72.
12. Madico G, Quinn TC, Rompalo A, McKee KT Jr, Gaydos CA. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swab samples. J Clin Microbiol 1998; 36: 3205-10.
13. Kengne P, Veas F, Vidal N, Rey JL, Cuny G. *Trichomonas vaginalis*: repeated DNA target for highly sensitive and specific polymerase chain reaction diagnosis. Cell Mol Biol 1994; 40: 819-31.
14. Ryu JS, Chung HL, Min DY, Cho YH, Ro YS, Kim SR. Diagnosis of *trichomoniasis* by polymerase chain reaction. Yonsei Med J 1999; 40: 56-60.
15. Mayta H, Gilman RH, Calderon MM, et al. 18S ribosomal DNA-based PCR for diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 2000; 38: 2683-7.
16. Alderete JF. Cloning and molecular characterization of two genes encoding adhesion proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. Mol Microbiol 1995; 17: 69-83.
17. Lawing LF, Hedges SR, Schwebke JR. Detection of trichomonosis in vaginal and urine specimens from women by culture and PCR. J Clin Microbiol 2000; 38: 3585-8.
18. Pillay A, Radebe F, Fehler G, Htun Y, Ballard RC. Comparison of a TaqMan-based real-time polymerase chain reaction with conventional tests for the detection of *Trichomonas vaginalis*. Sex Transm Infect. 2007; 83: 126-9.
19. Ingersoll J, Bythwood T, Abdul-Ali D, Wingood GM, Diclemente RJ, Caliendo AM. Stability of *Trichomonas vaginalis* DNA in urine specimens. J Clin Microbiol 2008; 46: 1628-30.
20. Hardick A, Hardick J, Wood BJ, Gaydos C. Comparison between the Gen-Probe transcription-mediated amplification *Trichomonas vaginalis* research assay and real-time PCR for *Trichomonas vaginalis* detection using a Roche LightCycler instrument with female self-obtained vaginal swab samples and male urine samples. J Clin Microbiol 2006; 44: 4197-9.
21. Hobbs MM, Lapple DM, Lawing LF, et al. Methods for detection of *Trichomonas vaginalis* in the male partners of infected women: implications for control of *trichomoniasis*. J Clin Microbiol 2006; 44: 3994-9.
22. Paces J, Urbánková V, Urbánek P. Cloning and characterization of a repetitive DNA sequence specific for *Trichomonas vaginalis*. Mol Biochem Parasitol 1992; 54: 247-55.

## VANKOMİSİNE DİRENÇLİ ENTEROKOKLAR

Doç. Dr. Zerrin Aktaş

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

Enterokoklar hastane enfeksiyonları etkenleri arasında ikinci sırada yer alırlar<sup>1</sup>. Olguların %85-90'ından *Enterococcus faecalis*, %5-10'undan *Enterococcus faecium* sorumludur<sup>2</sup>. Dünyada ve ülkemizde, vankomisine dirençli enterokok (VRE) enfeksiyonlarında son zamanlarda artış gözlenmektedir ve en çok saptanan direnç geni *VanA*'dır<sup>3-9</sup>. Günümüze kadar glikopeptid direncinde *VanA*-G ve VanL olarak isimlendirilen yedi fenotip tanımlanmış ve bunlardan *VanA*, VanB ve VanC en sık saptanan fenotipler olarak bildirilmiştir<sup>10</sup>. *VanA* fenotipindeki enterokok suşları vankomisin (MİK: 64->1024 µg/ml) ve teikoplanine (MİK: 16->512 µg/ml) yüksek düzeyde dirençli, VanB fenotipindeki izolatlar vankomisine değişik düzeylerde dirençli, teikoplanine duyarlıdır. Her iki fenotipte de direnç indüklenebilir ve diğer türlere aktarılabilir özelliktedir. VanC fenotipindeki izolatlar vankomisine kromozomal olarak düşük seviyelerde (MİK: 2-32 µg/ml) dirençli ve teikoplanine duyarlıdır<sup>10</sup>. Bu direnç indüklenemez ve aktarılamaz özelliktedir. *VanA* ve VanB fenotipi başlıca *E.faecalis* ve *E.faecium* türlerinde; VanC fenotipi *E.gallinarum* (VanC1), *E.casseliflavus* ve *E.flavescens* (VanC2/3)'de; VanE, VanG ve VanL fenotipi ise *E.faecalis*'te bildirilmiştir<sup>11</sup>.

Günümüzde sınıflandırma, özgül ligaz genlerinin varlığına göre yapılmaktadır. Vankomisin direncinin regülasyonu ve oluşumunda rol alan diğer genler (*VanR*, *VanS*, *VanH*, *VanX*, *VanY*, *VanZ*) ve *VanA* geni Tn 1546 transpozonu üzerinde yer almaktadır<sup>3</sup>. *E.faecium*'da ise bu gen plazmid üzerindedir. Bu genlerin işlevi ile D-ala-D-ala yerine D-ala-D-ala-laktat ile sonlanan anormal peptidoglikan öncül maddesi sentez edilir. Normal peptidlerin yerine bu uca vankomisin düşük düzeyde bağlanabilir. *VanR* ve *VanS* iki komponentli düzenleyici olarak rol oynar. *VanH*, *VanA* ve *VanX*'in transkripsiyonunu, *VanR* ve *VanS*'nin oluşturduğu sistem düzenler. *VanS*, vankomisin varlığı veya etkisini algılar; *VanH*, *VanA* ve *VanX*, promotorlarını aktive ederek *VanR*'ye aktarır. Bir dehidrojenaz olan *VanH*, D-lac oluşumunu sağlar. Ligaz olan *VanA* bunu D-ala-D-ala-lac sentezinde substrat olarak kullanır. *VanZ* nin fonksiyonu tam olarak bilinmemekte, ancak teikoplanin direncinde rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Enterokoklar sefalosporinlere, penisilinlere, linkozamidlere, aminoglikozidlere (düşük düzeyde) intrensek olarak dirençlidir. Enterokokların bir çok antibiyotiğe karşı (aminoglikozidler, makrolidler, streptogramin ve kloramfenikol, glikopeptid grubu antibiyotikler) kazanılmış direnç mekanizmaları da bulunmaktadır. Kazanılmış direnç, genellikle bir DNA mutasyonu ya da yeni bir DNA segmentinin transferi sonucunda gelişir. *E.faecium*, *E.faecalis*'den daha sık olarak ampisilin ve vankomisin direncini biriktirmeye yatkındır<sup>12</sup>. Direnç genleri, hem enterokoklar arasında hem de stafilokok gibi daha patojen bakterilere transfer edilebilir. Michigan'da hastanede yatan bir hastada vankomisin direncinde sorumlu Inc18 tipi plazmid üzerinde bulunan transpozonların (Tn1546), VRE'den metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'a (MRSA) aktarılması ile ortaya çıkan ilk vankomisin-metisilin dirençli *S.aureus* (VRSA) suşu buna en çarpıcı örnektir<sup>13,14</sup>. Günümüze kadar 9 VRSA suşunun üçü Michigan, birer tanesi Pensilvanya ve New York'tan bildirilmiştir. Bu hastalar arasında epidemiyolojik ilişkinin olmaması önemlidir ve her vakada direnç gelişimi birbirinden bağımsız olarak gelişmiştir. VRE'lerin kullanımında olan tüm antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilme özellikleri nedeniyle, bu bakterilere bağlı enfeksiyonların tedavisinde önemli problemler ortaya çıkmaktadır<sup>15</sup>. Kinupristin-dalfopristin, linezolid ve daptomisin gibi yeni antibiyotikler bulunmakla birlikte bunlara karşı da dirençli suşlar bildirilmiştir<sup>16,17</sup>. *E.faecalis*, kinupristin-dalfopristine intrensek olarak dirençlidir<sup>17,18</sup>. Ancak VRE tedavisinde karşılaşılan zorluklar kadar önemli diğer konu, vankomisin direncinin başka bakterilere (MRSA) aktarılmış olması ve önümüzde duran VRE kaynaklı VRSA problemidir.

## Epidemiyoloji

VRE'nin epidemiyolojisi tam olarak aydınlatılmış değildir. Epidemiyolojik çalışmaların temel amacı enfeksiyon kaynağının yayılım yollarını saptamak ve bu yayılımı önlemek için gerekli bilgiyi sağlamaktır. Enterokoklar, gastrointestinal sistem ve genital sistemin normal florasında bulunduğu için, bu mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonların çoğunun, hastanın endojen florasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla beraber yapılan çalışmalarda, VRE de dahil olmak üzere enterokokların direkt olarak hastadan hastaya temas veya indirekt olarak personelin elleri ile ya da kontamine olmuş çevresel yüzeylerden ve hasta bakım setlerinden yayıldığı gösterilmiştir<sup>19</sup>. Yoğun bakım ünitesinde yatan, kronik böbrek sorunlu, immün sistemi baskılanmış, kanserli veya hastanede yatış süresi uzamış hastalar, VRE enfeksiyonu gelişmesi açısından riskli gruplar içinde yer alırlar. Bunlardan başka; vankomisin ve 3. kuşak sefalosporin kullanımı, anaerob enfeksiyonlarda metronidazol kullanımı, VRE ile kontamine olmuş tıbbi aletlere maruz kalma, bilinen bir VRE olgusunun yakınında yatma ve VRE'li bir hastaya bakım veren aynı hemşirenin bakımı altında olma gibi faktörler de kolonizasyon ve enfeksiyon gelişmesi için risk faktörleri olarak belirtilmiştir<sup>9,10</sup>.

1997-2002 tarihleri arasında Kuzey Amerika, Güney Amerika, Latin Amerika ve Avrupa ülkeleri ile birlikte ülkemizin de katıldığı "SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme" çalışmasında VRE oranları 1997'de %1.6, 2002'de %5.3 olarak saptanmıştır<sup>20</sup>. ABD'nde VRE, başlangıçta hastanelerde sporadik olarak saptanırken, son zamanlarda monoklonal salgınlar hızla artmış ve sonra da hastanelerde poliklonal ve endemik hale geçmiştir. Enterokoklar nozokomiyal bakteriyemilerde üçüncü sırada yer almaktadır ve yoğun bakım ünitelerinde enterokoklara bağlı bakteriyemilerde %28 oranında saptanmaktadır. Son zamanlarda çeşitli raporlarda hemodiyaliz hastaları, pediatrik hematoloji-onkoloji bölümlerinde de yaygın hale geldiği bildirilmektedir<sup>20</sup>.

Avrupa'da ise VRE, başlangıçta hastanelerde nadir bir patojen iken toplum kaynaklarında (sağlıklı insan ve hayvanlarda) beklenenden yüksek saptanmış ve yapılan incelemede bunun glikopeptid grubundan bir antibiyotiğin (avoparsin) hayvan yemlerinde büyüme faktörü olarak kullanılması ile ilgili olduğu anlaşılmıştır. 1997'de Avrupa'da avoparsinin yasaklanmasından sonra toplumda VRE prevalansı azalmıştır. 1990'den sonra sporadik monoklonal nozokomiyal salgınlar ve enfeksiyonlar çoğunlukla nefroloji ve hematoloji ünitelerinden bildirilmiştir<sup>21</sup>. Bununla birlikte son yıllarda VRE ve özellikle vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* (VREfm) ile oluşan enfeksiyonlar, Avrupa hastanelerinde de artış göstermektedir<sup>22</sup>. Bu yüzyılın başından beri Avrupa'da VRE'lerle oluşan enfeksiyonlar ve nozokomiyal salgınlarda artış gözlenmektedir. European Antimicrobial Resistance Surveillance System'in (EARSS) (<http://www.earss.rivm.nl>) 2005'te yayınlanan raporunda enterokoklara bağlı bakteriyemilerde VRE prevalansının yedi Avrupa ülkesinde %10'un üzerinde, beş ülkede %20'nin üzerinde olduğu (Çek Cumhuriyeti, %13.7 ve Almanya %13; İsrail, %45.7; Kıbrıs, %40; Portekiz, %33.7; İrlanda, %30.9; Yunanistan, %29.1) bildirilmiştir. Nozokomiyal salgınlar aynı zamanda Asya ve Avustralya'dan da artan bir sıklıkta bildirilmektedir. Amerika ve Avrupa'da *VanA* direnci en sık saptanırken, Avustralya ve Singapur'da ise *VanB* predominant olarak saptanmaktadır<sup>23,24</sup>. Latin Amerika'da da VRE'ye bağlı bakteriyemi oranları %0'dan %5'e yükselmiştir<sup>25</sup>.

Türkiye'de ilk VRE kökeni 1998 yılında Vural ve arkadaşları<sup>26</sup> tarafından Akdeniz Üniversitesi'nden bildirilmiş ve bunu 1999 yılında Başustaoglu ve arkadaşları<sup>27</sup> tarafından Ankara Gülhane Askeri Tıp Akademisinden bildirilen kökenler izlemiştir. VRE son zamanlarda ülkemizde de artan bir sıklıkta bildirilmeye başlanmıştır ve bu suşlar *VanA* fenotipindedir<sup>6,8</sup>. *VanB* genotipi ise Ankara'da Coşkun ve arkadaşları<sup>28</sup> tarafından *E.faecium*'da bildirilmiştir. Otuzbir Avrupa ülkesinin katıldığı EARSS verilerine göre ülkemizde 2003-2006 yıllarında *E.faecium*'da glikopeptid antibiyotikler için direnç oranları %3-5, 2008'de %5-10, 2009'da ise %11.8 olarak saptanmış; amino-penisilin direnci ise 2003-2006'da %75-87 arasında bildirilmiştir. 2009 yılında vankomisine dirençli *E.faecalis* suşu saptanmamıştır.

VRE'nin yayılımının önlenmesi için VRE ile kolonize veya enfekte hastaların en kısa sürede saptanması gerekir. VRE için en önemli rezervuar gastrointestinal sistem taşıyıcılığı bulunan hastalardır. VRE enfeksiyonları genellikle gastrointestinal kolonizasyonu takiben gelişen endojen enfeksiyonlar olarak kabul edilse de, VRE'nin ekzojen yollarla da alınabileceği gösterilmiştir. İzolasyonlarında seçici besiyerleri kullanılabilir. Azid içeren besiyerleri seçici izolasyonda başarı ile kullanılmaktadır. Azid, gram-negatif bakterileri inhibe eder, besiyerindeki eskülini hidrolize ederek siyah koloniler oluşmasına neden olur (Eskülinli safralı azidli agar, coccose agar). Columbia kolistin-nalidiksik asit (CNA) veya feniletal alkol agar (PEA) ve kromojen agar [Chromagar VRE ve chromID VRE (C-ID)] enterokokların seçici izolasyonlarında kullanılabilir<sup>29</sup>. VRE saptanması için baz besiyerine 6µg/ml vankomisin eklenir. Disk difüzyon yöntemini kullanan laboratuvarlarda da plakların 24 saat süreyle inkübe edilmesi ve inhibisyon zonlarının yeterli ışık altında okunması önerilmektedir. Vankomisin için MİK değerleri, agar dilüsyon, agar gradiyent veya sıvı dilüsyon yöntemlerinden biriyle saptanmalı ve inkübasyon süresi 24 saat olmalıdır. Enterokoklardaki vankomisin direnci polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak perianal, perirektal, rektal sürüntü ve dışkı örneklerinden de saptanabilir. PCR özellikle düşük düzeyde vankomisin direnci taşıyan enterokok suşlarındaki (VanC veya VanB) direncin saptanması için yararlı bir yöntemdir. Klasik PCR, gerçek zamanlı (real-time) PCR, Evigene VRE tespit kiti Velogene (VEL) (*VanA*, *VanB*) bu amaçlarla kullanılmaktadır<sup>30,31</sup>. CM 2004

### VRE Epidemiyolojisinin Araştırılmasında Kullanılan Yöntemler

VRE'nin epidemiyolojisini araştırmak için çeşitli fenotipik ve genotipik yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar arasında biyotiplendirme, serotiplendirme, "multilocus enzyme electrophoresis" (MLEE), faj tiplendirmesi, "insertion sequence element-based typing", "pulsed-field gel electrophoresis" (PFGE), "multilocus variable-number tandem repeat analysis" (MLVA), "restriction fragment length polymorphism" (RFLP) analizi, ribotiplendirme, "repetitive sequence-based PCR", "arbitrary primed PCR" (AP-PCR) ve "random amplification of polymorphic DNA" (RAPD) gibi yöntemler sayılabilir<sup>32-35</sup>. Bu yöntemleri kullanarak yapılan çalışmaların sonucunda, bazı VRE suşlarının bir ülke içinde veya ülkeler hatta kıtalar arasında klonal olarak yayıldığı belirlenmiştir. Günümüzde bakterilerin moleküler tiplendirmesi amacıyla en sık kullanılan yöntem, sonuçlarının tekrarlanabilirliği, aynı zamanda da ayırım gücü yüksek olan ve altın standart olarak önerilen PFGE'dir<sup>25</sup>. Ancak PFGE yönteminin zaman alıcı olması, laboratuvarlar arasında sonuçların karşılaştırılmasındaki zorluklar ve DNA fragmanlarındaki değişiklikler, allelik profilin değişmesinden daha hızlı olmakta, bu nedenle suşların PFGE profillerine göre aynı klondan olup olmadıklarını saptamak güçlük göstermektedir. Lokal epidemiyolojik çalışmalarda daha fazla kullanım yeri olan PFGE, majör uluslararası klonların karşılaştırılması söz konusu olduğunda yerini *E.faecium* suşları için altın standart olarak kabul edilen MLST yöntemine bırakmaktadır. Homan ve arkadaşları<sup>36</sup>, "multilocus sequence typing" (MLST) yöntemiyle *E.faecium*'un karakterizasyonu için bir çizelge tasarlamışlardır. MLST yönteminde *E.faecium*'da bulunan yedi "house-keeping" gen (*adk*, *atpA*, *ddl*, *gyd*, *gdh*, *purK*, *pstS*) araştırılmaktadır. Bu sistemde dizi analizi ile bir veri tabanı oluşturulmuş ve bu veri tabanı internet ortamında kullanıma açılmıştır (<http://efaecium.mlst.net/>).

### *E.faecium*'un Genetik Evrimi ve Virülans Faktörleri

Epidemiyolojik araştırmalara ek olarak moleküler tiplendirme verileri, evrimsel gelişme ile ilgili soyların paternlerini incelemek ve bakteriyel patojenlerin popülasyon yapısı hakkında bilgi kazanmak için de kullanılabilir. VRE ile ilgili epidemiyolojik araştırmaların asıl temeli, bu mikroorganizmanın direnç geni ve bunun yayılım potansiyeli ile oluşturulacak ilişkinin kurulmasını gerekli kılmaktadır. VRE, hastane ortamında son derece kalıcı olabilen ve yayılım potansiyeli gösterebilen bir bakteridir. Hastane ortamında böylesine yayılım gösterebilmesi ve kalıcı olabilmesi, bu bakteriye özgünlük kazandıran genetik direnç yapısı ile ilgilidir. ST17'den köken alıp monoklonal iken farklılaşma potansiyeli taşıyan ve daha sonra da poliklonal hale gelerek "Klonal kompleks-17" (CC17) adını alan bu oluşum, genetik anlamda VRE

salgınlarının önemli bir belirleyicisi durumundadır<sup>37</sup>. Özellikle *esp* genine sahip enterokokların hastane ortamında çevreye daha kolay adapte olduğu, canlı organizmada ya da hastane ortamında kolonizasyon ve biyofilm oluşturma potansiyelini artırdığı, buna bağlı olarak da eliminasyonunun güçleştiği bilinmektedir. CC17, ampisilin ve kinolon direnci ile karakterizedir. Vankomisin direncinin kazanılmasından sonra (CC17 ile ilgili veya ilgisiz) bu *E.faecium* popülasyonu ilk önce Amerika'da sonra da Avrupa ve diğer kıtalarda nozokomiyal patojen haline gelmiştir. CC17 muhtemelen çoğul adaptif mekanizmalarla, örneğin antibiyotik direncinin kazanılmasıyla, başarılı bir şekilde hastane ortamına uyum sağlamıştır. Ampisilin direnci, CC17'nin çok özgün genetik belirteci olduğu gibi, ampisiline dirençli enterokok (ARE)'lar ile oluşan enfeksiyon oranlarının artışı, hastanede CC17'nin ortaya çıktığını gösteren ilk bulgu olarak kabul edilmektedir. VRE enfeksiyonları düşük olan ülkelerde, ampisiline dirençli enterokokların ortaya çıkışının, nozokomiyal VRE salgınlarının ortaya çıkacağına ilişkin göstere olabileceği öne sürülmektedir. CC17 suşlarının çoğu, mobil elementler, faj genleri ve plazmid dizileri, antibiyotik ve düzenleyici genler, enterokokal yüzey proteini (*esp*) geni ve patojenite adalarını içeren 100'ün üzerinde "hospital-clade-specific" genler içerir<sup>38</sup>. Jelatinaz, agregasyon maddesi, sitolizin, feromonlar, enterokokal yüzey proteini ve hiyalürinidaz gibi enzimler enterokokların virülansında rol oynarlar. Özgül bir virülans faktörü olması nedeniyle *esp* geninin saptanması, epidemik suşların epidemik olmayanlardan ayrılmasında faydalı olabilir.

#### KAYNAKLAR

1. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: Annual summary of data reported to the national healthcare safety network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29:996-1011.
2. Moellering JC. *Enterococcus* species, pp: 2147-56. In: Mandell GL (ed), *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 2000, 5th ed. Churchill Livingstone, New York.
3. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* 2006; 42 (Suppl 1):S25-34.
4. Kawalec M, Gniadkowski M, Hryniewicz W. Outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a hospital in Gdansk, Poland, due to horizontal transfer of different Tn1546-like transposon variants and clonal spread of several strains. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3317–22.
5. Nichol KA, Sill M, Laing NM, Johnson JL, Hoban DJ, Zhanel GG. Molecular epidemiology of urinary tract isolates of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from North America. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 392-6.
6. Inan D, Gunseren F, Colak D, Saba R, Kazan S, Mamikoglu L. First confirmed case of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* meningitis in Turkey: case report and literature review. *J Chemother* 2004; 16: 608-11.
7. Malathum K, Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci: recent advances in genetics, epidemiology and therapeutic options. *Drug Resist Updat* 1999; 2: 224-43.
8. Aktas Z, Diyarbakırlı P, Bal C, et al. Investigation of phenotypic and genotypic characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41:347-56.
9. Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sahm DE, Courvalin P. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2161–64.
10. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall, CG. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 686–707.
11. Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, vanL. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:2667-72.
12. Tenover FC, McDonald LC. Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control. *Curr Opin Infect Dis* 2005; 18:300–5.
13. Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, et al. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 2003; 302:1569–71.
14. Reyes K, Malik R, Moore C, et al. Evaluation of risk factors for coinfection or cocolonization with vancomycin-resistant *Enterococcus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2010; 48:628-30.
15. Chavers LS, Moser SA, Benjamin WH, et al. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. *J Hosp Infect* 2003; 53:159-71.

16. Bonora MG, Solbiati M, Stepan E, et al. Emergence of linezolid resistance in the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* multilocus sequence typing C1 epidemic lineage. J Clin Microbiol 2006; 44:1153–5.
17. Hershberger E, Donabedian S, Konstantinou K, Zervos MJ. Quinupristin-dalfopristin resistance in Gram-positive bacteria: mechanism of resistance and epidemiology. Clin Infect Dis 2004; 38:92–8.
18. Acar J, Casewell M, Freeman J, Friis C, Goossens H. Avoparcin and virginiamycin as animal growth promoters: a plea for science in decision-making. Clin Microbiol Infect 2000; 6: 477–82.
19. Gold H. Vancomycin-resistant enterococci: mechanisms and clinical observations. Clin Infect Dis 2001; 33: 210-9.
20. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report. Data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. Am J Infect Control 2004; 32:470–85.
21. Goossens H. The epidemiology of vancomycin-resistant enterococci. Curr Opin Infect Dis 1999; 12:537–41.
22. Treitman AN, Yarnold PR, Warren J, Noskin GA. Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002). J Clin Microbiol 2005; 43:462–3.
23. Kühn I, Burman LG, Haeggman S, Tullus K, Murray BE. Biochemical fingerprinting compared with ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis of DNA for epidemiological typing of enterococci. J Clin Microbiol 1995; 33:2812-7.
24. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J Bacteriol 2004; 186: 1518–30.
25. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2000; 38:1008-15.
26. Vural T, Şekercioglu AO, Ögünç D. Vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* suşu. ANKEM Derg 1999; 13:1.
27. Başustaoglu A, Özyurt M, Beyan C ve arkadaşları. Kan kültüründe izole edilen glikopeptid dirençli *Enterococcus faecium*. Flora 2005; 10: 142-7.
28. Coskun FA, Mumcuoglu I, Balaban N, et al. Phenotypic and genotypic traits of vancomycin-resistant enterococci in a teaching hospital, Ankara, Turkey: the first *vanB*-positive *Enterococcus faecium* isolates. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Vienna, Austria, 2010. P.1015.
29. Peltroche-Llacsahuanga H, Top J, Weber-Heynemann J, Lütticken R, Haase G. Comparison of two chromogenic media for selective isolation of vancomycin-resistant enterococci from stool specimens. J Clin Microbiol 2009; 47:4113-6.
30. Kilic A, Baysallar M, Bahar G, Kucukkaraaslan A, Cilli F, Doganci L. Evaluation of the EVIGENE VRE detection kit for detection of *vanA* and *vanB* genes in vancomycin-resistant enterococci. J Med Microbiol 2005; 54:347-50.
31. Appleman MD, Citron DM, Kwok R. Evaluation of the Velogene genomic assay for detection of *vanA* and *vanB* genes in vancomycin-resistant *Enterococcus* species. Clin Microbiol 2004; 42:1751-2.
32. Coconcelli PS, Porro D, Galandini S, Senini L. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. Lett Appl Microbiol 1995; 21:376-9.
33. Descheemaeker P, Lammens C, Pot B, Vandamme P, Goossens H. Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA fragments for identification of enterococci important in human medicine. Int J Syst Bacteriol 1997; 47:555-61.
34. Gordillo ME, Singh KV, Murray BE. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for subspecies differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*. J Clin Microbiol 1993; 31:1570-4.
35. Tomayko JF, Murray BE. Analysis of *Enterococcus faecalis* isolates from intercontinental sources by multilocus enzyme electrophoresis and pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 1995; 33:2903-7.
36. Homan WL, Tribe D, Poznanski S, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol 2002; 40: 1963–71.
37. Willems RJ, Top J, van Santen M, et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. Emerg Infect Dis 2005; 11:821–8.
38. Leavis H, Top J, Shankar N, et al. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. J Bacteriol 2004; 186: 672–82.

## METİSİLİNE DİRENÇLİ STAFİLOKOKLAR

Doç. Dr. Z. Ceren Karahan

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Morfoloji Yerleşkesi, Ankara.

Stafilokok türleri, insanlar da dahil olmak üzere birçok memelide özellikle deri ve mukozaları kolonize eden ve başta bağışıklık sistemi baskılanmış konaklar olmak üzere önceden sağlıklı bireylerde de değişik türleri ile farklı hastalık tabloları oluşturabilen fırsatçı patojenlerdir. Stafilokok türleri ile ortaya çıkan enfeksiyonların konak ve klinik spektrumlarının geniş olmasından, sahip oldukları çok çeşitli virülans faktörleri, kendilerine karşı kullanılan antimikrobilyallere hızlı direnç geliştirebilme yetenekleri ve yüksek bulaşıcılıkları sorumludur. 1959'da penisilinaza dirençli penisilinlerin (metisilin) büyük ümitlerle kullanıma başlanmasından sadece 2 yıl sonra, 1961'de, ilk metisiline dirençli *S.aureus* izolatu tanımlanmıştır. Bugün tüm dünyada, *S.aureus* izolatlarının-ülkeler arasında farklılıklar olmakla birlikte- yaklaşık yarısının metisiline dirençli olduğu ve yaklaşık 2 milyar kişinin *S.aureus* taşıyıcısı olduğu tahmin edilmektedir. Kuzey Avrupa ülkelerinde metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) prevalansı <%1 iken, ülkemiz de dahil Akdeniz ülkelerinde, ABD'nde ve bazı Asya ülkelerinde bu oran %25-50 olarak bildirilmektedir.

Stafilokoklarda metisilin direncinden sıklıkla, aktarılabılır bir genetik eleman olan stafilokokkal kaset kromozomu *mec* (*SCCmec*) üzerinde yer alan *mecA* geni ve regülatörlerinin kontrolünde kodlanan yeni bir penisilin bağlayan protein (PBP2' veya PBP2a) sentezlenmesi sorumludur. Metisiline dirençli stafilokoklar (MRS), tüm beta-laktam antibiyotiklere (in-vitro duyarlı görünseler bile) klinik direnç gösterirler. Bazı *SCCmec* elemanları üzerinde çok çeşitli antimikrobilyallere (aminoglikozitler, tetrasiklin, eritromisin) ve ağır metallere (cıva, kadmiyum) direnç taşıyan plazmid ve transpozonların yer alabilmesi nedeniyle, özellikle hastane enfeksiyonu etkeni olan MRS'da diğer antimikrobilyallere direnç de sıktır.

Metisilin direnci, homojen veya heterojen olarak karşımıza çıkabilir. Homojen dirençte, koloniyi oluşturan bakterilerin hepsi yüksek konsantrasyonda metisilin varlığında üreyebilme özelliği gösterirler. Oysa heterojen dirençte, koloniyi oluşturan bakterilerin hepsi *mecA* genini taşımakla birlikte, tüm üyelerinde direnç açığa çıkmayabilir. Bu tip direnç gösteren topluluklar, homojen dirençli topluluklardan daha yavaş üreyebilir (3 güne kadar uzayabilir). İnkübasyon sıcaklığını azaltmak (30-35°C), besiyerinde daha yüksek tuz konsantrasyonları kullanmak (%2-4 NaCl) bu tip suşların yakalanmasını kolaylaştırır. Test edilecek beta-laktam antibiyotiklerin uygun olmayan koşullarda saklanmaları (özellikle oksasilin diskleri ortam sıcaklığından hızlı etkilenmektedir, oksasilin ve sefoksitin disklerinin dondurucuda saklanması, en fazla bir hafta süreyle buzdolabında bekletilmesi önerilmektedir), inkübasyon süresinin 24 saatten kısa tutulması, inkübasyon sıcaklığının yüksek (37°C) olması, az inokulum kullanılması gibi teknik hatalar, metisilin direncinin tespitinde hatalı sonuç alınmasına neden olmaktadır.

### Stafilokokların Tanısı

Rutin klinik mikrobiyoloji uygulamalarında stafilokoklar, koyun kanlı agarda oluşturdukları kolonilerin özellikleri (beyaz/krem/sarı renkli, düzgün kenarlı, konveks, S tipi, beta hemoliz zonu ile çevrili) ve Gram boyamada üzüm salkımı şeklinde kümeler oluşturan gram-pozitif kok formunda görünümüleri ile dikkat çekerler. Katalaz pozitiflerdir. Serbest ve/veya bağlı koagülazın varlığı *S.aureus*'u klinik önemi olan diğer stafilokoklardan (koagülaz negatif stafilokoklar, KNS) ayırır.

### Metisilin Direncinin Belirlenmesi

CLSI 2010 M100-S20 kitapçığında MRSA, "*mecA* genini veya PBP'lerde oksasilin bağlanma afinitesinin azalması gibi diğer metisilin direnç mekanizmalarını eksprese eden *S.aureus* suşlarıdır" şeklinde tanımlanmaktadır. MRS'lar, tüm b-laktam antibiyotiklere [penisilinler, b-laktam/b-laktamaz inhibitör kombinasyonları, sefemler (anti-MRSA aktivitesi olduğu belirtilen yeni sefalosporinler hariç) ve karbapenemler] in-vitro olarak duyarlı olarak görünseler bile, bu antimikrobilyallerin klinik kullanımı başarı-

sızlıkla sonuçlanmaktadır. Bu nedenle metisilin direnci saptandığında, bu ilaçlara dirençli olarak raporlanmalı veya hiç bildirim yapılmamalıdır.

Moleküler yöntemlerle (PCR, real-time PCR, vb) *mecA* geni varlığının gösterilmesi, metisilin direncini ortaya koymada en güvenilir yoldur. Bugün klinik örneklerden direkt olarak metisiline dirençli stafilokok varlığını gösteren ticari sistemler de piyasada yerini almaktadır. Bu testler, tanı süresini 2 saatin altına indirmek suretiyle, özellikle riskli hastalara ve tarama yapılan hastalara avantaj sunmaktadır. Bununla birlikte moleküler yöntemlerin yüksek maliyeti ve deneyimli personel gerektirmesi, klinik mikrobiyoloji laboratuvarında yaygın olarak uygulanmasını engellemektedir.

### Disk difüzyon yöntemi

Bugün metisilin direncinin belirlenmesinde, metisilin (MET) diski yerine oksasilin (OXA) ve sefoksitin (FOX) diskleri belirleyici olarak kullanılmaktadır. OXA, aktivitesini MET'den daha uzun süre korur ve heterorezistan suşları tespit etmede daha iyidir. FOX'un *mecA* genini çok daha iyi indüklediği, OXA diskine göre daha net sınırlar oluşturduğu, değerlendirmesinin OXA'dan daha kolay olduğu belirtilmektedir.

Oksasilin disk difüzyon yöntemi: Kimyasal yapısının daha stabil olması nedeniyle, metisilin direncinin belirlenmesinde indikatör antibiyotik olarak sıklıkla oksasilin (OXA) kullanılmaktadır. 0.5 McFarland bulanıklığına ( $10^8$  CFU/ml) ayarlanmış bakteri süspansiyonundan Mueller-Hinton Agar (MHA) besiyerine ekim yapıldıktan sonra, 1 mg OXA diski yerleştirilir. 35 °C sıcaklıkta, normal atmosfer şartlarında inkübe edildikten sonra tam inhibisyonun gözlemlendiği alanın çapı, disk çapı ile birlikte ölçülür. CLSI 2010 kriterlerine göre inkübasyon süresinin 24 saat olması önerilmektedir. OXA zon çapının ölçülmesi için, petri plağı ışık kaynağına doğru (ışık arkadan gelecek şekilde) tutulur. İnhibisyon zonunun sınırı, çıplak gözle görülebilir üremenin bittiği sınır olarak kabul edilir. İnhibisyon zonu kenarında sadece büyüteç ile görülebilen küçük kolonilerin oluşturduğu hafif üreme dikkate alınmaz, ancak OXA diski etrafındaki inhibisyon zonu içerisinde yer alan herhangi bir üreme, dirençli olarak raporlanmalıdır. 1 mg OXA diski için CLSI 2010 kriterlerine göre *S.aureus* için  $\geq 13$  mm duyarlı, 11-12 mm orta duyarlı,  $\leq 10$  mm dirençlidir. *S.lugdunensis* dahil KNS için OXA ile disk difüzyon testi önerilmemektedir. Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST), stafilokoklarda metisilin direncinin saptanmasında OXA disk difüzyon testini önermemektedir.

Bazı *S.aureus* izolatları, yüksek miktarda beta-laktamaz üretimine bağlı olarak, metisiline dirençli olmadıkları halde disk difüzyon testinde sınırda dirençli bulunurlar. Testin duyarlılığını artırmak için besiyerine %5 NaCl eklenebilir, inkübasyon süresi 48 saate uzatılabilir, yüksek inokulum kullanılabilir ya da inkübasyon derecesi 35°C'den 30°C'ye düşürülebilir. Bu durumlarda beta-laktamaz üretimi artar ve daha önce duyarlı görülen suşlar metisiline dirençli olarak saptanabilir.

Sefoksitin disk difüzyon yöntemi: Bu yöntemde OXA diski yerine 30 mg FOX diski antibiyogram plağına yerleştirilerek 35°C sıcaklıkta, normal atmosfer şartlarında 24 saat inkübasyon yapılır. CLSI tarafından belirlenen sınır değerler, *S.aureus* ve *S.lugdunensis* için  $\geq 22$  mm duyarlı,  $\leq 21$  mm dirençli; diğer koagülaz negatif stafilokok (KNS)'lar için  $\geq 25$  mm duyarlı,  $\leq 24$  mm dirençlidir. EUCAST dökümanında *S.aureus* ve *S.lugdunensis* suşlarında 30 mg FOX diski kullanılarak uygulanan disk difüzyon testinde  $>22$  mm olan izolatların metisiline duyarlı,  $<22$  mm olanların metisiline dirençli olarak raporlanması önerilmektedir. Diğer KNS'ların taranmasında 30 mg sefoksitin diskinin kullanımını, eşik değer olarak da  $>25$ mm bulunanların duyarlı,  $<25$  mm bulunanların dirençli olarak raporlanmasını önermektedir.

*S.aureus* ve *S.lugdunensis* test edilmesi esnasında hem OXA hem de FOX diskleri kullanılıyorsa, ikisinden birinin veya her ikisinin dirençli tespit edilmesi durumunda metisiline dirençli olarak rapor edilmesi önerilmektedir.



## Sıvı mikrodilüsyon yöntemi

%2 NaCl içeren katyon katkılı Mueller Hinton buyyon (KKMHB) besiyeri kullanılarak uygulanır. İnokulum miktarı 0.5 McFarland bulanıklığında olacak şekilde ayarlanmalı ve inkübasyon 35°C'de 24 saat yapılmalıdır. Antibiyotik olarak öncelikli olarak OXA tercih edilmelidir. *S.aureus* ve *S.lugdunensis* için OXA MİK değeri  $\leq 2$  mg/mL ise duyarlı,  $\geq 4$  mg/mL ise dirençli olarak raporlanmalıdır. Diğer KNS için OXA eşik değerleri,  $\leq 0.25$  mg /mL ise duyarlı,  $\geq 0.5$  mg/mL ise dirençli şeklindedir. MİK değerleri 0.5-2 mg/mL aralığında bulunan bazı *S.epidermidis* dışındaki KNS'ların *mecA* geni taşımadığı ve sadece OXA değerlendirme kriterleri kullanıldığı takdirde gerçekte olandan daha sık metisilin direnci rapor edilebileceği belirtilmektedir. Bu nedenle, *S.epidermidis* dışındaki KNS ile ortaya çıkan ağır enfeksiyonlarda, OXA MİK değerleri 0.5-2 mg/mL arasında tespit edilirse, bu suşlarda *mecA* geni veya PBP2a varlığı araştırılmalı ya da FOX diski ile disk difüzyon testi yapılmalıdır. EUCAST kriterlerinde de, OXA MİK değeri  $> 2$  mg/L bulunan *S.aureus* ve *S.lugdunensis* suşları ile MİK değeri  $> 0.25$  mg/L bulunan diğer KNS suşlarının, sıklıkla *mecA* geni varlığına bağlı olarak metisiline dirençli olduğu belirtilmektedir.

CLSI kriterlerine göre, FOX ile yapılan sıvı mikrodilüsyon yönteminde *S.aureus* ve *S.lugdunensis* için MİK değeri  $\leq 4$  mg/mL ise duyarlı,  $\geq 8$  mg/mL ise dirençli olarak raporlanmalıdır. Diğer KNS için FOX ile sıvı mikrodilüsyon yönteminin kullanılması önerilmemektedir. EUCAST tarafından da FOX için MİK değerleri  $> 4$  mg/L bulunan *S.aureus* ve *S.lugdunensis* suşlarının çoğunun *mecA* geni varlığı nedeniyle metisiline dirençli olduğu belirtilmektedir. Diğer KNS'larda, MİK değerlendirmesinin disk difüzyon testine kıyasla metisilin direncini ortaya koymada üstünlüğü olmaması nedeniyle, FOX ile MİK tayini önerilmemektedir.

## Agar tarama yöntemi

“Oksasilin agar tarama testi” metisilin direncinin belirlenmesinde yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahiptir. Bu nedenle özellikle tarama kültürlerinde kullanılması önerilmektedir. Bu yöntemde 6 mg/mL OXA ve %4 NaCl içeren MHA besiyerine 0.5 McFarland bulanıklığındaki bakteri süspansiyonundan ekim yapılır. Bunun için, 1 ml'lik öze ile veya steril bir eküvyon kullanılarak hazırlanan süspansiyondan örnek alınır. Öze veya eküvyon ile plak üzerinde yaklaşık 10-15 mm'lik bir alana dairesel ekim yapılır. Plaklar 24 saat süre ile 33-35°C'de, normal atmosfer şartlarında inkübe edilir. Değerlendirme, plak ışık kaynağına doğru tutularak yapılmalıdır. Ekim yapılan alanda herhangi bir koloninin üremesi halinde sonuç “metisiline dirençli” olarak verilir.

## E-test yöntemi

E-test (AB Biodisk, İsveç) yöntemi, önceden belli bir gradiente göre antimikrobiyal emdirilmiş strip-lerin kullanıldığı, sıvı dilüsyon ve difüzyon testlerinin çeşitli yönlerini kombine eden bir yöntemdir. Antibiyotik gradiyenti süreklilik gösterdiğinden, sadece iki kat aralıktaki değerleri değil, arada kalan inhibitör konsantrasyon değerlerini gözlemek de mümkündür. E-test striplerinin soğukta saklanması, paket açıl-madan önce oda sıcaklığına getirilmesi ve nemden korunması gereklidir. Açılan bir pakette artan strip-ler, hava geçirmeyen sıkı kapaklı bir kap içerisinde soğukta saklanmalıdır. Testin uygulanması için, %2 NaCl içeren MHA besiyerine 0.5-1 McFarland bulanıklığında hazırlanmış bakteri süspansiyonu ekilir. Yoğun süspansiyonların heterorezistan suşları daha iyi belirlediği bildirilmektedir. Ekilen plak yüzeyi tamamen kuruduktan sonra, üzerine OXA veya FOX strip-leri tek hamlede yerleştirilir. MİK değerlerinin yorumlanmasında sıvı mikrodilüsyon yöntemindekiyle aynı standartlar kullanılır. Tespit edilen ara dilüsyon değerleri en yakındaki bir üst iki kat sulandırım değerine yuvarlanmalıdır (örneğin E-test MİK değeri 3 mg/mL bulduysa, standart değerlendirmede 4 mg/mL olarak dikkate alınmalıdır). Yapılan farklı çalışmalarda *S.aureus* için OXA stripinin duyarlılığı %98-99, özgüllüğü %100; KNS için duyarlılığı %98-100, özgüllüğü %50-91 arasında bulunmuştur. FOX stripi kullanıldığında *S.aureus* için duyarlılık ve özgüllük %99-100; KNS için duyarlılık %98, özgüllük %97 olarak belirtilmektedir. Özellikle KNS'de

FOX stripi ile E-test sonuçları üzerine tereddütlü ifadeler bulunması nedeniyle OXA stripinin tercih edilmesi önerilmektedir.

### Lateks aglütinasyon testi

PBP2a saptanmasını sağlayan ve hızlı sonuç veren bir yöntemdir. Testin duyarlılık ve özgüllüğü yüksektir. Lateksle kaplanmış PBP2a monoklonal antikorları ile koloni süspansiyonu karşılaştırılarak uygulanır. Aglütinasyon gözlenmesi halinde test sonucu “metisiline dirençli” olarak raporlanır. Özellikle *mecA* geni araştırılmayan laboratuvarlarda PBP2a varlığını göstermesi açısından iyi bir alternatif olduğu belirtilmektedir.

### Kromojenik besiyerleri

Kromojenik enzimatik substratlar içeren ticari besiyerleri, metisilin direncinin saptanmasında son yıllarda sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Bu besiyerlerinde metisiline dirençli stafilokoklar çeşitli renklerde koloniler oluşturarak metisiline duyarlı suşlardan ayırt edilmektedir. Özellikle tarama kültürlerinden kısa sürede sonuç alınmasını sağlayan bu besiyerleri kullanılarak yapılan farklı çalışmalarda, kromojenik besiyerlerinin duyarlılık ve özgüllükleri oldukça farklı bildirilmektedir. Bununla birlikte vakaların %85’ini 24 saatte tespit edebilmesi nedeniyle iyi bir tarama testi olarak değerlendirilmektedir.

### Otomatize sistemler

Özellikle çok sayıda testin çalışıldığı laboratuvarlarda iş yükünü azaltmak ve hızlı sonuç vermek için geliştirilmiş otomatize sistemlerin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Bu sistemler, tekrarlanabilirliği yüksek ve objektif sonuçlar vermekle birlikte, standart olarak kabul gören yöntemler arasına girmeyi henüz başaramamışlardır. Bu nedenle, otomatize sistemlerle elde edilen antibiyotik duyarlılık test sonuçlarının, standart kriterler kullanılarak doğrulanması önerilmektedir.

### Metisilin Direncini Belirlemede Kullanılan Kalite Kontrol Suşları

CLSI tarafından önerilen kalite kontrol suşları; *S.aureus* ATCC 25923 (disk difüzyon), *S.aureus* ATCC 29213 (MİK, agar dilüsyon-DUYARLI, *mecA* negatif), *S.aureus* ATCC 43300 (agar dilüsyon, sıvı mikrodilüsyon tarama-DİRENÇLİ, *mecA* pozitif) iken, EUCAST tarafından önerilen kalite kontrol suşları: *S.aureus* ATCC 29213 (zayıf beta-laktamaz üreticisi), *S.aureus* NCTC 12973, *S.aureus* CIP 103429, *S.aureus* DSM 2569, *S.aureus* CCUG 15915 ve *S.aureus* NCTC 12493 (*mecA*-pozitif, heterorezistan MRSA)’dür.

### Tarama Kültürleri

CLSI 2010 kitapçığında, oksasilin direncini belirlemede kullanılacak tarama testleri için aşağıdaki yöntemler önerilmektedir:

*S.aureus* OXA direncinin belirlenmesinde agar dilüsyon yöntemi veya *S.aureus* ve *S.lugdunensis*’de *mecA* aracılı oksasilin direncini belirlemede 30 mg FOX diski ile disk difüzyon testi (33-35°C’de 16-18 saat inkübasyon sonrasında  $\leq 21$  mm ise *mecA* pozitif,  $\geq 22$  mm ise *mecA* negatif) veya FOX ile sıvı mikrodilüsyon (33-35°C’de 16-20 saat inkübasyon sonrasında  $> 4$  mg/mL ise *mecA* pozitif,  $\leq 4$  mg/mL ise *mecA* negatif) önerilmektedir. Bu yöntemlerle *mecA* pozitif bulunan suşlar metisiline dirençli olarak isimlendirilmeli ve tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençli olarak raporlanmalıdır. FOX ile *mecA* negatif olarak bulunan, ancak OXA dirençli (MİK değerleri  $\geq 4$  mg/mL) olan suşlarda *mecA* dışındaki nadir direnç mekanizmalarından birine sahip olabileceği göz önüne alınarak “metisiline dirençli” olarak rapor edilmelidir.

*S.lugdunensis* haricindeki KNS’larda FOX ile *mecA* aracılı direncin tespiti için 30 mg FOX diski ile disk difüzyon testi önerilmektedir. 33-35°C’de 24 saat (dirençliler 18 saat sonra raporlanabilir) bekle-tildikten sonra zon çapı  $\leq 24$  mm ise *mecA* pozitif,  $\geq 25$  mm ise *mecA* negatiftir. *mecA* pozitif bulunan

izolatlar “metisiline dirençli” olarak raporlanmalıdır. *mecA* negatif bulunduğu halde OXA dirençli (MİK değerleri  $\geq 4$ mg/mL) bulunan izolatlarda, *mecA* dışında diğer nadir direnç mekanizmalarından birinin bulunabileceği göz önüne alınarak “metisiline dirençli” olarak raporlamak gerekir. *S.epidermidis* dışındaki diğer KNS’larla ortaya çıkan ciddi enfeksiyonlarda OXA MİK değeri 0.5-2 mg/mL arasında ise *mecA* veya PBP2a araştırılması uygundur.

## KAYNAKLAR

1. Adaleti R, Nakipoğlu Y, Karahan ZC, Taşdemir C, Kaya F. Comparison of polymerase chain reaction and conventional methods in detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dev Ctries 2008; 2: 46-50.
2. Akcam FZ, Boşgelmez Tinaz G, Kaya O, et al. Evaluation of methicillin resistance by cefoxitin disk diffusion and PBP2a latex agglutination test in *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*, and comparison of *mecA* with *femA*, *femB*, *femX* positivities. Microbiol Res 2009; 164: 400-3.
3. Atay T, Gülay Z. Comparison of PBP2a latex agglutination test with disk diffusion, *mecA* PCR and VITEK for the detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. ANKEM Derg 2004; 18: 205-8.
4. Babel BS, Decker CF. Microbiology and laboratory diagnosis of MRSA. Dis Mon 2008; 54: 769-73.
5. Carroll KC. Rapid diagnostics for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Current status. Mol Diag Ther 2008; 12: 15-24.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory detection of: Oxacillin/Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. 2005. Available at: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar\\_lab\\_mrsa.html](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_lab_mrsa.html)
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth Informational Supplement. 2010. CLSI document M100-S20. Wayne, PA.
8. European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). <http://www.rivm.nl/earss/result/>
9. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.0 December 2009. [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
10. Bou G. Minimum inhibitory concentration (MIC) analysis and susceptibility testing of MRSA, pp: 29-49. In: Ji Y (ed), Methods in Molecular Biology: MRSA Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
11. Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. Lancet 2006; 368: 874-85.
12. Mackenzie FM, Bruce J, Van looveren M, et. al. Antimicrobial susceptibility testing in European hospitals: report from the ARPAC study. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 1185-92.
13. Milstone AM, Perl TM. MRSA: Screening and laboratory identification. Pediatr Infect Dis J 2008; 27: 927-8.
14. Sancak B. *Staphylococcus aureus*'ta metisilin ve vankomisin direnci. Hacettepe Tıp Dergisi 2007; 38: 127-34.
15. Sevgican E, Sınırtaş M, Özakin C, Gedikoğlu S. *Staphylococcus* türlerinde metisilin direncinin farklı yöntemlerle saptanması. İnfeksiyon Derg 2009; 23: 63-8.
16. Stürenburg E. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost considerations. Ger Med Sci 2009; 7: Doc06.
17. Tacconelli E, de Angelis G, de Waure C, et al. Rapid screening tests for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at hospital admission: systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 2009; 9:546-54.

## KARBAPENEMAZ POZİTİF GRAM-NEGATİF BASİLLER

Doç. Dr. Özgen Eser

*Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.*

Gram-negatif basiller, özellikle de *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*, klinik olarak önemli bakteriyel enfeksiyonlara yol açmaktadır. Bunlar arasında yer alan *E.coli*, toplumdan kazanılmış üriner sistem enfeksiyonlarına neden olan en sık etkindir. Gram-negatif basil enfeksiyonlarında tedavide direnç söz konusu olduğunda son seçenek ilaç karbapenemlerdir. Karbapenemler arasında imipenem, meropenem, ertapenem ve doripenem tedavide sıklıkla tercih edilen ajanlardır<sup>1-4</sup>. Karbapenem direnci, ilacın hücre içinde porin değişikliği veya atım pompası nedeniyle etkin konsantrasyona ulaşamaması; kromozomal veya kazanılmış olarak bulunabilen karbapenemleri hidroliz eden enzimlerin varlığı veya penisilin bağlayan proteinlerde hedef değişimi sonucu ortaya çıkabilmektedir<sup>5</sup>.

Moleküler surveyans çalışmaları, bakterilerde ortaya çıkan bazı direnç tiplerinin diğerlerine nazaran daha sıklıkla görüldüğünü ortaya koymaktadır. Karbapenemazlar, özellikle klinik olarak tedavisi güçlük yaratan bakteriyel enfeksiyonlarda son beş yıl içinde en sık bildirim yapılan, dirençten sorumlu tutulan enzimler arasında yer almaktadır. Gram-negatif basillerde karbapenem direnci, hayatı tehdit eden enfeksiyonlarda tedaviye alternatif başka ilaç olmaması nedeniyle, tedaviyi belirgin şekilde kısıtlamaktadır. Bu nedenle, yayılımın önlenmesi için karbapenemazların saptanması ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanması büyük önem taşımaktadır<sup>6</sup>.

Kazanılmış karbapenemazlar, *Enterobacteriaceae* ve *Acinetobacter* türlerinde sefalosporinazlarla birlikte porin kaybının ortaya çıkışı veya karbapenemaz varlığı ile, *Pseudomonas aeruginosa*'da porin kaybı, atım pompası veya karbapenemazlar ile ortaya çıkmaktadır. Karbapenemazlar, moleküler sınıf A, B ve D' de yer alan beta-laktamazlardır. Sınıf A karbapenemazlar arasında yer alan KPC, SME, IMI, GES sıklıkla *Enterobacteriaceae*'da rol oynarken, sınıf B karbapenemazlar arasında yer alan IMP, VIM, GIM, SIM ve SPM ise *P.aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* ve *Acinetobacter* türlerinde izlenmektedir. Sınıf D karbapenemazlardan olan OXA enzimleriyle, sıklıkla *Acinetobacter baumannii*'de görülmektedir<sup>7-9</sup>. *Enterobacteriaceae*'da karbapenem direnci, karbapenemazlar dışında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) veya AmpC tipi beta-laktamaz ile birlikte porin kaybı olduğunda da ortaya çıkabilmektedir<sup>10</sup>.

*Enterobacteriaceae*'da yer alan KPC tipi karbapenemazlar, *K.pneumoniae* karbapenemazlar olup sınıf A beta-laktamazlar içinde yer almaktadır. KPC tipi karbapenemazlar, karbapenemler ve geniş spektrumlu sefalosporinler de dahil olmak üzere tüm beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı dirence neden olmaktadır. En sık *K.pneumoniae*'da bildirilmekle birlikte *Enterobacteriaceae* ailesinin birçok üyesinde görülmektedir. KPC tipi karbapenemazlar, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *E.coli*, *Salmonella* ve *Serratia* türleri yanı sıra non-fermentatifler arasında yer alan *P.aeruginosa*'da da bildirilmiştir<sup>4</sup>. KPC karbapenemaz, plazmid ile taşınabilen konjugasyon ile suşlar arasında aktarılabilen bir enzimdir. Genellikle, *bla*<sub>KPC</sub> genini taşıyan plazmidler beraberinde GSBL, aminoglikozid ve florokinolon direnç genlerini de taşımaları nedeniyle, kazanılmış tip karbapenem direnci varlığında birlikte çoklu antibiyotik direnci de gözlenmektedir. KPC tipi karbapenemazlar, kateter ilişkili kan yolu ve üriner sistem enfeksiyonlarında, ventilatör ilişkili pnömonide daha sıklıkla ortaya çıkmaktadır<sup>7</sup>.

KPC tipi karbapenemazların tespitinde bazı zorluklar yaşanmaktadır. KPC tipi karbapenemaza sahip izolatlarda düşük düzey karbapenem direncinin var olması, in vitro duyarlılık testleri sırasında KPC tipi karbapenemazların saptanmasını güçleştirmektedir ve bu durum bazı otomatize sistemlerin düşük düzeyde karbapenem direncini tespit etmekte güçlük çekmesi nedeniyle tanıda sorun yaşanmasına neden olmaktadır<sup>11,12</sup>. KPC karbapenemazların saptanması için öncelikle tarama testi olarak imipenem ve meropenem minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerinin 2-4 µg/ml veya ertapenem MİK değerinin ≥2 µg/ml olması aranırken, bu değerlerde bulunan tüm izolatlar karbapenem duyarlı bile olsa konfir-

masyon testine alınmalıdır. KPC tipi karbapenemaz tespitinde destekleyici fenotipik tanı testi “Modifiye Hodge Testi” (MHT)’dir<sup>13</sup>. MHT’de *E.coli* ATCC 25922 suşu 0.5 McFarland standard bulanıklık ayarına getirilip 1:10 oranında sulandırıldıktan sonra Mueller-Hinton agar yüzeyine yayılarak ortaya bir imipenem diski yerleştirilmektedir. Karbapenemaz şüpheli izolat ise disk kenarından plak kenarına kadar tek bir çizgi halinde ekilerek plak bir gece 35°C’da inkübe edilir. Ertesi gün şüpheli suş tarafında *E.coli* üremesi KPC tipi karbapenemaz varlığını göstermektedir<sup>11</sup>. MHT, GSBL ile porin kaybının birlikte olduğu durumlarda yanlış sonuçlar verebilmektedir<sup>14</sup>. KPC tipi karbapenemaz tespitinde MHT dışındaki karbapenem-karbapenem/boronik asit kombine disk difüzyon testi veya E-test de kullanılabilir<sup>15,16</sup>. Mikrodilüsyon testi için duyarlılık ve özgüllüğün en yüksek olduğu karbapenem meropenemdir. E-test ve disk difüzyon yönteminde ise duyarlılık ve özgüllük en yüksek ertapenem ile alınmaktadır. Otomatize sistemlerde ise ertapenem ile Microscan sisteminde en yüksek duyarlılık ve özgüllük sonuçları alınmaktadır. KPC tipi karbapenemaz tespit edilen suşlarda, mikrobiyoloji laboratuvarı, MİK sonucunu doğrudan yorumuz bildirmeli ve izolatın karbapeneme duyarlı bir *Enterobacteriaceae* olduğu, in vitro olarak karbapenemaz ürettiği ve tedavide karbapenem kullanımı için klinik etkinliğin doğrulanmadığı belirtilmelidir<sup>18</sup>.

Şimdiye kadar KPC-1 ile KPC-7 arası bildirilen toplam yedi KPC tipi karbapenemaz bulunmaktadır. İlk KPC izolatı, ABD’de Kuzey Carolina’dan rapor edilmiştir. Şimdiye kadar KPC tipi karbapenemazlar ABD dışında, İsrail, Yunanistan, Çin, Güney Amerika ve Hindistan gibi ülkelerden de bildirilmiştir<sup>7</sup>. Ülkemizde de benzer çalışmalar vardır. Hacettepe Çocuk Hastanesinde izole edilen 214 GSBL pozitif *E.coli* ve *K.pneumoniae* kan izolatında AmpC ve KPC pozitifliği sırasıyla %1 ve %1.4 bulunurken<sup>19</sup>, Hacettepe Erişkin Hastanesinde izole edilen 210 GSBL pozitif *E.coli* ve *K.pneumoniae* kan izolatında AmpC ve KPC pozitifliği her biri için %1.4 olarak saptanmıştır<sup>20</sup>. Özellikle GSBL varlığının yüksek olduğu bölgelerde karbapenemlerin tedavide tek seçenek kalması, KPC karbapenemazların önemini daha da artırmıştır. Bakteride KPC varlığı ile birlikte GSBL pozitifliği olması, GSBL pozitif izolatların yanlış tanımlanması gibi sorunlara neden olabilmektedir<sup>21</sup>.

KPC karbapenemazların yayılımının ve bulaşının engellenmesi için kolonize hastaların saptanması önem taşımaktadır. Karbapeneme dirençli veya karbapenemaz üreten *K.pneumoniae* ve *E.coli* taşıyıcılarının belirlenmesi için aktif sürveyans çalışmaları yürütülmelidir<sup>22</sup>. Bu amaçla, triptik soy buyyon içerisine konulan imipenem diski ile, hasta örneklerinde KPC pozitif bakterilerin aranması en kolay uygulanabilecek yöntemlerden biri kabul edilmektedir<sup>23,24</sup>. Karbapenem direncinin kontrol altına alınabilmesi için hem bölgesel hem ulusal çaplı etkin sürveyans çalışmalarına gereksinim bulunmaktadır. Özellikle in vitro karbapenem duyarlı izolatlarda KPC enzimlerinin doğru tanımlanması, yayılımın önlenmesi açısından önem taşımaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Sundin DR. Hidden beta-lactamases in the *Enterobacteriaceae* - Dropping the Extra Disks for Detection, Part I. Clin Microbiol Newsl 2009; 31: 41-4.
2. Sundin DR. Hidden beta-lactamases in the *Enterobacteriaceae* - Dropping the Extra Disks for Detection, Part II. Clin Microbiol Newsl 2009; 31: 47-52.
3. Siegel JD, Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L; Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. Am J Infect Control 2007; 35(10 suppl 2): 165-93.
4. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. Lancet Infect Dis 2009; 9: 228-36.
5. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, et al. Comparative review of carbapenems. Drugs 2007; 67: 1027-52.
6. Kattan JN, Villegas MV, Quinn JP. New developments in carbapenems. Clin Microbiol Infect 2008; 14: 1102-11.
7. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev 2007; 20: 440-58.

8. Livermore DM. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. Scand J Infect Dis (Suppl) 1991; 78: 7-16.
9. Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. Future Microbiol 2007; 2: 501-12.
10. Yang D, Guo Y, Zhang Z. Combined porin loss and extended spectrum beta-lactamase production is associated with an increasing imipenem minimal inhibitory concentration in clinical *Klebsiella pneumoniae* strains. Curr Microbiol 2009; 58:366-70.
11. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol 2007; 45: 2723-5.
12. Tenover FC, Kalsi RK, Williams PP, et al. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. Emerg Infect Dis 2006; 12:1209-13.
13. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect 2001; 7:88-91.
14. Carvalhaes CG, Picao RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 249-51.
15. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, et al. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-Possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. J Clin Microbiol 2009; 47: 362-7.
16. Pournaras S, Poulou A, Tsakris A. Inhibitor based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in clinical practice by using boronic acid compounds. J Antimicrob Chemother 2010; Apr 15. [Epub ahead of print]
17. Cao VT, Arlet G, Ericsson BM, Tammelin A, Courvalin P, Lambert T. Emergence of imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* owing to combination of plasmid-mediated CMY-4 and permeability alteration. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 895-900.
18. Landman D, Salvani JK, Bratu S, Quale J. Evaluation of techniques for detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in stool surveillance cultures. J Clin Microbiol 2005; 43: 5639-41.
19. Baykal A, Çöplü N, Şimşek H, Esen B, Gür D. Kan izolatu *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında geniş spektrumlu beta-laktamaz KPC-tip karbapenemaz ve plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz varlığının araştırılması. Gülhane Mikrobiyoloji Günleri, 20-22 Nisan 2010, İstanbul. s: 188-9, P-9.
20. Köseoğlu Eser Ö, Uludağ Altun H, Şener B, Haşçelik G. Carbapenem resistance in extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli* blood isolates. Clin Microbiol Infect 2010; 16(Suppl 2): 472. P1618.
21. Villegas MV, Lolans K, Correa A, et al.; Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50:2880-2.
22. Lledo W, Hernandez M, Lopez E, et al. Guidance or control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* in acute care facilities. MMWR 2009; 58: 256-60.
23. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for KPC carbapenemases: an emerging cause of multi-drug resistant infection. J Antimicrob Agent 2010; 65:1119-25.
24. Calfee D, Jenkins SG. Use of active surveillance cultures to detect asymptomatic colonization with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in intensive care unit patients. Infect Control Hosp Epidemiol 2008; 29:966-8.

## PANEL 5

## DÜNYADA VE ÜLKEMİZDE 2009-2010 “TOP 10” YAYINLAR

Doç. Dr. Füsün Can<sup>1</sup>, Prof. Dr. Tijen Özacar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

Bilimsel araştırmaların bilimsel dergilerde makale olarak yayınlanması, bilimsel yöntemin önemli bir aşamasıdır. Bilimsel makaleler, yeni araştırmalara ışık tutmakta ve üst düzey eğitim (seminer, kurs vs.) amacıyla kullanılmaktadır.

Bilimsel yayınların tarihi 1665 yılında Fransızca “Journal des Scavans” ve İngilizce “Philosophical Transactions of Royal Society” dergilerinin ilk kez düzenli olarak araştırma sonuçlarını yayınlamasıyla başlamıştır<sup>1</sup>. XVIII. yüzyılda sayıları 1000’e ulaşmış, daha sonraki yıllarda da hızla artış göstermiştir. PubMed ile ulaşılabilen ve 1950-2004 yılları arasında yayınlanmış makale sayısı 9.398.715 olarak bildirilmiştir<sup>2</sup>. Günümüzde PubMed aracılığı ile ulaşılabilen bilimsel dergi sayısı yaklaşık 21.300’dür. Eylül 2004’de PubMed, PubMed Central ve diğer NLM (National Library of Medicine) servislerine saniyede yaklaşık 1300 giriş olmuş ve günde 1.3 tetrabyte büyüklüğünde dosya indirilmiştir. PubMed ile ulaşılabilen makale sayısı 2009 yılında 1.75 milyondur<sup>3</sup>.

Bu kadar yoğun araştırma ve makale trafiğinde çalışmaların ne kadarına ulaşabiliyor, hangilerinden yararlanıyoruz? Pek çoğumuz kendi çalıştığımız alanla ilgili yayınları takip etmekteyiz. Bu oturumun amacı, 2009-2010 yıllarında mikrobiyoloji alanında yayınlanmış makaleler arasında seçilen, yeni bir yöntem tanımlayan ya da alanımıza yeni bir bakış açısı getiren 10 çalışmayı sizlerle paylaşmaktır. Böylece mikrobiyolojinin farklı alanlarındaki önemli çalışmaları sizlerle tartışma fırsatı bulacağız.

Makalelerin seçiminde nelere dikkat etmeliyiz? Aslında bir çalışmanın bilimsel gücünü gösteren en uygun değerlendirme kriteri “atıf sayısı”dır. Ancak bu parametrenin belirlenmesi iki yıllık bir süreç gerektirdiğinden bu oturum için uygun bir kriter gibi görünmemektedir. Pek çok bilimsel dergi, yayınladıkları makaleler arasında “Top 10” seçiminde okuyucu istatistiklerini dikkate almaktadır. Bu konuda yapılan istatistikler makalelerin okunma oranları ile ISI atıf indeksleri arasında iyi bir doğrusal orantı olduğunu göstermektedir<sup>2,4</sup>. Ancak tek başına okunma oranlarının dikkate alınarak makalelerin değerlendirilmesi, bu oturumun amacıyla tam olarak örtüşmemektedir. Bu nedenle bizim “Top 10” makale seçim kriterlerimizden birisi mikrobiyolojinin farklı alanlarında (bakteriyoloji, viroloji, mikoloji, parazitoloji, immüno-loji) yapılan çalışmaların derlenmesi olacaktır. Dünyada olduğu kadar ülkemizde de önemli olan yurtiçi ve yurtdışı çalışmaları araştırmayı ve her alanda oluşturulacak jürilerin desteği ile değerlendirmeyi ve sizlere sunmayı planlıyoruz. Keyifli ve yararlı olacağını ümit ettiğimiz oturumda birlikte olmayı diliyoruz.

## KAYNAKLAR

1. Stewart WW, Feder N. The integrity of the scientific literature. Nature 1987; 325: 207- 14.
2. Cokol M, Iossifov I, Rodrugez-Esteban R, Rzhetyok A. How many scientific papers should be retracted. Embo Reports 2007; 8:422-3.
3. [http://www.nlm.nih.gov/bsd/serfile\\_addedinf.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/serfile_addedinf.html)
4. <http://www.mendeley.com/blog/academic-features/the-top-10-articles.html>

## VİRUS YAPISI, İMMÜNOLOJİSİ VE ÜLKEMİZDEKİ EPİDEMİYOLOJİSİ

Doç. Dr. Gülendaml Bozdayı

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

### Virusun Yapısı

İnsan papilloma virusları (Human Papilloma Virus; HPV), *Papillomaviridae* ailesinde bulunmaktadır. Bu viruslar 50-55 nm büyüklüğünde, zarfsız, ikozahedral nükleokapsidli bir yapıya sahiptirler. Viral kapsid 72 kapsomerden oluşmaktadır. Virusun dış protein kılıfı bir majör ve bir minör olmak üzere 2 protein içermektedir. HPV'nin genetik bilgisi yaklaşık 8.000 baz çifti içeren halkasal, çift zincirli bir DNA molekülünde kodlanmaktadır<sup>1-3</sup>.

HPV'ler, diğer birçok virusun aksine, antijenik yapılarından çok DNA yapısına göre sınıflandırıldığından serotipler yerine genotipler olarak ve keşfedildikleri sıraya göre numaralandırılırlar<sup>1,3</sup>. Günümüzde 200'den fazla HPV tipi tanımlanmış, ancak bugüne kadar 96'sının tam olarak sekansı yapılmıştır. HPV'lerin sınıflandırılması, tür orijini ve DNA hibridizasyonu ile tespit edilen viral genomlar arasındaki homolojinin derecesine bağlıdır. Papilloma virus tiplerinin, alt tiplerinin ve varyantlarının taksonomik sınıflandırılmasında, majör viral protein olan L1 gen bölgesinin homolojisi göz önünde alınmaktadır<sup>3,4</sup>. HPV tipleri klinik olarak da üç kategoriye ayrılmaktadır. Bunlar; düşük riskli HPV (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55 ve 62), olası yüksek riskli HPV (26, 53 ve 66) ve yüksek riskli HPV (16 başta olmak üzere 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 68, 73 ve 82) gruplarıdır<sup>5,6</sup>.

Papillomaviruslar, küçük boyutlarına rağmen kompleks bir moleküler biyolojik yapıya sahiptirler. Genom, fonksiyonel olarak erken bölge (early: E), geç gölge (late: L) ve uzun kontrol bölgesi (long control region: LCR) olmak üzere üç bölgeye bölünür. Tüm papillomaviruslarda bu üç bölge, iki poliadenilasyon (pA) bölgesi tarafından ayrılmaktadır (erken pA ve geç pA). Erken bölgede 6 ORF (Open reading frame- açık okuma bölgesi) ve geç bölgede 2 ORF bulunur. Bütün HPV ORF'leri, virusun sadece bir sarmalı üzerinde yer almaktadır ve 8 ORF viral hayat siklusundaki gen ekspresyon sırasına göre erken ve geç olarak isimlendirilir. Erken proteinler E1, E2, E4, E5, E6 ve E7 viral replikasyon ve hücre transformasyonunda rol alır<sup>2</sup>. Son yıllarda keşfedilen E3 ve E8 de aynı bölgede oluşmaktadır. E3'ün işlevi henüz tam olarak bilinmemekte olup, E8 açık okuma bölgesi sadece sığır papillomavirus tip 1 (BPV-1) ve HPV tip 31'de kodlanmaktadır<sup>7</sup>. Geç gen bölgesinde ise L1 ve L2 kodlanmaktadır. L1 geni majör kapsid proteinini ve L2 geni minör kapsid proteinini kodlar. Tüm bu proteinler transmembranın uyarılması, hücre siklusunun düzenlenmesi ve transformasyon aktivitesinin denetlenmesi gibi pleotropik fonksiyonlara sahiptir<sup>8</sup>.

Viral entegrasyon, tipik olarak viral E1 ve E2 bölgelerinde meydana gelmektedir. Bu genler viral gen ekspresyonu ve replikasyonunu düzenleyen proteinleri kodlamaktadır. E1 proteinini viral DNA replikasyonu için önemli olan helikaz aktivitesine sahiptir. E1 proteinini, viral replikasyonun başlamasında anahtar rol oynamaktadır ve potansiyel bir terapötik adaydır. E2 proteinini aynı zamanda iki protein kodlar; bunlardan biri erken bölgenin transkripsiyonunu inhibe ederken, diğeri artırılmaktadır. HPV ile ilişkili servikal kanserin gelişiminde E2 bölgesinde sıklıkla kırılma meydana geldiğinden HPV DNA entegrasyonu önemlidir. Entegrasyon esnasında E2'de meydana gelen kırılma, E2'nin E6 ve E7 üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırır. Sonuçta, E6 ve E7 viral proteinlerinin kontrolsüz ekspresyonuna yol açar<sup>9</sup>. Bu nedenle, E6 ve E7 onkoproteinleri kanser gelişimi için önemlidir. Bununla birlikte, HPV tiplerinin yüksek risk taşıması, tümör süpresör proteinini p53 ve retinoblastoma (Rb) ile ilişkili olan E6 ve E7 proteinlerine sahip olmasından kaynaklanmaktadır. E6 ve E7 genlerinin transformasyon aktivitesi, onların hücre siklusunda görevli hücre proteinleri ile olan etkileşimlerinden kaynaklanmaktadır. E7 proteinini HPV-16



ve HPV-18 gibi yüksek riskli HPV'ler tarafından kodlanır ve Rb'ye yüksek afinite ile bağlandığı tespit edilmiştir. E7 proteini Rb'ye 'cep domaini' adı verilen bir bölgeden bağlanır. RB'nin cep domain dizisi tümör süpresör fonksiyonu için önemlidir<sup>10</sup>.

E5 geninin rolü, enfeksiyonun başlangıcında oldukça önemlidir. Epidermal büyüme faktörü reseptörü, trombositleri aktive edici büyüme faktörü reseptörü ve koloni uyarıcı faktör-1 reseptörü ile bir kompleks oluşturarak hücre büyümesini uyarır. Son yıllarda E5, apoptozisi izleyen DNA hasarında da görülmektedir<sup>1</sup>.

E8 ORF bölgesi BPV-1 ve HPV-31 dışında, birçok tavşan papillomaviruslarında da bir onkogen olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, BPV-1 ve HPV-31'de viral transkripsiyon ve replikasyonun bir negatif regülatörü olarak E8<sup>E2</sup> füzyon proteini belirlenmiştir<sup>7</sup>. Bu durum E8<sup>E2C</sup>'nin viral yaşam siklusunun erken evresi boyunca HPV DNA replikasyonunun negatif bir regülatörü olduğunu göstermektedir<sup>11</sup>.

Geç gen bölgesinde yer alan L1 geni, viral protein kılıfının büyük bir kısmını meydana getiren majör kapsid proteinini oluştururken, L2 geni minör kapsid proteinini oluşturmaktadır<sup>12</sup>.

### **Virusun Replikasyonu**

Bazal hücrelerde virus enfeksiyonu ile başlangıçta düşük kopya sayısı görülür. Daha sonra viral DNA replikasyonunda hücre siklusuna bağlı olarak, viral yük yaklaşık 50-100 kopya/hücre sayısına ulaşır. Enfekte hücre, öncül kök hücreden ayrılarak epitelin diğer tabakalarına girer<sup>13</sup>. Daha sonra viral gen ifadesi minimal düzeydedir ve özellikle E6 ve E7 onkogenlerinin ifadesi, açıkça saptanabilen E6/E7 transkriptleri ile sıkı bir kontrol altındadır. Enfekte keratinosit farklılaşan tabakalara girdiğinde, hücre döngüsünden ayrılır. Burada viral gen ifadesinin etkili bir regülasyonu vardır, viral DNA replikasyonu gerçekleşir. Viral kopya sayısı en azından 1000 kopya/hücre ulaşır. Erken genler E6 ve E7'nin çok sayıda ifadesi ve geç promoter'dan geç genlerin ifadesi görülür<sup>13</sup>. Hücre döngüsüyle farklılaşan hücrede meydana gelen bu olayların gerçekleşmesi önemlidir. Papillomaviruslar sadece bir DNA replikasyon enzimi, E1'i ve bundan başka viral E2 proteinini kodlar. Replikasyon tamamen hücre DNA sentez mekanizmasına bağlıdır. Bu virus için problem, hücre DNA polimerazın ve replikasyon faktörlerinin sadece mitotik olarak aktif hücrelerde üretilmesidir. Bu problemi çözmek için viruslar, viral yaşam döngüsü kapsamında proteinler kodlar. Döngüsüz hücrelerde hücre DNA sentezini reaktif eder, apoptozisi inhibe eder ve enfekte keratinositlerin farklılaşma programını geciktirir. Viral DNA replikasyonuna izin veren bir çevre oluşturur. Gerçekleştirilen kusursuz detaylar tam olarak anlaşılabilir, ancak bu fonksiyonlar için viral genlerin merkezi E6 ve E7'dir. Yüksek riskli HPV replikasyonunda bu işlev sayesinde, enfekte hücrelerde büyüme kontrol edilemez ve kanser gelişir<sup>14</sup>.

### **HPV Enfeksiyonunda İmmün Yanıt**

HPV enfeksiyonuna karşı immün yanıt, genellikle diğer viral enfeksiyonlara göre daha geç gelişir. Bunun nedeni, HPV'nin konak immün cevabından kaçmasıdır. Bu kaçış esnasında, bazı immün sistem fonksiyonlarını da baskılayabilir. Bu sebeple HPV enfeksiyonlarının iyileşmesi uzun zaman almaktadır. Yüksek riskli HPV tiplerinin temizlenmesi için gerekli olan süre yaklaşık 16-18 ay iken, düşük riskli HPV tiplerinin temizlenmesi için 10 ay gibi kısa bir süre yeterlidir<sup>2</sup>. Virus, immün sistemden kaçabilmek için birçok mekanizma geliştirmiştir. Bunlardan en önemlisi replikasyon döngüsüdür. Viremi fazı içermez. Enfeksiyonun epitel hücrelerinin lizisine yol açmaması ve farklılaşmaya bağımlı viral protein ekspresyonunun immün sistem hücrelerinden uzakta, epitelin üst tabakalarında olması doğal immün cevabın uyarılmasını azaltmaktadır. İmmün cevaptan kaçıştaki diğer önemli faktör, keratinositlerin iyi antijen sunamamasıdır. Böylece adaptif immün sistemin aktivasyonu da geciktirilmektedir. Bunların dışında HPV, doğal immüneyi de engelleyen bazı mekanizmalar içermektedir. Yüksek riskli HPV'lerde bulunan E6 ve E7 proteinleri, hücre yüzeyinde MHC-I ekspresyonunu azaltır; tip-I interferon ekspresyonunu ve sinyal iletimini bozar<sup>15</sup>.

## HPV'nin Ülkemizdeki Epidemiyolojisi

Ülkemizde, HPV ile ilgili olarak yapılan çok çeşitli çalışmalar ve sonuçlar mevcuttur. Güney ve ark.<sup>16</sup>'nın yaptığı bir çalışmada 21 gebe kadının %9.5'inde PCR yöntemi ile HPV pozitifliği gösterilmiştir. Özçelik ve ark.<sup>17</sup>, kanser gelişimi açısından düşük risk grubu oluşturan 230 kadında hibrid yakalama (Hybride Capture-I) sistemini kullanarak yaptıkları çalışmada %6.1 oranında HPV pozitifliği saptamışlar; gruplar arasında yaşa bağlı istatistiksel bir fark gözlememişlerdir. Öztürk ve ark.<sup>18</sup>'nin rastgele seçtikleri 18-62 yaş arası kadınların servikal örneklerinde yaptıkları çalışmada, hibrid yakalama yöntemi ile %4.9 oranında HPV pozitifliği saptanmıştır. Pozitiflik oranları; ilk cinsel ilişki yaşı düşük grupta (15-19 yaş arası) %6.3, 30-39 yaş grubunda %7.3, eğitim seviyesi düşük olan kadınlarda %6.9, oral kontraseptif kullanan kadınlarda ise %7.7 olarak bulunmuştur. Normal servikal sitolojiye sahip kadınlarda %2.1 HPV DNA pozitifliği saptanırken, epitelial hücre anomalisi gösteren kadınlarda %42.9 oranında pozitiflik saptanmıştır<sup>18</sup>.

Ankara'dan Onan ve ark.<sup>19</sup>'nın yaptığı bir diğer çalışmada, 94 hasta değerlendirilmiştir. Bu hastaların %50'sinde CIN I, %28.8'inde CIN II ve %21.2'sinde CIN III mevcuttur. Hastaların HPV DNA pozitifliği sırasıyla; %4.2, %14.8 ve %45 oranında saptanmıştır<sup>19</sup>. CIN III olan hastaların DNA pozitifliği CIN I ve II olan hastalardaki DNA pozitifliğine göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca bu hastalarda yapılan kantitasyon sonuçları da istatistiksel olarak gösterilememekle birlikte, CIN III grubundaki hastalarda en yüksek seviyede bulunmuştur<sup>19</sup>. Ergünay ve ark.<sup>20</sup>'nin servikal kanserli 35 hastada nested PCR yöntemi ile yaptıkları çalışmada %80 oranında HPV DNA tesbit edilmiştir. En sık saptanan HPV tipleri ise, DNA dizi analizi yöntemi ile; tip 16, 18, 31, 33, 45, 56, 59 (yüksek riskli tipler), 53 (muhtemel yüksek riskli tip), 6, 54, 72, 81 (düşük riskli tipler) olarak bildirilmiştir<sup>20</sup>.

Bizim laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda ise Rota ve ark.<sup>21</sup>, farklı hasta gruplarını araştırmışlar ve 92 gebe kadının %3'ünde, 59 infertil hastanın %12'sinde, 12 genital papillomlu hastanın biyopsi örneklerinde %25 ve çeşitli şikayetler ile başvuran 313 hastanın %11'inde HPV DNA varlığı saptamışlardır. Bölümümüzde yapılan diğer bir çalışmada da, Fidan ve ark.<sup>22</sup> servikal HPV ile apoptozis arasındaki ilişkiyi araştırmış ve 110 servikal sürüntü örneğinde gerçek zamanlı PCR yöntemi ile %8.1 oranında HPV tip 16, %5.4 oranında HPV tip 18 DNA'sı bulmuşlardır.

HPV enfeksiyonlarının diğer malignansilerle de birlikteliği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda; anal kanserlerde %70-100; oral kanserli hastalarda %31, tonsiller kanserli hastalarda %51, sinonasal papillomada %33 ve laringeal papillomada %76.2 oranlarında HPV DNA varlığı bildirilmektedir<sup>23-25</sup>. Syrjanen ve ark.<sup>24</sup>'nin 422 hastada tonsiller kanser ile HPV ilişkisini araştırdığı çalışmada, HPV tip 16 %84 sıklıkla pozitif bulunurken, tip 16/18 birlikteliği %3, tip 16/33 birlikteliği ise %1.4 oranında gösterilmiştir. Larinks kanserinde ise son yıllarda oldukça fazla çalışma mevcut olup, HPV DNA varlığı ile kanser yakından ilişkilendirilmektedir. Bir derleme yazıda; 1997-2005 yılları arasında yapılan çalışmalarda, toplam 1252 larinks kanserli hastanın %25'inde HPV DNA tesbit edildiği ve en büyük sıklıkla HPV tip 16'nın gösterildiği belirtilmektedir<sup>25</sup>. Ülkemizde 2007 yılında Güngör ve ark.<sup>26</sup>'nın yaptığı çalışmada, laringeal skuamöz hücre karsinomlu hastalarda %7.4 (7/95) oranında HPV DNA varlığı saptanırken, bizim 2009 yılında yaptığımız bir çalışmada, larinks karsinomlu hastalarda bu oran %41.5 olarak belirlenmiştir<sup>27</sup>.

## KAYNAKLAR

- zur Hausen. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 342-50.
- Ramael M, Gudleviciene Z, Didziapetriene J. Natural history and biological behaviour of human papillomavirus: implications for cervical cancer screening. *ACTA Medica Lituanica* 2004; 11: 1-7.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17-27.
- Münger K, Baldwin A, Edwards KM, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004;

78:11451-60.

5. Dehn D, Torkko KC, Shroyer KR. Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer* 2007; 111:1-14.
6. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, Maruo T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci* 2004; 50:9-19.
7. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* 2006; 11:2286-302.
8. Howley PM. The molecular biology of papillomavirus transformation. Warner-Lambert Parke-Davis Award Lecture. *Am J Pathol.* 1983; 113:414-21.
9. Fehrman F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* 2003; 22: 5201-7.
10. Kubbutat MH, Vousden KH. Role of E6 and E7 oncoproteins in HPV-induced anogenital malignancies. *Sem Virol* 1996; 7: 295-304.
11. Stubenrauch F, Zobel T, Iftner T. The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31. *J Virol* 2001; 75: 4139-49.
12. Palefsky JM, Holly EA. Molecular virology and epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4:415-28.
13. Middleton K, Peh W, Southern S, et al. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol* 2003; 77:10186-201.
14. Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans* 2007; 35 (Pt 6): 1456-60.
15. Scott M, Nakagawa M, Moscicki AB. Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 209-20.
16. Guney AL, Ince U, Kullu S, Pekin S, Cırakoglu B. Detection and typing of human papillomavirus in cervical specimens of Turkish women. *Eur J Gynaecol Oncol* 1997; 18:546-50.
17. Özçelik B, Serin IS, Gökahmetoğlu S, Başbuğ M, Erez R. Human papillomavirus frequency of women at low risk of developing cervical cancer: a preliminary study from a Turkish university hospital. *Eur J Gynaecol Oncol* 2003; 24:157-9.
18. Öztürk S, Kaleli I, Kaleli B, Bir F. Investigation of human papillomavirus DNA in cervical specimens by hybrid capture assay. *Mikrobiyol Bul* 2004; 38: 223-32.
19. Onan MA, Taskiran C, Bozdayi G, et al. Assessment of human papilloma viral load of archival cervical intraepithelial neoplasia by real-time polymerase chain reaction in a Turkish population. *Eur J Gynaecol Oncol* 2005; 26: 632-5.
20. Ergünay K, Mısıroğlu M, Pinar F, Tuncer ZS, Ustaçelebi S. Human papillomavirus DNA in cervical samples with cytological abnormalities and typing of the virus. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41:219-26.
21. Rota S, Biri A, Bozdayi G, Dinç B, Güner H. Farklı hasta gruplarında servikal biopsi ve sürüntü örneklerinde PCR ile genital human papillomavirus araştırması ve tip tayini. *Türk Mikrobiol Cem Derg* 2004; 34:185-9.
22. Fidan I, Bozdayi G, Rota S, Biri A, Çetin Gurelik F, Yuksel S, Imir T. The relationship between cervical human papillomavirus infection and apoptosis. *Clin Invest Med* 2008; 31: E168-E175.
23. Syrjanen K, Syrjanen S (eds). *Papillomavirus infections in human pathology*, pp: 1-615. 2000. John Wiley & Sons Inc., New York.
24. Syrjanen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol* 2004; 57: 449-55.
25. Syrjanen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 2005; 32: S59-S66.
26. Gungor A, Cincik H, Baloglu H, Cekin E, Dogru S, Dursun E. Human papilloma virus prevalence in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Laryngol Otol* 2007; 121:772-4.
27. Bozdayi G, Kemaloglu Y, Ekinci O, et al. Role of human papillomavirus (HPV) in clinical and histopathologic features of laryngeal and hypopharyngeal cancers. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2009; 38:119-25.

## HPV TANI VE TİPLENDİRMESİNDE MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Doç. Dr. Yasemin Bulut

*Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ.*

Human papillomavirus (HPV), *Papillomaviridae* ailesinde yer alan, çift iplikli sirküler DNA'ya sahip bir virustur<sup>1</sup>. Epitelyotropik bir virus olan HPV'nin yol açtığı lezyonlar genellikle lokalizedir ve kendiliğinden iyileşen ya da belirtisiz kalıcı enfeksiyonlar şeklinde seyretmektedir. Ancak bazı HPV tipleri kanser gelişiminde rol oynar. Günümüzde HPV, serviks kanseri başta olmak üzere, anogenital bölge, deri, üst solunum ve üst sindirim yolları kanserleri ile ilişkisi belirlenmiş olan onkojenik bir DNA virusu olarak değerlendirilmektedir<sup>1,2</sup>.

HPV'nin L1 proteinindeki DNA sekans bölgeleri baz alınarak yapılan filogenetik sınıflandırma neticesinde 120'den fazla genotipi belirlenmiştir. Bunlar kanserle ilişkilerine göre düşük (HPV tip 6, 11, 42, 43, 44, 53), orta (HPV tip 31, 33, 35, 39, 51, 52, 59 ve 68) ve yüksek riskli HPV (HPV tip 16, 18, 45, 56 ve 58) grupları olarak isimlendirilirler<sup>3</sup>. Serviks kanserlerinde tespit edilen HPV tiplerinin %70.7'sinde HPV-16 ve HPV-18 DNA'ları belirlenmiştir. Kalan yaklaşık %30'luk dilimde ise sırasıyla; HPV 45, HPV 58, HPV 31, HPV 33 ve HPV 52 varlığı tespit edilmiştir. Bu nedenle HPV tipleri içerisinde toplum sağlığı açısından HPV-16 ve HPV-18 en önemli tipler olarak değerlendirilmektedir<sup>3,4</sup>.

HPV ile serviks kanserleri arasında epidemiyolojik ilişkinin anlaşılmasından sonra, erken tanı ve tedavide kullanılmak üzere, bu virusun tespitine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Kadınlarda belirli bir yaştan sonra altı ayda bir yapılan Papanicolaou (Pap smear; cervical smear) tarama testleri, servikal kanserlerle mücadelede uzun yıllar etkili savaşım yaklaşımı olarak değerlendirilmiştir. Bu yaklaşım bugün dahi savaşımında önemlidir. Ancak yanlış negatif Pap testi sonuçları sıklıkla görülmektedir ve sonuçların değerlendirilmesi yoruma açıktır. Ayrıca bu yöntemde, adenokarsinomlar için atipik glandüler hücrelerin saptanması güçtür ve değerlendirmenin deneyimli bir sitolog tarafından yapılamaması durumunda tarama sonuçlarının izlemi yetersiz kalmaktadır. Diğer bir husus, Pap taramasında yanlış pozitiflikler sonucunda gereksiz, masraflı ve acı verici yaklaşımlara gidilmesidir. Bu nedenlerden dolayı tarama ile ilgili tartışmalar sık yapılır olmuştur<sup>5-8</sup>. Örneğin, Amerika Bileşik Devletleri'nde yılda 50–60 milyon Pap testinin yapıldığı, şüpheli durumlarda Pap testinden sonra kolposkopi ve LEEP (loop electrosurgical excision procedure) gibi yaklaşımlara başvurulduğu ve tüm bu işlemlerin maliyetinin altı milyar doları bulduğu kaydedilmektedir. Bahsedilen nedenlerden dolayı, günümüzde sitolojik tarama programları tek başlarına %100 etkili ve uygulanabilir program olarak değerlendirilmemektedir. Bu nedenle sitolojik tanıyı doğrulayacak ya da destekleyecek alternatif yaklaşımlar uzun yıllardır tartışılmaktadır.

HPV tiplerinin tamamına yakını in-vitro hücre kültürlerinde üretilmemektedir. Bu nedenle HPV tanısında, klasik virus izolasyonu ve tanımlanmasına yönelik virolojik yaklaşımlar mümkün olmamıştır. Ayrıca, immünoperoksidaz ve immüno Floresan yöntemleri gibi virusun izolasyonuna gerek olmaksızın kullanılan viral protein tespitine yönelik immünohistokimyasal yaklaşımlar ise HPV DNA varlığına rağmen, viral proteinlerin her zaman enfekte dokuda ifade edilmemesi nedeniyle sonuç vermez. Ek olarak, duyarlılıklarının düşük ve zaman alıcı olmaları da, bu metotların rutin kullanımlarını kısıtlayan diğer önemli faktörlerdir. Diğer bir yaklaşım olan tipe özgül antikorların tespiti ise, virusun konakta mevcudiyetinin ve enfeksiyonun durumunun belirlenmesinde bilgi sağlayamadığı için anlam ifade etmemektedir. Bu nedenle virusun izolasyonuna gereksinim duymayan ve az sayıda virusun varlığını belirleyen genom tespitine yönelik testlerin, HPV'nin tanı ve tiplendirmesinde kullanılması bir bakıma zorunluluktur. Günümüzde moleküler saptama metotları HPV'nin tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir. HPV'nin tanısında kullanılan moleküler yaklaşımlar 3 ana başlık altında toplanabilir<sup>9,10</sup>:

Direkt prob metotları: Bunlar, "Southern Transfer Hybridization" (STH), "Dot-blot Hybridization" (DB) ve "In-situ Hybridization" (ISH) gibi amplifikasyon gerektirmeyen yaklaşımlardır. Bu yaklaşımlardan STH, altın standart olarak kabul edilmekle birlikte, duyarlılığı oldukça düşüktür ve testin uygula-

ması uzun bir süre almaktadır. Dolayısıyla bu gruptaki yöntemlerin, emek-yoğun olduğu, kalifiye eleman gerektirdiği ve duyarlılığı düşük olan pahalı yaklaşımlar olduğu söylenebilir.

Sinyal amplifikasyon metotları: Bunlar, “Hybrid Capture Assay” (HC) gibi sinyal amplifikasyonla birlikte hibridizasyon aşamalarının kullanıldığı yaklaşımlardır. Bu grupta en iyi bilinen ve en yaygın olarak kullanılan “Digene HC2 HPV DNA Test” (Qiagen, USA), FDA tarafından lisanslandırılmış olan bir yaklaşımdır. HC2; HPV'nin düşük (6, 11, 42, 43, 44) ve yüksek riskli (16, 18, 31, 33, 35, 51, 58, 59 ve 68) tipleri için iki farklı RNA problemleri ile farklı renk üretme temelli olarak geliştirilmiş olan bir testtir. Testin DNA-RNA hibridlenmesi aşamasından sonraki adımları ise, bu hibrid yapıya bağlanan antikorun kullanıldığı yakalama aşaması ile kemilüminesans raportör ile işaretli antikorun kullanıldığı saptama aşamasıdır. Ticari olarak temin edilebilen FDA onaylı bu test miktar tayinine olanak sağlar; ancak sonuçlar sadece düşük ve yüksek riskli tipler olarak belirlenir. Bu nedenle de epidemiyolojik veri toplamada ve özellikle de aşı stratejisi belirlemeye yönelik çalışmalarda kullanımı sınırlıdır<sup>9</sup>.

Hedef amplifikasyon metotları: “Polymerase Chain Reaction” (PCR) ve “In-situ PCR” gibi hedef amplifikasyon yaklaşımları bu grupta yer almaktadır. Bu yaklaşımların tamamının, standardize edildikleri takdirde, duyarlılığı ve özgüllüğü oldukça yüksektir. Ayrıca bu metotlar farklı amaçlarla kullanım (viral yükün belirlenmesi ve tiplendirme) için rahatlıkla modifiye edilebilmektedir. Bu yaklaşımların dezavantajları PCR'da karşılaşılan standart olumsuzluklardır.

DNA temelli HPV testlerin birbirlerine farklı üstünlükleri olmakla birlikte, STH metodunda saptama için DNA'nın büyük miktarlarına ihtiyaç vardır ve metot uzun iş gücü gerektirir. ISH metodu ise HPV için orta derecede bir duyarlılığa sahiptir. HC testi HPV çalışmalarında en sık ve yaygın olarak kullanılan test olmasına rağmen, HPV DNA belirlemeye yönelik testlerin kendi aralarında duyarlılık yönünden kıyaslandıklarında en duyarlı olan yaklaşım PCR'dır. Özellikle gerçek zamanlı (real-time) kantitatif PCR (RQ-PCR)'ın duyarlılığı %99-100 gibi yüksek düzeydedir. HC testinin duyarlılığı ise PCR temelli testlere kıyasla düşük, direkt hibridizasyon testlerine kıyasla ise oldukça yüksektir. Bu testin duyarlılığı 1.0 pg hedef/ml olup, yaklaşık  $10^5$  virus partikülüne karşılık gelir. Son yıllarda, modifiye HC testlerinde saptama basamağı için avidin-biyotin sisteminin kullanılması, bu testi  $10^3$  miktarlardaki virusları belirleme duyarlılığına getirmiştir. Buna karşın RQ-PCR'da saptama limiti 10 virion düzeyindedir<sup>10-12</sup>.

HPV DNA'sının belirlenmesi amacıyla doku örneklerinin kullanımı yaygındır. Ancak örnek alma yönteminin invazif olması, belirli aralıklarla örnek almayı gerektiren HPV enfeksiyonlu kadınlar için caydırıcı olabilmekte ve örnek akışında ve taramalarda ciddi azalmalara yol açabilmektedir. Bu nedenle invazif örnek alma yöntemlerine alternatif yaklaşımların değerlendirilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Son yıllarda HPV testlerinin duyarlılığının artması ile birlikte invazif olmayan örneklerle çalışmaların sayısında da önemli artışlar olmaya başlamıştır<sup>12,13</sup>.

Yapılan patojenite çalışmalarında, viral yük ile kanser oluşumu ve hızlı gelişimi arasında ilişki bulunmuştur<sup>9-12</sup>. Bu çalışmalarla viral yükün belirlenmesine yönelik yaklaşımların değerinin anlaşılması ile birlikte bu amaca yönelik testlerin klinik uygulamaları artmıştır. Bu amaçla HC2 testinin de genel bir kanaat verdiği ifade edilse de, bu amaca yönelik olarak yapılması gereken en doğru ve en duyarlı yaklaşım RQ-PCR'dır. Bu şekilde, çoğaltılan PCR ürününün jelde göçüne gerek kalmaksızın renkli propların varlığı ile bilgisayar ortamında takip gerçekleştirilir. Bu yöntemin otomatize edilmiş olması, uygulama ve yorumunu kolaylaştırmaktadır. Bu yaklaşımın en önemli dezavantajı, diğer HPV testlerine kıyasla birim fiyatının daha yüksek olmasıdır<sup>13</sup>.

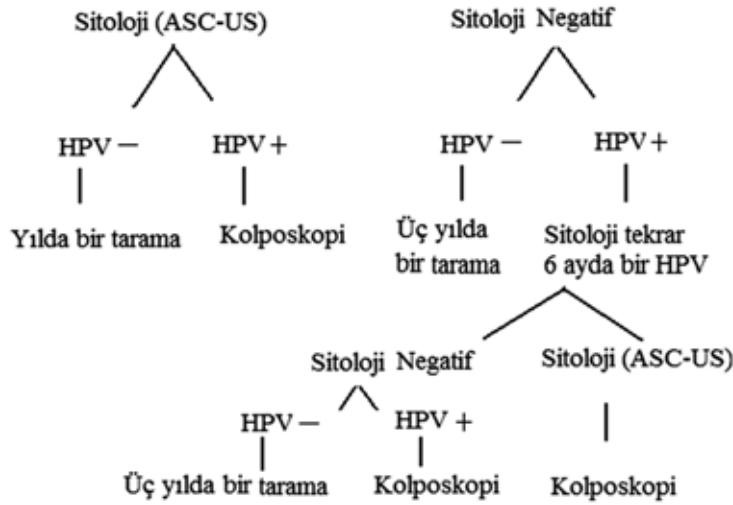
HPV'nin moleküler yöntemlerle araştırılmasındaki yeni yaklaşımlardan birisi de, DNA'dan ziyade HPV mRNA'sının belirlenmesidir. Viral RNA'nın belirlenmesi ile virusun ve hastalığın geçerli durumu hakkında kanaat edinilebilir<sup>13</sup>. Bu amaçla gerçekleştirilen test, ters transkripsiyonlu PCR (RT-PCR)'dır ve özellikle HPV genomunun E6 ve E7 gen kısımlarına yönelik mRNA'ların tespiti, virusun mevcut durumu veya enfeksiyonun üretken olup olmadığı hakkında önemli veri sağlamaktadır<sup>14</sup>.

HPV'ye karşı savaşında erken tanı ve tedavi kadar diğer önemli bir etkili yaklaşım da aşılama değildir. Zhou ve ark.<sup>15</sup>, 1991 yılında ökaryotik hücrelerde HPV-16'nın kapsid proteinleri olan L1 ve L2 genini çoğaltarak VLP (virus-like partikül) sentezlemişler ve aşı çalışmalarının başlatılmasında önemli bir adım atmışlardır. Daha sonraki yıllarda başka araştırmacılar VLP'yi saflaştırmışlar ve VLP'lerin morfolojik olarak doğal virionlara benzerlik göstermelerini belirlemişlerdir. Bu yapılar, günümüzde birçok ülkede kullanılan profilaktik (koruyucu) aşıların temelini oluşturmaktadır. Bir ülkede HPV aşılarının gerekliliğinin kabulü noktasında en önemli veriler, serviks kanserleri ile HPV tiplerinin epidemiyolojik ilişkisinin ortaya konmasıdır. Bu epidemiyolojik veriler ancak tiplendirmeye yönelik olarak gerçekleştirilen HPV testleri kullanılarak elde edilebilmektedir. Bu nedenle HPV moleküler testleri, özellikle de tiplendirmeye yönelik testler, sadece tanı amaçlı değil aşı stratejisinin oluşturulmasında da epidemiyolojik amaçlı kullanım için gereklidir. Yukarıda ifade edildiği üzere, HPV tiplendirilmesi yalnızca riskli genotipleri belirlemek amacıyla değil aynı zamanda aşı stratejini belirlemek amacıyla da önem arz etmektedir. Genotiplendirme amacıyla farklı metotlar kullanılmaktadır<sup>11-14</sup>. HC testleri ile tiplendirme, yalnızca düşük ve yüksek riskli gruplar olarak ayrımı sağlar ve genotipleri bireysel olarak ortaya koyamaz. Bu nedenle tiplendirme amacıyla kullanımı çok fayda getirmemektedir. Bu nedenle, yine DNA temelli olan, tiplendirme amaçlı olarak farklı yaklaşımlar kullanılmaktadır. Bu yaklaşımların birçoğunda tipler arasında farklı dizilimlere sahip olan ve filogenetik analize imkan tanıyan büyük kapsid proteinini kodlayan L1 gen bölgesi hedef alınır. Filogenetik ayrıma olanak tanıyan ve bu nedenle tiplendirmede hedef alınan diğer bölgeler ise E6 ve E7 gen bölgeleridir.

Genotiplendirme amacıyla en çok tercih edilen yaklaşım, konsensus PCR ile çoğaltılan gen kısmının RFLP (PCR-RFLP) veya "line prop assay" (PCR-LIPA) ile çalışılmasıdır. Genotipe özgül primerlerle gerçekleştirilen PCR ile de, RFLP veya LIPA gibi ek bir aşamaya gerek olmaksızın genotiplendirme yapılabilmektedir. PCR-LIPA yaklaşımı, klasik PCR işlemini takiben PCR ürünlerinin "Western blot" (WB) yöntemine benzer şekilde katı faz membrana transferi ve burada görüntülenmesi işlemi olarak özetlenebilir. Bu test ile HPV genotipleri yüksek duyarlılıkla belirlenebilmektedir. LIPA temelli olarak kullanılan ve ticari olarak temin edilen "Short PCR fragment 10-line probe assay" (SPF10-LiPA) veya INNO-LIPA gibi farklı sistemler bulunmaktadır<sup>16-18</sup>. LIPA temelli testlerin en önemli dezavantajı pahalı olmalarıdır. PCR-RFLP ise, öncelikle konsensus primerlerle çoğaltılan PCR ürünlerinin, daha sonra BamHI, HaeIII, HinfI ve PstI gibi restriksiyon endonükleazlarla kesilip, kesim ürünlerinin agaroz jelde kıyaslanması temeline dayanan bir metottur. Karışık enfeksiyonların olması durumunda, kesim ürünlerinin motiflerinin yorumlanmasında problemler yaşanır. Ayrıca bu test zaman alıcı ve çok emek isteyen bir sürece ihtiyaç duyar. Bu nedenle bu metodun, rutinde klinik amaçlı olarak kullanımı zordur; çoğunlukla bilimsel amaçlı çalışmalarda tercih edilir<sup>12,19</sup>. Genotiplendirmede kullanılan diğer bir yaklaşım da, PCR ürünlerinin sekanslanmasıdır. Oldukça etkili ve duyarlı bir yaklaşım olmakla birlikte, bu metodun klinik amaçlı kullanımı şu an için istenen düzeyde değildir. Ancak, yakın gelecekte "pyrosequencing", "biochip" veya "DNA microarray" gibi metotların daha pratik kullanımının geliştirileceği ve sekanslama temelli metotların yaygınlaşacağı beklenmektedir<sup>20-22</sup>.

HPV testleri, özellikle de moleküler temelli testlerin, yapılması gerekliliği ile ilgili bir tartışma gelişmiş ülkelerde bugün için yapılmamaktadır. Bu ülkelerdeki tartışmalar bu testlerin hangi durumlarda, hangi sıklıkla ve hangi sıra ile uygulanacağı noktasındadır. Tartışmaların bu boyutta seyretmesinin önemli sebeplerinden birisi, HPV testlerinin toplum taraması amacıyla yaygın kullanımından dolayı artan maliyetidir<sup>23</sup>. Yapılan çalışmalar, moleküler metotların birim fiyatının geleneksel metotların iki katı olduğunu göstermiştir<sup>23</sup>. Ancak, DNA temelli metotla elde edilecek verilerin geleneksel metotlardan elde edilen verilerle kıyaslanamayacak üstünlükleri dikkate alındığı zaman, iki kat fiyat önemsiz bir rakam olarak değerlendirilmektedir. Yine de bu fiyatlar dikkate alınarak moleküler testlerin gereksiz kullanımının önüne geçmek amacıyla, gerek 2002 yılında Amerika Kanseri Birliği'nin (American Cancer Society), gerekse Amerika Kolposkopi ve Servikal Patoloji Topluluğu'nun (American Society for Colposcopy and

Cervical Pathology) deklare ettiği rehberler dikkate alınarak farklı stratejiler uygulanmaya konmuştur<sup>24</sup>. Farklı uygulamalarına rağmen genel kabul gören yaklaşım, HPV DNA testlerin 30 yaşından sonra, sitoloji ile birlikte primer test olarak yapılmasıdır. 30 yaşın seçilmesinin en önemli sebebi, daha erken yaşlarda belirlenen virus varlığının 20'li yaşlardan sonra kendiliğinden kaybolma oranının oldukça yüksek seyretmesidir. Sitolojik incelemelerde negatif olan, ancak o an için HPV pozitif olabilen vakaların yüksek oranı da dikkate alınarak, sitolojinin tek başına yeterli olmayacağı düşünüldüğünden 30 yaştan sonra moleküler yaklaşımların primer test olarak uygulanması kabul edilmiştir. Diğer kabul gören ortak yaklaşımlardan birisi de; sitoloji ile ASC-US (önemi belirlenemeyen atipik skuamöz hücre; atypical squamous cells of undetermined significance) tanısının konması halinde, vakalarda HPV DNA taramasının 6-12 ayda bir gibi sürelerde tekrar edilmesi ve pozitiflik durumunda kolposkopiye baş vurulmasıdır. Bu konu ile ilgili genel kabul gören bir algoritma Şekil 1'de verilmiştir<sup>12</sup>.



Şekil 1. HPV testlerinin uygulamasına yönelik bir algoritma<sup>12</sup>

Sonuç olarak, gerek HPV'nin erken tanısı ve tedavisi gerekse koruyucu aşılama yönelik ulusal aşı stratejisinin belirlenmesi için HPV tiplerinin tespiti amacıyla HPV'nin tanı ve tiplendirilmesinde moleküler metotların kullanımı zorunludur. Ancak bu metotların altın standart olabilmesi için, seçilen yöntemin iyi şekilde standardize edilmesi ve kalifiye elemanlar tarafından çalışılması gerekliliği vardır. Ayrıca, amaca yönelik olarak kullanılacak, duyarlılığı yüksek ve fiyat olarak uygun testlerin seçimi de, moleküler tanisal metotların yaygınlaşmasında önemli olan diğer hususlardır.

#### KAYNAKLAR

- zur Hausen H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288: 55-78.
- Lazzari CM, Krug LP, Quadros OF, Baldi CB, Bozzetti MC. Human papillomavirus frequency in oral epithelial lesions. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 260-5.
- DeVilliers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17-27.
- Muñoz N, Bosch FX, Castellsagué X, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* 2004; 111: 278-85.
- Wenzel L. Defining and measuring reproductive concerns of female cancer survivors. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005; 2005 (34): 94-8.
- Rogstad KE. The psychological impact of abnormal cytology and colposcopy. *Br J Obstet Gynaecol* 2002; 109: 364-8.
- McIntosh N. Human papillomavirus and cervical cancer. JHPIEGO Strategy Paper No. 8; 2000. Available at: <http://www.reproline.jhu.edu/english/3cc/3refman/sphpv214.pdf>

8. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997; 102: 3-8.
9. Coutlée F, Mayrand MH, Provencher D, Franco E. The future of HPV testing in clinical laboratories and applied virology research. *Clin Diagn Virol* 1997; 8:123-41.
10. Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127:940-5.
11. Zaravinos A, Mammias IN, Sourvinos G, Spandidos DA. Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *Int J Biol Markers* 2009; 24:215-22.
12. Bhatla N, Moda N. The clinical utility of HPV DNA testing in cervical cancer screening strategies. *Indian J Med Res* 2009; 130:261-5.
13. Coutlée F, Mayrand MH, Roger M, Franco EL. Detection and typing of human papillomavirus nucleic acids in biological fluids. *Public Health Genomics* 2009; 12:308-18.
14. Tinelli A, Leo G, Pisanò M, et al. HPV viral activity by mRNA-HPV molecular analysis to screen the transforming infections in precancer cervical lesions. *Curr Pharm Biotechnol* 2009; 10:767-71.
15. Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, Frazer IH. Expression of vaccinia recombinant of HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly HPV virion-like particles. *Virology* 1991; 185: 251-7.
16. de Méndez MT, Bosch AL. Detection and genotyping of human papillomavirus DNA using polymerase chain reaction short PCR fragment 10-line probe assay in abnormal Papanicolaou-stained cervicovaginal smears. *Acta Cytol* 2009; 53:540-7.
17. Tan SE, Garland SM, Rumbold AR, Tabrizi SN. Human papillomavirus genotyping using archival vulval dysplastic or neoplastic biopsy tissues: comparison between the INNO-LiPA and linear array assays. *J Clin Microbiol* 2010; 48:1458-60.
18. Galan-Sanchez F, Rodriguez-Iglesias MA. Comparison of human papillomavirus genotyping using commercial assays based on PCR and reverse hybridization methods. *APMIS* 2009; 117:708-15.
19. Nobre RJ, de Almeida LP, Martins TC. Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. *J Clin Virol* 2008; 42:13-21.
20. Travasso CM, Anand M, Samarth M, Deshpande A, Kumar-Sinha C. Human papillomavirus genotyping by multiplex pyrosequencing in cervical cancer patients from India. *J Biosci* 2008; 33:73-80.
21. Rajeevan MS, Swan DC, Duncan K, Lee DR, Limor JR, Unger ER. Quantitation of site-specific HPV 16 DNA methylation by pyrosequencing. *J Virol Methods* 2006; 138:170-6.
22. Gharizadeh B, Oggionni M, Zheng B, et al. Type-specific multiple sequencing primers: a novel strategy for reliable and rapid genotyping of human papillomaviruses by pyrosequencing technology. *J Mol Diagn* 2005; 7:198-205.
23. Méréa E, Le Galès C, Cochand-Priollet B, et al. Cost of screening for cancerous and precancerous lesions of the cervix. *Diagn Cytopathol* 2002; 27:251-7.
24. Solomon D, Papillo JL, Davey DD. Statement on human papillomavirus DNA test utilization. *Cytopathology Education and Technology Consortium. Arch Pathol Lab Med* 2009; 133:1276-7.



## HPV'DE PATOLOJİK, SİTOPATOLOJİK TANI YAKLAŞIMI

Prof. Dr. Alp Usubütün

*Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Ankara.*

Cinsel temas ile bulaşan hastalıklar içerisinde en sık görülen ve en fazla maddi kayba neden olan HPV, tüm omurgalı türleri enfekte ederek skuamoz epitelyal tümörlere neden olur. Farklı HPV tipleri değişik lokalizasyonlarda ve farklı tiplerde lezyonlara neden olurlar. HPV'lerin bir kısmı deride lezyon oluştururken, diğerleri mukozalarda (ağız ve serviks) lezyon yapar. Bir kısmı öncül lezyonlar ve kanserde bulunurken (yüksek riskli tipler) diğerleri bu lezyonlarda bulunmazlar (düşük riskli tipler). Ancak yüksek riskli tipler ile oluşan lezyonların büyük kısmının da kendiliğinden kaybolduğu unutulmamalıdır.

Kanser oluşturan HPV tipleri serviks kanserlerinin tamamına yakınından (%99), anal kanserlerin %85'inden, vajen kanserlerinin %70'i, penis kanserlerinin %47'si, vulva %40, orofarenks kanserlerinin %36, oral kavite kanserlerinin %36'sından sorumludur. Çeşitli organ ve sistemlerde benign ve malign neoplazmlara neden olabilen HPV'nin doku üzerinde oluşturduğu patolojik etkisi en çok kadın genital sisteminde çalışılmıştır. Bu nedenle özellikle kadın genital sistemi üzerinde olan histolojik etkilerinden söz edilecektir.

Servikste kanser gelişimine yol açan öncül lezyonlar 1800'lerin sonunda tanımlanmış, bilgi birikimi doğrultusunda sürekli olarak yeniden sınıflandırılmaya çalışılmıştır. Kanser gelişimi, bilindiği gibi moleküler düzeyde hücre içinde oluşan bir mutasyon ile başlar ve daha sonra buna eklenen mutasyonlar basamak basamak kanser oluşmasına yol açar. Daha açık bir ifade ile kanser gelişimi çok basamaklı bir süreçtir. Bu moleküler düzeyde oluşan değişikliklere morfolojik düzeyde de değişiklikler eşlik eder. Bu da bize, öncül lezyonların saptanması yolu ile daha kanser gelişmeden tanı koyma şansı verir. Günlük uygulamada servikal sitolojik tarama sayesinde, servikal lezyonları daha kanser gelişmeden öncül lezyon aşamasındayken yakalayabilme şansı verir.

### Servikal Öncül Lezyonların Sınıflandırılması

1886 yılında Sir John Williams invazif serviks tümörlerine komşu epitelde normalden farklı değişiklikler olduğunu saptamıştır. 1900'de Cullen, serviks epitelinde meydana gelen bu değişikliklerin tümördekine benzer olduğunu fark etmiş; 1930'da Broders "Karsinoma insitu" terimini yeniden tanımlamıştır. Daha sonra epiteldeki bu değişiklikleri takiben kanser geliştiği görülmüş ve bu lezyonlar ile kanser arasında ilişki olduğu ortaya konmuştur.

Bu değişikliklerin sitolojik olarak da tanınabileceğinin anlaşılması, sitolojik tarama programlarının başlamasını sağlamıştır. Yıllar içerisinde bu konuda biriken deneyim, bazı hücrelerde görülen atipik değişikliklerin daha hafif derecede olduğunu göstermiştir. 1956 yılında Reagan, karsinoma insitu ile normal hücre arasındaki spektrumda yer alan hücresel değişiklikler için "displazi" terimini, Koss ise HPV enfeksiyonu için karakteristik "koilositotik atipi"yi tanımlamıştır. Bu yıllarda, biyolojik olarak farklı davrandığı düşünülen iki gruptan "displazi" tanısı alanlara tedavi verilmemiş, buna karşın "karsinoma insitu" tanısı alanlara histerektomi uygulanmıştır. Ancak o günden beri, bu iki grubun aslında morfolojik olarak çok kolay ayrılamadığı ve tanılarının belirgin "inter ve intra observer" değişkenlik gösterdiği görülmüştür.

Daha sonra 1960'ların sonunda displazi ve karsinoma insituda görülen değişikliklerin benzer olduğu, her ikisinin de monoklonal ve anaploid DNA içerdiği ve bu nedenle tüm lezyonların serviks karsinomunun öncülü olduğu ve tek bir hastalığın spektrumunu gösterdiği öne sürülmüştür. Bu, servikal öncül lezyonların tanımlanmasında ilk paradigma değişikliğidir. Dolayısıyla 1970 ve 1980'lerde yaygın kullanılan CIN (Cervical Intraepithelial Neoplasia; servikal intraepitelyal neoplazi) terimi, tüm lezyonların kanserin öncülü olduğu ve basamaklı olarak kansere gittiği tezi üzerine kurulmuştur. Bu hipoteze göre, epitelin 1/3 alt kısmını tutan lezyonlar CIN 1 (hafif displazi), 2/3 alt kısmını tutan lezyonlar CIN 2 (orta displazi), 2/3'den fazla

tutulmuş gösteren lezyonlar CIN 3 (şiddetli displazi) olarak adlandırılır. Tüm lezyonlar, aynı sürecin değişen şiddetteki basamakları olarak kabul edildiklerinden, tüm CIN tanılı hastalar tedavi edilmişlerdir.

HPV'nin etken ajan olduğunun ortaya konması ve özellikle düşük riskli HPV tiplerinin kansere progresyon göstermediklerinin bulunması paradigmayı yine değiştirmiştir. "Squamous Intraepithelial Lesion" (SIL) olarak tanımlanan bu hipotezde, lezyonlar HPV'ye bağlı 2 farklı hastalığı temsil etmektedir. Bunlardan birisi; HPV'nin kansere dönüşüm riski düşük olan "düşük dereceli skuamoz intraepitelyal lezyonlar" (LSIL), -ki bunların HPV'ye bağlı enfeksiyon olduğu düşünülmektedir-, diğeri ise kansere dönüşme riski yüksek olan, gerçek öncül lezyon "yüksek dereceli skuamoz intraepitelyal lezyon" (HSIL) olarak adlandırılır. Bu sınıflamanın bir diğer özelliği de; yassı kondülom, ekzofitik kondülom ve immatür kondülom gibi bazı lezyonlar CIN terminolojisi dışında tutulurken, HPV'nin tümünde etken ajan olduğunun saptanması ile bu lezyonlar da SIL terminolojisi içinde LSIL olarak sınıflanmaya başlamıştır.

Bethesda sınıflaması olarak bilinen bu terminoloji, özellikle sitolojik tanıda kullanıma girmiştir. Aynı sınıflama patolojik tanıda da kullanılmaktadır. Bu sınıflamanın detaylarını burada tartışmak amacın dışındadır, ancak HPV ile ilişkili servikal lezyonların sitolojisinden söz ederken ASCUS (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance) tanımından söz etmekte yarar vardır. Sitolojik değerlendirmede hücresel değişiklikler benign inflamatuvar veya diğer reaktif değişikliklere tam olarak uymuyor, ancak skuamoz intraepitelyal lezyon tanısı için yetersiz kalıyor ise ASCUS olarak tanımlanmaktadır. Bu grup hastalar detaylı araştırıldığında, bir kısmında öncül lezyonlar saptanırken, bazılarında hiçbir patoloji görülmemektedir. Kliniği en çok zorlayan hasta grubunu oluşturmasının bir diğer nedeni de, bu grup hastaların tanısında gözlemciler arası uyumunun çok düşük olmasıdır.

Servikal glandüler neoplazilerin gelişiminde de HPV'nin rolü olmakla beraber, lezyonun gelişim basamakları skuamoz lezyonlardaki gibi tam olarak tanımlanmamıştır ve düşük dereceli lezyonun karşılığı yoktur.

### HPV Tipleri ve Lezyon İlişkisi

HPV'nin bazı tiplerine belli lezyonlarda daha sık rastlanmaktadır. İnvazif karsinom ve HSIL geliştirme riskleri tamamen HPV tipleri ile ilişkilidir. Tip dağılımları belirgin bölgesel farklılık göstermekle beraber, kanser olgularının yarısı ile ilişkili olan HPV tip 16'dır. Yüksek riskli HPV tipleri kanserlerin ve HSIL olgularının yaklaşık %90'ından sorumludur. Kanser ve HSIL olgularının yarısında HPV-16 etken ajandır. LSIL olgularında sık görülen HPV-6 ve -11 kanser olgularında neredeyse hiç rastlanmaz.

Adenokarsinomlarda HPV-16 en sık görülen tip olmakla beraber, HPV-18 adenokarsinomlarda skuamoz lezyonlara göre daha sık görülür. Buna karşın küçük hücreli nöroendokrin karsinom olgularının tamamı HPV-18 ilişkilidir. LSIL olgularının yarısında yüksek riskli HPV tipleri etken ajan olarak saptanabilmektedir. Yani HSIL olgularının büyük kısmı 16, 18, 31, 33 ve 45 gibi tipler ile sınırlıyken, LSIL oldukça heterojen bir grup tarafından oluşturulmaktadır. "Neden bazı yüksek riskli HPV tiplerinin düşük riskli lezyonlar yaptığı" ise yanıtlanması gereken önemli bir sorudur. HPV alt tip varyantlarının etkisi, etkilenen hücre tipi, konakçı özelliklerinin gelecekte lezyonun karakterini belirleyebileceği tartışılmaktadır.

Genital siğillerin %90'ından HPV-6 ve -11 sorumludur. HPV-6 bu lezyonların 2/3'ünü, HPV-11 ise 1/3'ünü oluşturur. Morfolojik olarak değişik mukozal yüzeylerdeki benzer lezyonlar, benzer tip HPV'ler tarafından oluşturulur. Laringeal ve konjonktival papillomlarda da HPV tip 6 ve 11 siktir. Ancak aynı HPV tipleri bazen farklı histolojik özellikler de gösteren lezyonlara neden olabilirler. Servikste gelişen ekzofitik kondülom (kondüloma akkümümatum) ve immatür kondülomun (skuamoz papillom) her ikisi de HPV tip 6 ve 11 etkisi ile gelişirken farklı morfolojik görünüm sergilerler.

Kütanöz lezyonlardan plantar siğilde HPV-1, genel olarak siğillerde HPV-2 ve -4, ender görülen diğer bir deri lezyonu olan epidermodysplasia verruciformis (EV) de çok sayıda HPV tipinin varlığı bilinmektedir. İlginç olarak kansere ilerleyen EV olgularında etken sıklıkla HPV-5 veya -8 olmaktadır.

Dolayısıyla HPV tipinin, her lezyonda toplum içinde yaygınlığının ve dağılımının bilinmesi, tarama ve aşı programlarının geliştirilmesi için önemli bir yer tutmaktadır.

### **Servikal Karsinogenez Modeli ve Morfolojik Değişiklikler**

Serviks kanserleri gelişimi için HPV'nin transformasyon zonundaki "rezerv/kök/bazal" hücreyi enfekte etmesi gerekir. Bu bölgede sadece bazal hücrelerin çoğalma potansiyeli vardır. HPV gen ekspresyonu ise proliferatif aktivitesini kaybetmiş hücrelerde olur. Prodüktif enfeksiyonlarda genom, E1 proteini tarafından epizomal formda tutulur. E1 tam olarak eksprese edilemediğinde, epizomal form kaybolur ve konakçı DNA'sına entegre olur. DNA'ya entegrasyon E2, E4 ve E5'in kaybı veya fragmentasyonuna yol açar. Fragmente E2 proteini, E6 ve E7 üzerindeki baskılayıcı etkisini kaybeder ve bu proteinler artar. Prodüktif enfeksiyonlarda, gen ekspresyonu farklılaşmaya başlayan hücrelerde sıkıca kontrol edilir ve proliferere olma yeteneğini kaybetmiş bu hücrelerde meydana gelen değişiklikler sonucu düşük dereceli SIL oluşur. Nükleer büyüme ve hiperkromazi ile karakterize "koilositotik atipi" sadece farklılaşma gösteren bu hücrelere sınırlıdır. Koilositotik atipi, E6 ve E7'nin konak DNA sentezini aktive etmeleri ile oluşur. Süreç tam olarak ortaya çıkmaz ise, nükleer değişikliklerde daha hafif derece olur (ASCUS). Sitoplazmik şeffaflanma ise, E4 protein ekspresyonunun sitokeratinde yaptığı değişiklikler sonucudur.

Yüksek dereceli SIL'lerde bazal hücre benzeri hücrelerin proliferasyonu vardır. Bu lezyonlarda farklılaşma ve erken gen ekspresyonu arasındaki ilişki kaybolur. E2'nin E6 ve E7 üzerindeki etkisinin kaybolması, bölünme potansiyeli olan hücrede proliferasyona neden olur. Böylece epitel katmanları boyunca skuamöz matürasyon göstermeyen, bazal hücrelere benzer hücreler giderek çoğalır. Bu hücrelerde farklılaşma ve prodüktif viral enfeksiyon görülmez. Görüldüğü gibi hem morfolojik hem de klinik olarak farklı iki lezyon ile karşı karşıyayız.

Servikal lezyonların tanısında altın standart servikal biyopsidir, ancak örnekleme ve tanı hataları nedeniyle HSIL olgularının %30-50'si gözden kaçmaktadır. Hem sitolojide hem de biyopsi tanısında, gözlemciler arası ciddi uyumsuzluklar olabilmektedir. Bu durum sitolojide en çok ASCUS tanısında ortaya çıkarken, biyopsilerde en çok LSIL ile reaktif değişikliklerin ayırımında patoloğlar arası uyumsuzluklar yaşanmaktadır. HPV veya p16 varlığının araştırılması morfolojik tanıya ek destek sağlayıp uyumsuzlukları azaltabilir.

### **Diğer HPV ilişkili Kanserler**

HPV'nin vulva neoplazileri ile ilişkisi bilinmektedir. Vulvada gelişen karsinomların yaklaşık %40'ı HPV ile ilişkili olup genç hastalarda görülür ve karakteristik olarak "warty" ve/veya "basilioid" morfoloji gösterir. HPV ile gelişen öncül lezyonlar (klasik VIN), HPV'den bağımsız gelişenlerden (iyi diferansiye VIN) farklıdır. HPV'den bağımsız gelişen vulva kanserleri ise ileri yaşta görülüp, iyi diferansiye morfolojidedir. Baş-boyun bölgesi kanserlerinin yaklaşık %35'i HPV ile ilişkilidir. Bu bölge kanserlerinin büyük kısmı HPV tip 16 ve 18 tarafından oluşturulur; diğer tipler çok seyrektr. İlginç olarak HPV ile ilişkili baş-boyun kanserlerinin daha iyi prognoza sahip oldukları bildirilmektedir. Deri kanserleri, epidermodysplasia verruciformis (EV) ile ilişkili HPV tipleri kanser gelişiminde rol alabilir. Bunların büyük kısmı melanoma dışı deri kanserleri olup, genellikle skuamöz hücreli karsinomlar veya bazal hücreli karsinomlardır. Deri kanserlerinde primer etken güneş ışığı olmakla beraber, HPV tip 5 ve 8 kofaktör olarak rol oynayabilir. Penil kanserlerde, sıklıkla HPV tip 16, 18, 31, 33, 45 gibi serviks kanserlerine benzer bir dağılım görülmektedir. HPV ile ilişkili bu tümörler genellikle morfolojik olarak "warty" veya "bazoloid" morfolojidedir. Konjonktival karsinomlar ve displazilerde HPV'nin rolü olabileceğine dair ipuçları vardır.

## KAYNAKLAR

1. Crum CP, Rose PG. Cervical squamous neoplasia, PP: 306-10. In: Crum CP, Lee KR (eds), Diagnostic Gynecologic and Obstetric Pathology. 2006, 1st ed. Elsevier Saunders, Philadelphia.
2. Crum CP. Contemporary theories of cervical carcinogenesis: the virus, the host, and the stem cell. *Mod Pathol* 2000; 13:243-51.
3. Crum CP. Female genital tract, PP: 1035-91. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL (eds), Robbins Pathologic Basis of Disease. 1999, W.B.Saunders Company, Philadelphia.
4. Jo VY, Mills SE, Stoler MH, Stelow EB. Papillary squamous cell carcinoma of the head and neck: frequent association with human papillomavirus infection and invasive carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2009; 33:1720-4.
5. Miralles-Guri C, Bruni L, Cubilla AL, Castellsagué X, Bosch FX, de Sanjosé S. Human papillomavirus prevalence and type distribution in penile carcinoma. *J Clin Pathol* 2009; 62:870-8.
6. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006; 24 (Suppl 3):S3/1-10.
7. Newsletter on human papillomavirus. No.20. [www.hpv.com](http://www.hpv.com)
8. Stoler MH. Human papillomavirus biology and cervical neoplasia: implications for diagnostic criteria and testing. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 935-9.
9. Stoler MH. Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis. *Int J Gynecol Pathol* 2000; 19:16-28.
10. Thomison J 3rd, Thomas LK, Shroyer KR. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 2008; 39:154-66.
11. Usubütün A, Alemany L, Küçükali T, et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer specimens from Turkey. *Int J Gynecol Pathol* 2009; 28:541-8.
12. Wright CT, Ferenczy A, Kurman JR. Carcinoma and other tumors of the cervix, pp: 325-81. In: Kurman RJ (ed), Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. 2002, Springer, New York.
13. Yıldız IZ, Usubütün A, Firat P, Ayhan A, Küçükali T. Efficiency of immunohistochemical p16 expression and HPV typing in cervical squamous intraepithelial lesion grading and review of the p16 literature. *Pathol Res Pract* 2007; 203:445-9.

**PANEL 7 GENOMİK VE PROTEOMİK KATKILARIYLA FUNGAL ENFEKSİYONLAR İÇİN TANIMLANAN YENİ VE POTANSİYEL TANI BELİRTEÇLERİ**

## GENOMİK VE PROTEOMİK ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN YÖNTEMLER

Prof. Dr. Meltem Yalınay Çırak

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

Moleküler biyolojik tekniklerin hızla ilerlemesi ile hücresel düzeydeki her türlü bilgi ve değişiklik günümüzde detaylı olarak ortaya konabilmektedir. Bu teknikler, DNA'nın genomu (**genomik**) ve DNA'nın epigenetik modifikasyonlarının incelenmesini (**epigenomik**); RNA'nın transkriptom (**transkriptomik**) ve protein ifadenmesi (**proteomik**) analizleri ile karmaşık protein yapılarını ve protein-protein etkileşimleri (**interaktomik**) ile organizmadaki fizyolojik ifadenmenin sistematik olarak çalışılmasını sağlamaktadır<sup>1,2</sup>. Moleküler yöntemlerin mikrobiyoloji alanında en önemli fayda sağladığı alanların başında patogenezi aydınlatılması gelmektedir. “Omik” tekniklerin kullanımıyla, **patogenomik** ve **karşılaştırmalı genomik** kavramları klinik mikrobiyolojide yerini bulmuştur. Her bir “omik” teknolojisi ile elde edilen verilerle birçok sonuca ulaşılabılırken, esas olan bunların bir araya getirilmesi ve mikroorganizmanın hücresel davranışı ile ilgili genel bir bakış açısı kazanılabilmektedir. Genom ve vital verilerin en iyi şekliyle ortaya konduğu proteom kavramı ile ilişkili yöntemler aşağıda gözden geçirilmiştir.

### Genomik

Belirli bir organizmada bulunan genlerin toplamını (genom) incelemek için kullanılan yöntemlerin tümüdür. Genomik; genomların yapı, içerik ve gelişimlerini inceler, bu nedenle gen ve proteinlerin hücre ve tüm organizma düzeyinde anlatımlarını araştırır<sup>3</sup>. Genomik çalışmalarda kullanılan yöntemler, esasen genomun yapısı, genomdaki polimorfizm ve mutasyonların aydınlatılmasını sağlamayı amaçlar<sup>4-9</sup>. Bu yöntemler aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- Polimeraz zincir reaksiyonunun kullanıldığı yöntemler: Gerçek zamanlı, multipleks, konsensus, v.b.
- Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)'na dayalı yöntemler:
  - ◊ PCR-RFLP: PZR ve restriksiyon enzimleri ile kesilen parça uzunluk polimorfizm analizi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
  - ◊ REP-PCR: Birçok kopyada bulunan dizilerin hedef olarak PZR parmak izi çalışmalarında kullanılması (Repetitive Extragenic Palindromic; tekrarlayan ekstrasjenik palindromik diziler)
  - ◊ RAPD: Rastgele amplifiye edilen polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA)
  - ◊ AFLP: Amplifiye parça uzunluk polimorfizm analizi (Amplified Fragment Length Polymorphism)
- PFGE: Değişken alanlı jel elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis)
- DNA dizi analizi ve dizi analizine dayalı yöntemler
  - ◊ MLST: Multilokus dizi tiplendirmesi (Multilocus Sequence Typing)
  - ◊ Pirosekanslama
- DNA çip (mikroarray) yöntemleri
  - ◊ Gen ifadenmeleri
  - ◊ Tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs)

Genomik yaklaşımla sayısız genom, dizi analizi ile birçok gen aydınlatılmıştır. Ancak bir teknoloji tek başına organizmadaki fizyolojik yolların anlaşılması için yeterli olmaz. Genom, hastalıkların moleküler temelini araştırılması için geçmiş çalışmalarda üzerinde en çok durulan konu iken, genlerle kodlanan bilginin mRNA olarak transkripsiyonu ile ortaya çıkan transkriptom ve bunun da işlenip, modifiye edilip birçok proteini üretmek üzere translasyonu sonucu ortaya çıkan proteom kavramları, farklı çevre koşullarına yanıt olarak organizmanın fizyolojik durumunu doğrudan gösterebilme konusunda çok yararlı olmaktadır<sup>10-13</sup>.

## Proteomik

Proteomik ve proteom terimleri 1995'de ortaya konmuştur<sup>14</sup>. Karmaşık ve fazla miktarda olan genom dizi analizi verilerinden sonra ortaya çıkmıştır. Belli bir zamanda, belli bir hücrede, belli bir dokuda, belli bir organizmada bulunan gereken tüm biyokimyasal tepkimeleri yürüten proteinlerin tamamına proteom denir. Proteomik, belli bir organizmada bulunan proteinlerin toplamını incelemek için kullanılan yöntemlerin tümüdür. Proteomik analizi vital veriler sağlar, zira proteinlerin direkt etkisini ortaya koyar<sup>15</sup>. Proteomikler belirli bir hücre içinde bütün veya seçilen proteinlerin tanımlanmasına ve protein ağındaki bilgi akışına olanak sağlar<sup>16</sup>. Proteomik ifadenmesinin belirlenmesinde en sık kullanılan yöntemler şunlardır<sup>14-21</sup>:

- ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
- İki yönlü elektroforez (2D-PAGE; Polyacrylamide gel electrophoresis)
- Doku ve protein çip teknolojisi (Mikroarray)
- Kütle spektrometresi
  - ◊ MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight Mass Spectrometry)
  - ◊ SELDI-TOF MS (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight Mass Spectrometry)
- Kantitatif kütle spektrometresi
- Lazer yakalama mikrodiseksiyon (LCM; Laser Capture Microdissection)
- Protein-protein, protein-DNA bağlanma reaksiyonları
  - ◊ Afinite kromatografisi
  - ◊ Floresans rezonans enerji transferi (FRET)
- Peptid ve proteinlerin üç boyutlu incelenmesi
  - ◊ X- ışını kristalografisi
  - ◊ Nükleer manyetik rezonans

Bu yöntemler arasında en sık kullanılanlar iki yönlü elektroforez ve kütle spektrometresi yöntemleridir. İki yönlü elektroforez (2D-PAGE), proteinleri hem kütle hem elektrik yüklerine göre ayıran bir yöntemdir. Protein ekspresyonlarının karşılaştırılması ve tanımlanması için kullanılmıştır. Başlangıç materyali olarak fazla miktarda proteine gereksinim duyar. Düşük yoğunlukta proteinleri saptama ve tanımlamada güvenilir değildir.

MALDI-TOF MS, 1980'lerin sonunda Alman ve Japon bir grup tarafından bulunmuştur. MALDI-TOF yöntemi, proteinleri peptid kütle parmak izi ile tanımlar. Örnekler kütle spektrometreye pasif bir proba sunulur. Matriks-enerji absorbe eden bileşik laser enerjisi termal enerjiye çevirir ve desorpsiyon/iyonizasyon işlemini kolaylaştırır. Analitik varyasyonların fazla olması nedeniyle klinik geçerliliğindeki başarı düşüktür<sup>16-17</sup>. SELDI-TOF MS yöntemi ise, 1990'ların başında T. William Hutchens ve Tai-Tung Yip tarafından geliştirilmiştir. Gaz haline gelmeyen bileşiklerin desorpsiyon/iyonizasyon yöntemi ile çalışılmasında, örneği sunan yüzey, çalışılan örneğin ekstraksiyon, sunum, yapısal modifikasyon, amplifikasyon ve/veya iyonizasyonunda aktif rol oynar. Dakikalar içinde, çalışılan örneğin alt proteomları proteomik parmak izi gibi görüntülenebilir. Bu yöntem çok yüksek çıktılı olup, veriler dakikalar içinde alınır. SELDI-TOF MS yöntemi ile geniş grup çalışmaları için birkaç saatte sonuç alınırken, bu süre 2D-PAGE'de günler almaktadır<sup>18</sup>.

Birçok yöntemin proteomik kantitasyonu için, kantitatif kütle spektrometre teknikleri ile bir arada kullanılması, genomun proteom ifadenmesini daha açık ortaya koyabilmektedir. Sıvı kromatografisi ve kütle spektrometre esaslı teknikler ile izotopla işaretli nitrojen, aminoasit, peptid kullanılan birçok göreceli ve mutlak sonuçlar veren yöntemler üzerinde son yıllarda yoğun çalışmalar yapılmaktadır<sup>19-21</sup>.

Proteomik tekniklerinin kullanıldığı çalışma alanları ve güncel klinik araştırma konuları aşağıdaki gibi özetlenebilir<sup>3,9,11,16</sup>:

1. Ekspresyon farklılık haritalanması
  - a. Hedef keşfi ve doğrulama
  - b. Hastalık izlemi (ilaç etkinlik çalışmaları)
  - c. Toksikoloji
  - d. Klinik tanı
  - e. Farmakokinetik
2. Protein saflaştırma ve tanımlama
  - a. Saflaştırma geliştirilmesi ve monitorizasyon
  - b. Peptid haritalama
  - c. Sekanslama
  - d. Epitop haritalama
3. Etkileşim keşif haritalanması
  - a. Immunoassay geliştirme ve görüntüleme
  - b. Reseptör-ligand deneyleri
  - c. Protein-protein etkileşimleri
  - d. DNA-protein etkileşimleri

### Genomik, Proteomik ve Fungal Enfeksiyonlar

Mikrobiyolojik tanı, hızlı moleküler genetik çalışmalardan çok yararlanmaktadır. Birçok laboratuvar da genomik teknikler kullanılarak, doğrudan hasta örneğinden en güç üreyen mikroorganizmalar bile rutin olarak tanımlanabilmektedir. Patogenomik yaklaşımla, genom dizi analizi ile elde edilen bilgiden yararlanarak enfeksiyon hastalıklarına neden olan genlerin tanımlanması sağlanabilmektedir. Bu amaçla kullanılan en etkili yöntemlerin başında karşılaştırmalı genomik kavramı gelmektedir. DNA, RNA ve protein ifadenme yollarının çalışılması fungal etkenlerin moleküler ve fizyolojik mekanizmalarının anlaşılabilmesi için de çok önemli katkılar sağlamaktadır<sup>22-26</sup>. Patogenomik ve karşılaştırmalı genomik değerlendirmeleri, gelişen genomik teknikler ve biyoinformatik yöntemlerin bir arada ele alınması ile, genomik plastisite ortaya konulabilecek ve yaşamı tehdit eden patojenlere karşı, daha doğru tanı, tedavi ve koruyucu yaklaşımlar sağlanabilecektir<sup>23-26</sup>.

### KAYNAKLAR

1. Gilbert GL. Molecular diagnostics in infectious diseases and public health microbiology: cottage industry to postgenomics. *Trends Mol Med* 2002; 8: 280-7.
2. Vlaanderen J, Moore LE, Smith MT, et al. Application of OMICS technologies in occupational and environmental health research; current status and projections. *Occup Environ Med* 2010; 67:136-43.
3. Gilbert GL, James GS, Sintchenko V. Culture shock. Molecular methods for diagnosis of infectious diseases. *Med J Aust* 1999; 171: 536-9.
4. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1661-9.
5. Magee JT, Fox JD, Stubbs SL. Cashing in your chips: speculation on the future of diagnostic laboratories in the era of DNA chips. *J Med Microbiol* 2001; 50:111-5.
6. Aitman TJ. DNA microarrays in medical practice. *BMJ* 2001; 323: 611-5.
7. Cummings CA, Relman DA. Using DNA microarrays to study host-microbe interactions. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 513-25.
8. Moutsinger AA, Haas DW, Hulgren T, Ritchie MD. Human genomic association studies: a primer for the infectious diseases specialist. *J Infect Dis* 2007; 195:1737-44.
9. Lundstrom K. Structural genomics and drug discovery. *J Cell Mol Med* 2007; 11: 224-38.
10. Özcengiz G. Proteomik: Post-Genomik Dönemin En Güçlü Teknolojisi. İnovasyon Forum 2007, Sayı: 40. Available at: <http://www.bsn-anatolia.org.tr/inovasyon/index.php?sayi=40>

11. Singh OV, Nagaraj NS. Transcriptomics, proteomics and interactomics: unique approaches to track the insights of bioremediation. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2006; 4:355-62.
12. Griffin JL. The Cinderella story of metabolic profiling: does metabolomics get to go to the functional genomics ball? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361:147-61.
13. Park SJ, Lee SY, Cho J, et al. Global physiological understanding and metabolic engineering of microorganisms based on omics studies. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 68: 567-79.
14. Banks R E, Dunn MJ, Hochstrasser DF, et al. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet* 2000; 356: 1749-56.
15. Stein LD. Human genome: end of the beginning. *Nature* 2004; 431:915-6.
16. Azad NS, Rasool N, Annunziata CM, Minasian L, Whiteley G, Kohn EC. Proteomics in clinical trials and practice: present uses and future promise. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5:1819-29.
17. Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 2006; 312:212-7.
18. Engwegen JY, Gast MC, Schellens JH, Beijnen JH. Clinical proteomics: searching for better tumour markers with SELDI-TOF mass spectrometry. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27:251-9.
19. Elliott MH, Smith DS, Parker CE, Borchers C. Current trends in quantitative proteomics. *J Mass Spectrom* 2009; 44:1637-60.
20. Matthiesen R, Carvalho AS. Methods and algorithms for relative quantitative proteomics by mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 2010; 593:187-204.
21. Li X, Pizarro A, Grosser T. Elective affinities--bioinformatic analysis of proteomic mass spectrometry data. *Arch Physiol Biochem* 2009; 115:311-9.
22. Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, et al. Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *J Clin Microbiol* 2003; 41:324-9.
23. Demuth A, Aharonowitz Y, Bachmann TT, et al. Pathogenomics: an updated European Research Agenda. *Infect Genet Evol* 2008; 8:386-93.
24. Pompe S, Simon J, Wiedemann PM, Tannert C. Future trends and challenges in pathogenomics. A Foresight study. *EMBO Rep* 2005; 6:600-5.
25. Yoon SH, Park YK, Lee S, et al. Towards pathogenomics: a web-based resource for pathogenicity islands. *Nucleic Acids Res* 2007; 35 (Database issue):D395-400.
26. Kiechle FL, Zhang X, Holland-Staley CA. The -omics era and its impact. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128:1337-45.



## GENOMİK, PROTEOMİK VE *CANDIDA* ENFEKSİYONLARININ TANISI

Prof. Dr. Mine Doluca

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

*Candida* enfeksiyonları ve özellikle sistemik kandidoz (SK) insidansı riskli hasta gruplarında alarm derecesinde bir artış göstermesinin yanı sıra, özellikle yoğun bakım, cerrahi ve kanser olgularında önde giden mortalite ve morbidite nedeni ve de riskli hastalarda hastanede kalma süresini uzatan ve hasta maliyetini artıran önemli bir etkidir. Buna karşın SK tanısı, klinik bulgularının özgün olmaması, tanıda altın standart kabul edilen kan kültürü ve doku biyopsilerinin hastalığın ilk dönemlerinde duyarlılığının düşük olması (<%50), kritik hastalarda ise invazif girişim gerektirmesi nedeniyle çok zordur. Sonuçta SK tanısı genellikle geç kalınmış olarak konulabilmekte ya da otopsi ile belirlenebilmektedir. Bu nedenlerden dolayı hastanın yaşam olasılığını artıracak erken ve doğru SK tanısı için hızlı ve güvenilir tanı testlerine gereksinim söz konusudur. *C.albicans*'ın genom dizisinin yayınlanmasından sonra, bu mantarın fonksiyonel genomikleri incelenmeye başlanmış, bu da, "mikroarray"ler ve proteomik yöntemler gibi genomik teknolojilerinin gelişmesini kolaylaştırmıştır. Bir sistemin proteomik analizi, eksprese edilen proteinlerin tanımlanması ve fonksiyonel olarak belirlenmesini içerir ve sistemdeki proteinlerin fonksiyon ve regülasyonunun daha iyi anlaşılmasını sağlar. Genomik ve proteomik incelemeler, hem antifungal ilaçlar ve aşılardan yeni hedeflerin, hem de potansiyel olarak kullanılacak tanı belirteçlerinin belirlenmesine yardımcı olmaktadır.

Pitarch ve ark. *C.albicans* hücre duvarının immünojenomunu incelemek için proteomik ve biyoinformatik teknikleri birlikte uygulamışlardır. Araştırmacılar, multivaryant lojistik regresyon sonuçlarına göre, **glukan 1,3-β-glukozidaza (Bgl2) karşı ve duvar fosfogliserat kinaza (Pgl1p) karşı oluşan IgG antikor** seropozitifliğinin SK'nın bağımsız belirleyicileri olduğunu saptamışlardır. Çalışmada SK'lı olgular, SK tanısı olmayan ancak benzer hastalığı olanlar ve sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubu dikkate alındığında, anti-Bgl2 IgG antikorlarının duyarlılığı %78, özgüllüğü %93, pozitif ve negatif prediktif değerleri ise %81 ve %92 olarak belirlenmiştir. Anti-Bgl2 antikorlarının kontrol grubuna göre SK'lı olgularda belirgin olarak yüksek olması nedeniyle, bu antikorların serumda incelenmesinin SK tanısı için kullanılabilir ve yeni bir belirleyici olabileceği ileri sürülmüştür. Bgl2 ve Pgl1p'ye karşı oluşan antikorlar birlikte değerlendirildiğinde duyarlılık %87, özgüllük ise %88 olarak saptanmıştır. Bgl2p'ye karşı oluşan bu güçlü immün yanıtın nedeni olarak; bu antijenin bol bulunması, hücre duvarı ile gevşek ilişkisi ve salgısal yapısı gösterilmiş ve bu antijenlerin kana kolayca geçebilmesi ve immün kompetan hücreler tarafından erkenden işlenmesinin söz konusu olabileceği ileri sürülmüştür. Bgl2p fonksiyon kaybının *Candida* virülansını azalttığı, anti-Bgl2p nötralizan antikorların SK'ya karşı önemli bir savunma mekanizması olduğu bildirilmiştir.

Pitarch grubunun bir başka çalışmasında da; Pgl1p yanında **alkol dehidrogenaz (Adh1p)** enzimlerinin asidik formlarının SK'lı hasta serum örnekleri tarafından özgün olarak tanınabildiği ve bunların epitoplarının ya *C.albicans* kolonizasyonunda bir antikor yanıtına neden olmadığı ya da diğer kommensal veya enfeksiyöz etkenler tarafından paylaşılmadığı saptanmıştır. Bu açıdan belirtilen iki antijenin asidik formlarının özgün epitoplarının, SK için geliştirilecek tanı testlerinde kullanılabilmesi bildirilmiştir.

Pitarch ve ark. yaptıkları çalışmada, **hücre duvar enolazına (Eno1p) karşı oluşan IgG antikorları**nın invazif hastalıktan korunmada önemli olduğunu saptamış ve bunun yeni bir prognostik indikatör olabileceğini belirtmiştir. SK'lı olgularda, yüksek anti-Bgl2p antikor düzeyleri ve anti-Eno1p IgG pozitifliğinin birbirleri ile korele olduğu ve 2 aylık ölüm riskinin azaldığını gösterdiği vurgulanmıştır. Anti-Eno1p IgG antikorları, seropozitivite açısından yaşam için bir prognoz faktörü olarak ele alındığında, duyarlılık ve özgüllük %97 ve %83 olup; seronegativite açısından ölüm için bir prognoz faktörü olarak düşünüldüğünde ise bu değerler sırasıyla %83 ve %97 şekline dönüşmektedir. Glikolitik özelliği olmayan bu enolazın insan plasminojenini aktive edip, *Candida* hücrelerine dokuya yayılma ve harap etmek için

fazladan ekstraselüler proteolitik aktivite kazandırdığı belirlenmiş ve bu hücre yüzeyindeki plasminojen bağlayan proteini nötralize eden antikorların da patogeneze rol oynadığı ve etkili bir savunma bariyeri oluşturduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada serum anti-sitoplazmik enolaz antikorları ile klinik sonuç arasında bir ilişki belirlenmemiştir. Van Deventer ve ark. *Candida* enolazını antijen olarak kullandıkları bir enzim immunoassay geliştirmişler ve bunun immün yetmezlikli ve immün sisteminde sorunu olmayan olgularda invazif kandidoz ile kolonizasyonu ayırt edebildiğini belirlemiş ve bu grup hastalarda sırasıyla duyarlılığı %53 ve %50; özgüllüğü ise %78 ve 86 olarak saptamışlardır.

Bunların yanında SK'dan iyileşen olgularda izlenen **ısı şok proteini (Hsp90p)**, **trioz fosfat izomeraz (Tpi1p)** ve **52-kDa'luk mannoproteine karşı oluşan antikorların** da koruyucu kapasitesinin bulunduğu ve SK için prognoz açısından değer taşıyabileceği bildirilmiştir. Öte yandan hematolojik malignitesi olan olgularda SK'nın izlenmesinde *C.albicans* **çimlenme borusuna karşı oluşan antikorların** saptanmasının da yararlı olabileceği ileri sürülmüştür.

**Hif duvar proteini (Hwp1)** gibi hife özgü moleküllerin de *C.albicans*'a karşı olan konak yanıtında önemli bir hedef olduğu ve *Candida* enfeksiyonları için özgül tanı indikatörleri olabileceği bildirilmiştir. Bu konuda Naglik ve ark.nın yaptığı bir çalışmada, HWP1 mRNA, kültür pozitif oral ve vajinal kandidoz ile mukozal taşıyıcılığın söz konusu olduğu tablolarda saptanmış, kültür negatif ve semptomsuz olgularda belirlenmemiştir. Ancak Hwp1 ile karşılaşma, kültür negatif sağlıklı olgularda, oral kandidoz ve asemptomatik mukozal enfeksiyonlarda, lokal tükrük ve sistemik anti-Hwp1 antikorlarının izlenmesi ile gösterilmiştir. HWP1 gen ekspresyonunun, taşıyıcıların oral ve vajinal örneklerinde yüksek oranda saptanması, Hwp1 ve hif yapılarının *C.albicans*'ın mukozal yüzeylere tutunması ve varlığını sürdürdürebilmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Araştırmada *C.albicans*'ın gastrointestinal kolonizasyonu ile mukozal semptomatik ve asemptomatik enfeksiyonlarında Hwp1'in önemli bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır. Farklı östrojen düzeylerine sahip vulvovajinal kandidozlu olgularda ALS1 ve HWP1 mRNA ekspresyonu %62 ve %68 oranlarında saptanmış, ancak bu adezyon genlerinin hastaların östrojen düzeyi ile korele olmadığı sonucuna varılmıştır.

SK tanısı ile ilgili yapılan birçok çalışmada; **mannan antijeni ile anti-mannan antikorunun birlikte** araştırılmasının SK'nın erken tanısında önemli olduğu, özellikle riskli hastalarda rutin tanıda kolaylıkla ve güvenilir olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir. Olgularda ilk mannan testi pozitifliğinin klinik mikolojik tanıdan ortalama 8.8 gün önce izlendiği, yaklaşık %60 olguda en azından bir serolojik test pozitifliğinin kan kültüründe üreme olmadan izlendiği saptanmıştır. Mannan ile anti-mannan testlerinin kombine kullanımının duyarlılığı ve özgüllüğü, farklı hasta grupları, klinik tanı kriterleri ve örnek alma sayısı ile değişmekle birlikte sırasıyla %73-100 ve %80-93 arasında yer almaktadır. Bunun yanında bir çalışmada enfeksiyon etkeni *Candida* türüne göre testlerin duyarlılık oranlarının %40 ile %83 arasında değiştiği bildirilmiştir.

SK tanısı açısından klinik örneklerde moleküler yöntemlerle *Candida* DNA'sının saptanması önemli ve umut vericidir. Ancak polimeraz zincir tepkimesi (PZT) temelli yöntemler çapraz kontaminasyona açık olup, yalancı pozitifliklerle sonuçlanabilmektedir. Diğer yöntemsel sorunlar; *Candida* türlerinin sert hücre duvarı olması -ki bu ciddi ve yoğun DNA eldesi işlemleri gerektirir-, SK esnasında kanda bulunan maya sayısının düşük olması ve klinik örnekleri kontamine edebilecek DNA kolonizasyonu şeklinde sıralanabilir. Bunun yanında PZT için örnek toplanması, işlenmesi, DNA eldesi, DNA hedefleri ve amplikon saptanması için standart yaklaşımların bulunmaması, yöntemlerin duyarlılığını ve özgüllüğünü düşürmektedir. Bu nedenlerden dolayı günümüzde moleküler sonuçlar, üzerinde anlaşma sağlanmış tanı koydurucu kriterler olarak kabul edilememektedir. PZT temelli yöntemlerde, öncüllerin belirlendiği hedef bölgeler "çok kopyalı" ya da "tek kopyalı" gen bölgeleri şeklinde olabilmektedir. Çok kopyalı bölgelerin hedef alındığı durumlarda duyarlılık yüksek, tek kopyalı bölgelerin hedef olarak seçildiği durumlarda ise özgüllük yüksek olmakta, ancak düşük sayıdaki fungusu saptayabilecek duyarlılıkta olamayabilmekte-

dir. Çok kopyalı gen hedefleri olarak ribozomal DNA (rDNA) gen kümesi [bu bölgede 18S, 5.8 S, 28S rDNA alt üniteleri ve bunları ayıran “intergenic transcribed spacer (ITS) bölgeleri olan *ITS1* ve *ITS2*] ve *Candida* sekreteruar aspartik proteinaz (*SAP*) geni; tek kopyalı gen hedefleri olarak da aktin, kitin sentaz, ısı şok proteini 90 ve lanosterol-14-alfa-demetilaz (*LIA1*) genleri kullanılmıştır. Çalışmalarda panfungal PZT sonrası uygulanan saptama yöntemleri; southern hibridizasyonun takip ettiği elektroforez, restriksiyon enzim analizi, radyoaktif madde ile veya enzim ile işaretlenmiş problemlerin kullanıldığı hibridizasyon, PZT temelli enzim immunoassay, “single-strand conformational polymorphism” ve sekanslama olarak sıralanabilir. Bazı araştırmalarda ise “nested” veya “semi-nested” PZT yöntemi uygulanmıştır. Çalışmalarda, kullanılan PZT için seçilen hedef bölgelere, saptama yöntemlerine ve incelenen hasta popülasyonuna göre değişimle birlikte duyarlılık %86-100, özgüllük ise %54-100 olarak bildirilmiştir. PZT teknolojisi en popüler olan olmakla birlikte izotermal nükleik asit sekans temelli amplifikasyon (NASBA) yöntemi de tanı için bir alternatif oluşturmaktadır.

En son gerçek zamanlı PZT teknolojileri olan “light cycler”, “ABI PRISM 7700 sekans saptama” (Taqman) ve “Roto-gene four channel multiplexing” sistemleri, amplifikasyon sonrası işlemlere bağlı olmadığından yalancı pozitif sonuç riskini azaltmakta ve niceliksel sonuç vermektedir. Öte yandan bu yöntemin PZT duyarlılığını artırması yanında, sağaltıma yanıtı değerlendirmede de yararlı olabileceği bildirilmiştir. Ancak bu teknolojilerde de yayınlanmış yöntemlerin laboratuvarlar arası değerlendirilmesinin yapılması, bir yöntem üzerinde uzlaşılması ve kalite stratejilerinin düzenlenmesinin gerektiği vurgulanmıştır. Gerçek zamanlı PZT yönteminin uygulandığı birçok çalışmada kullanılan hedef bölge, problem, sistem ve araştırılan hasta gruplarına göre değişimle birlikte duyarlılık oranları %81-100, özgüllük oranları ise %96-100 arasında bildirilmiştir.

Moleküler yöntemlerle tanıda, *Candida* DNA'sının saptanmasında “reverse line-blot assay” PZT yöntemini çip teknolojisi ile birleştirmenin de bir diğer uygun alternatif olabileceği bildirilmektedir.

Sistemik *Candida* enfeksiyonlarının tanısında nükleik asit temelli yöntemler artan hızda önem kazanmaktadır. PZT ile *Candida* DNA'sının saptanmasında hedef olarak çok kopyalı gen bölgelerinin ve de türe özgü problemlerin kullanıldığı yöntemlerin en yüksek duyarlılık ve özgüllük oranlarına sahip olduğu; rDNA gen kümesinin popüler bir hedef olduğu ancak *Candida LIA1* geninin hedef alındığı PZT-REA ile *SAP* geninin hedef alındığı PZT yöntemlerinin ve gerçek zamanlı PZT teknolojisinin de umut verici olduğu vurgulanmıştır. Tüm bunların yanında alınacak örneğin, DNA eldesinin, kullanılan hedef ve saptama yönteminin standardize edildiği PZT temelli hızlı, güvenilir, duyarlı ve özgün tanı yöntemlerinin geliştirilmesine gereksinim söz konusudur.

Proteomik incelemeler gibi genomik yaklaşımlar, potansiyel tanı koydurucu ve prognoz belirleyici belirteçleri tanımlamakta, ancak yöntemin standardizasyonu ve klinik değerlendirilmesi gerekmektedir. Genomik ve proteomik teknolojilerin, SK'nın erken tanısı ve prognozunun değerlendirilmesinde yeni biyomarkerlerin belirlenmesinin yanında, yeni antifungal ve aşı hedeflerinin de tanımlanmasında etkin rol oynayabileceği bildirilmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Alam FF, Mustafa AS, Khan ZU. Comparative evaluation of (1,3)- $\beta$ -D-glucan, manan and anti-mannan antibodies, and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia. BMC Infect Dis 2007; 7:103-11.
2. Badiee P, Kordbacheh P, Alborzi A, Zakernia M, Haddadi P. Early detection of systemic candidiasis in the whole blood of patients with hematologic malignancies. Jpn J Infect Dis 2009; 62:1-5.
3. Baskova L, Landlinger C, Preuner S, Lion T. The pan-AC assay: a single-reaction real-time PCR test for quantitative detection of a broad range of *Aspergillus* and *Candida* species. J Med Microbiol 2007; 56:1167-73.
4. Bretagne S, Costa JM. Towards a molecular diagnosis of invasive aspergillosis and disseminated candidosis. FEMS Immunol Med Microbiol 2005; 45:361-8.

5. Chen SCA, Halliday CL, Meyer W. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. *Med Mycol* 2002; 40:333-57.
6. Ellis M, Al-Ramadi B, Bernsen R, et al. Prospective evaluation of mannan and anti-mannan antibodies for diagnosis of invasive *Candida* infections in patients with neutropenic fever. *J Med Microbiol* 2009; 58:606-15.
7. Khelif M, Mary C, Selami H, et al. Evaluation of nested and real-time PCR assays in the diagnosis of *Candidaemia*. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15:656-61.
8. Klingspor L, Jalal S. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:745-53.
9. Naglik JR, Fostira F, Ruprai J, et al. *Candida albicans* HWP1 gene expression and host antibody responses in colonization and disease. *J Med Microbiol* 2006; 55:1323-7.
10. Nas T, Kalkancı A, Fidan I et al. Expression of ALS1, HWP1 and SAP4 genes in *Candida albicans* strains isolated from women with vaginitis. *Folis Microbiol* 2008; 53:179-83.
11. Ozer S, Yücesoy M. Kan örneklerinde polimeraz zincir tepkimesi yöntemi ile *Candida* DNA'sının saptanması. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41:419-28.
12. Pitarch A, Abian J, Carrascal M, et al. Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies. *Proteomics* 2004; 4:3084-106.
13. Pitarch A, Jimenez A, Nombela C, Gil C. Decoding serological response to *Candida* cell wall immunogenome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic *Candidates* for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5:79-96.
14. Prella M, Bille J, Pugnale M, et al. Early diagnosis of invasive candidiasis with mannan antigenemia and antimannan antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 51:95-101.
15. Rohrbough JG, Galgiani JN, Wysocki VH. The application of proteomic techniques to fungal protein identification and quantification. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1111:133-46.
16. Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, et al. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: Useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1510-7.
17. Sendid B, Poirot JL, Tabouret M, et al. Combined detection of mannanaemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species. *J Med Microbiol* 2002; 51:433-42.
18. Van Deventer AJ, Van Vliet HJ, Hop WC, Goessens WH. Diagnostic value of anti-*Candida* enolase antibodies. *J Clin Microbiol* 1994; 32:17-23.
19. Verduyn Lunel FM, Donnelly JP, van der Lee HAL, Blijlevens NMA, Verweij PE. Circulating *Candida*-specific anti-mannan antibodies precede invasive candidiasis in patients undergoing myelo-ablative chemotherapy. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15:380-6.
20. Weig M, Brown AJ. Genomics and the development of new diagnostics and anti-*Candida* drugs. *Trends in Microbiol* 2007; 15:310-7.
21. White PL, Archer AE, Barnes RA. Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43:2181-7.
22. White PL, Shetty A, Barnes R. Detection of seven *Candida* species using the Light-cycler system. *J Med Microbiol* 2003; 52: 229-38.

## GENOMİK, PROTEOMİK VE *ASPERGILLUS* HASTALIKLARININ TANISI

Prof. Dr. Beyza Ener

*Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Görükle, Bursa.*

*Aspergillus* türleri doğada yaygın olarak bulunan küf mantarlarıdır. Genellikle çürüten organik maddelerde yaşamını sürdürür ve sporları hava akımı ile çevreye yayılır. Çok sayıda *Aspergillus* türü bulunmakla beraber, insanda hastalık oluşturan türler sınırlıdır. *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* ve *A. terreus* patojen olarak karşımıza çıkan türlerdir. Sporların inhalasyon yolu ile alınması nedeniyle üst ve alt solunum yolları en fazla hastalığa maruz kalan bölgeler olmaktadır. Bu türler, basit saprofitik kolonizasyondan hayatı tehdit eden invazif hastalığa kadar çok değişik klinik tablolar oluşturmaktadır<sup>1,2</sup>.

*Aspergillus* enfeksiyonlarının klinik bulguları non-spesifik olup, tanıda halen problemler yaşanmaktadır. Görüntüleme bulguları, mikroskopik bulgular, örneklerde üretme, serolojik testler, antijen arama testleri ve moleküler testler günümüzde en çok kullanılan metotlardır. Ancak hiçbirinin özgüllük, duyarlılık, pozitif ve negatif tanı değerleri istenilen ölçüde değildir ve yeni tanı araçlarına her zaman ihtiyaç bulunmaktadır.

**Genomiks**, organizmaların tüm genetik materyaline göre biyolojilerinin incelenmesidir. Son yıllarda hızla artan genom projeleri ile *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. terreus* ve *Neosartorya fischerii* türlerinin gen dizileri saptanmıştır ve ilgili web sitelerinden ulaşılmaktadır<sup>3,4</sup>. Dizi analizi yapılmış *Aspergillus* türlerinde genom büyüklüğü 29.3 Mb (*A. fumigatus*) ile 37.1 Mb (*A. oryzae*) arasında değişmektedir. *A. fumigatus*'da 9926 gen bulunurken, *A. oryzae*'da 12071 gen bulunmaktadır<sup>4,5</sup>.

*Aspergillus* türlerinin gen dizilerinin belirlenmesinin yararları aşağıdaki gibi sıralanabilir<sup>4</sup>:

1. Filogenetik yakınlığın belirlenmesi: Gen dizilerinin belirlenmesi taksonomiden türler arası yakınlığın daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Örneğin *A. niger*, *A. oryzae* ve *A. terreus*' a yakın iken, *A. fumigatus*, *A. clavatus* ve *Neosartorya fischerii* ile bir grup oluşturmuştur. *A. nidulans* ise her iki gruba biraz daha uzaktır.

2. Seksüel üremenin olması / olmaması: Gen dizi analizi, seksüel üreme ile ilgili gizeme bir miktar açıklık getirmiştir. *A. nidulans*'da seksüel üremeyi başlatan 61 farklı gen saptanmıştır.

3. Gen dizi analizinin patojenite ile ilişkisi: Gen dizi analizlerinin belirlenmesi, ne yazık ki patojeniteye bir açıklık getirememiş ve tek başına patojenite sırrını açıklamaya yetmemiştir. *A. fumigatus*'da virülans ile ilgili tek ve belirgin bir gen bulunamamıştır. *Aspergillus* türlerinin gezegenimizde pek çok yerde ve ortamda yaşayabildiğini düşünürsek, patojenite ile ilgili genleri aramaktansa, fırsatçılıklar ilgili genlerin aranmasının daha doğru olacağı düşünülmektedir.

**Proteomiks**, bir genom tarafından eksprese edilen tüm proteinlerin sistemik analizini ifade eder<sup>6</sup>. Bütün genler her zaman eksprese edilemeyeceğinden proteomiksin hücre biyolojisini ve davranışını anlamada daha yararlı olacağı düşünülmektedir<sup>7</sup>. Genomiks çalışmaları gibi, proteomiks çalışmalarının da tıbbi hedeflerinden biri patojenite problemini çözmektir. *A. fumigatus*'un virülansı multifaktöryal olup, pek çok genin ekspresyonuna ve birçok proteinin sentezine bağlıdır.

Patojenitede ilk basamak, konak hücrelerine bağlanmadır. Bu nedenle bağlanmayı sağlayabilecek hücre duvarı proteinlerinin analizi ilk proteomiks çalışmalarını oluşturmuştur. Bruneau ve ark.<sup>8</sup> dokuz farklı glikosilfosfolidil-inositol (GPI) yapısında protein göstermişlerdir. Bunların beş tanesi mayalarda bulunan ve konak hücrelerine bağlanmada aracılık yapan proteinlerle benzerlik göstermektedir. *Aspergillus* hücre duvarının analizinin geliştirilmesi ile yeni antifungaller için hedefler çıkartılabileceği düşünülmektedir.

Konak savunma hücrelerinden kaçma ve bu hücrelerce öldürülmeyle korunma, diğer önemli virülans

faktörüdür. Proteomiks çalışmaları ile *A.fumigatus*'un stres altında kaldığında salgıladığı proteinler gösterilmiş ve bu proteinler yardımı ile konak savunma hücrelerince öldürülmekten kurtulduğu belirlenmiştir<sup>9</sup>.

*Aspergillus* enfeksiyonlarının tanısında proteomiks çalışmalarının kullanılması bir diğer hedefdir. Alerjik bronkopulmoner aspergilloz ve aspergillomali hastaların serumlarında çeşitli alerjenler saptanmıştır<sup>4</sup>. Ayrıca stres durumunda ortaya çıkabilen tioredoksin peroksidaz AspF3 antijeninin galaktomannan ve beta-glukan gibi invazif aspergilloz tanısında kullanılabileceği düşünülmektedir<sup>4</sup>.

#### KAYNAKLAR

1. Verweij P, Brandt ME. *Aspergillus*, Fusarium, and other opportunistic moniliaceous fungi, pp: 1802-38. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2007, ASM Press, Washington, DC.
2. Paterson T. *Aspergillus* species, pp: 3241-56. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. 2010, Churchill Livingstone, Philadelphia.
3. Jones MG. The first filamentous fungal genome sequences: *Aspergillus* leads the way for essential every day resources or dusty museum specimens? Microbiology 2007; 153: 1-6.
4. Bennett JW. *Aspergillus*: a primer for the novice. Med Mycol 2009; 47 (Suppl 1): 5-12.
5. Andersen MR, Nielsen J. Current status of systems biology in Aspergilli. Fungal Genet Biol 2009; 46 (Suppl 1): S180-90.
6. Bhadauria V, Zhao WS, Wang LX, et al. Advances in fungal proteomics. Microbiol Res 2007; 162: 193-200.
7. Kniemeyer O, Lessing F, Brakhage AA. Proteome analysis for pathogenicity and new diagnostic markers for *Aspergillus fumigatus*. Med Mycol 2008; 47 (Suppl): S248-54.
8. Bruneau JM, Magnin T, Tagat E, et al. Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidyl-inositol anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. Electrophoresis 2001; 22: 2812-2823.
9. Lessing F, Kniemeyer O, Wozniok I, et al. The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse model. Eukaryot Cell 2007; 6:2290-302.

## DIŞKININ İNCELEMELERİ

Prof. Dr. Ülgen Zeki Ok

*Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa.*

### Dışkı Örneklerinin Toplanması

Bağırsakta yerleşen parazitler enfeksiyonların çoğunda tanı, dışkıda protozoon trofozoit, kist veya ookistleri ile helmint yumurta veya larvalarının saptanmasıyla konur. Bu nedenle dışkı örneklerinin doğru biçimde toplanması ve saklanması, dışkı örneği laboratuvara ulaşana dek, tanıya götürecekteki yapıların korunması açısından büyük önem taşır. Antibiyotik, antidiyareik, antasid, baryum sülfat veya bizmut gibi ilaçlar parazitlerin ortaya çıkarılmasını önleyebilir; bu ilaçların kullanımından sonra en az bir hafta süreyle örnek alınmasının ertelenmesi uygundur<sup>1-3</sup>.

Rutin parazitolojik incelemeler için gerekli dışkı miktarı, şekilli dışkıları için yaklaşık iri bir ceviz büyüklüğünde (20-40 gr), sulu dışkıları için ise 5-6 çorba kaşığı hacindedir. Küçük çocuklarda dışkı örneği eldiven giyilerek rektumdan direkt olarak alınabilir. Hastanın klinik belirtileri, düşürdüğü gözle görülen bir parazit olup olmadığı, önceden geçirdiği enfeksiyonlar, yolculuk öyküsü, bağışıklık durumu gibi bilgiler araştırılmalıdır<sup>1,2</sup>.

Dışkı örneğinin hasta veya yakınları tarafından doğru biçimde alınabilmesi için ilgili yöntemler hastalara açık bir biçimde anlatılmalıdır. Örnek alma yöntemini tarif eden resimler ve basılı açıklamalar yararlı olabilir. Temiz, geniş ağızlı ve sıkıca kapanabilen kaplarda toplanan örneklerle su, idrar veya diğer yabancı maddelerin teması önlenmelidir<sup>1-3</sup>.

Helmint yumurtalarının çoğu hastanın her dışkı örneğinde saptanabilirken, protozoonların çoğu dışkı ile aralıklı olarak atılır. Özellikle *Entamoeba histolytica* veya *Giardia intestinalis* enfeksiyonlarından şüphelenildiğinde, 2-3 günlük aralarla, en az üç dışkı örneği incelenmelidir. Üç örnek farklı günlerde ve olası ise iki günde bir alınmalı, bu sağlanamazsa ilk ve son dışkının arası 10 günü aşmamalıdır. Protozoon enfeksiyonu nedeniyle sağaltım uygulanmışsa 3-4 hafta sonra, *Taenia* tedavisi uygulananlarda ise 5-6 hafta sonra kontrol yapılmalıdır<sup>1-3</sup>.

### Fiksatifler

Protozoa trofozoitleri genellikle sıvı ve diyareli dışkılarda bulunduğu için, bu dışkıları, dışkılamadan sonraki ilk 30 dakika içinde incelenmeli; incelenemeyecekse uygun fiksatiflerin içinde tespit edilmelidir. Şekilli dışkıların incelenmesi bir süre ertelenebilir; aynı gün içinde incelenemeyecekse, dışkı örneği fiksatifle tespit edilmeli veya dışkı kabının kapağı iyice kapatılarak buzdolabında (3-5°C) saklanmalıdır<sup>1,2</sup>.

15-30 ml'lik sıkıca kapanan vida kapaklı, plastik veya cam şişelerde saklanabilen fiksatiflerde genellikle kullanılan oran, 3 kısım fiksatifte 1 kısım dışkıdır. Dışkının tespit edilip, saklanması için kullanılan tüm fiksatiflerin bazı avantaj ve dezavantajları vardır. Antijen arama veya PCR gibi immünolojik bir tanı yöntemi uygulanacaksa, kullanılan fiksatifin yöntemle uygunluğundan emin olunmalı, fiksatif içinde korunan örnekler oda ısısında tutulmalıdır<sup>1-3</sup>. En sık kullanılan fiksatifler %10 formol, Schaudinn fiksatif, polivinil alkol (PVA) ve sodyum asetat-asetik asit-formoldür (SAF).

**%10 formol** ucuzdur ve kolay uygulanır. Dışkılara daha sonra konsantrasyon yöntemi uygulanarak, özellikle dışkıda seyrek bulunabilen protozoa kist ve ookistleri ile helmint yumurta ve larvaları ortaya çıkarılabilir. Trikrom gibi kalıcı boyaların kullanımına uygun olmadığından tek başına yeterli değildir<sup>3,4</sup>.

**Schaudinn fiksatif**, örnekleri kurum içindeki hastalardan alan laboratuvarların tercih ettiği bir fiksatifdir. PVA ile birlikte, kalıcı boyaların kullanılması öncesinde en iyi fiksasyonu ve ardından en nitelikli

boyanmayı sağlayan yöntemdir. Toksik olan cıva klorür yerine çinko sülfat kullanılabilir<sup>5</sup>. Dezavantajı, lamların en çok bir gece bekletilebilmesidir<sup>3,4</sup>.

**PVA**, örneklerin nakledilebilmesine ve dilendiğinde boyanabilmesine olanak sağlar. Özellikle sıvı dışkı örneklerinde yararlıdır. Bir tüp veya şişede dışkı ile karıştırılabildiği gibi, birkaç damlası lam üzerinde az miktarda dışkıyla karıştırılarak da kullanılabilir. Toksik cıva klorür yerine çinko sülfat kullanılabilir. Dehidrate olursa veya buzdolabına konursa, jelatinsi beyaz bir görünüm alarak bozulur<sup>3,4</sup>.

**SAF** içinde korunmuş dışkı örneklerine hem yoğunlaştırma yöntemleri, hem de kalıcı boyalar uygulanabilir. Daha az toksiktir; ancak boyama sonrası organizmaların morfolojisi cıva klorür içeren fiksatiflerdeki kadar iyi değildir. Tek bir fiksatif kullanmaya istekli laboratuvarlar bu seçeneği tercih edebilirler<sup>3</sup>.

## Taze ve Tespit Edilmiş Dışkıların İncelenmesi

### Makroskobik inceleme

Dışkının kıvamı, kan ve/veya mukus varlığı bildirilmelidir. Makroskobik inceleme ile *Ascaris* ve *Enterobius* gibi nematodların erişkinleri veya *Taenia* türlerinin halkaları dışkının yüzeyinde veya dışkı kabının içinde saptanabilir<sup>1,2</sup>.

Taze ve tespit edilmiş dışkı örneklerinin parazitolojik incelemesinde en yaygın olarak, direkt taze bakı (nativ-Lugol gibi), yoğunlaştırma yöntemleri (yüzdürme veya çöktürme) ve kalıcı boya yöntemleri kullanılmaktadır.

### Direkt taze bakı (Native-Lugol)

Helminthlerin ve protozoonların tüm tanı evrelerinin tanınmasına olanak sağlar, ancak dışkıda seyrek bulunan yapıların tanısında sıklıkla yetersiz kaldığından, paraziter enfeksiyonların birçoğunun kesin tanısında tek başına yetersizdir. Özellikle diyareli dışkı örneklerinde hareketli trofozoitlerin araştırılmasında yararlıdır.

Rutin incelemede formol – etil asetat çöktürme gibi bir yoğunlaştırma ve trikrom gibi bir kalıcı boyama yöntemi kullanıldığında, direkt taze bakının tanıya fazla bir katkı sağlamadığı ve uygulanmasının gereksiz olduğu iddia edilmektedir<sup>6,7</sup>.

Lugol solüsyonu gibi seyreltilmiş iyot boyaları en sık kullanılan geçici boyalardır. İyot trofozoitleri öldürdüğü ve tahrip ettiği için daha çok kist evrelerinin tanısında değer taşır. Kistlerin içindeki nükleusların daha iyi görünür hale gelmesi ile hem nükleusların sayısı hem de morfolojik özellikleri daha rahat izlenir<sup>1,2</sup>.

### Yoğunlaştırma (konsantrasyon) yöntemleri

Yoğunlaştırma yöntemleri hem taze, hem de saklanmış dışkı örneklerine uygulanabilir, ancak hiçbir yoğunlaştırma yöntemi tek başına, organizmaların tümünü başarı ile yoğunlaştıramaz. Yoğunlaştırma yöntemlerinin amacı, direkt bakıda ve kalıcı boyalı preparatlarda gözden kaçabilen seyrek organizmaları ortaya çıkarmaktır.

Daha sık tercih edilen çöktürme (sedimentasyon) yöntemlerinin avantajı, dışkıdaki parazitlere ait tüm yapıları çöktürmesi, en büyük dezavantajı ise çöken aşırı dışkı artığının parazitlerin varlığını maskeleyebilmesidir. En sık kullanılan formol - etil asetat (veya eter) yöntemi zaman alıcı olduğundan bazı laboratuvarlarda bu yöntemin modifiye edilmiş bir şekli kullanılmaktadır<sup>4</sup>.

Yüzdürme (flotasyon) yöntemlerinin temel prensibi ise, yüksek özgül ağırlıklı solüsyonların parazitleri yüzdürmesidir. Yüzdürme sonrası elde edilen materyal, dışkı artıklarından oldukça arınmıştır ve parazitler daha kolay fark edilir. Ancak birçok ağır sestod ve trematod yumurtası yüzmez; ayrıca kısa sürede incelenmediğinde yumurta ve kist duvarları büzüşerek tanıyı güçleştirebilir. Dünyada en yaygın kullanılanı



çinko sülfat yüzdürme yöntemidir. Ülkemizde sık kullanılan **Doymuş Tuzlu Suyu Yüzdürme Yöntemi** helmint yumurtalarının büyük kısmını yoğunlaştırmada başarılı, ancak protozoa kistlerini yoğunlaştırmada başarısızdır. **Sheather'in Şekerli Yüzdürme Yöntemi** sonrası faz-kontrast mikroskopisi ise, taze veya formolle korunmuş örneklerde *Cryptosporidium* ookistlerinin araştırılmasında yararlıdır<sup>1,2,4</sup>.

### Kalıcı boyalı yaymalar

Daha çok bağırsak protozoonlarının tanısında kullanılan kalıcı boyalı yayma preparatları, taze veya PVA içinde saklanmış dışkılarından hazırlanabilir ve birçok önemli avantajı vardır: İyi boyanmış organizmaların morfolojileri immersiyon objektifi ile ayrıntılı olarak izlenebilir. Taze preparatlarda nadir rastlanmaları veya küçük olmaları nedeniyle gözden kaçabilen organizmalar daha kolay saptanabilir. İnceleme uygun bir zamana ertelenebilir. Boyanmış yaymalar kalıcı bir kayıt olarak saklanabilir. Pozitif lamlar referans veya araştırma materyali olarak kullanılabilir. Tanıda şüphe bulunduğu lamlar gönderilerek, konsültasyon istenebilir<sup>1,2</sup>.

Parazit araştırılması için gönderilen her dışkı örneğinde kalıcı boyalı yaymaların hazırlanması önerilmektedir. Bu inceleme, yoğunlaştırma yöntemleriyle birlikte uygulandığında, tek bir rutin inceleme ile parazit enfeksiyonlarının çoğunu saptayabilen yararlı ve güvenilir bir yöntemdir.

Dışkı örneklerinin kalıcı boya ile boyanması farklı protozoa türlerinin tanı ve ayırımında en etkili yöntemdir. Dışkı yaymalarında en yaygın kullanılan kalıcı boya **Gomori'nin Trikrom Boyasının Wheatley Modifikasyonu** ve **Heindenhein'in Demir Hematoksin Boyası'nın** modifikasyonlarıdır. **Trikrom Boyası** özellikle *Dientamoeba fragilis* ve *Blastocystis hominis* gibi direkt taze bakı ile tanınması güç organizmaların tanısında çok yararlı bulunmuştur<sup>7-9</sup>.

AIDS ve diğer bağışıklığı baskılayan tabloların görülme sıklığındaki artışa paralel olarak önem kazanan bağırsak koksidiyan ve mikrosporidian parazitlerinin tanısı ve ayırt edilmesi için boyama yöntemlerinin yanında epifloresan mikroskopun kullanımı önerilmektedir<sup>10</sup>. Özellikle bağışıklığı baskılanmış ishal ve/veya karın ağrısı gibi belirtileri olan olgularda bu parazitler de mutlaka araştırılmalıdır. Bunun için önerilen algoritma şöyledir: Dışkı örneği %10 formolde tespit edildikten sonra, 330-380 nm filtrelili epifloresan mikroskopta direkt taze bakı ile otofloresan açısından incelenir. 8-10 mm'lik mavimsi yuvarlak yapılar *Cyclospora*, 20-33 mm'lik ovoid yapılar *Isoospora* ön tanısı alır. Örneklere ayrıca Calcofluor ve Auramine-Rhodamine boya uygulanır ve epifloresan mikroskopla incelenir. Calcofluor boyalı preparatlar için 330-380 nm filtre kullanılır; 1-2 mm'lik küçük mavimsi oval yapılar Microsporidia tanısı alır. Auramine-Rhodamine boyalı preparatlar ise 480-520 nm filtreyle incelenir, 4-6 mm'lik sarımsı yuvarlak yapılar *Cryptosporidium* ön tanısı alır. *Cyclospora*, *Isoospora* ve *Cryptosporidium* ön tanı veya şüphesi olduğunda aside dirençli boya ile doğrulama gerekir<sup>10</sup>.

Koksidiyan ve mikrosporidian parazitlerin tanısı ve ayırt edilmesi için kullanılan yöntemlerin hangi dışkı örneklerine uygulanması gerektiği tartışmalıdır. Bazı araştırmacılar tarafından tüm diyareli hastalarda, bazılarında ise tüm bağışıklığı baskılanmış hastalarda veya yalnızca risk gruplarındaki (bağışıklığı baskılanmış, su/besin kaynaklı ishal, yolculuk öyküsü) diyareli hastalarda önerilmektedir<sup>2</sup>.

Aside dirençli boyalardan **Modifiye Acid-Fast Boyası** ısı gerektirirken (mikrodalga fırın da kullanılabilir), **Kinyoun'un Karbol-Fuksin Boyası**'nda ısıya gereksinim yoktur. Bu yöntemlerin her ikisi de hem taze dışkıdan fikse edilmiş yaymalara hem de formolle fikse edilmiş dışkıya uygulanabilir. Sadece taze dışkıya uygulanan **Dimetil Sülfoksit (DMSO) Modifiye Acid-Fast** boyası da tercih edilebilir<sup>10</sup>.

Microsporidia sporlarını mayalardan ve diğer fekal elementlerden ayırt edebilmek için tanıda Chromotrope boya da kullanılabilir. Bu boyalardan **Weber Boyası** zaman alıcıyken, ısı kullanımı gerektiren **Hızlı Sıcak Gram – Chromotrop Boyası** daha hızlı sonuç verir<sup>10</sup>.

## Diğer Yöntemler

Bağırsak parazitlerinden *Enterobius vermicularis*'in yumurtaları, olguların büyük bölümünde dışkıya karışmaz; bu enfeksiyonu araştırmak için anal bant yöntemi kullanılır. *Fasciola*, *Giardia* ve *Cryptosporidium* enfeksiyonlarında, enfeksiyon kanıtı olan yumurta, kist veya ookistlerin duodenumda daha yoğun bulunması nedeniyle dışkı örneğinde tanı konulamayabilir. Bu durumda, duodenum aspirasyonu veya Entero-Test adlı ipli bilye içeren bir kapsülün yutulması ile elde edilen safra materyali incelenebilir. Yüksek eosinofilili diyareli olgularda agar-plak kültürü veya yatık filtre kağıdı kültür yöntemi gibi bir yöntemle *Strongyloides* enfeksiyonuna yönelik araştırmalar yapılabilir<sup>1,2,10</sup>.

## Antijen saptama

Son yıllarda dışkıda özellikle *Giardia*, *Cryptosporidium* ve *Entamoeba* türlerinin antijenlerini saptamaya yönelik bazı EIA ve floresan antikor ticari kitleri geliştirilmiştir. Antijen saptama testlerinin avantajları, o an geçirilen enfeksiyonu göstermeleri ve deneyimsiz laboratuvar personelinin bile kolayca uygulayabilmesidir. Ayrıca duyarlılık ve özgüllükleri mikroskopik incelemeden daha üstün bulunmuştur. Başlıca dezavantajları ise, çoğunlukla tek bir patojeni saptayabilmeleridir<sup>3</sup>. Bu testler arasında en yararlı olanları *E.histolytica* - *E.dispar* ayrımı yapanlardır; mikroskopik tanısı güç olan *Cryptosporidium* enfeksiyonunu tanıyanlar da yararlı olabilir. Uygun boyalardan sonra bile mikroskopik tanısı güç olan *D.fragilis* antijenlerini belirleyen ticari kitle gereksinim vardır.

## Moleküler Yöntemler

Organizmaların tür tayini için, daha çok araştırma amaçlı olarak PCR ve seçilmiş genlerin sekans analizi de kullanılmaya başlanmıştır.

Özetle; uygun şekilde alınıp, tespit edilmiş tüm dışkı örneklerine formol – etil asetat gibi bir yoğunlaştırma yöntemi ve trikrom gibi bir kalıcı boyama yöntemi uygulanmalı, farklı günlerde alınmış üç dışkı örneği incelenmelidir. Özellikle bağışıklığı baskılanmış, yolculuk öyküsü olan, olası su veya besin kaynaklı diyareli olgularda *Cryptosporidium*, *Isospora*, *Cyclospora* ve *Microporida*'ya; yüksek eosinofili varlığında ise *Strongyloides*'e yönelik testler uygulanmalıdır. Mikroskopide *E.histolytica* / *dispar* trofozoit ve/veya kistleri görüldüğünde ticari kitlelerle tür ayrımı yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR

1. Ash LR, Orihel TC. Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification. 1987, ASCP Press, Chicago.
2. Ok ÜZ, Girginkardeşler N, Kilimcioğlu A, Limoncu E. Dışkı İnceleme Yöntemleri, s: 1-61. Özcel MA, Altuntaş N (ed), Parazit Hastalıklarında Tanı. 1997, Türkiye Parazitoloji Derneği. Yayın No: 5, İzmir.
3. Deplazes P, Garcia LS, Shimizu RY. Specimen collection, transport and processing: Parasitology, pp: 1995-2012. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2007, ASM Press, Washington, DC.
4. Ok ÜZ, Yereli K. Parazitoloji laboratuvarlarında sık kullanılan dışkı inceleme yöntemlerinin değerlendirilmesi. Türkiye Parazitoloji Derg 1996; 20: 285-92.
5. Garcia LS, Shimizu RY, Shum A, Bruckner DA. Evaluation of intestinal protozoan morphology in polyvinyl alcohol preservative: comparison of zinc sulfate- and mercuric chloride-based compounds for use in Schaudinn's fixative. J Clin Microbiol 1993; 31: 307-10.
6. Estevez EG, Levine JA. Examination of preserved stool specimens for parasites: lack of value of direct wet mount. J Clin Microbiol 1985; 22: 666-7.
7. Ok ÜZ, Korkmaz M, Ok GE, Özkan AT, Özcel MA. Barsak protozoasının tanısında nativ-Lugol, formol-eter konsantrasyon ve trichrome yöntemlerinin karşılaştırılması. Türkiye Parazitoloji Derg 1996; 20: 77-84.
8. Ok ÜZ, Cirit M, Üner A, et al. Cryptosporidiosis and blastocystosis in renal transplant recipients. Nephron 1997; 75: 171-4.
9. Girginkardeşler N, Coşkun Ş, Balcıoğlu İC, Ertan P, Ok ÜZ. *Dientamoeba fragilis*, a neglected cause of diarrhea, successfully treated with secnidazole. Clin Microbiol Infect 2003; 9:110-3.
10. Ash LR, Orihel TC. Ash & Orihel's Atlas of Human Parasitology. 2007, 5th ed. American Society for Clinical Pathology Press, Chicago, IL.

## SEROLOJİK İNCELEMELER

Prof. Dr. Metin Korkmaz

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

Parazitik enfeksiyonların tanısında dolaylı tanı yöntemlerine sıklıkla baş vurulur. Parazit antijenlerine karşı oluşmuş özgül antikorları veya özgül antikorlarla parazit antijenlerini saptayan serolojik tanı yöntemleri, daha çok kan ve dokularda yerleşerek hastalık oluşturan parazitlerin araştırılmasında kullanılır. Bu yöntemler tek başlarına tanı koyduracak özellikte olmamalarına karşılık, bazı parazitik enfeksiyonların tanısında en önemli destekleyici bilgiyi sağlamaktadırlar. Bununla birlikte bir serolojik testin ne kadar iyi veya yeni olduğu değil, uygun durumlarda istenilmesinin önem taşıdığı ve testlerin her koşulda klinik bulgular ile birlikte değerlendirilmesi gerektiği unutulmamalıdır. Serolojik yöntemler, özellikle helmantik enfeksiyonların tanısında kullanıldığında başka helmintlere bağlı antikorların çapraz reaksiyonları yanıltıcı olabilir. Bu nedenle testler değerlendirilirken testlerin performans değişkenleri bilinmeli, testin değil hastanın tedavi edildiği göz önünde bulundurulmalıdır. Serolojik testler;

1. Tanı ve hastaların izlenmesi için gerekli,
2. Komplikasyonları ve hastalığın gidişini değerlendirmede yararlı,
3. Araştırma uygulamaları ile sınırlı (gelecek için potansiyel) olarak değerlendirilebilir.

Serolojiye dayalı yöntemler genelde enzim ile işaretli antikor veya antijenin kullanıldığı immunosorbent ölçümler (ELISA), indirekt hemagglütinasyon (IHA), direkt veya indirekt floresan antikor yöntemi (DFA, IFA), Western blot (WB) yöntemi ve hızlı tanı testlerine dayanır.

Antijen veya antikoru immünokromatografik yöntemlerle saptamaya çalışan hızlı tanı testleri, özellikle sıtmada olmak üzere bir çok parazitik enfeksiyonda mikroskopiye destek olarak kullanım alanı bulmuştur. Hızlı tanı testleri, sıtmada *Plasmodium falciparum*'un histidinden zengin proteini veya türe özgül laktat dehidrogenaz enzim izotiplerini saptamaya çalışır. Basit, ucuz, hızlı ve fazla deneyim gerektirmeyen bu yöntemler, kırsal bölgelerdeki sıtma enfeksiyonlarının tanısında yararlı bulunmuş; Afrika ülkelerinde kullanılan hızlı tanı testlerinin, gereksiz tedavileri ve potansiyel direnç gelişimini engelleyebileceği belirtilmiştir. Sıtma tanısına yönelik 80'den fazla hızlı tanı geliştirilmiş ve bunlardan 23'ünün Dünya Sağlık Örgütü'nün koyduğu uluslararası pazarlama kriterlerine uyduğu belirtilmiştir.

Viseral *Leishmaniasis* tanısında, mikroskopi ve kültürün yanı sıra sınırlı sayıda laboratuvarlarda IFA testi kullanılmaktadır. rK39 antijenine karşı oluşmuş antikorları saptamaya yönelik hızlı tanı testlerinin duyarlılık ve özgüllükleri yüksektir. Bu hızlı tanı testleri, yeterli donanıma veya deneyimli personele sahip olmayan laboratuvarlar için önemli bir destek sağlayabilir. Toxoplasmosis tanısında temel olarak serolojik testlerden yararlanılır. Serolojide Sabin-Feldman boya testi referans olarak değerlendirilen bir test olmakla birlikte, canlı *Toxoplasma gondii* kullanılması ve uygulama güçlüğü nedeniyle Türkiye'de çok az merkezde yürütülmekte, tanıda genelde ELISA ve IFA yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Günümüzde HIV, organ transplantasyonları ve bağışıklık sistemini baskılayan ilaçların kullanımı hastalığın önemini artırmakla birlikte, annenin hamileliği sırasında etken ile ilk kez karşılaştığında gelişebilen konjenital enfeksiyon riski nedeniyle özellikle hamilelerde serolojik incelemelerle akut enfeksiyon araştırılır. Sero-negatif iken pozitifleşme, anti-*Toxoplasma* IgM, IgA, IgE antikorlarında artış, düşük IgG aviditesi veya üç hafta aryla 4 katlık anti-*Toxoplasma* IgG artışı yakın dönemde edinilmiş enfeksiyonu destekleyen göstergelerdir. Tek serum örneğiyle ve özgül IgG antikorlarıyla avidite testinde kişinin geçmişte herhangi bir zamanda etkeni aldığı araştırılabilir. Yüksek aviditenin 4 aydan önce edinilmiş bir enfeksiyonu desteklemesi, hamilelerde gereksiz endişe ve yanlış tedavi olasılığını azaltabilir.

Barsakta yerleşen protozoonların tanısında, antijen yakalamaya yönelik hızlı tanı veya ELISA testleri ticari olarak pazarlanır. Aynı testte birden fazla protozoonu araştıran testler, deneyimli personeli olma-

yan laboratuvarlar için alternatif bir seçenek olabilir. Ancak bu testlerin performans değişkenleriyle ilgili deneyim ve bilgilere gereksinim duyulmaktadır. İnvazif amebiasis olgularında, antiamebik antikorların araştırılmasına yönelik ticari IHA kitleri bulunmakla birlikte ekonomik olmaması kullanımını sınırlamaktadır.

Kist hidatiğin serolojik tanısında IHA, ELISA ve WB yöntemleri kullanılır. Bu yöntemlerin duyarlılıkları, lezyonların kalsifiye veya inaktif olması veya karaciğer dışında yerleşmesi halinde düşer. Diğer helmintik enfeksiyonlara bağlı çapraz reaksiyonlar nedeniyle yalancı pozitifliklere de sık rastlanılır. Bu nedenle birden fazla serolojik yöntem (örneğin IHA ve ELISA) birlikte kullanılarak duyarlılık ve özgüllük artırılmaya çalışılır. WB yöntemi kullanılarak alveolar ve kistik ekinokokkozun ayırımı yapılabilir.

Toxocariasis tanısında en önemli desteği serolojik yöntemler sağlar. Serolojik tanıda, genelde *Toxocara* larvaların çıkartı/salgısal antijenlerinin kullanıldığı ve anti-*Toxocara* IgG antikorlarının araştırıldığı ELISA yöntemi tercih edilir. Bununla birlikte kullanılan bu antijenlerin bazı bileşenleri, diğer helmint türleriyle çapraz reaksiyonlar verebilmekte, helmint enfeksiyonlarının sık rastlandığı bölgelerde tanısız açıdan sıkıntılara yol açabilmektedir. Yalancı pozitiflikleri azaltmak için WB yönteminin kullanılması ve düşük moleküler ağırlıklı bantlarla ELISA pozitifliğinin doğrulanması önerilir. Serolojinin önemli olduğu bu helmintik enfeksiyonda, ELISA yönteminde negatif saptanan bazı olguların WB yönteminde pozitif saptanmış olması (kişisel deneyim), tanının ilk basamağında WB yönteminin kullanılmasına neden olmuştur. Son yıllarda geliştirilen farklı rekombinant antijenlerin birlikte kullanıldığı ve IgG4 antikorlarının araştırıldığı ELISA yöntemleri, gelecek için potansiyel tanı testleri olarak değerlendirilebilir.

Fasciolosis tanısında serolojik yöntemlerin temel tanı yöntemleri olarak değerlendirilmesi gerektiği, bu yöntemlerle dışkıda yumurtalarının henüz görülmediği dönemde bile tanıya gidilebileceği ve tedavinin izlenmesinde yararlı oldukları belirtilmektedir. Tanıda genellikle *Fasciola hepatica*'nın çıkartısal/salgısal veya kısmen saflaştırılmış antijenlerinin kullanıldığı IHA veya ELISA yöntemlerinde parazite karşı oluşmuş antikorlar araştırılır. Ticari IHA kitleri veya bazı merkezlerin kendilerinin hazırladığı ELISA yöntemleriyle enfeksiyonun serolojik tanısı yapılmaktadır.

Trichinellosis tanısı temel olarak klinik ve anamneze dayanmakla birlikte şüpheli olgularda tanıyı desteklemek amacıyla serolojik testlere gereksinim duyulur. Antikorların araştırılmasına dayanan ve saflaştırılmış antijenler kullanılarak duyarlılık ve özgüllükleri artırılmış ELISA kitleri, diğer laboratuvar bulguları ile birlikte trichinellosis tanısına yardımcı olmaktadır. 2004 yılında İzmir'de bir çiğ köfteciden kaynaklanan salgın sırasında kullanılan serolojik yöntemler, salgının anlaşılmasına ve hastaların tedavisine önemli katkılarda bulunmuştur. Günümüzde az sayıda olmakla birlikte, ayırıcı tanıda trichinellosis düşünülen ve serolojik destek istenilen olgulara rastlanılmaktadır.

Lenfatik filariasis tanısında temel yöntem mikroskopisi olmakla birlikte, bunun için genelde iyi eğitilmiş deneyimli personel gereksinimi duyulur. Tanıya destek amacıyla filariyal IgG4 antikorlarının araştırıldığı serolojik yöntemlerde, filariyal türlerin tümüyle çapraz reaksiyon veren *Dirofilaria immitis* antijenlerinin kullanılıyor olması nedeniyle duyarlılık ve özgüllük düşüktür. Antijen saptamaya yönelik geliştirilen hızlı tanı ve ELISA testlerinin ise oldukça duyarlı ve özgül olduğu belirtilmektedir. Ülkemizde klinik olarak ayırıcı tanıda filariyasis düşünülen olgularla karşılaşılacakla birlikte, Türkiye'de filariasis varlığı kuşkuludur. Durumun anlaşılması amacıyla Ankara Refik Saydam Hıfzıssıhha Başkanlığı serolojik olarak ICT kart testiyle filariasis tanısına destek olmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Duffy P, Fried M. Malaria: new diagnostics for an old problem. Am J Trop Med Hyg 2005; 73:482-3.
2. Mohamad S, Azmi NC, Noordin R. Development and evaluation of a sensitive and specific assay for diagnosis of human toxocariasis by use of three recombinant antigens (TES-26, TES-30USM, and TES-120). J Clin Microbiol 2009; 47:1712-7.

3. Molyneux DH. Filariasis control and elimination: diagnostic, monitoring and surveillance needs. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103:338-41.
4. Ndao M. Diagnosis of parasitic diseases: old and new approaches. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009; 2009: 278246.
5. Ozturhan H, Emekdaş G, Sezgin O, Korkmaz M, Altıntaş E. Seroepidemiology of *Fasciola hepatica* in Mersin province and surrounding towns and the role of family history of the fascioliasis in the transmission of the parasite. *Turk J Gastroenterol* 2009; 20:198-203.
6. Rosenblatt JE. Laboratory diagnosis of infections due to blood and tissue parasites. *Clin Infect Dis* 2009; 49:1103-8.
7. Sensini A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:504-12.
8. Sharp SE, Suarez CA, Duran Y, Poppiti RJ. Evaluation of the Triage Micro Parasite Panel for detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* in patient stool specimens. *J Clin Microbiol* 2001; 39:332-4.
9. Torgerson PR, Deplazes P. Echinococcosis: diagnosis and diagnostic interpretation in population studies. *Trends Parasitol* 2009; 25:164-70.
10. Turk M, Kaptan F, Turker N, et al. Clinical and laboratory aspects of a trichinellosis outbreak in Izmir, Turkey. *Parasite* 2006; 13:65-70.

## İDRAR KÜLTÜRÜ

Prof. Dr. Özay Arıkan Akan

*Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İbni Sina Hastanesi Merkez Laboratuvarı, Ankara.*

İdrar kültürleri mikrobiyoloji laboratuvarında en sık rastlanan kültürlerdir. Bunun bir nedeni idrar yolu enfeksiyonlarının hastane içi ve dışı ortamlarda sıklığı, diğer bir nedeni de idrar kültür örneğinin göreceli olarak kolay elde edilebilir bir materyal olmasıdır. Amerika Birleşik Devletleri'nde en sık rastlanan bakteriyel enfeksiyon olarak her yıl 7-8 milyon doktor başvurusunun nedeninin semptomatik idrar yolu enfeksiyonları olduğu tespit edilmiştir. Hastane enfeksiyonlarının %35'inden bu enfeksiyonlar sorumludur. Bu durumda mikrobiyoloji laboratuvarlarında idrar kültürü örneklerinin en sık rastlanan örnekler olması yadsınmaz.

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarının görevi, konu ile ilgili tanıyı ve tedaviyi yönlendirecek gerekli bilgileri (test sonuçlarını) maliyet-etkinlik kuralları çerçevesinde sunmaktır.

Bunun gerçekleşmesi için ;

1. İdrar yolu enfeksiyonlarının klinik tipleri
2. Özellikli hasta grupları
3. Neden olan etkenler
4. Örnek temini
5. Örneğin laboratuvar-içi değerlendirmesi ve raporlanması

konularında bilgi birikiminin yeterli olması ve laboratuvarında bu konularla ilgili protokollerinin hazır olması gereklidir.

Bu konuda klasikleşmiş yaklaşım modellerinin yanı sıra, özellikle örnek alımı, etkenler ve/veya antibiyotik duyarlılık durumları, kültür öncesi tarama testlerinin kullanımı, kültürlerin değerlendirilmesi, yeni ortaya çıkan etkenler gibi konulardaki olası değişikliklerin farkında olunması, bu değişikliklerle pratik uygulamada karşılaşma sıklığımız ve tercihan kliniklere yansımaları ile birlikte değerlendirilmesi, laboratuvarımıza yeni bir bakış açısı kazandıracak ve kullanılmakta olan protokollerin yeniden gözden geçirilmesini sağlayacaktır.

Protokoller oluşturulurken şu soruların yanıtlarının göz önüne alınması gerekmektedir.

1. Çalıştığımız merkezde bize gönderilen idrar örnekleri uygun olarak alınıyor mu? (analiz – öncesi dönem): Hastanemizde idrar kültürü alımında kullanılan ekipman ve yöntemler, ayrıca laboratuvara gönderilme süre ve koşulları nelerdir?
2. İdrar örneği ile birlikte bilmek istediğimiz hasta bilgileri neler? (semptomatik – asemptomatik hasta, antimikrobiyal kullanımı)
3. Laboratuvar içi uygulamalarında kültür öncesi herhangi bir yaklaşım söz konusu olmalı mı? (örnek uygunluğu ya da tarama testleri kullanılıyor mu?)
4. Kültür ekmek için kullanılacak besiyerleri ne olmalı? Yeni besiyerlerine ya da yeni yöntemlere ihtiyaç var mı?
5. Kültür değerlendirirken kullanılacak kriterler ne olmalı?
6. Raporlama nasıl yapılmalı?

## 7. İdrar kültürü uygulamaları sırasında “olmazsa olmaz” kurallarımız olmalı mı?

Bu bilgiler ışığında hazırlanacak olan “idrar yolu enfeksiyonlarında tanısal yaklaşım protokolleri”, laboratuvarımızda bu enfeksiyonlara güncel, güvenilir ve maliyet-etkin değerlendirmeyi sağlayacaktır.

**KAYNAKLAR**

1. Abrams P, Cardozo L, Fall M, et al. The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn* 2002; 21:167-78.
2. Alam MT, Coulter JB, Pacheco J, et al. Comparison of urine contamination rates using three different methods of collection: clean-catch, cotton wool pad, and urine bag. *Ann Trop Pediatr* 2005; 25:29-34.
3. Colgan R, Nicolle LE, McGlone A, Hooton TM. Asymptomatic bacteriuria in adults. *Am Fam Physician* 2006; 74: 985-90.
4. Kunin CM, White LV, Hua TH. A reassessment of the importance of ‘low count’ bacteriuria in young women with acute urinary symptoms. *Ann Intern Med* 1993; 119:454-6.
5. Lifshitz E, Kramer L. Outpatient urine culture: does collection technique matter? *Arch Intern Med* 2000; 160:2537-40.
6. McCarter YS, Burd EM, Hall GS, Zervos M. Laboratory diagnosis of urinary tract infections. *Cumitech 2C*. 2009. ASM Press, Washington DC.
7. Miller JM (ed). *A guide to specimen management in clinical microbiology*. 1998, 2nd ed. ASM Press, Washington DC.
8. Sierra-Hoffman M, Watkins K, Jinadatha C, Fader R, Carpenter JL. Clinical significance of *Aerococcus* *urinae*: A retrospective review. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53:289-92.
9. Stamm WE, Counts GW, Running KR, Fihn S, Turck M, Holmes KK. Diagnosis of coliform infection in acutely dysuric women. *N Engl J Med* 1982; 307:463-8.
10. Wilson ML, Gaido L. Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. *Med Microbiol* 2004; 38:1151-8.

## DIŞKI KÜLTÜRÜ

Prof. Dr. Meral Gültekin

*Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.*

Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarları, kullandıkları testlerin analitik değerlerinin yanı sıra klinik kullanılabilirlik ve faydasını da bilmeli ve yorumlamalıdır. Örneğin; “bir test ile elde edilen sonuç, hastaların tedavisinde, salgınların saptanmasında ve kontrolünde yararlı mıdır?” ve “klinisyen tedavisini bu sonuca göre mi belirleyecektir?” sorularına yanıt alınabilmelidir. Öte yandan, bir tanı testinin klinik yararlılığı, tetkik yapılan grupta o enfeksiyonun sıklığına da bağlı olduğundan, araştırılan etkenin neden olduğu enfeksiyon hastalığının insidans ve prevalansını da değerlendirmek durumundadır. Bir test ile ilgili olarak “doğru mu?” sorusuna vereceğimiz yanıtlar, o testin analitik doğruluk-geçerlilik özellikleridir. Bunlar; duyarlık, özgüllük, pozitif belirleyici değer ve negatif belirleyici değer olarak değerlendirilir. Klinik duyarlılık-geçerlilik ise “test anlamlı mı?” sorusuna alınacak yanıtlardır. Ve nihayet “test yararlı mı?” diye sorulduğunda alınacak yanıt “klinik yararlılık” olarak değerlendirilir.

Bu oturumda, yukarıdaki özellikler ışığında ve maliyet-etkin çalışmaların sonuçlarına göre, dışkı örneklerinin laboratuvar değerlendirmesinde aşağıdaki sorulara yanıt arayarak algoritmalar uygulamaya çalışacağız.

### Pre Analitik Evre

- Dışkı örneği ne zaman, nasıl alınmalıdır?
- Rektal sürüntü örneği kimlerden alınabilir?
- Dışkı örneği laboratuvara nasıl gönderilmelidir? Red kriterleri nelerdir?
- Ardışık örnek duyarlılığı artırır mı?
- Dışkı örneği kabulünde uygulanması önerilen ‘üç gün kuralı’ nedir?

### Analitik Evre

- Direkt mikroskopik inceleme yapalım mı?
- Gram boyama yapalım mı? Başka boya kullanalım mı?
- Fekal laktoferrin testinin değeri nedir? Salgın durumunda kullanalım mı?
- Etkenlerden (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, barsak patojeni *E.coli*, *Aeromonas*, vb) hangilerine yönelik rutin kültür uygulaması yapalım? Hangilerini özel durumlarda yapalım?
- Yaş gruplarına göre kültür besiyerlerini farklı kullanalım mı? Hangi besiyerlerini kullanalım?
- Zenginleştirme besiyerleri kullanalım mı? CHROMağarları kullanalım mı?
- Tanımlama aşamasında süreyi kısaltabilen biyokimyasal testler algoritması, uygulama sonuçları nelerdir?
- Tanımlamada cins düzeyinde tanımlama yeterli mi ?
- Otomatize sistemlerin yeri nedir ?
- Antibiyogram yapalım mı?
- *C.difficile* tanısında glutamat dehidrogenaz testinin tarama değeri var mı?



## Post Analitik Evre

- Sonuçları nasıl raporlayalım?
- Antibiyogram yaptıysak nasıl raporlayalım?

## KAYNAKLAR

1. De Ryck R, Struelens MJ, Serruys E. Rapid biochemical screening for *Salmonella*, Shigella, Yersinia and Aeromonas isolates from stool specimens. J Clin Microbiol 1994; 32:1583-5.
2. Goldenberg SD, Cliff PR, Smith S, et al. Two-step glutamate dehydrogenase antigen, real time polymerase chain reaction assay for detection of toxigenic *Clostridium difficile*. J Hospital Infect 2010; 74:48-54.
3. Imperatrice CA, Nachamkin I. Evaluation of the Vitek EPS enteric pathogen screen card for detecting *Salmonella*, Shigella, and Yersinia spp. J Clin Microbiol 1993; 31:433-5.
4. van Langerberg DR, Gearry RB, Wong HL, Ward M, Gibson PR. The potential value of fecal lactoferrin as a screening test in hospitalized patients with diarrhea. Intern Med J 2009; Oct 22. [Epub ahead of print]
5. Maddodes S, Olma T, Chen S. Comparison of CHROMAgar *Salmonella* medium and xylose-lysine-desoxycholate and *Salmonella*-Shigella agars for isolation of *Salmonella* strains from stool samples. J Clin Microbiol 2002; 40:2999-3003.
6. Wilson G. Rapid and economical method for biochemical screening of stool isolates for *Salmonella* and Shigella species. J Clin Microbiol 2004; 42:4821-3.
7. Yazıcı V, Gültekin B, Aydın N ve ark. Akut gastroenteritli olguların dışkı örneklerinde bazı bakteri ve virusların araştırılması. ANKEM Derg 2009; 23:59-65.

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

DEĞERLİ HOCAMIZIN ANISINA SAYGIYLA...



## SOLUNUM YOLLARI ENFEKSİYONLARINDA İMMÜNOPATOGENEZ

Prof. Dr. Selim Badur

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

*Ulusal Influenza Referans Laboratuvarı.*

*“If grippe condemns, the secondary infection execute”  
(Louis Cruvelhier, 1919)*

Solunum sistemi enfeksiyonlarından sorumlu virusların, ikincil enfeksiyonların “önünü açtığı”; özellikle grip pandemileri sırasında kaybedilen olgularda, bu olumsuz gelişmeden sekonder bakteri enfeksiyonlarının sorumlu olduğu uzun yıllardır kabul edilen bir gerçektir. Tüm pandemilerin “atası” kabul edilen 1918 pandemisine ait kayıtlar incelendiğinde, bakteriyel pnömoni tablosunun ölümlerin nedeni olarak değerlendirildiği görülmekte; o günlerin koşullarında etken olarak izole edilen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* gibi etkenlerin sorumlu patojenler olarak ele alındığı anlaşılmaktadır<sup>1</sup>. İlk gözlemleri izleyen yıllarda, özellikle tanı tekniklerindeki gelişmelere paralel olarak, solunum sistemini ilgilendiren patolojilerde virus-bakteri birlikteliğinin “sırları” açığa kavuşturulmuş; bu tür koenfeksiyonların sıklığı ve önemi vurgulanmıştır<sup>2</sup>.

Konunun ayrıntılarını irdeleyen ve etkileşim mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik ilk hayvan deneyleri 1945 yılına dayanmaktadır. Bu tarihte kobay, fare ve sıçanlarla başlatılan çalışmalarda, deney hayvanlarına adapte edilen Influenza A/Puerto Rico/8/34 (PR8) suşu kullanılarak intranasal yoldan *Haemophilus influenzae*, *S.pneumoniae* ve *S.aureus* ile koenfekte edilen farelerde fatal pnömoni gelişimi izlenmiş; daha sonraları ise benzer deneyler gelincikler üzerinde yinelenerek pnömokoksik otitis media ve sinüzit tablolarının oluşum mekanizmaları araştırılmıştır<sup>3-5</sup>.

20. yüzyılın son yıllarında ise, solunum yolları enfeksiyonları etkenleri arasında yüksek morbidite ve bazı özel gruplarda yüksek mortalite ile seyreden influenza viruslarının neden oldukları patolojilerin önemi ve yaygınlığı konusu üzerinde sıklıkla durulmaya başlanmıştır. Özellikle 2006 yılında H5N1 ile ortaya çıkan pandemi riski ve 2009 yılında H1N1 suşunun neden olduğu “gerçek” pandemi, influenza viruslarının nasıl ölümcül enfeksiyonlara yol açtıklarını; bu “masum” görünüşlü etkenlerin hangi yolları kullanarak bakteri enfeksiyonlarına zemin hazırladıklarını irdeleyen çalışmaların artmasına neden olmuş; sonuçta pandemi planlarının hazırlanmasında bu özel koenfeksiyon tablosunun göz ardı edilmemesi vurgulanmıştır<sup>6</sup>.

Günümüzde influenza viruslarının hem mekanik yolları kullanarak, hem de aktif biçimde antibakteriyel immün yanıtı olumsuz yönde etkileyerek bakterilerin “önünü açtığı” kanıtlanmıştır. Influenza viruslarının doğal bağışıklık ile ilişkileri, immünokompetan hücreler yüzeyinde yer alan TLR7 ve RIG-I reseptörleri aracılığı ile başlamaktadır. Bu iki patern tanıyan reseptörün aktivasyonu sonucunda, IRF-7 ve IRF-3 sinyal ileti yolları üzerinden anti-viral özelliği bilinen **interferonların** (IFN) üretimi gerçekleşir<sup>7</sup>. Ancak gelincik modelleri kullanılarak gerçekleştirilen ölümcül influenza enfeksiyonlarında, deney hayvanlarında IFN düzeyinin azaldığı; buna karşın **IL-6** miktarının artmış olduğu saptanmıştır<sup>8</sup>. Bu tip bir IFN defektinin nasıl gerçekleştirildiği incelendiğinde, influenza viruslarının Jak/Stat yoluna müdahale ettikleri<sup>9</sup>; bu gelişmede **NS1 proteinlerini** kullandıkları gösterilmiştir<sup>10</sup>. Bu arada aynı virus grubunun **SOCS3** ekspresyonunu kamçılıyarak da, özellikle tip 1 IFN sinyalizasyonunu inhibe ettiği de gösterilmiştir<sup>11</sup>.

Influenza viruslarının **PB1-F2 proteini** de patogeneizde rol oynayan önemli bir yapıtaşdır. Özellikle polimeraz aktivitesini artırarak ve RNA yığılmasına neden olarak etki gösteren bu protein, dolaylı yoldan fatal pnömoni tablosunun hazırlayıcısı olarak kabul edilmektedir<sup>12,13</sup>. Bu arada, genel anlamda influenza viruslarının sitokin dünyası üzerine etkili olarak hastalık seyrini değiştirdiği anlaşılmıştır. Nitekim aşırı **IL-10** üretimine yol açarak konağın pnömokoksik pnömoniye duyarlılığını artıran influenza suşları<sup>14</sup>;

kemik iliği kaynaklı dendritik hücrelerdeki **IL-12p35** transkripsiyonunu baskılayarak immünoşüpresyona neden olurlar<sup>15</sup>. Bu arada influenza virüsleri ile oluşan salgınlar sırasında, fatal olgularda genellikle bir “sitokin fırtınasının” gerçekleştiği ve bu tür bir aşırı sitokin üretiminin bir çok sorunun nedeni olduğu anlaşılmıştır<sup>16</sup>.

Influenza A virüsleri, anti-bakteriyel immünitede önemli bir doğal direnç yapıtaşı olan **nötrofilleri** apoptoza sürükleyerek bu hücrelerin yaşam süresinin kısalmasına; böylece bakteri enfeksiyonunun kolayca yayılmasına yol açarlar<sup>17</sup>. Aynı etkenler, doğal direncin bir diğer hücresel yapıtaşları olan **NK hücrelerine** de etki etmektedirler. Nitekim influenza suşlarının **NK**’ları enfekte ederek apoptoza sürükledikleri; MHC-I proteinlerinin yüzey ekspresyonunu artırarak bu hücreleri devre dışı bırakabildikleri gösterilmiştir<sup>18,19</sup>. Ayrıca yukarıda değinilen sitokinler ve hücreler üzerine etkileri yoluyla, bakterilere karşı enfekte ettikleri organizmaları savunmasız kılan influenza virüslerinin, inhibitör reseptörler olan **CD200** dengesini bozarak; ve nihayet serum **glukokortikoid** düzeyini artırarak da immün yanıtı olumsuz etkilediği gösterilmiştir<sup>20,21</sup>.

Özet olarak, influenza virüslerinin ağırlıklı olarak doğal direnç parametrelerine etki ederek bakteri enfeksiyonlarına zemin hazırladıklarını; bu virüslerin yol açtığı enfeksiyonların immünolojik açıdan ciddi yıkımlara neden olduklarını ve alınacak önlemlerde konuya bu açıdan bakmanın da önemli olduğunu söylemek olasıdır.

#### KAYNAKLAR

1. Hament JM, Kimpen JL, Fleer A, Wolfs TF. Respiratory viral infection predisposing for bacterial disease: a concise review. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 26:189-95.
2. Nichol K, Cherry J. Bacterial-viral interrelations in respiratory infections of children. *New Engl J Med* 1967; 277: 667-72.
3. McCullers JA. Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 571-82.
4. Peltola VT, Boyd KL, McAuley JL, Rehg JE, McCullers JA. Bacterial sinusitis and otitis media following influenza virus infections in ferrets. *Infect Immun* 2006; 74:2562-7.
5. Bakaletz LO. Developing animal models for polymicrobial diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 552-68.
6. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumoniae as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis* 2008; 198:962-70.
7. See H, Wark P. Innate immun response to viral infection of the lungs. *Paediatr Resp Rev* 2008; 9: 243-50.
8. Svitek N, Rudd PA, Obojes K, Pillet S, von Messling V. Severe seasonal influenza in ferrets correlates with reduced interferon and increased IL-6 production. *Virology* 2008; 376:53-9.
9. Uetani K, Hiroi M, Meguro T, et al. Influenza A virus abrogates IFN- $\alpha$  response in respiratory epithelial cells by disruption of the Jak/Stat pathway. *Eur J Immunol* 2008; 38:1559-73.
10. Fernandez-Sesma A, Marukian S, Ebersole BJ, et al. Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein. *J Virol* 2006; 80:6295-304.
11. Pauli EK, Schmolke M, Wolff T, et al. Influenza A virus inhibits type 1 IFN signaling via NF-kappaB-dependent induction of SOCS-3 expression. *PloS Pathol* 2008; 4: e1000196.
12. Zamarin D, Ortigoza MB, Palese P. Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J Virol* 2006; 80: 7976-83.
13. Conenello GM, Palese P. Influenza A virus PB1-F2: a small protein with a big punch. *Cell Host Microbe* 2007; 2: 207-9.
14. van der Sluijs K, van Elden LJR, Nijhuis M, et al. IL-10 is an important mediator of the enhanced susceptibility to pneumococcal pneumonia after influenza infection. *J Immunol* 2004; 172: 7603-9.
15. Noone CM, Lewis EA, Frawley AB, et al. Novel mechanism of immunosuppression by influenza virus haemagglutinin: selective suppression of interleukin 12p35 transcription in murine bone marrow-derived dendritic cells. *J Gen Virol* 2005; 86 (Pt 7): 1885-90.
16. De Jong MD, Simmons CP, Thanh TT et al. Fatal outcome of human Influenza A (H5N1) is associated with high viral

- load and hypercytokinemia. *Nat Med* 2006; 12:1203-7.
17. Engelich G, White M, Hartshom KL. Neutrophil survival is markedly reduced by incubation with influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*: role of respiratory burst. *J Leukoc Biol* 2001; 69:50-6.
  18. Mao H, Tu W, Qin G, et al. Influenza virus directly infects human natural killer cells and induces cell apoptosis. *J Virol* 2009;83: 9215-22.
  19. Achdout H, Manaster I, Mandelboim O. Influenza virus infection augments NK cell inhibition through reorganization of major histocompatibility complex class I proteins. *J Virol* 2008;82: 8030.
  20. Rygiel TP, Rijkers ES, de Ruiter T, et al. Lack of CD200 enhances pathological T cell responses during influenza infection. *J Immunol* 2009; 183: 1990-6.
  21. Jamieson AM, Yu S, Annicelli CH, Medzhitov R. Influenza virus-induced glucocorticoids compromise innate host defense against a secondary bacterial infection. *Cell Host Microbe* 2010; 7:103-14.

## İNFLUENZA A (H1N1) 2009 VİRUSUNUN LABORATUVAR TANISI

Dr. Meral Akçay Ciblak

*İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı, Ulusal İnfluenza Referans Laboratuvarı, İstanbul.*

13 Nisan 2009 tarihinde ABD'nin California eyaletinin San Diego şehrinde 10 yaşında bir çocuk, ateş, öksürük ve kusma belirtileri ile polikliniğe başvurmuş ve alınan nazofaringeal sürüntü örneğinde influenza A virusu saptanmıştır. Ancak A/H1N1, A/H3N2 ve A/H5N1 alt tiplere çalışmaları negatif sonuç vermiş; örnek ileri tetkikler yapılması amacıyla CDC'deki referans laboratuvarına ulaştırılmıştır. CDC'de yapılan incelemeler sonucunda virusun mevsimsel A/H1N1'den farklı genler taşıyan "swine influenza A(H1N1)" olduğu saptanmıştır<sup>1</sup>. Aynı haftalarda Meksika'nın bazı bölgelerinde influenza benzeri hastalık salgınları meydana gelmiş, dizi analizleri bu salgınların etkeninin California'da saptanan virüsle aynı olduğunu göstermiştir<sup>2</sup>. Takip eden günlerde salgın farklı coğrafyalarda hızla yayılmaya başlamış, ve nitekim DSÖ, 11 Haziran 2009'da yüzyılın ilk pandemisini ilan etmiştir<sup>3</sup>.

Pandemi ile beraber laboratuvarlar hızlı, duyarlı ve kapasitesi artırılabilir tanı yöntemi arayışına girmiştir. Bu yazıda, doğru örnek alımından başlanarak, pandemik influenza A (H1N1) virusunun laboratuvar tanısında dünya genelinde ve ülkemizde kullanılan tanı yöntemleri özetlenmiştir.

### Örnek Seçimi

Tüm hastalıklarda olduğu gibi pandemik influenzanın laboratuvar tanısında da örneğin kalitesi önem taşımaktadır. Uygun dönemde ve bölgeden alınarak, uygun koşullarda laboratuvara ulaştırılmayan örneklerde "yanlış" sonuç alma riski artmaktadır. Pandemik influenza tanısı için örneklerin, viral atılımın en yoğun olduğu hastalık semptomlarının başlangıcından sonraki ilk üç gün içinde alınması gerekmektedir. Ancak zorunlu durumlarda, viral atılımın, belirtilerin başlangıcından sonra azalarak da olsa ortalama olarak 7 gün kadar sürdüğü göz önüne alınarak, ilk üç gün içinde örnek alınamadıysa belirtilerin başlangıcından sonraki yedi gün içinde de örnek alınabileceği bildirilmektedir<sup>4</sup>. Viral atılımın 7 günden fazla sürdüğü durumlarda, örneğin oseltamivir tedavisi alan hastalarda, olası direnç gelişimini araştırmak amacıyla örnek alınıp laboratuvara ulaştırılabilir<sup>5</sup>.

Mevsimsel influenzanın tanısında olduğu gibi pandemik influenzanın tanısı için de üst solunum yollarından alınan örneklerin uygun olduğu bildirilmiştir. Buna göre sırasıyla, nazofaringeal sürüntü, burun sürüntüsü, nazofaringeal aspirat ve bronşiyal aspirat uygun olan örneklerdir<sup>6</sup>.

Pandemik influenza (H1N1) 2009 tanısı için İstanbul Tıp Fakültesi, Ulusal İnfluenza Referans Laboratuvarında nazofaringeal sürüntü ve burun sürüntüsü örnekleri incelenmiştir. Ancak, bazı ağır olgulardan alınan burun sürüntüsü ve nazofaringeal sürüntü örnekleri negatif sonuç verirken, aynı hastaların akciğer otopsi örneklerinden pandemik A (H1N1) saptanmıştır. Singh ve ark.<sup>7</sup> farklı yaşlardaki üç hastada nazofaringeal sürüntü örneklerini negatif olarak saptarken, bronkoalveolar lavaj (BAL) örneklerini pozitif olarak saptadıklarını bildirmiştir. Bu nedenle özel durumlarda gerektiğinde endotrakeal aspirat, BAL ve balgam örnekleri de laboratuvara ulaştırılmalıdır<sup>4</sup>.

Sürüntü örnekleri için kullanılacak eküvyonlar PCR inhibitörü içermemelidir. Buna göre, eküvyonlar sentetik uçlu (polyester ya da dakron) olmalı ve sapı plastik ya da alüminyumdan yapılmış olmalıdır. Sürüntü örnekleri mutlaka 1-3 ml viral transport besiyeri içinde laboratuvara ulaştırılmalıdır. Ulaşımın sorun olduğu durumlarda örnekler viral transport besiyeri içinde, +4°C'de en fazla 4 gün saklanabilmektedir. Viral transport besiyeri dışındaki besiyerleriyle laboratuvara gönderilen örnekler tanı amacıyla kullanılamazlar.

## Laboratuvar Tanı Yöntemleri

### 1. Moleküler Yöntemler

ABD'nin California'daki indeks vakasından izole edilen influenza A virusunun dolaşımdaki A/H1N1 viruslarından farklı olduğu, dizileme yoluyla anlaşılmış ve bu ilk virusun gen dizileri 27 Nisan 2009 tarihinden itibaren A/California/04/2009 olarak NCBI, GeneBank'ta yayınlanmıştır<sup>8</sup>. Bunu takiben CDC, DSÖ, merkezi Londra olan Sağlık Koruma Merkezi (HPA) ve Kanada Halk Sağlığı Merkezi gibi kuruluşlar mevcut moleküler yöntemleri geliştirerek pandemik influenza virusunun tanısı için optimize etmiş ve referans laboratuvarlarıyla paylaşımına sunmuşlardır. CDC mevsimsel influenza tanı ve sürveyans çalışmaları için geliştirmiş olduğu "real-time reverse transcription-polymerase chain reaction" (rRT-PCR) tanı yöntemini modifiye ederek tanı paneline pandemik A(H1N1) 2009 virusunu da ekleyerek tanı protokolünü ülkemiz dahil birçok ulusal grip referans merkeziyle paylaşmıştır<sup>9</sup>.

Pandemi yayılmaya devam ettikçe yeni pandemik A (H1N1) gen dizilimleri gen bankasına bildirilmiş ve birçok farklı araştırmacı gen bankasındaki bu dizilimleri kullanarak primer ve prob dizayn ederek duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek rRT-PCR metodu geliştirmişlerdir<sup>10,11</sup>.

### 2.. Virus İzolasyonu

Virus izolasyonu güvenilir bir teknik olmasına rağmen, sonuç almak için birkaç gün gerektirmesi nedeniyle pandemik influenza enfeksiyonlarında kesin tanı amacıyla kullanılmaktadır. Mevsimsel influenza için kullanılan Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) hücre kültürü ya da embriyonlu yumurta, pandemik A (H1N1) virusu için de önerilen izolasyon yöntemleridir. Ancak mevsimsel influenza için laminar kabinde çalışmak yeterli olmasına karşın, pandemik A (H1N1) izolasyon çalışmalarının biyogüvenlik düzeyi 2 (BSL2) ortamında yapılması önkoşulu getirilmiştir<sup>6</sup>.

### 3. Hızlı Testler ve İmmüno Floresan (DFA) Testler

Mevsimsel influenza A ve B viruslarının tanısı için tasarlanmış, duyarlılıkları seçilen çalışma grubuna, örnekteki virus miktarına ve testi uygulayan kişiye göre değişebilen hızlı testlerin, kullanım kolaylığı ve 15-30 dakika gibi kısa sürede sonuç vermeleri nedeniyle pandemik A(H1N1) 2009 virusunun tanısında kullanımı gündeme gelmiş ve bu konuda bir çok araştırma yapılmıştır. Ancak yapılan çalışmalarda, farklı testler farklı yaş grupları ele alınarak değerlendirildiği için, bu çalışmaları birbiriyle kıyaslayarak bir sonuca varmak olası değildir. Örneğin CDC tarafından yayınlanan ilk raporda, hızlı testlerin pandemik H1N1 tanısındaki duyarlılıklarının %40-69 oranında olduğu, okul salgınlarının irdelendiği ikinci raporda aynı test grubu için bu oranın %47 olarak bulunduğu bildirilmiştir<sup>12,13</sup>.

DFA yönteminin hızlı testlerden daha duyarlı olduğu bildirilmektedir<sup>14</sup>. Ancak bu testler, mikroskop alt yapısı ve deneyimli personel gerektirmekte ve aynı zamanda bu testlerle influenza viruslarının alt tipleri saptanamamaktadır. Bu nedenle pandemik influenza A (H1N1) 2009 tanısındaki kullanımı ilgi görmemiştir.

Sonuç olarak, pandemik A (H1N1) 2009 tanısında nükleik asit bazlı testlerin diğer tüm yöntemlerden (hücre kültürü, DFA ve hızlı testler) üstün oldukları bildirilmiştir. Nükleik asit testleri, hızlı, duyarlı ve özgüllükleri yüksek olup kapasiteleri gerektiğinde artırılabilir. Hızlı testlerin pozitif prediktif değerleri (PPV) yüksek olmasına karşın, negatif prediktif değerleri (NPV) düşüktür ve influenza alt tiplerini saptayamamaktadır. Bu nedenle CDC, negatif hızlı test sonuçlarına göre klinik kararlar alınmasından kaçınılması gerektiğini vurgulamıştır<sup>14-16</sup>. Nitekim, hızlı test yapıldıktan sonra alt tiplere ve kesin tanı için mutlaka RT-PCR yapılmalıdır. Özellikle risk grubunda ve gebeler için doğru ve zamanında tanı koymanın önemi düşünülecek olursa, hızlı testlerin yarardan ziyade vakit ve ekonomik kayba yol açtıklarını söylemek yanlış olmaz.

Türkiye'deki iki Ulusal İnfluenza Referans Laboratuvarından biri olan İstanbul Üniversitesi, İstanbul



Tıp Fakültesi, Ulusal İnfluenza Referans laboratuvarı, CDC ile irtibata geçerek pandemik A (H1N1) 2009 tanısı için gerekli reaktifleri temin etmiş ve 24 Nisan 2009 itibariyle laboratuvara ulaştırılan örnekler rRT-PCR ile çalışılmaya başlanmıştır. CDC yöntemi, kantitatif “one-step probe” RT-PCR (Invitrogen SuperScript™III Platinum® One-Step Quantitative Kit) kullanılarak, 96 kuyucuklu pleyt sistemi ile çalışan ve dolayısıyla bir defada 20’den fazla örneğin test edilebilmesine olanak sağlayan Applied Biosystems™ real-time PCR (7000, 7300, 7500), BioRad real-time PCR Detection Systems (iQ™ ya da iQ5™) ve Stratagene QPCR Instruments (MX4000<sup>R</sup>, MX3000R ya da MX3005<sup>R</sup>) PCR cihazlarına uygun olarak optimize edilmiştir. CDC yöntemi, tanıda dört farklı hedef gen kullanmaktadır: Ünlversal İnf A matriks geni (İnf A), A/California/04/2009 matriks geni (SW İnfA), A/California/04/2009 H1 Geni (SW H1) ve son olarak da örneğin insandan ve doğru alındığını teyid etmek için Rnase P (RNP) kontrol geni<sup>8</sup>. Örnek sonucunun değerlendirilmeye alınması, ancak RNP geninin pozitif sonuç verdiği durumlarda mümkün olmaktadır. RNP sonucu negatif olan örnekler değerlendirilmeye alınmazlar. RNP sonucunun pozitif olduğu durumlarda, yukarıda sayılan üç parametreden en az ikisinin (İnf A+SW İnfA, İnf A+SW H1 ya da SW İnfA+SW H1) pozitif olduğu durumlarda örnekler pozitif olarak değerlendirilmektedir.

15 Mayıs 2009 tarihinde ise laboratuvarımız Türkiye’nin ilk “swine influenza” vakasının tanısını koymuştur<sup>17</sup>. Laboratuvarımız pandemik A(H1N1) 2009 tanısı için CDC rRT-PCR yöntemini kullanmaya devam etmektedir. İnfluenza virusları, biyolojik yapıları gereği devamlı mutasyon geçirdiklerinden dolayı virusların yapısı devamlı olarak incelenmekte ve rRT-PCR metodu buna göre CDC tarafından güncellenerek referans laboratuvarlarına iletilmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. CDC. Swine influenza A (H1N1) infection in two children-Southern California, March-April 2009. *Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58:400-2.
2. CDC. Outbreak of swine-origin influenza A (H1N1) virus infection-Mexico, March-April 2009. *Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58: 467-70.
3. WHO. World now at the start of 2009 influenza pandemic. [http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1\\_pandemic\\_phase6\\_20090611/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/en/index.html)
4. CDC. Interim guidance of specimen collection, processing and testing for patients with suspected novel influenza A (H1N1) virus infection. <http://www.cdc.gov/h1n1flu/specimencollection.html>
5. Ling LM, Chow AL, Lye DC, et al. Effects of early oseltamivir therapy on viral shedding in 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection. *Clin Infect Dis* 2010; 50:963-9.
6. WHO. WHO information for laboratory diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 virus in humans-revised. [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO\\_Diagnostic\\_RecommendationsH1N1\\_20090521.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO_Diagnostic_RecommendationsH1N1_20090521.pdf).
7. Singh K, Vasoo S, Stevens J, Schreckenberger P, Trenholme G. Pitfalls in the diagnosis of Pandemic (Novel) A/H1N1 2009 Influenza. *J Clin Microbiol* 2010; doi: 10.1128/JCM.02483-09.
8. NCBI, GenBank April 2009. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/FJ966082.1?ordinalpos=13&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence\\_ResultsPanel.Sequence\\_RVDocSumCDC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/FJ966082.1?ordinalpos=13&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence_ResultsPanel.Sequence_RVDocSumCDC).
9. CDC. Protocol of Real-time RT-PCR for Influenza A (H1N1). <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimertpcr/en/index.html>.
10. Carr MJ, Gunson R, Maclean A, et al. Development of a real time RT-PCR for the detection of Swine-lineage Influenza A (H1N1) virus infections. *J Clin Virol* 2009; 45: 196-9.
11. Whiley MD, Bialasiewicz, Bletchly C, et al. Detection of novel influenza A(H1N1) virus by real-time RT-PCR. *J Clin Virol* 2009; 45: 203-4.
12. CDC. Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A (H1N1) virus. United States, 2009. *MMWR* 2009; 58: 826-9.
13. CDC. Performance of rapid influenza diagnostic tests during two school outbreaks of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection-Connecticut, 2009. *MMWR* 2009; 58: 1029-32.

14. Boggild AK, McGeer J. Laboratory diagnosis of 2009 H1N1 influenza A virus. *Crit Care Med* 2010; 38: S1-S5.
15. Drexler JF, Hemler A, Kirberg H, et al. Poor clinical sensitivity of rapid antigen test for influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg Infec Dis* 2009; 15:1662-4.
16. Hurt AC, Baas C, Deng Y-M, Roberts S, Kelso A, Barr IG. Performance of influenza rapid point-of-care tests in the detection of swine lineage A(H1N1) influenza viruses. *Influenza Other Resp Viruses* 2009; 3: 171-4.
17. Ciblak MA, Albayrak N, Odabaş Y, et al. Cases of influenza A(H1N1)v reported in Turkey, May-July 2009. *Euro Surveilance* 2009; 14: 1-4

## HEPATİT TANISINDA KARŞILAŞILAN SORUNLAR

Prof. Dr. Arzu Sayiner<sup>1</sup>, Prof. Dr. Hakan Abacıoğlu<sup>1</sup>, Prof. Dr. Selda Erensoy<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balçova, İzmir.

<sup>2</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir.

### Giriş

Viral hepatitler yüksek morbiditeleri, mortaliteleri ve sağlık ekonomilerine oluşturdukları yük nedeniyle önemli toplum sağlığı sorunlarıdır. Bu enfeksiyonların tanısında temel olarak serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yaklaşım çoğu kez tanı koymak için yeterli olmakla birlikte enfeksiyonun evresi ve atipik profiller gibi nedenlerle tanısız sorunlar yaşanabilmektedir. Bu bağlamda, son yıllarda hem HBV hem de HCV için okült (gizli) enfeksiyonların varlığı gündeme getirilmiştir. Diğer yandan transplant alıcıları/immünoşüpre hastalar gibi özel hasta gruplarında yaşanabilen sorunlar söz konusudur. Örneğin, organ alıcılarında, normalde kronikleşmeyen HEV enfeksiyonlarının kronik hepatitlere neden olabileceği bildirilmiştir. Bu gruplarda, HBV, HCV ve HDV enfeksiyonlarının tanı ve izleminde de özel yaklaşımlara gerek vardır.

HBV, HCV ve HDV kronikleşebilen ve kronik hepatit zemininde siroz ve hepatosellüler karsinoma neden olabilen enfeksiyonlardır. HBV ve HCV enfeksiyonlarında tedavi seçeneklerinin bulunması ve özellikle son yıllarda yeni antivirallerin kullanıma girmesi ile hastaların izlemi ve antiviral direncin saptanması son derece önemli olmuştur. İzleminde temel yaklaşım, kantitatif nükleik asit tabanlı testlerle viral yükün belirlenmesidir. Son yıllarda, immünoassay teknolojilerinde yaşanan ilerlemelere bağlı olarak yüksek duyarlılığa sahip kantitatif HBsAg, HCV kor (core) Ag gibi serolojik testlerin hasta izleminde kullanılması gündeme gelmiştir. Antiviral direncin varlığı viral yükteki artışla anlaşılabilse de, dirence neden olan mutasyonların varlığının genotipik olarak tanımlanması, rasyonel bir tedavi planlaması için değerli veriler sağlar.

Bu toplantıda, hepatit virus enfeksiyonlarının tanı ve izleminde karşılaşılan sorunlar, HBV, HCV ve HDV bağlamında ele alınmaktadır. Bu sorunlar, aşağıdaki başlıklar altında tartışılacaktır:

HBV ve HCV enfeksiyonu tanısında kullanılan serolojik testlerde karşılaşılan atipik profiller, okült (gizli) enfeksiyon kavramı, immünoşüpre hastalarda/transplant alıcılarında sorunlar ve izlem önerileri, Dr. Arzu Sayiner tarafından ele alınacaktır.

HBV, HCV ve HDV enfeksiyonlarının tanı ve izleminde kullanılan kantitatif testler, Dr. Hakan Abacıoğlu tarafından ele alınacaktır. Bu bağlamda yalnızca kantitatif nükleik asit tabanlı testler değil kantitatif immünoassay'ler de tartışılacaktır.

Antivirallere direnç ve tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarında direncin saptanması, Dr. Selda Erensoy tarafından ele alınacaktır.

### Serolojik Profillerle İlgili Sorunlar

HBV tanı testlerinin rutin kullanımında karşılaşılan sorunlar, sıklık sırasıyla, salt anti-HBc pozitifliği, HBsAg ve anti-HBs birlikteliği ve salt HBsAg pozitifliğidir. Anti-HBc'in tek başına pozitif olması (HBsAg ve anti-HBs negatif) en sık görülen atipik profildir. Nedenleri aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Yalancı pozitiflik: Özellikle eşik değere yakın pozitifliklerin bir nedenidir. Farklı bir EIA testi kullanımı veya HBV aşısına primer yanıt alınması ile belirlenebilir.
- Düşük düzey HBV DNA ile giden kronik hepatit (okült enfeksiyon): Duyarlı bir HBV DNA testi kullanılarak virusun varlığı (plazmada ve/veya karaciğer dokusunda) gösterilebilir.
- Mutant virus ile enfeksiyon: HBsAg'nin (özellikle a determinantının) antijenik özelliğini veya vi-

rusun replikasyonunu etkileyen mutasyonlar, testlerde antijenin saptanamamasına yol açabilmektedir. HBV DNA araştırılarak virusun varlığı, dizi analizi ile de soruna yol açan mutasyonlar saptanabilir.

- Diğer hepatit virusları ile koenfeksiyon: HCV ve HDV varlığı araştırılmalıdır.
- HBsAg ve anti-HBs'nin immün kompleksler halinde bulunması ve standart testlerde saptanamaması
- HBV'ye karşı bağışıklık bulunmasına karşın anti-HBs'nin düşük düzeyde olması: Bu olgular, HBV aşısına verdikleri sekonder tipte yanıt ile belirlenebilirler.

HCV tanı testlerinde en sık rastlanan sorun ise, anti-HCV pozitifliğinin yorumlanabilmesi için doğrulama testi ile HCV RNA testi arasında nasıl bir seçim yapılacağıdır. Anti-HCV testinde, S/CO (Sample/Cut-off) değerinin yüksek olması genellikle viremi ile korelasyon gösterdiği için, bu olgularda HCV RNA testinin kullanılması önerilmektedir. Düşük S/CO değeri elde edildiğinde ise, yalnızca pozitiflik ihtimali daha yüksek olduğu için öncelikle anti-HCV doğrulama testinin kullanılması, pozitiflik saptanması durumunda, aktif enfeksiyonun varlığını araştırmak için HCV RNA bakılması önerilir. Sorun, S/CO değerlendirmesi için seçilecek eşik değerin, kullanılan anti-HCV testine, HCV RNA testinin duyarlılığına, dolayısıyla laboratuvara göre değişkenlik göstermesidir.

### Okült HCV Enfeksiyonu

İki tür okült HCV enfeksiyonu varlığından söz edilmektedir.

Sekonder okült HCV enfeksiyonu: HCV enfeksiyonunun spontan veya tedavi sonucu sonlanmasından sonra HCV RNA'nın plazma, periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) ve karaciğer dokusunda düşük düzeyde saptanabilir olmasıdır. Bu hastalarda anti-HCV antikorları pozitifdir, ALT normaldir. Düşük düzey virus miktarı, plazma için 100-200 virus genom eşdeğeri (vge)/ml veya kopya/ml'nin altında; PBMC ve karaciğer dokusu için 10-100 vge/ug arası total RNA varlığı olarak tanımlanmaktadır.

Kriptojenik okült HCV enfeksiyonu: Anti-HCV antikorları negatiftir, ancak ALT yüksekliği ve düşük düzey HCV RNA pozitifliği saptanır.

### Tanı

Okült HCV enfeksiyonu ancak özel HCV RNA testleri ile saptanabilmektedir. Testin analitik duyarlılığının  $\leq 10$  vge/ml ( $\leq 3$  IU/ml) veya  $\leq 5$  vge/ug total RNA ( $\leq 1.5$  IU/ug total RNA) olması gerektiği belirtilmektedir. Belirtilen düzeyler, rutinde kullanılan TMA (Transcription-Mediated Amplification) veya gerçek zamanlı PCR esaslı testlerinin ulaşabildiği duyarlılığın altındadır.

Okült HCV enfeksiyonu varlığı konusunda yayınlar arasındaki tutarsızlıkların, dolayısıyla bu konudaki şüphelerin birkaç nedeni olabileceği vurgulanmaktadır:

- a. HCV RNA, kullanılan testin yeterli duyarlılığa sahip olmaması nedeniyle saptanamayabilir.
- b. Okült enfeksiyonda HCV RNA düzeyi dalgalanmalar gösterebilir. Saptanabilmesi için tek bir ölçümle yetinilmemesi, hastadan bir seri örnek alınması önerilmektedir. Kullanılacak örnek miktarının da rutinde kullanılanlardan daha fazla olması (1-4 ml plazma veya  $1-4 \times 10^6$  hücre), HCV RNA'nın saptanma olasılığını artırmaktadır.
- c. PBMC'lerinin ex vivo mitojen ile uyarılmalarından sonra HCV RNA aranması önerilmektedir.
- d. Örneklerin alınması, saklanması ve nükleik asit ekstraksiyonu sırasında, ortamda bulunan az miktardaki viral RNA kaybının en aza indirilmesi için özen gösterilmesi gerekmektedir.

Okült HCV enfeksiyonunun klinik önemi henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak, immün baskılanma ile HCV reaktivasyonu olabileceğini gösteren olgular bildirilmiştir. Ayrıca, karaciğer hasarı, hepatoselüler kanser, ekstrahepatik hastalıklar gibi sorunların gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir.

## Okült HBV Enfeksiyonu

HBsAg negatif olmasına karşın HBV DNA'nın pozitif saptanması (karaciğer ve/veya plazmada) durumu olarak tanımlanmaktadır. Olgular ikiye ayrılabilir:

1. Seronegatif enfeksiyon: Anti-HBc ve anti-HBs negatiftir. HBV DNA düzeyi çok düşüktür. Olguların yaklaşık %20'si bu gruptadır. HBsAg'nin pozitifleşmesinden önceki erken dönem akut HBV enfeksiyonu bu gruba girer.
2. Seropozitif enfeksiyon: Anti-HBc +/- , anti-HBs pozitifdir. Olguların yaklaşık yarısı bu gruptadır.

### Tanı

Testler arası farklar nedeniyle seçilecek HBsAg ve HBV DNA testlerin analitik duyarlılıkları, okült enfeksiyon tanısı koymada etkilidir. HBV DNA testinin duyarlılığının  $\leq 5$  IU/ml (~30 kopya/ml) olması ve genomun tek bir bölgesini değil en az üç bölgesini kapsaması önerilir. Okült HBV enfeksiyonunda saptanan HBV DNA, ortalama ~5-10 IU/ml olup, %95 olguda 35 IU/ml altındadır. HBV DNA belli bir düzeyin (180-2860 IU/ml) altında ise HBsAg genellikle negatiftir. Virion:subviral partikül oranlarındaki değişkenlik nedeniyle HBsAg – HBV DNA arasındaki ilişkide de farklar saptanabilir.

Ticari HBsAg testlerinin duyarlılıklarında ve varyant/mutant antijeni yakalama kapasiteleri arasında farklar vardır. Okült enfeksiyonu belirlemede, mümkün olan en duyarlı ve varyantları saptayabilen bir testin kullanılması önerilir.

Okült HBV enfeksiyonunun, bulaşmaya yol açabileceği gösterilmiştir. Kan donörlerinde HBV DNA yanı sıra anti-HBs ( $\geq 100$  mIU/ml) pozitifliğinin de bulunması, bulaşmayı önlemektedir. Benzer şekilde alıcının da anti-HBs pozitif olması, riski azaltmaktadır. Kronik HCV hastalarında okült HBV enfeksiyonu saptanabilir ve varlığı, interferona yanıtı azaltmakta, siroz ve kanser gelişimine ise katkıda bulunmaktadır. Solid organ transplantasyonunda (özellikle karaciğer naklinde), vericinin okült HBV taşıması, alıcıda hepatit gelişmesine yol açabilir. Okült HBV, immün süpresif tedavilerde, (çeşitli faktörlere bağlı olarak) reaktivasyona yol açabilir. Sorun, özellikle kemoterapinin sonlanmasından sonra ortaya çıkar. Anti-HBs negatif olgularda profilaksi düşünülebilir.

## HBV, HCV ve Transplantasyon

### Karaciğer transplantasyonu

HBV ile enfekte alıcıda, profilaksi uygulanmazsa, HBV enfeksiyonunun yinelenme riski %80; 5 yıllık yaşam şansı %40-60'dır. Risk, büyük ölçüde transplantasyon sırasında replikatif HBV enfeksiyonu varlığı ile ilişkilidir. Transplantasyondan birkaç ay önce başlanacak antiviral tedavi ile virus replikasyonunun baskılanması (HBV DNA PCR testinin negatifleşmesi), transplantasyondan sonra ise HBIG+antiviral kombinasyonu ile profilaksinin sürdürülmesi önerilir.

Olguların izleminde kullanılacak HBV DNA testinin duyarlılığı önemlidir. İzleminde, normal koşullar altında, üç aylık aralarla HBsAg, anti-HBs ve HBV DNA PCR izlemi önerilir. HBV DNA'da beklenen yanıtın alınamaması durumunda, tedavinin düzgün kullanılmaması veya ilaç direncinin gelişmesi söz konusu olabilir. Antiviral ajanlara direnç gelişimini belirleyecek mutasyon analizlerinin yapılması gerekebilir. HBV nüksü saptanan olgularda tedavi, giderek artan antiviral seçenekleri ile daha kolay düzenlenebilmektedir. Transplantasyon sonrası uygulanan profilaksinin süresi bilinmemektedir. Karar verilmesinde karaciğer dokusunda HBV DNA ve/veya cccDNA'nın araştırılması yol gösterici olabilir.

HCV pozitif hastalarda, enfeksiyonunun yinelenme riski, transplantasyondan sonraki ilk yılda %70, transplantasyon öncesi viremi varsa %90'dır. Nüks, serum ve/veya karaciğerde HCV RNA'nın saptanması ile belirlenir. Hastalık, immünsüpresyonu olmayanlara göre daha hızlı ilerlemekte, 5 yılda siroz gelişimi %20-30'a ulaşmaktadır. Graft kaybının en sık nedeni, yineleyen HCV enfeksiyonudur. Transplantasyon

öncesi virus yükünün yüksek olması, genotip 1 enfeksiyonu ve HBV/HIV koenfeksiyonu varlığı, risk faktörleridir. Transplantasyon öncesi virus yükünün azaltılması, mümkünse saptanamaz hale getirilmesi önerilir. Transplantasyon öncesi ve sonrası tedavide interferon+ribavirin kombinasyonu kullanılır. Tedavi, plazma virus yükü ile izlenir, doz ve süre konusunda belirsizlikler bulunmaktadır

Transplantasyon sonrası CMV enfeksiyonu da viral yükü artırıcı etki yapmaktadır. Nüksü önlemeye yönelik tedavi alan olgularda, transplantasyon sonrası 3. ve 6. ayda virus yükünün incelenmesi, 6. ayda nüks saptanmadıysa, 12. ayda HCV RNA testinin tekrarlanması önerilmektedir.

### **Böbrek transplantasyonu**

**HBV** tedavisi uygulanmayan, HBsAg pozitif böbrek alıcılarının %80'de kronik karaciğer hastalığı gelişmekte, ölümlerin %35-57'si karaciğer hastalığına bağlı olarak gelişmektedir. HBV'ye bağlı karaciğer fonksiyon bozukluğu, sıklıkla nakil sonrası birinci yıl içinde ortaya çıkar. İmmün süpresif tedavi, özellikle kortikosteroid kullanımı virus replikasyonunu artırmaktadır. HBsAg negatif, anti-HBc pozitif olgularda transplantasyon sonrası reaktivasyon gelişebilmektedir. Transplantasyon öncesi HBV DNA pozitif hastalarda, risk daha fazladır. Karaciğer transplantasyonunda olduğu gibi, HBV DNA miktarını duyarlı bir yöntemle belirlemek ve transplantasyon öncesi antiviral tedaviye başlayarak replikasyonu baskılamak önemlidir. HBV DNA'nın izlenmesi, tedaviye yön verilmesinde ve direnç gelişiminin erken dönemde belirlenmesinde önemlidir.

**HCV** ile enfekte alıcıda, transplantasyon öncesi HCV RNA'nın negatifleştirilmesi önerilmektedir. İnterferon kullanımı da rejeksiyon riskini artırdığı için, transplantasyon sonrası tedavi sorun teşkil etmektedir. Hemodiyaliz hastalarında heparin kullanımı nedeniyle PCR esaslı testlerde inhibisyon saptanabilir. TMA esaslı testler, heparinden etkilenmemeleri nedeniyle tercih edilebilir. Diyaliz hastalarında anti-HCV negatif, HCV RNA pozitif olgular görülebildiği için transplantasyon adaylarının 3-6 ayda bir HCV-RNA testi ile değerlendirilmeleri önerilir.

### **Hematopoetik hücre transplantasyonu**

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

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

Transplantasyon sonrası anti-HBc ve anti-HBs pozitif alıcılarda da anti-HBs kaybı ve HBV reaktivasyonu gelişebilmektedir (ters serokonversiyon). Bu nedenle alıcı, anti-HBs ve HBV DNA açısından uzun süre izlenmelidir. Vericinin HBsAg pozitif olması durumunda, transplantasyon öncesi antiviral tedavi ile virus yükünün düşürülmesi, tercihan HBV DNA PCR negatifliğinden sonra hücre toplanması önerilmektedir.

Hematopoetik hücre transplantasyonu ile HBV/HCV ilişkisini irdeleyen çalışmalar genellikle allojenik transplantasyon alıcılarında yapılmıştır. HCV, erken dönemde veno-oklüzif hastalık riskini artırmaktadır. Kronik HCV enfeksiyonunun gidişi genellikle ilk 10 yılda sessiz olmakta, sonraki yıllarda ise siroz gelişme riski giderek artmaktadır.

## Hepatit Viruslarının Tanısında Kantitatif Testler

Son yıllarda hepatit viruslarına bağlı enfeksiyonların tanı ve izleminde nükleik asit tabanlı (NAT) testlerin yeri ve önemi giderek artmıştır. Bu durum, özellikle, kronikleşebilen ve kronik hepatit zemininde siroz ve hepatoselüler karsinom (HSK) gelişimine neden olabilen HBV, HCV ve HDV enfeksiyonlarında belirgindir.

Hepatit virusları ile oluşan enfeksiyonların tanısında, çoğunlukla antijen-antikor tepkimesine dayalı serolojik testler kullanılmakla birlikte bazı durumlarda nükleik asit tabanlı testlere gerek olmaktadır. Analitik duyarlılığı yüksek **kantitatif NAT** testlerinin kullanımını gerektiren bu durumlar; (a) seronegatif enfeksiyonlar ve (b) kan bankacılığıdır. İlk duruma örnek olarak HBsAg'nin negatif olduğu erken akut HBV enfeksiyonları ve anti-HCV yanıtlarının zayıf ya da negatif olabildiği hemodiyaliz hastalarındaki HCV enfeksiyonları verilebilir. Bu ve benzeri durumlarda, yakın tarihe kadar analitik duyarlılığı yüksek kantitatif testlerin kullanılması önerilmiştir. Söz konusu testler tedavi sonrası kalıcı viral yanıtların değerlendirilmesi için de önerilmektedir.

Kronik HBV (ve HDV) ve HCV enfeksiyonlarında, prognoz ve tedaviye yanıtın belirlenmesi açısından viral yük saptanması önemlidir. Tedavi başarısının, son yıllardaki olumlu gelişmelere karşın, yeterince yüksek olmaması, buna karşın tedavi maliyetlerinin yüksekliği, kantitatif NAT testlerinin önemini artırmıştır. Kullanıma girdikleri ilk yıllarda analitik duyarlılıkları yeterince yüksek olmayan, genotip-bağımlı, kantitatif aralıkları dar, kontaminasyona açık ve emek-yoğun olan bu testlerde, süreç içinde önemli iyileştirmeler sağlanmıştır. Özellikle gerçek zamanlı PZT (real-time PCR, rtPCR) teknolojisi bu bağlamda önemli bir açılım sağlamıştır. Bu teknolojiyi kullanan testler yüksek analitik duyarlılıkları, geniş kantitasyon aralıkları ve kontaminasyon risklerinin hemen hiç olmaması nedenleriyle tercih edilmektedir. Diğer yandan transkripsiyona dayalı amplifikasyon (transcription-mediated amplification, TMA) ve dallanmış DNA (branched DNA, bDNA) teknolojilerine dayalı testlerin performanslarında da önemli gelişmeler sağlanmıştır.

Immunoassay'lerin duyarlılıklarında da işaretleme tekniklerindeki ilerlemelere bağlı olarak çok önemli iyileşmeler sağlanmıştır. Buna bağlı olarak kantitatif HBsAg ve HCV kor antijen gibi testlerin tanı ve izlemedeki yerleri yeniden değerlendirilmekte ve bazı durumlarda moleküler testlere alternatif olabilecekleri öne sürülmektedir.

Bu bölüm, kronik enfeksiyonlara neden olan HBV, HCV ve HDV enfeksiyonlarında kantitatif immunoassay ve nükleik asit tabanlı testlerin yerini, kısıtlılıkları ve üstünlüklerini gözden geçirmeyi amaçlamaktadır.

### Hepatit B

HBsAg'nin 6 aydan uzun sürede pozitif kalması kronikleşme kanıtıdır. Dinamik bir süreç olan kronik HBV enfeksiyonu 5 evreden oluşur. Bu evreler ve temel özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Kantitatif testlerin kronik hepatit B enfeksiyonlarındaki yeri aşağıda başlıklar halinde özetlenmiştir.

- Tedavi öncesi değerlendirme: HBV DNA saptanması ve HBV DNA düzeyinin ölçülmesi tanı, tedavi kararının verilmesi, prognoz ve daha sonra yapılacak izlemler için gereklidir.
- Tedavi kararı: HBV DNA düzeyleri 2000 IU/mL üzerinde olan ve/veya serum ALT düzeyleri normal üst sınırın (NÜS) üzerinde olan ve karaciğer biyopsisinde orta-ağır aktif nekroinflamasyon veya fibrozis olan hastalar tedavi edilmelidir. HBV DNA düzeyi 2000 IU/mL altında ve ALT düzeyi normal olan bireylerde 6 ayda bir HBV DNA kantitasyonu yapılmalıdır.
- Prognoz belirlenmesi: HBV DNA düzeyleri hastalığın prognozu ile yakından ilişkilidir. Tayvanlı 3000 hastada yapılan REVEAL çalışmasında HBV DNA düzeyleri  $>4.3 \log_{10}$  ( $\sim 2 \times 10^4$  IU/mL) olan

hastalarda kronik hepatitin siroz ve HSK'a ilerleme riskinin anlamlı olarak yüksek olduğu ve bu riskin HBeAg varlığı ve ALT etkinliğinden bağımsız bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, HSK riski HBV DNA düzeyi ile yakından ilişkilidir ve  $2 \times 10^3$  IU/mL üzerinde anlamlı olarak artmaktadır.

- Tedavi yanıtının izlemi: HBV tedavisinin izlemi, hastanın HBe durumundan ve aldığı tedaviden bağımsız olarak 3-6 ayda bir kantitatif HBV DNA ve ALT düzeyi ölçümleri ile yapılmalıdır. Tedavi öncesinde viral yükü düşük (HBV DNA  $< 10^7$  IU/mL), ALT düzeyi yüksek ( $> 3 \times \text{NÜS}$ ) ve karaciğer biyopsisinde yüksek aktivite skoru (en az A2) olan hastalarda HBeAg serokonversiyon olasılığı yüksektir. Bilindiği gibi HBV enfeksiyonlarının tedavisinde interferon-alfa (IFN) ve nükleozid/nükleotid analogları (NucA) kullanılmaktadır.

◇ IFN tedavisi alanlarda; (a) 12. haftada HBV DNA'nın 20.000 IU/mL altına inmesi HBeAg pozitif hastalarda %50 olasılıkla anti-HBe'ye serokonversiyon olacağını gösterir, (b) 24. haftada HBeAg düzeylerinin düşmesi HBe serokonversiyonuna işaret edebilir, (c) genotip A ve B, interferona C ve D'ye göre daha iyi yanıt verir, (d) HBeAg negatif hastalarda tedavinin 12. ve 24. haftalarında HBsAg düzeylerinde 1 log<sub>10</sub> IU/mL düşme görülmesi veya 48. haftada HBsAg düzeyinin  $< 10$  IU/mL olması kalıcı virolojik yanıtı işaret edebilir.

◇ NucA tedavisi alanlarda: 24. veya 48. haftalarda rtPCR ile HBV DNA saptanamaması kalıcı virolojik yanıtı işaret eder.

◇ Tedavi sonu değerlendirme: HBeAg pozitif ve negatif hastalarda ideal sonuç HBsAg'nin negatifleşmesidir. HBsAg düzeyi, enfekte karaciğer hücrelerinin sayısı ve dolaylı olarak da intrahepatik cccDNA düzeyi ile ilişkilidir. Bu nedenle, otomasyona açık olması ve HBV DNA testlerine göre görece olarak ucuz olması gibi nedenlerle, kantitatif HBsAg, tedavi yanıtını izlemede bir alternatif olabilir. Şu anda ticari olarak piyasada bulunan "Abbott Architect HBsAg Assay"ın duyarlılığı  $\leq 0.05$  IU/mL olup üst saptama sınırı 250 IU/mL dir.

- Antivirallere direnç: Başlangıçta virolojik yanıtı olan hastalarda tedavi sürecinde HBV DNA düzeyinde  $> 1$  log<sub>10</sub> artış olması antivirallere direnç geliştiğini düşündürür. Diğer yandan, tedavinin 12. haftasında başlangıçtaki HBV DNA miktarından 1 log<sub>10</sub> dan daha fazla bir düşme sağlanamazsa, primer yanıtızsızlık akla gelmelidir. Bu durumda interferon tedavisi sonlandırılmalı ve NucA'na geçilmelidir.

**Tablo 1.** Kronik HBV (KHB) enfeksiyonunun evreleri \*

Kronik HBV evresi	ALT	HBsAg (log <sub>10</sub> IU/mL)	HBeAg	Anti-HBe	HBV DNA (IU/mL)	Karaciğer histolojisi
İmmün tolerans	< NÜS	+ (4.53-4.96)	+	-	$> 2 \times 10^5$	Genellikle normal; hafif inflamasyon olabilir
İmmün reaktif	$> 2 \times \text{NÜS}$	+ (4.03-4.37)	+	-	$> 2 \times 10^4$	Aktif inflamasyon
İnaktif HBsAg taşıyıcılığı	< NÜS (alevlenmeler olabilir)	+ (2.86-3.09)	-	+	$< 2 \times 10^2$	İmmün reaktif evredeki hasara bağlı olarak hafif inflamasyondan inaktif siroza kadar değişebilir
HBeAg negatif KHB	$> 2 \times \text{NÜS}$	+ (3.35-3.87)	-	+	$> 2 \times 10^3$	Aktif inflamasyon
HBsAg negatif (Gizli hepatit B)	Yüksek olabilir	- (-)	-	-	$< 2 \times 10^2$	Normalden siroza ve HSK'a kadar değişebilir.

\* Jaroszewicz J (2010), Nguyen T (2010), Chevaliez S (2008)' den uyarlanmıştır. NÜS: Normalin Üst Sınırı

Kantitatif HBV DNA saptanmasının önemli olabileceği bir başka alan sağlık çalışanları ile ilişkilidir. İnvazif girişimde bulunan HBsAg pozitif sağlık çalışanlarına, HBV DNA düzeylerine göre girişim için izin verilmesi gündemdedir. Bazı Avrupa ülkelerinde 200 ile 20.000 IU/mL arasında değişen eşik değerler önerilmektedir.



## Hepatit D

Kronik viral hepatitler arasında en ağır seyreden form Delta hepatitidir. Ülkemizde prevalansı düşme eğilimi göstermesine karşın, özellikle Doğu ve Güneydoğu Anadolu'da hala her 4 kronik hepatit B (KHB) hastasından biri HDV ile enfektedir. Kronik delta hepatitinde tedavi seçenekleri kısıtlıdır. Pegile interferon hastaların ancak %25'de etkili olurken, halihazırda HBV için kullanılan nükleoz(t)it analogları (tenofovir ve entecavir için henüz veri yoktur) ile başarı elde edilememiştir.

HBsAg pozitif olan tüm bireylerde anti-HDV IgG antikorları bakılmalıdır. Antikoru negatif olan hastalarda HDV RNA bakılmasının ek bir yarar sağladığı yönünde kanıt yoktur; bu nedenle söz konusu test yalnızca anti-HDV IgG pozitif hastalarda aktif enfeksiyonun varlığını göstermek için yapılmalıdır. Kantitatif HDV RNA, antiviral tedavi alan hastalarda tedavi yanıtını izlemek amacıyla kullanılmalıdır. Bir çalışmada (Mederacke I, et al. 2010), HDV RNA düzeyleri ile hastalık aktivitesi arasında korelasyon olduğu bildirilmiş olsa da bu bulgu başka çalışmalarda doğrulanmamıştır. Yapılan çok merkezli bir çalışmada (Zachou K, et al. 2009), kronik delta hepatiti olan hastalarda HDV replikasyonunun HBsAg düzeyleri ile korele olduğu ve yüksek HDV RNA düzeylerinin genellikle düşük HBV DNA düzeyleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalarda PEG-IFN-a2b tedavisine yanıt veren hastalarda tedavinin ilk 3-6 ayında HDV RNA'nın düştüğü, 6. ay sonunda HDV RNA düzeylerinde 3 log düşme olmamasının tedavi başarısızlığına işaret ettiği bildirilmiştir.

HDV RNA için henüz standardize edilmiş ticari bir test bulunmaması ve kantitasyon standardizasyonuna yönelik uluslararası bir standart olmaması önemli bir eksikliktir. Her iki konuya yönelik olarak çabalar sürmektedir.

## Hepatit C

Akut HCV enfeksiyonları genellikle asemptomatik seyirlidir. Bu nedenle, kontamine kesici/delici cisim yaralanmaları gibi özel durumlar dışında akut HCV enfeksiyonlarını tanımak güçtür. Önceden anti-HCV yönünden negatif olduğu bilinen bir bireyde antikorun pozitifleşmesi, HCV RNA'nın saptanması ve karaciğer enzimlerinde artış, akut HCV kanıtlarıdır. Enfeksiyon kuşkusu olduğunda ilk yapılacak test EIA yöntemi ile anti-HCV bakılmasıdır. Ancak, normal bireylerde antikorların ortaya çıkması (ortalama 2-8 hafta) 6 aya kadar uzayabilir. Bu süre immünoşüpresif bireylerde daha da uzun olabilir. Bu nedenle, kuşkulu temas öyküsü olan bireylerde, analitik duyarlılığı yüksek ( $\leq 50$  IU/mL) bir testle HCV-RNA bakılması önerilmektedir. Söz konusu testler donör kanlarının taranmasında da kullanılmaktadır.

HCV RNA'nın 6 aydan uzun süre pozitif bulunması kronik HCV kanıtıdır. Kronik HCV enfeksiyonlarında kantitatif HCV RNA testlerinin temel kullanım alanı, tedavinin izlemidir. Tedavi öncesi genotip ve viral yük (kantitatif HCV RNA) tayini yapılmalıdır. Genotip 1, 4, 5 ve 6 ile enfekte hastalarda 12. haftada HCV RNA kantitasyonu yapılmalıdır. Tedavi öncesi değere göre 2 logdan az düşme varsa hastada kalıcı virolojik yanıt olasılığı %2'den azdır. Eğer HCV RNA saptanamaz ise tedavi 48 hafta sürdürülmelidir. Hastada HCV RNA düzeyi 2 logdan daha çok düşmüş ancak hala pozitif ise tedavi 72 haftaya tamamlanmalıdır. Diğer yandan tedavinin 4. haftasında hızlı virolojik yanıt vererek HCV RNA'sı saptanamayan ( $< 50$  IU/mL) hastalarda tedavi süresinin genotip 1, 4, 5 ve 6 için 24 hafta, genotip 2 ve 3 için 12-16 hafta olarak uygulanabileceği bildirilmektedir.

HCV RNA düzeyleri ile karaciğer hastalığının şiddeti ve siroz ile HSK'a ilerleme arasında bir korelasyon yoktur. Bu nedenle, prognozu belirleme amacıyla HCV RNA kantitasyonu önerilmemektedir.

HCV RNA testinin pahalı olması, özel donanım ve deneyim gerektirmesi gibi nedenlerle HCV kor antijen testinin iyi bir seçenek olabileceği düşünülmüştür. On yıl kadar önce Ortho firması tarafından çıkarılan "Trak-C core" antijen testi, analitik duyarlılığın görece olarak düşük olması (1.5 pg/mL

- 10,000-27.000 IU/mL HCV RNA), test-içi ve testler arası varyasyon katsayısının %20-30 düzeyinde olması ve dinamik aralığının görece olarak dar olması (44.4 fmol/L – 3.600 fmol/L) gibi nedenlerle yaygınlaşmamıştır. Ancak, yakın tarihte kullanıma sunulan “Abbott Architect HCV Core Ag Assay”ın analitik duyarlılığının 0.06 pg/mL (3 fmol/L ~ 500-3,000 IU/mL HCV RNA) olduğu ve 10 ile 20.000 fmol/L arasında doğrusal ölçüm yapabildiği bildirilmiştir (Vermehren J, et al. 2008; Medarecke I, et al. 2009; Ross RS, et al. 2010). Testin varyasyon katsayısı %10’nun altındadır. Abbott HCV Ag testinin genotip 2 kor antijeni için performansı (analitik duyarlılığı), diğer genotiplere göre daha düşüktür. Dinamik aralığı 50-50.000 fmol/L arasında olan ve kemolüminesans temeline dayalı diğer bir HCV Ag testi olan “Lumipulse II Core Antigen Assay (Fujiebio, Japonya)”ın de genotip 2 HCV kor antijenini belirlemede performansının düşük olduğu ve bunun, testte kullanılan monoklonal antikörün kor proteinin 48. aminoasidindeki farklılıktan etkilenmesinden kaynaklandığı bildirilmiştir.

### Kantitatif NAT testleri

Kronikleşen hepatit virus enfeksiyonlarında, viral nükleik asitlerin saptanması ve kantitasyonu temel olarak; (a) aktif enfeksiyonların tanısında, (b) antiviral tedavi alması gereken hastaların belirlenmesinde ve (c) tedaviye yanıtın izleminde önemlidir. Bu amaçla kullanılan testler ya hibridizasyon sinyalinin ya da hedef nükleik asidi çoğaltma temeline dayanmaktadır. İlk gruptaki testlere örnek olarak “Hybrid Capture” ve “bDNA” testleri, ikincilere örnek olarak PZT, TMA ya da gerçek zamanlı PZT tabanlı testler verilebilir. HBV ve HCV enfeksiyonlarında kullanılan ticari testler ve özellikleri Tablo 2’de özetlenmiştir. Söz konusu testlerin (kullandıkları teknolojiye bağımsız olarak) belirli performans özelliklerine sahip olmaları gereklidir:

- **Analitik duyarlılık:** Bir testin ölçebildiği en düşük analit miktarını tanımlar. Bu miktar ne kadar düşükse testin analitik duyarlılığının o kadar yüksek olduğundan söz edilir. Genel olarak PZT ve özellikle de gerçek zamanlı PZT testlerinin analitik duyarlılıkları sinyal amplifikasyon yöntemlerine göre daha yüksektir (Tablo 2). Alt saptama sınırı (lower limit of detection: LLD) terimi, analitik duyarlılık ile eş anlamlı olarak kullanılmaktadır.

- **Özgüllük:** Bu tür testlerin özgüllüklerinin çok yüksek olması ve tüm genotipleri eşit oranda saptayabilmesi gerekir. Belirli genotipleri saptamada başarısız olan testlerin “genotip bağımlı” olduklarından söz edilir. Testlerde bu bağlamda önemli iyileştirmeler sağlanmış olsa da, hala bazı testlerde genotip bağımlılığı bir sorun olarak karşımıza çıkabilmektedir. Örneğin, “Cobas TaqMan HCV” testi, genotip 2 içeren örneklerin yaklaşık %15’inde, genotip 4 içeren örneklerin ise %30’unda viral yükü olduğundan daha düşük ölçmektedir. Bu durum, problemlerle hedef diziler arasındaki nükleotit farklılıklarından kaynaklanmaktadır.

- **Dinamik aralık (kantitasyon aralığı):** Bir testin, örnek sulandırılmasına gerek olmaksızın doğru miktar tayini yapabildiği konsantrasyon aralığını tanımlar. Bu aralığın geniş olması yeğlenir. Gerçek zamanlı PZT testlerinin en önemli avantajlarından biri, geniş dinamik aralıklarıdır. Bu testlerin aynı zamanda alt kantitasyon sınırları (lower limit of quantification: LLQ) da düşük olduğundan (Tablo 2) tanısal amaçla ve tedavi sonrası kalıcı virolojik yanıtları değerlendirmek amaçlarıyla kullanıma da uygundur.

- **Doğruluk (accuracy) ve yinelenebilirlik (reproducibility):** Doğruluk, bir analitin gerçek değerini belirleyebilme yetisidir. Bu yeti, bir taraftan örnek alımı, işlenmesi gibi pre-analitik parametrelere, diğer yandan da analiz yöntemine bağlıdır. Yinelenebilirlik ise bir analitin farklı çalışmalarda (farklı günlerde, farklı lot numaralı kitlerle, farklı teknisyenlerle, farklı laboratuvarlarda, vb) benzer sonuç verme özelliğini tanımlar. Yinelenebilirlik varyasyon katsayısı (%CV) değeri ile izlenir. Varyasyon katsayısının düşük olması istenir.

- **Kantitasyon standardizasyonu:** Farklı NAT testlerinin sonuçlarının kıyaslanabilir olması için Dünya Sağlık Örgütü’nün uluslararası standartlarına göre testin kalibre edilmesi ve IU/mL cinsinden sonuç

verilmesi gündeme gelmiştir. Bu yolla, farklı testlerin sonuçlarının kıyaslanabilir olması sağlanmaya çalışılmıştır. Ancak, bu konuda sorunların tümüyle çözüldüğünü söyleyebilmek zordur. Sorunlardan biri, oluşturulan standartların belirli bir genotipe özgü olmasıdır. Örneğin, HBV DNA için kullanılan 97/746 standardı genotip A HBV kullanılarak hazırlanmıştır. Buna göre kalibre edilen testlerin diğer genotipleri (örneğin, Türkiye’de baskın olan genotip D) eş duyarlılıkta saptayıp saptayamadığı bilinmemektedir. İkinci sorun, standartların farklı versiyonları ile kalibre edilen testler arasında kantitasyon farkları olabilmesidir. Örneğin, Cobas TaqMan, Abbott Real-time PCR ve bDNA testleri arasında HCV genotip 1 içeren örnekleri belirlemede 0.5-0.7 log düzeyinde farklılık söz konusudur. Bu farkın, Cobas TaqMan’ın ilk versiyonla, Abbott Real-time PCR testinin ise 2. versiyonla kalibre edilmiş olmasına bağlı olduğu belirtilmiştir.

**Tablo 2.** HBV ve HCV kantitasyonunda kullanılan bazı ticari testler

Test	Üretici	Yöntem	En düşük saptama sınırı (analitik duyarlılık)	Dinamik aralık (kantitasyon aralığı)
<b>HBV</b>				
Cobas TaqMan HBV	Roche	Otomatik ekstraksiyon sonrası (Cobas Ampliprep) gerçek zamanlı PZT (Cobas TaqMan)	12 IU/mL	54 - 110.000.000 IU/mL
Real-Art HBV PCR assay	Qiagen	Manuel (yarı-otomatik) ekstraksiyon sonrası gerçek zamanlı PZT	4 IU/mL	9 - 100.000.000 IU/mL
Abbott Real-time HBV	Abbott	Otomatik ekstraksiyon sonrası (m2000 <sub>sp</sub> ) gerçek zamanlı PZT (m2000 <sub>RT</sub> )	10 IU/mL	10 - 1.000.000.000 IU/mL
Ultrasensitive Hybrid Capture II	Digene	Hibrid yakalama	8x10 <sup>3</sup> kopya/mL	8x10 <sup>3</sup> - 1.7x10 <sup>9</sup> kopya/mL
VERSANT HBV DNA 3.0	Siemens	bDNA	3.3x10 <sup>3</sup> kopya/mL	3.3x10 <sup>3</sup> - 1.0x10 <sup>8</sup> kopya/mL
<b>HCV</b>				
Cobas TaqMan HCV	Roche	Otomatik ekstraksiyon sonrası (Cobas Ampliprep) gerçek zamanlı PZT (Cobas TaqMan)	15 IU/mL	46 - 69.000.000 IU/mL
Abbott Real-time HCV	Abbott	Otomatik ekstraksiyon sonrası (m2000 <sub>sp</sub> ) gerçek zamanlı PZT (m2000 <sub>RT</sub> )	12-30 IU/mL	12 - 100.000.000 IU/mL
Amplicor LCx	Roche	Manuel ekstraksiyon sonrası RT-PCR	600 IU/mL	600 - 500.000 IU/mL
	Abbott	Manuel ekstraksiyon sonrası RT-PCR	25 IU/mL	25 - 2.630.000 IU/mL
VERSANT 3.0	Siemens	bDNA	615 IU/mL	615 - 7.700.000 IU/mL

## Antiviral Direnç Testleri

Başarılı antiviral ajanların tedavi protokollerinde yer alması ve antivirallere karşı direnç gelişimi nedeniyle çoklu ilaç protokollerinin gerekliliği, HBV enfeksiyonunda hasta yönetiminde antiviral direnç testlerinin kullanımını yaygınlaştırmaktadır.

### HBV ve Direnç Testlerinin Kullanımı

Kronik B hepatitli hastalar nükleotit ve nükleozit (nüklez(t)id) analogları (NuCA) ile başarılı bir şekilde tedavi edilmektedir. Ancak sıklıkla ortaya çıkan dirençli mutantlar, tedavi başarısızlığına ve karaciğer hastalığının ilerlemesine neden olmaktadır. Lamivudin monoterapisi ile birlikte bu sorunun fark edilmesi, genotipik HBV ilaç direnci testlerinin hızla rutin kullanımda yer almasına yol açmıştır. Bu amaçla, YMDD motifiindeki rtM204I/V/S mutasyon analizlerine rt180 mutasyonlarının analizi eklenmiştir. Ardından adefovire karşı direnç ile ilişkili mutasyon analizleri rutin kullanıma girmiş; adefovir direnci ile ilişkili rt236 ve rt180 mutasyonları araştırılmaya başlamıştır. Mutasyon analizinde altın standart olan nükleik asit dizi analizinin, daha duyarlı yöntemlerle alternatifleri geliştirilmiştir. Ters hibridizasyon testleri ve gerçek zamanlı PZR ile

özgül mutasyonları saptama temelli testler, ticari olarak hasta yönetiminde kullanılmak üzere sunulmuştur.

Kronik B hepatitli hastaların tedavi yönetiminde, çapraz direnç mekanizmalarının anlaşılması önemlidir. Bir NucA'ya karşı dirençten sorumlu bir mutasyonun başka bir NucA direncine de yol açması anlamına gelen çapraz direncin bilinmesi, başlangıçta ve tedavi başarısızlığında başarılı ilaç seçimi için gereklidir.

HBV polimeraz ve zarf proteinlerini kodlayan genlerin örtüşmesi, polimerazdaki direnç mutasyonlarının sıklıkla HBsAg sunumunun etkilenmesine yol açar. Bu değişiklikler, enfektiviteyi, karaciğer hastalığının patogenezi, laboratuvar tanısını, aşının etkinliğini ve virusun popülasyonda yayılımını etkiler.

Tedavinin yönetiminde genotipik testler yerini almıştır. HBV'nin bir DNA virusu olmasına karşın, aracı RNA kullanarak revers transkriptaz enziminin devrede olması mutasyon hızını anlamlı derecede artırmaktadır. NucA direncini önlemede en iyi stratejilerden biri, başlangıçta en etkili ve direnç olasılığı en düşük antivirallerin kullanılmasıdır. Yeni tedavi hedeflerinin tanımlanmasında, yeni antiviral ajanların geliştirilmesinde ve ilaç direncini engellemek üzere kombinasyon tedavilerinin tasarlanması için araştırmaların yapılması önemlidir.

Kronik B hepatitli hastaların tedavisinde dünyada genelde onaylanmış beş NucA üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bunlar; lamivudin (LMV), adefovir dipivoksil (ADV), entekavir (ETV), telbivudin (LdT) ve tenefovir (TDF)'dir.

HBV DNA'sının kovalen olarak kapalı dairesel DNA formu (cccDNA), viral genom replikasyonu için hücrede rezervuar oluşturur. HBV cccDNA, antiviral tedavinin kesilmesinden sonra viral nüks kaynağıdır. Dirençli mutantlar cccDNA'da arşivlenir; çapraz direnç gösteren ilaçlar kullanıldığında hızla seçilebilirler. HBV genomlarının klon ve pirosekanslama ile analizi virus havuzunda tedavi başlamadan önce de tek tek mutantların bulunabileceğini göstermiştir. Enfeksiyon sırasında, türümsü (quasispecies)'ler gelişir. Konağın immün yanıtına ve antiviral tedaviye yanıt olarak farklı varyant ve mutantlar seçilir.

Dirençin saptanması ve izlenmesinde viral yük testleri, genotipik analiz, pirosekanslama, hibridizasyon testleri ve fenotipik testler kullanılmaktadır.

**Viral yük testleri:** NucA ilaçlara karşı direnç geliştiğinde, antiviralin kullanılmasına karşın viral yükte sürekli yükselme görülür. Dirençli mutant virusun replikasyonu daha yavaştır, ancak duyarlı viral yük testleri ile yükselme saptanır. İlaç direnci dışında, hastanın ilacı düzenli kullanmaması ve farmakogenomik faktörler gibi başka nedenler de viral yükü etkileyebilir. HBV ilaç direnci, sadece genotipik ve fenotipik analizlerle doğrulanabilir.

**Genotipik analizler:** Tedavi sırasında hastadan izole edilen HBV nükleik asitleri veya aminoasit dizileri, tedavi öncesi izole edilenlerle karşılaştırılır. Tedavi öncesi izolatlar yoksa, aynı HBV genotipinin yayınlanmış vahşi tipleri ile karşılaştırma yapılabilir. PZR ürünlerinin doğrudan analizi ile mutantların saptanabilmesi için virus havuzunda %20'nin üzerinde mutant bulunması gerekir. Klonlama ile daha düşük oranlarda mutantlar saptanabilir, ama çok sayıda klonun incelenmesi gerekir. Restriksiyon fragman analizi ile %5 oranındaki mutantlar da saptanabilir, ancak mutantlara özgü farklı restriksiyon enzim reaksiyonlarının tasarlanması gerekir. Ticari olarak tasarlanmış dizi analizi ile genotipleme sistemleri de geliştirilmiştir.

**Pirosekans analizi:** Primerin 3' ucunun dNMP eklenmesi ile salınan pirofosfatlar ölçülür. Bu yöntem duyarlı (%0.1) ve hızlı bir testtir. Klasik dizi analizine göre daha kısa parçaların analizi yapılabilir.

**Hibridizasyon:** Yoğunluk spektrometrik analizleri, ters hibridizasyon yöntemleri (özgül problemler membranlara fikse edilmiştir), DNA çip teknolojisi ile tek nükleotid değişiklikleri araştırılabilir. Bu yöntemlerde her mutasyon için testlerin ayrı ayrı tasarlanması gerekir.

**Fenotipik testler:** Bir mutasyon paterninin ilaç direncindeki rolünü ve çapraz direnç etkisini göstermek için bu testler gereklidir. Dirençli mutantların transfer edildiği hücre kültürü modelleri ile ilaç duyarlılık testleri, viral polimeraz enzimatik testleri ve HBV dirençli hücre dizileri ile fenotipik özellikler araştırılabilir.

Hasta yönetimi algoritmalarının oluşturulması için dirençli mutantların seçilme ve virusun stabil hale geçme mekanizmalarını anlamada fenotipik testler önemlidir.

### HCV ve Direnç Testlerinin Kullanımı

Günümüzde hepatit C tedavisinde de yeni bir dönem başlamaktadır. Temelde doğrudan HCV'yi hedefleyen, HCV replikasyonunu durduran antiviraller üzerinde çalışılmaktadır. Halen kullanımda olan pegile interferon ve ribavirin (pIFN/RBV) tedavisinin toksisite ve etkinlik sorunu nedeniyle, özgül olarak virüsü temizlemeyi hedefleyen ilaç kombinasyon (STAT-C) tedavileri üzerinde çalışılmaktadır. Ancak, HCV'nin replikasyon hızının çok yüksek olması, direnç geliştirme kapasitesini de artırmaktadır. Proteaz ve polimeraz inhibitörleri, tedavi almamış hastalarda, standart pIFN/RBV tedavisine göre daha kısa sürede, kalıcı viral yanıtı %20'den fazla artırmıştır.

HCV ilaçları olarak çeşitli ilaç sınıfları tanımlanmaktadır. Tüm viral enzimler ve hücresele reseptörler ile 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. Çalışılmakta olan ilaç grupları arasında; giriş inhibitörleri, translayon inhibitörleri, proteaz inhibitörleri, replikasyon inhibitörleri (nükleozit/nükleotitler, non-nükleozitler), NS5a inhibitörleri, P7 iyon kanal inhibitörleri, hücresele komponentlerin inhibitörleri, yeni interferonlar, yeni ribavirinler, immün modülatörler ve nitazokanid gibi başka tiazolidler de yer almaktadır.

HCV'nin hata yapma oranının çok yüksek olması, yüksek viral türümsü çeşitliliği ve konak immün yanıtına karşı viral adaptasyonları kolaylaştırmaktadır. Tüm viral popülasyonlarda dirençli viruslar bulunmaktadır; ilaç baskısı altında bu varyantlar hızla seçilir. Ek olarak, viral ilaç direnç paternlerinin HCV genotipleri ile ilişkili olduğu akıldan çıkarılmamalıdır.

Genotipik ilaç direnç testleri moleküler testlere dayanmaktadır. Nükleik asit dizi analizi altın standart olmakla birlikte, duyarlılığı artırılmış gerçek zamanlı PZR temelli testlerle minör mutantlar erken dönemde saptanabilmektedir. Dirençli virusun bulaşması ve virusun replikasyon etkinliği (viral uyum) ile dirençli virusların virus arşivinde kalıp kalmadığı yanıt bekleyen sorulardır.

HCV'de proteaz inhibitörlerine karşı dirençle ilişkili mutasyonlar tanımlanmıştır. Bunlar aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- A156V/T, V36+R155, V36+A156S teleprevire karşı yüksek direnç ile ilişkilendirilmiştir.
- V36A/M, T54A, R155K/T ve A156S telprevir ve boceprevire karşı düşük düzeyde direnç ile ilişkilendirilmiştir.
- Geliştirilen diğer proteaz inhibitörlerine karşı direnç ile ilişkilendirilmiş mutasyonlar da tanımlanmıştır.

Nükleozit analogu polimeraz inhibitörleri ile ilişkili mutasyonlar da tanımlanmıştır: S96T, N142'de mutasyon R1479 ilacı ile seçilir. Valopicitabine ile S282T seçilmektedir. Non-nükleozit polimeraz inhibitörleri ise, toksisitelerinin en düşük olmasına rağmen, dirence en açık olan gruptur. Bu grup, polimeraz molekülünde konformasyonel değişikliklere neden olur. Polimeraz molekülünün beş farklı cebi vardır; bu da farklı direnç paterni grupları demektir. Diğer ilaç grupları ile çapraz direnci engeller.

HCV kombinasyon tedavisinin gündeme geldiği bu yeni dönemde, karmaşık bir araştırma alanı ortaya çıkmıştır. Yeni ajanların kullanımında, etkinliklerini koruyacak şekilde akılcı protokoller oluşturmak çok önemlidir. İlaçların biyoyararlanımı ve toksisiteyi dikkate alınarak etkinlikleri korunacak şekilde protokoller oluştururken, direnç paternlerinin çalışılması için çok geniş bir araştırma alanı açılmıştır.

## KAYNAKLAR

***Atipik profiller, okült enfeksiyonlar ve transplantasyon hastalarında tanisal sorunlar***

1. Botero RC. Should patients with chronic hepatitis C infection be transplanted? *Transplant Proc* 2004; 36:1449-54.
2. Hollinger FB, Sood G. Occult hepatitis B virus infection: a covert operation. *J Viral Hepat* 2010; 17: 1-15.
3. Knoll A, Boehm S, Hahn J, et al. Reactivation of resolved hepatitis B virus infection after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 925-9.
4. Lau GK, Leung YH, Fong DY, et al. High hepatitis B virus (HBV) DNA viral load as the most important risk factor for HBV reactivation in patients positive for HBV surface antigen undergoing autologous hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2002; 99:2324-30.
5. Charlton M. Recurrence of hepatitis C infection: Where are we now? *Liver Transpl* 2005; 11:S57-S62.
6. Natov SN, Pereira BJ. Transmission of viral hepatitis by kidney transplantation: donor evaluation and transplant policies (Part 1: hepatitis B virus). *Transpl Infect Dis* 2002; 4:117-23.
7. Onozawa M, Hashino S, Izumiyama K et al. Progressive disappearance of anti-hepatitis B surface antigen antibody and reverse seroconversion after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with previous hepatitis B virus infection. *Transplantation* 2005; 79:616-9.
8. Özdoğan O, Ratip S, Ahdab YA, et al. Causes and risk factors for liver injury following bone marrow transplantation. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36:421-6.
9. Pawlowsky JM. Use and interpretation of hepatitis C virus diagnostic assays. *Clin Liver Dis* 2003; 7:127-37.
10. Peffault de Latour R, Levy V, Asselah T, et al. Long-term outcome of hepatitis C infection after bone marrow transplantation. *Blood* 2004; 103:1618-24.
11. Perrillo RP. Hepatitis B and renal transplantation: securing the sword of Damocles. *Hepatology* 2002; 36:1041-5.
12. Pham TN, Coffin CS, Michalak TI. Occult hepatitis C virus infection: what does it mean? *Liver Int* 2010; 30; 502-11.
13. Ponde RA, Cardoso DD, Ferro MO. The underlying mechanisms for the 'anti-HBc alone' serological profile. *Arch Virol* 2010; 155:149-58.
14. Rostaing L. Treatment of hepatitis C virus infection after renal transplantation: new insights. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15(Suppl 8):74-6.
15. Terrault N, Roche B, Samuel D. Management of the hepatitis B virus in the liver transplantation setting: A European and an American perspective. *Liver Transpl* 2005; 11:716-32.

***Kantitatif testler***

1. Brunetto MR, Moriconi F, Bonino F, et al. Hepatitis B virus surface antigen levels: a guide to sustained response to peginterferon alfa-2a in HBeAg negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2009; 49:1141-50.
2. Chevaliez S, Pawlowsky JM. Diagnosis and management of chronic viral hepatitis: antigens, antibodies and viral genomes. *Best Prac Res Clin Gastroenterol* 2008; 22:1031-48.
3. Chevaliez S, Pawlowsky JM. How to use virological tools for optimal management of chronic hepatitis C. *Liver Int* 2009; 29 (Suppl 1): 9-14.
4. Değertekin H, Yalçın H, Yakut M, Yurdaydın C. Seropositivity for delta hepatitis in patients with chronic hepatitis B and liver cirrhosis in Turkey: a meta-analysis. *Liver Int* 2008; 24:494-8.
5. European Association for the Study of the Liver. EASL Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009; 50:227-42.
6. Fried MW, Piratvisuth T, Lau GK, et al. HBeAg and hepatitis B virus DNA as outcome predictors during therapy with peginterferon alfa-2a for HBeAg positive chronic hepatitis B. *Hepatology* 2008; 47:428-34.
7. Gerlich WH, Glebe D, Schütter CG. Deficiencies in the standardization and sensitivity of diagnostic tests for hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 2007; 14 (Suppl 1): 16-21.
8. Jaroszewicz J, Serrano BC, Wursthom K, et al. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a European perspective. *J Hepatol* 2010; 52: 514-22.
9. Le Guillou-Guillemette H, Lunel-Fabiani F. Detection and quantification of serum or plasma HCV RNA: mini review of commercially available assays. *Methods Mol Biol* 2009; 510:3-14.
10. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. *Hepatology* 2009; 50: 1-36.

11. Maheswari A, Thuluvath PJ. Management of acute hepatitis C. *Clin Liver Dis* 2010; 14:169-76.
12. Medaracke I, Wedemeyer H, Ciesek S, et al. Performance and clinical utility of a novel fully automated quantitative HCV core antigen assay. *J Clin Virol* 2009; 46:210-5.
13. Mederacke I, Bremer B, Heidrich B, et al. Establishment of a novel quantitative HDV RNA assay using the Cobas TaqMan platform to study HDV RNA kinetics. *J Clin Microbiol* 2010 Mar 29. [Epub ahead of print].
14. Moucari R, Mackiewicz V, Lada O, et al. Early serum HBsAg drop: a strong predictor of sustained virological response to pegylated interferon alfa-2a in HBsAg negative patients. *Hepatology* 2009; 49: 1151-7.
15. Nguyen T, Thompson AJ, Bowden S, et al. Hepatitis B surface antigen levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a perspective on Asia. *J Hepatol* 2010; 52: 508-13.
16. Ross RS, Viazov S, Salloum S, Hilgard P, Gerken G, Roggendorf M. Analytical performance characteristics and clinical utility of a novel assay for total hepatitis C virus core antigen quantification. *J Clin Microbiol* 2010; 48:1161-8.
17. Saeed M, Suzuki R, Kondo M, et al. Evaluation of hepatitis C virus core antigen assays in detecting recombinant viral antigens of various genotypes. *J Clin Microbiol* 2009; 47:4141-3.
18. Valsamakis A. Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20:426-39.
19. Vermehren J, Kau A, Gartner BC, Göbel R, Zeuzem S, Sarrazin C. Differences between two real-time based hepatitis C virus (HCV) assays (RealTime HCV and Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan) and one signal amplification assay (Versant HCV RNA 3.0) for RNA detection and quantification. *J Clin Microbiol* 2008; 46:3880-91.
20. Wedemeyer H, Manns MP. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7:31-40.
21. Zachou K, Yurdaydin C, Drebbler U, et al. Quantitative HBsAg and HDV RNA levels in chronic delta hepatitis. *Liver Int* 2009; 30:430-7.

#### ***Antiviral direnç testleri***

1. Belon CA, Frick DN. Helicase inhibitors as specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C. *Future Virol* 2009; 4:277-93.
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. Kuntzen T, Timm J, Beral 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.
4. Lange CM, Sarrazin C, Zeuzem S. Review article: HCV – STAT-C era of therapy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010 Mar 31. [Epub ahead of print]
5. 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.
6. 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.
7. Pawlotsky JM, Chevaliez S, McHutchison JG. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* 2007; 132:1979-98.
8. Pawlotsky JM. The concept of hepatitis B virus mutant escape. *J Clin Virol* 2005; 34 (Suppl 1): S125-9.
9. Solmone M, Vincenti D, Prosperi MC, et al. Use of massively parallel ultradeep 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.
10. Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 2009; 137:1593-608.
11. 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.

## KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ ENFEKSİYONLARININ TANISINDA VİRUS İZOLASYONU

Prof. Dr. Aykut Özkul

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara.

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) hastalığı 12. yüzyılda bir doktor tarafından şu anki Tacikistan sınırları içinde tanımlanmıştır<sup>1</sup> (Hoogstraal, 1979). Değişik vücut salgıları ve çıkartılarında kan varlığı ile klinik tanımlaması yapılan hastalığın, çoğunlukla kargalarda normal olarak bulunan bit veya kenelerden kaynaklandığı bildirilmiştir. Hastalık, yüzyıllar boyunca güney Özbekistan yerli halkı tarafından “khung-ribta” (kan emen), “khunymuny” (burun kanaması) veya “karakhalak” (kara ölüm) gibi üç farklı isimle tanımlanmıştır<sup>1,2</sup>. Daha sonraları Orta Asya’da değişik kanamalı hastalıklar ve Özbekistan Kanamalı Ateşi yüzyıllar boyunca KKKA’ya benzer hastalıklar olarak bildirilmiştir<sup>2</sup>.

Kırım Kanamalı Ateşi (KKA), ilk kez 1944-1945 yıllarında Kırım’daki savaş sırasında yaklaşık 200 Sovyet askerinin enfekte olduğu dönemde klinik olarak tanımlanmıştır<sup>3,4</sup>. Bundan kısa bir süre sonra, psikiyatrik hastalarda KKA hastalarından alınan kanların kullanımıyla yapılan pirojenik terapi uygulamaları sırasında, hastalığın nakledildiğinin görülmesi, filtre olabilen ajanlardan şüphelenilmesine neden olmuştur<sup>5</sup>. Daha sonra viral etiyoloji ve muhtemel kene ile nakil olayları, sağlıklı gönüllü insanlara *Hyalomma marginatum* nimf süspansiyonlarının antibiyotik eşliğinde verilmesinden sonra, KKA hastalığının hafifi ancak belirgin semptomları oluşturularak ortaya konulmuştur<sup>5</sup>.

KKA araştırmalarında en önemli adım, Chumakov ve ark.’larının (1967) Moskova Poliomyelitis ve Viral Ensefalitler Enstitüsü’nde KKKA virusunu izole etmek için yavru fareleri kullanmaları ile atılmıştır<sup>6,7</sup>. Bu çalışmalar sonrasında, Rusya ve diğer ülkelerde bir çok deneyde prototip virus olarak kullanılan Drosdov (izole edildiği hastanın adına ithafen) suşu izole edilmiştir. Bu suş, virüsle ilgili bir çok bilinmeyen araştırıldığı çalışmalara da temel kaynak olarak ve değişik coğrafi bölgelerden izole edilen virüslerin tanımlama ve sınıflandırılmasında yararlanılan serolojik testlerde yaygın şekilde kullanılmıştır. Tarihsel süreçte Kazakistan, Özbekistan ve Afrika’daki birçok bölgede tespit edilen kene kaynaklı kanamalı hastalıklar birbirlerinden antijenik olarak ayırlamayacak kadar yakın bulunmuştur. Sonuçta yapılan çalışmalar Uganda ve Kongo’da hasta insanlardan izole edilen Kongo virüsünün, KKA virusuna antijenik olarak çok yakın olduğunu ortaya koymuştur<sup>8</sup>. Her iki virüsün aynı virus olduğu ortaya konulduktan sonra, öncelikle KKA-Kongo virus olarak isimlendirilmiş, daha sonraları ise KKKA virüsü olarak son şeklini almıştır<sup>1</sup>.

Virüsle ilişkin tanısal uygulamaların başında, her ne kadar son yıllarda moleküler tanı sistemlerinin ciddi bir üstünlüğü varsa da, özellikle virüsün izole edilmesi; tanısal veya profilaktik amaçla viral antijenlerin eldesi ve hücre kültürü temelli diğer serolojik tanı sistemlerinin hazırlanmasına olanak tanınması bakımından çok büyük önem taşımaktadır. KKKA virus izolasyonu oldukça zor ve zaman alıcı uygulamaların bir bütünüdür. Bu amaçla uygulamada en çok kullanılan yöntem, fare beyni inokülasyonu sonrasında, duyarlı hücre hatlarına adaptasyon çalışmalarıdır. Bu noktada, deneme hayvanlarından özellikle inokülasyon sonrası dönemlerde olası virus saçılımları nedeniyle, izolasyon şartları yüksek laboratuvarlarda çalışılması durumunda, çevresel güvenlikten tam anlamıyla söz edilebilmektedir.

Bizim çalışmalarımızda, KKKA virüsü için bilinen en duyarlı hücre hattı kullanılmakta ve viremik kişilere ait plazma örneklerinden virus izolasyonu hedeflenmektedir. Bu amaçla, nicel eş zamanlı RT-PCR tekniği ile  $>10^8$  kopya/ml RNA içerdiği saptanan insan plazma örnekleri, 0.2 µm membran filtreden geçirildikten sonra, 80000 hücre/mL olacak şekilde sulandırılan Vero E6 hücrelerine ilave edilmiş ve 37°C’de 30 dakika süreyle inkübe edildikten sonra, 25 cm<sup>2</sup> hücre “flask”larına aktarılmıştır. Bu andan itibaren her gün düzenli olarak mikroskop kontrolleri yapılan kültürler, belirgin bir sitopatoloji tespit edilinceye kadar 10 günde bir ortak kültüvyona tabi tutulmuştur. Bu amaçla, enfekte edilen flasktaki



hücreler enzimatik olarak şişe tabanından kaldırıldıktan sonra sağlıklı hücrelerle 1:3 (enfekte:sağlıklı) oranında karıştırılarak yeni hücre kültürü ortamına aktarılmıştır. Üç kez tekrarlanan her ortak kültür denemesinden sonra, nicel eş zamanlı RT-PCR yapılarak viral yük hakkında bilgi sahibi olunmuştur. Bu yöntem ile Vero E6 hücrelerine inoküle edilen toplam 17 adet viremik plazma örneğinin bir tanesinden KKKA virusu izole edilmiştir. Bu oturumda, izole edilen virusun enfektivitesi ve immünofloresan temelli serolojik testlerde kullanımına ilişkin ilk bilgiler sunulacaktır.

#### KAYNAKLAR

1. Hoogstraal H. The epidemiology of tick-borne Crimean–Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. *J Med Entomol* 1979; 15:307-417.
2. Chumakov MP, Smirnova SE, Shalunova NY, et al. Proofs of etiological identity to Crimean hemorrhagic fever in Central Asian hemorrhagic fever. IX International Congress on Tropical Medicine and Malaria, Athens, 1976. Vol. 1; pp. 33-4.
3. Chumakov MP. A new tick-borne virus disease-Crimean hemorrhagic fever, pp: 13-45. In: Sokolov AA, Chumakov MP, Kolachev AA (eds), *Crimean Hemorrhagic Fever (Acute Infectious Capillary Toxicosis)*. 1945. Izd. Otd. Primorskoi Armii, Simferopol, Moscow (in Russian).
4. Chumakov MP. A new virus disease-Crimean hemorrhagic fever. *Nov Med* 1947; 4:9-11 (in Russian; in English, NAMRU3-T900).
5. Chumakov MP. On 30 years of investigation of Crimean hemorrhagic fever. *Tr Inst Polio Virusn Entsefalitov Akad Med Nauk SSSR* 1974; 22:5-18 (in Russian; in English, NAMRU3-T950).
6. Chumakov MP. A short study of the investigation of the virus of Crimean hemorrhagic fever. *Tr Inst Polio Virusn Entsefalitov Akad Med Nauk SSSR* 1965; 7:193-6 (in Russian; in English, NAMRU3-T189).
7. Butenko AM, Chumakov MP, Bashkirtsev VN, et al. Isolation and investigation of Astrakhan strain (“Drozdov”) of Crimean hemorrhagic fever virus and data on serodiagnosis of this infection. *Mater 15 Nauchn Sess Inst Polio Virus Entsefalitov (Moscow)* 1968; 3:88-90 (in Russian; in English, NAMRU3-T866).
8. Chumakov MP, Smirnova SE, Tkachenko EA. Antigenic relationships between the Soviet strains of Crimean hemorrhagic fever virus and the Afro-Asian Congo virus strains. *Mater 16 Nauchn Sess Inst Polio Virus Entsefalitov (Moscow)* 1969; 2:152-4 (in Russian; in English, NAMRU3-T614).

## KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ ENFEKSİYONLARININ TANISI VE TAKİBİ

Prof. Dr. Ayhan Kubar

*Gülhane Askeri Tıp Akademisi Hastanesi, Temel Bilimler Binası, Viroloji Anabilim Dalı, Etlik, Ankara.*

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi virusu (KKKAV), *Bunyaviridae* ailesinin *Nairovirus* cinsi içerisinde yer almaktadır. *Nairovirus* cinsi içerisinde yer alan diğer 33 virus gibi KKKAV de keneler (sert veya yumuşak) tarafından taşınmaktadır.

KKKAV tek zincirli RNA virusudur ve genomu üç negatif zincirli segmentten oluşur. Bu segmentler S (small), M (medium) ve L (large) segmentleridir. Bunlar sırasıyla; nükleokapsid (N) proteini, iki zarf glikoproteini (G1 ve G2) ve polimerazı kodlamaktadır. Bu proteinlerin moleküler ağırlıkları ise sırasıyla 48-54 kD, 72-84 kD, 30-40 kD ve 180-200 kD'dur.

KKKAV etrafında 5-7 nm kalınlığında bir zarf bulunan, yaklaşık 100 nm çapında sferik bir virustur. Zarf üzerinde glikoprotein çıkıntılar bulunur. Zarflı bir virus olduğundan KKKAV lipit çözücülere ve deterjanlara duyarlıdır. Düşük pH ve 56°C'de inaktive edilebilirler. Serum içindeki virus enfektivitesi, oda ısısında birkaç gün, 4°C'de ise >3 hafta devam eder.

Bugün itibarıyla (12.04.2010) GenBank'ta S segmente ait 50 komple dizi analiz sonucu mevcuttur. M segmentin genetik yapısıyla ilgili yayınlar mevcut olup immünite ve patogeneze bu segment önemlidir ve gelecekte aşı geliştirmede yararlı olabileceği düşünülmektedir. L segmentin de komple gen dizisi çıkarılmıştır.

Farklı coğrafi bölgelerde KKKAV suşlarının moleküler heterojenitesi hakkındaki bilgiler az olmakla birlikte, bazen suşlar arasında önemli ölçüde genetik farklılıklar olduğu görülmektedir. Suşlar arasında nükleotid değişkenliğinin %20'ye varan ölçüde olduğu bildirilmiştir. KKKAV suşlarının M segmenti analizine göre karşılaştırıldığı çalışmalar olmasına rağmen, çoğu filogenetik ağaç S segmentin 220-260 bp'lik parçasının analizine göre yapılmaktadır.

Genetik varyantlar ile izolasyon yılı, konak türü veya suşun coğrafi orijini gibi epidemiyolojik özellikler arasında belirgin bir korelasyon yoktur. En büyük genetik değişkenlik farklı coğrafi bölgelerden ziyade farklı kene türlerinden izole edilen suşlar arasındadır. Bu da genetik varyasyonun bazı özel kene türleriyle ilişkili olduğunu göstermektedir.

Virusun coğrafik dağılımında, göçmen kuşlar, enfekte çiftlik hayvanları ve kenelerin rol oynadığı üzerine hipotez ve çalışmalar mevcuttur.

KKKAV'nu genetik gruplara ayıran farklı çalışmalar vardır. Burt ve Swanepoel'in (2005), 70 farklı coğrafi bölgeden izole edilen suşlarla yaptığı çalışmaya göre, virus 3 ana gruba ayrılmıştır. Buna göre alt tip A, Asya ve Madagaskar'da dolaşan iki gruptan oluşmaktadır. Alt tip B, güney ve batı Afrika'da dolaşmakta olup, alt tip C ise Yunanistan'dan izole edilen tek bir suş olma özelliği taşımaktadır. Bunun dışında virusu 7 ana genetik gruba ayıran çalışmalar mevcuttur ve bir çalışmada da ilave bir genetik grubun olduğu ileri sürülmüştür.

KKKA hastalığının laboratuvar bulgularında, enfeksiyonun başlangıç günlerinde ortaya çıkan lökositoz veya lökopeni görülebilmektedir. Daha sonra karaciğer enzimleri (AST, ALT, gama-GT, LDH veya alkalin fosfataz) veya kreatin kinaz enziminde hızla yükselme görülmektedir. Koagülasyon mekanizmasının bozulmasını gösteren trombositopeni, protrombin zamanında artış, fibrin degradasyon ürünlerinde artış ve fibrinojen ve hemoglobin seviyelerinde düşüş görülür.

### Virolojik Tanı Yöntemleri

KKKAV ile enfekte örnekler, biyogüvenlik seviyesi 4 (BGS4) laboratuvarlarda işleme alınmalıdır. Virolojik tanıda kullanılan yöntemler şu şekilde sıralabilir:

- Virus izolasyonu
- RT-PCR
- Viral antijenlerin saptanması
- Özgül IgM antikorlarının saptanması
- Serokonversiyon (akut ve konvelesan faz serumları arasındaki dört katlık antikor titre artışı gereklidir)

Bu yöntemler için periferik kan, kardiyak kan veya postmortem karaciğer örneği kullanılabilir.

### **Virus izolasyonu**

KKKAV, hastalığın başlangıcından sonraki 8. güne kadar (nadiren bu süre 12. güne kadar uzayabilir) hastaların kanlarından izole edilebilmektedir. Virus izolasyonu, hücre kültürü (Vero, PS, LLC-MK2, CER, BHK21 veya SW13 hücreleri) veya yenidoğan farenin intraserebral inokülasyonu ile gerçekleştirilebilir. Hücre kültürü, fare inokülasyonuna göre daha hızlı bir yöntemdir, ancak duyarlılığı daha düşüktür. Virusun çoğalması için uzun süreli inkübasyona ihtiyaç olduğunu gösteren çalışmalar mevcut olup,  $10^7$ - $10^8$  PFU/ml gibi maksimum seviyede virus elde etmek için 4-7 günlük bir inkübasyon süresine ihtiyaç olduğu gösterilmiştir. Virus izolasyonunu müteakip immüno Floresans, kompleman fiksasyon ve/veya nötralizasyon yöntemleri ile tanımlama yapılmalıdır.

### **Moleküler Tanı**

Hastalığın başlangıcından sonraki bir hafta boyunca S segmentinden seçilen hedefler için RT-PCR ile tanı koymak mümkündür. Günümüzde KKKAV saptanmasında tek basamaklı gerçek zamanlı RT-PCR yöntemi tanımlanmış olup, bu konuda en dikkat çekici olanlar Drosten ve ark. (2002) ile Yapar ve ark.'nın (2005) yaptığı çalışmalardır. Bu yöntem konvansiyonel PCR'a göre daha duyarlı ve daha özgüldür ve de aynı zamanda daha hızlıdır.

### **Serolojik Tanı**

Serolojik tanıda indirek immüno Floresans (IFA) ve ELISA yöntemleri kullanılabilir. Ancak IFA ile, hastalığın 3. gününden önce IgM ve IgG antikorları saptanamaz. Antikorlar hastaların %10'unda 4. ve 5. günlerde, %65'inde 6. günde, %83'ünde 7. günde, %94'ünde 8. günde ve hastaların tümünde 9. günden itibaren saptanmaya başlar. İkinci veya üçüncü haftanın sonunda IgM titresi maksimum seviyededir. IgM genellikle 5. aydan önce kaybolur. IgG, 4. ayda yükselmeye başlar ve en az 5 yıl saptanabilir düzeyde kalır.

IgM ve IgG için ELISA capture yöntemleri geliştirilmiştir. ELISA yöntemiyle IgM ve IgG hastalığın 3. günü gibi erken bir zamanda saptanabilmektedir. Günümüzde hastalığın hızlı tanısında ve epidemiyolojik çalışmalarda ELISA yöntemi en yaygın kullanılan yöntem olmakla birlikte, giderek yerini moleküler tekniklere bırakmaktadır. Ölümcül olgularda antikorların saptanması mümkün olmamakta ve tanı için virus izolasyonu veya RT-PCR yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır.

### **Virus Takibi**

Bu konuda çalışmalar henüz başlamış olup, özellikle viral yükün prognostik faktör olarak kullanılması olanaklı gözükmektedir.

### **KAYNAKLAR**

1. Bakir M, Ugurlu M, Dokuzoguz B, Bodur H, Tasyaran MA, Vahaboglu H. Crimean-Congo haemorrhagic fever outbreak in Middle Anatolia: a multicentre study of clinical features and outcome measures. *J Med Microbiol* 2005; 54: 385-9.
2. Burt FJ, Leman PA, Abbott JC, Swanepoel R. Serodiagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Epidemiol Infect* 1994; 113: 551-62.
3. Burt FJ, Swanepoel R. Molecular epidemiology of African and Asian Crimean-Congo haemorrhagic fever isolates. *Epidemiol Infect* 2005; 133: 659-66.

4. Chinikar S, Persson SM, Johansson M, et al. Genetic analysis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Iran. *J Med Virol* 2004; 73: 404–411.
5. Drosten C, Gottig S, Schilling S, et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2323-30.
6. Drosten C, Minnak D, Emmerich P, Schmitz H, Reinicke T. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Kosovo. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1122-3.
7. Elliott RM, Bouloy M, Calisher CH, et al. *Bunyaviridae*, pp: 599-621. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, et al (eds), *Virus Taxonomy. VII Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 2000, Academic Press, San Diego, CA.
8. Ergonul O, Celikbas A, Dokuzoguz B, Eren S, Baykam N, Esener H. Characteristics of patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever in a recent outbreak in Turkey and impact of oral ribavirin therapy. *Clin Infect Dis* 2004; 39:284-7.
9. Garcia S, Chinikar S, Coudrier D, et al. Evaluation of a Crimean-Congo hemorrhagic fever virus recombinant antigen expressed by Semliki forest suicide virus for IgM and IgG antibody detection in human and animal sera collected in Iran. *J Clin Virol* 2006; 35:154-9.
10. Hewson R, Chamberlain J, Mioulet V, et al. Crimean-Congo haemorrhagic fever virus: sequence analysis of the small RNA segments from a collection of viruses world wide. *Virus Res* 2004; 102:185-9.
11. Honig JE, Osborne JC, Nichol ST. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genome L RNA segment and encoded protein. *Virology* 2004; 321:29-35.
12. Hoogstraal H. The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia Europe and Africa. *J Med Entomol* 1979; 15: 307–417.
13. Karti SS, Odabasi Z, Kortzen V, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:1379-84.
14. Kinsella E, Martin SG, Grolla A, Czub M, Feldmann H, Flick R. Sequence determination of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus L segment. *Virology* 2004; 321:23-8.
15. Nabeth P, Cheikh DO, Lo B, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever, Mauritania. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:2143-9.
16. Nabeth P, Thior M, Faye O, Simon F. Human Crimean-Congo hemorrhagic fever, Senegal. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:1881-2.
17. Nabeth P. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, pp: 299-324. In: Tabor E (ed), *Emerging Viruses in Populations*. 2007, Elsevier BV, London.
18. Nichol ST. Bunyaviruses, pp: 1603-33. In: Knipe DM, Howley PM (eds), *Fields Virology*. 2001, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
19. Papa A, Bozovi B, Pavlidou V, Papadimitriou E, Pelemis M, Antoniadis A. Genetic detection and isolation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Kosovo, Yugoslavia. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:852-4.
20. ProMED-mail. Crimean-Congo hemorrhagic fever - Russia (Southern Federal District) (04). 10 August, 2006: 20060810.2242. <http://www.promedmail.org>
21. ProMED-mail. Crimean-Congo hemorrhagic fever-Turkey (04) WHO. 9 August, 2006: 20060809.2230. <http://www.promedmail.org>
22. Saijo M, Tang Q, Shimayi B, et al. Recombinant nucleoprotein-based serological diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections. *J Med Virol* 2005; 75:295-9.
23. Schmaljohn CS, Hooper JW. *Bunyaviridae: the viruses and their replication*, pp: 1581-602. In: Knipe DM, Howley PM (eds), *Fields Virology*. 2001, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
24. Yapar M, Aydogan H, Pahsa A, et al. Rapid and quantitative detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus by one-step real-time reverse-transcriptase PCR. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58:358-62.
25. Yashina L, Petrova I, Seregin S, et al. Genetic variability of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in Russia and Central Asia. *J Gen Virol* 2003; 84:1199-206.
26. Yashina L, Vyshemirskii O, Seregin S, et al. Genetic analysis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Russia. *J Clin Microbiol* 2003; 41:860-2.



# **POSTER BİLDİRİLER**



POSTER NO	TARTIŞMA GÜNÜ VE SAATİ	KONU
P01-01 – P01-22	16.06.2010 Çarşamba, 13.00 – 14.00	Bakteriyoloji
P02-01 – P02-20	17.06.2010 Perşembe, 12.30 – 13.30	Bakteriyoloji, Mikoloji, Parazitoloji, Genel Mikrobiyoloji
P03-01 – P03-19	18.06.2010 Cuma, 12.30 – 13.30	Viroloji

Tartışma Günü ve Saati		Tartışma Günü ve Saati		Tartışma Günü ve Saati	
16.06.2010 Çarş. 13.00 – 14.00		17.06.2010 Perş. 12.30 – 13.30		18.06.2010 Cuma 12.30 – 13.30	
<i>Poster No</i>	<i>Sunan araştırmacı</i>	<i>Poster No</i>	<i>Sunan araştırmacı</i>	<i>Poster No</i>	<i>Sunan araştırmacı</i>
P01-01	Betil Özhak Baysan	P02-01	Gülnur Tarhan	P03-01	Begüm Nalça Erdin
P01-02	Alper Akçalı	P02-02	Gülnur Tarhan	P03-02	Nurhan Albayrak
P01-03	Doğan Barış Öztürk	P02-03	Banu Bayraktar	P03-03	Abdullah Güvenli
P01-04	Nizami Duran	P02-04	Olca Özçolpan	P03-04	Tanıl Kocagöz
P01-05	Mert Sudağdan	P02-05	İhsan Hakkı Çiftçi	P03-05	Mehmet Sami Serin
P01-06	Şafak Ermertcan	P02-06	Burcu Öksüz	P03-06	Münire Pınarbaşı
P01-07	Meltem Yalınay Çırak	P02-07	Mehmet Emin Demircili	P03-07	Dilek Çolak
P01-08	Meltem Yalınay Çırak	P02-08	Elif Cihadiye Öztürk	P03-08	Tuba Köse
P01-09	Süleyman Durmaz	P02-09	Merve Aydın	P03-09	İhsan Hakkı Çiftçi
P01-10	Süleyman Durmaz	P02-10	Ayşe Seyer	P03-10	Zübeyde Lale
P01-11	Gül Bayram	P02-11	Ayşe Kalkancı	P03-11	Ahu Kamburoğlu
P01-12	Meltem Yalınay Çırak	P02-12	Çağrı Ergin	P03-12	Aydan Karagül
P01-13	Ahmet Güner	P02-13	Gülşah Biter	P03-13	Derya Mutlu
P01-14	İhsan Hakkı Çiftçi	P02-14	Nadire Seval Gündem	P03-14	Tercan Us
P01-15	Elif Aktaş	P02-15	Seray Özensoy Töz	P03-15	Tercan Us
P01-16	Neşe Balkan	P02-16	Elif Cihadiye Öztürk	P03-16	Gülçin Alp
P01-17	Neşe Balkan	P02-17	Fahriye Küçükaslan	P03-17	Melda Meral
P01-18	Barış Öztürk	P02-18	Mustafa Katı	P03-18	Nurhan Albayrak
P01-19	Dilek Kaya	P02-19	Mustafa Katı	P03-19	Koray Ergünay
P01-20	Yüksel Akkaya				
P01-21	Nur Merve Kaya				
P01-22	Özgen Köseoğlu Eser				



P01-01

## AYAKTAN SAĞLIK HİZMETİ ALAN HASTALARDAN İZOLE EDİLEN METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İZOLATLARINDA PANTON-VALENTİN LÖKOSİDİN GENİ VE *SCCmec* GEN KASETİ TİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE İZOLATLARIN GENOTİPLENDİRİLMESİ

Caner Baran<sup>1</sup>, Derya Mutlu<sup>2</sup>, Betül Özhak Baysan<sup>2</sup>, Filiz Günseren<sup>3</sup>, Ayla Ergani<sup>4</sup>, Dilara Ögünç<sup>2</sup>, Dilek Çolak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ardahan Devlet Hastanesi, Ardahan.

<sup>2</sup>Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

<sup>3</sup>Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

<sup>4</sup>Laboratoire de Virologie Moléculaire et Structurale Gifs sur Yvette CNRS, Fransa.

Toplumdan izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) kökenlerinin belirlenmesini çeşitli faktörler etkilemektedir. Bu çalışmanın amacı, toplum kaynaklı deri ve yumuşak doku enfeksiyonu etkeni olan MRSA suşlarının genetik özelliklerinin ve sağlık bakımı ile ilişkilerinin araştırılmasıdır. Akdeniz Üniversitesi Hastanesi polikliniklerinde ayakta sağlık hizmeti alan hastalardaki deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından izole edilen ve fenotipik olarak MRSA olarak tanımlanan 30 izolat çalışmaya alınmış ve risk faktörleri araştırılarak 28'i (%93.3) sağlık bakımı ile ilişkili (SBİ), 2'si (%6.7) toplum kaynaklı (TK) bulunmuştur. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile izolatların tümünde *nuc* ve *mecA* genleri pozitifdir. SBİ-MRSA ve TK-MRSA izolatlarında sırasıyla; rifampine %89.3 ve %0, siprofloksasine %89.3 ve %50, gentamisine %89.3 ve %0, eritromisine %50 ve %50 ve klindamisine %28.6 ve %0 oranlarında direnç saptanmış, vankomisin, linkozamid ve trimetoprim/sülfametoksazole karşı dirence rastlanmamıştır. SBİ-MRSA izolatlarının 24'ünde (%85.7) *SCCmec* tip III, birinde (%3.6) *SCCmec* tip IV; TK-MRSA izolatlarının tümünde (%100) *SCCmec* tip IV saptanmış, üç (%10.7) SBİ-MRSA izolatı kullanılan yöntemle tiplendirilememiştir. Panton-Valentin lökositidin (*PVL*) geni TK-MRSA izolatlarının tümünde (%100) pozitif bulunmuştur. PFGE analizinde 17 farklı genotip (A-R) belirlenmiş; SBİ-MRSA izolatları arasında A pulsotipi baskınken, TK-MRSA izolatları birbiri ile ilişkili bulunmuştur. Bu çalışmada, ayrıntılı sorgulama yapıp, SBİ risk faktörleri araştırıldığı için; aksi takdirde %100 olarak bildirilecek olan TK-MRSA oranının yalnızca %6.7 olduğu anlaşılmış ve izolatlar ait özelliklerin doğru bildirilmesi sağlanmıştır. MRSA izolatlarının kökeninin bilinmesi, seçilecek ampirik tedavi için önemlidir. Doğru tanımlamalarla birlikte yapılacak genetik araştırmalar MRSA epidemiyolojisinin ve evriminin anlaşılmasını sağlayacaktır.

**Anahtar sözcükler:** MRSA, Panton-Valentin lökositidin geni, sağlık bakımı ile ilişkili MRSA, *SCCmec*, toplum kaynaklı MRSA.

## BURUNDA METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SAPTAMAK İÇİN CEPHEID XPRT MRSA TESTİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Alper Akçalı<sup>1</sup>, Müşerref Tatman Otkun<sup>1</sup>, Alper Şener<sup>2</sup>, Nilgün Özbey<sup>1</sup>, Deniz Gazel<sup>1</sup>, Arif Aksu<sup>1</sup>  
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, <sup>1</sup>Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Çanakkale.

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), burun delikleri, deri ve mukozal yüzeylerde yerleşmektedir. Kolonize hastalarda hastalığın gelişmesi veya bu hastaların etkeni yayma olasılıkları yüksektir. Akredite sağlık kuruluşlarında MRSA taşıyıcılığı için aktif sürveyans programları sürdürülmektedir. Xpert MRSA testi, SSCmec-orfX bölgesini hedef alan piyasaya sürülen ikinci ticari PCR sistemdir. Çalışmamızda, bu sistemin bir ön değerlendirmesinin yapılması amaçlanmıştır. Testin analitik duyarlılığının saptanması için *mecA* geni taşıyan bir MRSA izolatının 0.5 McFarland süspansiyonu ve bu süspansiyonunun 10<sup>-7</sup>'ye kadar onar katlık seri dilüsyonları beyin-kalp infüzyon buyyonu içerisinde hazırlanmıştır. Sistemle birlikte verilen eküvyonlar bu süspansiyonlara batırılıp, iki kere çevrilip, kendi tüplerine aktarılmıştır. Bu örnekler üretici firmanın önerileri doğrultusunda GeneXpert sisteminde çalışılmış ve işlem farklı bir günde tekrarlanmıştır. Çalışmada, kanlı agarda üretilmiş olan *S.aureus* ATCC 6538 ve *S.aureus* ATCC 29213 suşları ile ikişer adet farklı *S.aureus* ve *S.epidermidis* klinik izolatu test edilmiştir. Tüm suşlara CLSI kriterlerine uygun olarak oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon testi (DDT) uygulanmıştır. Kitin sıvı bir örnekte 1500 CFU/ml MRSA'yı saptayabildiği tespit edilmiştir. Vitek2 compact ve DDT ile metisiline duyarlı bulunan *S.aureus* izolatu, bu sistem ile pozitif sonuç verirken, her iki yöntemle de MRSA olarak saptanan izolat sistemde negatif sonuç vermiştir. Ayrıca MSSA olduğu bilinen ATCC 29213 suşu ile MRSA olduğu bilinen ATCC 6538 suşu bu sistemde pozitif sonuç vermişlerdir. Test edilen *S.epidermidis* suşları ile sistemde negatif sonuç alınmıştır. DDT ile uyumlu olmayan sonuçlar, sistemin fazla sayıda izolat ve diğer moleküler bir yöntemle birlikte değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Testin kullanımı son derece kolaydır, kitlerin oda sıcaklığında saklanabilmesi diğer bir avantajdır. Ancak maliyeti yüksek olan bu testin, klinik kullanımının değerlendirilebilmesi amacıyla, ülkemizde çok merkezli çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** MRSA, *Staphylococcus aureus*, real-time PCR, Xpert MRSA testi.

P01-03

## METİSİLİNE DİRENÇLİ STAFİLOKOK SUŞLARINDA AZALMIŞ VANKOMİSİN DUYARLILIĞININ ARAŞTIRILMASI

Ferit Kuşcu, Doğan Barış Öztürk, Yunus Gürbüz, Emin Ediz Tütüncü, İrfan Şencan  
*SB Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara.*

Metisiline dirençli stafilokok (MRS) suşları ile gelişen enfeksiyonlar, hastane kökenli enfeksiyonlar arasında önemli bir yere sahiptir. Bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan glikopeptid antibiyotiklere karşı gelişen direnç ilk kez 1996'da Japonya'dan bildirilmiştir. Vankomisine azalmış duyarlılığa sahip bu izolata "vancomycin-intermediate" *Staphylococcus aureus* (VISA) ismi verilmiştir. Heterojen VISA (hVISA) suşlarının bildirimi de VISA izolatlarını takip etmiştir. Bu çalışmada, rutin laboratuvar yöntemleriyle tespit edilmesi mümkün olmayan, vankomisin "intermediate" stafilokok (VIS) ve heterojen VIS (hVIS) izolatlarının hastanemizdeki sıklığının araştırılması amaçlanmıştır. Değişik klinik örneklerden izole edilen 148 MRS suşunda, VIS ve hVIS tespiti için tarama yöntemi olarak 6 µg/ml vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon agar (BHI-V6) kullanılmıştır. Bu yöntemle VIS/hVIS şüpheli olarak bulunan izolatlar, ileri inceleme olarak, standart E-test, makro E-test ve popülasyon analiz profili eğri altında kalan alan (PAP-AUC) yöntemleri uygulanmıştır. Ayrıca izole edilen bütün suşların vankomin ve teikoplanin MİK değerleri E-test yöntemiyle belirlenmiştir. Sonuç olarak, 148 stafilokok suşunun 5'i (%3.37) VIS/GIS, 2'si (%1.35) ise hVIS/hGIS olarak tanımlanmıştır. Sadece *S.aureus* suşları değerlendirildiğinde, 107 izolat içinde, bir adet VISA, bir adet de hVISA saptanmış ve prevalanslarının %0.93 olduğu hesaplanmıştır. Hastanelerde VIS/hVIS prevalans oranlarının artması, glikopeptid antibiyotikler ile tedavi başarısızlığı yaşanmasına neden olabilir. Dolayısıyla bu izolatların, o merkezler için bir tehdit oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi ve gerekli önlemlerin alınması oldukça önemlidir.

**Anahtar sözcükler:** Stafilokok, vankomisin, VISA, hVISA.

## STAFİLOKOKLARDA ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI VE DİRENÇ GENLERİ ARASINDAKİ KORELASYON

Nizami Duran<sup>1</sup>, Burçin Özer<sup>1</sup>, Gülay Gülbol Duran<sup>2</sup>, Yusuf Önlen<sup>3</sup>, Cemil Demir<sup>1</sup>

Mustafa Kemal Üniversitesi, <sup>1</sup>Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Sağlık Yüksekokulu, <sup>3</sup>Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları AD, Hatay

Bu çalışmada, stafilokok klinik izolatlarında, klinikte yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı direnç oranlarının fenotipik ve moleküler yöntemlerle karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, çeşitli klinik örneklerden hastalık etkeni olarak izole edilen toplam 298 izolat (139 *S.aureus*, 159 koagülaz negatif stafilokok) dahil edilmiştir. İzolatların antibiyotik direnç profilleri disk difüzyon (DD) ve mikrodilüsyon yöntemleri ile direnç genlerinin varlığı ise multipleks PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmamızda DD yöntemi ile izolatların hiçbirisinde vankomisine karşı direnç saptanmamış; trimetoprim-sülfametoksazol, amoksisilin-klavulanik asit, ofloksasin, eritromisin, gentamisin, klindamisin, tetrasiklin, penisilin ve metisiline karşı toplam direnç oranları sırasıyla; %14.4, %23.8, %33.6, %21.5, %31.5, %39.3, %51, %84.6 ve %9.4 olarak belirlenmiştir. Multipleks PCR ile *mecA*, *aac(6')/aph(2'')*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*, *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *tet(K)*, *tet(M)*, *msrA* ve *blaZ* direnç genlerinin pozitiflik oranları ise sırasıyla; %16.8, %32.9, %21.5, %26.5, %39.9, %54, %87.2, %30.5, %30.2, %32.2 ve %24.8 olarak tespit edilmiştir. Stafilokok suşlarının 151'inde (%50.7) *femA* geni varlığı saptanmış; *S.aureus* izolatlarının hepsinin (n=139) *femA* genine sahip olduğu izlenmiştir. DD yöntemiyle metisilin direnci, *S.aureus* suşları için %12.2 (17/139), koagülaz negatif stafilokok suşları (KNS) için ise %6.9 (11/159) olarak bulunmuş; bu suşlarda *mecA* geni varlığı sırasıyla %18.7 (n=26) ve %15.1 (n=24) olarak belirlenmiştir. Ayrıca fenotipik olarak tespit edilemeyen 9 (%24.3) izolatta metilin direnç geni varlığı genotipik olarak tespit edilmiştir (p<0.01). Çalışmamızda gentamisine dirençli olarak tespit edilen 41 *S.aureus* ve 53 KNS olmak üzere toplam 94 (%31.5) izolatin, *aac(6')/aph(2'')*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia* genlerinden en az birisine sahip olduğu görülmüştür. DD yöntemiyle tüm izolatların 64'ünde (%21.5) eritromisine karşı direnç saptanmış; toplam 165 (%55.4) izolatta eritromisin direnç geni varlığı tespit edilmiştir. İzolatların %25.8'inde (77/298) *ermA+ermB*; 33'ünde (%11.1) *ermA+ermC* ve 67'sinde (%22.4) sadece *ermC* gen varlığına rastlanmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada, metisilin, eritromisin ve tetrasiklin gibi antibiyotik direnç genlerinin tespitinde, multipleks PCR ile disk difüzyon yöntemleri arasında anlamlı derecede fark bulunduğu tespit edilmiştir (p<0.01).

**Anahtar sözcükler:** Stafilokok, disk difüzyon, multipleks PCR, direnç genleri, antibiyotik.

## GIDA KAYNAKLI PANTON-VALENTINE LÖKOSİDİN GENİ POZİTİF METİSİLİNE DUYARLI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Mert Sudağdan<sup>1</sup>, Ali Aydın<sup>2</sup>

<sup>1</sup>İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Merkezi Araştırma Lab., İzmir.

<sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Ana Bilim Dalı, İstanbul.

Çalışmamızda, Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden temin edilen toplam 1209 adet gıda maddesinden izole edilerek stafilokok olarak tanımlanan 219 adet suşta Panton-Valentine lökositin (*PVL*) geni varlığı ve virülans özellikleri araştırılmıştır. Keşan bölgesinde 3 farklı gıdadan (makarna, yufka ve kaşar peyniri) izole edilen ve moleküler yöntemler ile *S.aureus* olarak tanımlanan 3 suşun *PVL* geni içerdiği tespit edilmiştir. Bu suşların MLST (Multilocus sequence typing) ve Spa (*S.aureus*-specific staphylococcal protein A) tiplendirilmesi yanında *lukSF-PV* gen bölgelerinin tüm DNA dizisi çıkarılmıştır. Virülans genlerinin varlığı PCR ile belirlenmiştir. Bu amaçla metisilin direnç geni (*mecA*), enterotoksin genleri (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sel*, *sek*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq* ve *seu*), toksik şok sendromu toksini geni (*tst*), eksfoliyatif toksin genleri (*eta*, *etb*), alfa- ve beta-hemolizin genlerinin (*hla*, *hlb*) varlığı araştırılmıştır. Suşların 21 antibiyotiğe (vankomisin, oksasilin, penisilin, gentamisin, eritromisin, sefoksitin, rifampisin, linezolid, fusidik asit, sefazolin, levofloksasin, kloramfenikol, ko-trimoksazol, teikoplanin, klindamisin, amoksisilin/klavulanik asit, ofloksasin, kanamisin, tobramisin, imipenem, tetrasiklin) karşı duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile tespit edilmiştir. Bakteriler arasındaki filogenetik ilişki ise PFGE-RFLP analizi ile gösterilmiştir. Çalışmamızda *PVL* geni taşıyan üç *S.aureus* (M1, YF-1B-b, PY-30C-b) suşunun MLST sonucunda ST152 klonal tipi ve Spa tiplendirilmesinde ise t355 tip olduğu bulunmuştur. PFGE analizinde üç suş aynı bant profilini göstermiş olup, test edilen tüm antibiyotiklere karşı duyarlı ve *mecA* geni bakımından negatif olarak belirlenmiştir. Virülans genleri incelendiğinde ise, tüm suşların sadece *hla* ve *hlb* genlerini içerdiği tespit edilmiştir. *PVL* pozitif suşlara ait *lukSF-PV* gen dizileri GenBank'ta yayınlanmıştır (FJ895584, FJ895585 ve FJ895586). Bu çalışma ile, dünyada ilk kez gıda kaynaklı *PVL*-pozitif metisiline duyarlı *S.aureus* suşlarının varlığı ve bu suşların virülans özellikleri rapor edilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Panton-Valentine lökositin, PFGE, *Staphylococcus aureus*, virülans genleri.

P01-06

## **STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE KÖKENLERİNDE FLOROKİNOLON DİRENCİNİN VE EFLUKS POMPASI MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

Esra Belliler, Ayşe Nur Yurtman, Şafak Ermertcan

*Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.*

*Streptococcus pneumoniae* kökenlerinde florokinolon grubu antibiyotiklerin in vitro aktivitesinin ve efluks pompası mekanizmasının araştırıldığı bu çalışmaya, penisiline dirençli 47 pnömokok kökeni dahil edilmiştir. Kökenler üzerine florokinolonların in vitro aktiviteleri agar dilüsyon yöntemi ile araştırılmış; direnç saptanan kökenlerde efluks mekanizmasının varlığı pompa inhibitörü rezepin içeren besiyeri kullanılarak belirlenmiştir. Rezerpine duyarlı aktif efluks saptanan kökenlerde RT-PCR ile efluks pompası genlerinin ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Kökenlerin direnç oranları norfloksasin için %59.5, ofloksasin için %46.8, siprofloksasin için %31.9, levofloksasin ve moksifloksasin için ise %14.8 olarak belirlenmiştir. Rezerpine duyarlı aktif efluks fenotipi en fazla siprofloksasinde (~%53), daha sonra norfloksasinde (~%38) gözlenmiştir. Siprofloksasin ve norfloksasin ile rezerpine duyarlı aktif efluks fenotipi saptanan kökenlerin çoğunda (%92) *PatA/B* ekspresyonu belirlenmiştir. Kökenlerin %46'sında *PatA*'nın *PatB*'ye oranla daha yüksek düzeyde eksprese edildiği, %30'unun ekspresyonunda ise belirgin bir fark olmadığı gözlenmiştir. Aktif efluks pompaları, özellikle florokinolon grubu antimikrobiyallere karşı direnç gelişiminde önem taşımaktadır. Bu çalışmada, rezepinin *S.pneumoniae* kökenlerinde efluks pompalarını inhibe ederek florokinolonların etkinliklerini artırdığı gösterilmiştir. Rezerpinin toksik etkileri nedeniyle klinik kullanımı kısıtlıdır. Ancak rezepinin molekül yapısında yapılacak değişiklikler veya toksik olmayan efluks pompa inhibitörlerinin geliştirilmesi ile antimikrobiyallerle kombinasyon halinde kullanılacaklardır. Böylece hem daha geniş spektrumlu antimikrobiyaller elde edilecek, hem de bakterilerin direnç kazanmaları engellenebilecektir.

**Anahtar sözcükler:** Aktif efluks, florokinolon, rezepin, *Streptococcus pneumoniae*.

## ÜROPATOJEN *ESCHERICHIA COLI* KÖKENLERİNDE KİNOLON DİRENCİNİN GENOMİK YÖNTEMLERLE GÖSTERİLMESİ

Duygu Kahraman<sup>1</sup>, Meltem Yalınay Çırak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

<sup>2</sup>Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Son yıllarda, hem toplum kaynaklı hem de hastane kaynaklı idrar yolu enfeksiyonlarından izole edilen üropatojen *E.coli* suşlarında antibiyotiklere karşı direnç artışı görülmektedir. Bu çalışmanın amacı; üropatojen *E.coli* suşlarında kinolon direncinin konvansiyonel ve moleküler yöntemler kullanılarak saptanmasıdır. Çalışmaya, laboratuvarımıza gönderilen idrar örneklerinden izole edilen 102 *E.coli* suşu alınmıştır. Bu örneklerin konvansiyonel yöntemlerle tiplendirilmesi yapılmıştır. *E.coli* suşlarının siprofloksasin, ofloksasin ve levofloksasine karşı duyarlılıkları CLSI önerilerine uygun olarak agar dilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır. Elde ettiğimiz verilere göre, izolatların 34'ü (%33.33) siprofloksasin, ofloksasin ve levofloksasine dirençli, 6'sı (%5.88) orta düzeyde dirençli, 62'si ise (%60.78) duyarlı olarak tespit edilmiştir. *E.coli*'de kinolon direncine sebep olduğu düşünülen ve üzerinde en çok çalışılan bölge DNA giraz geninin A alt ünitesidir (*gyrA* gen bölgesi). Çalışmamızda, kinolonlara dirençli olan izolatlardan rastgele seçilen 28 *E.coli* suşuna *gyrA* gen bölgesinin dizi analizi yapılarak moleküler olarak incelenmiştir. *gyrA* geninde yapılan dizi analizinde 83. ve 87. kodonlarda mutasyonlar saptanmıştır. *gyrA* gen bölgesinin dizi analizi sonuçları incelendiğinde, 83. kodonda serin aminosidinin lösin aminoasidine ve 87. kodonda aspartik asit aminoasidinin asparajin aminoasidine dönüşümü sonucu oluşan mutasyonlar, kinolonlara dirençli 28 *E.coli* suşunun 24'ünde (%85.71) saptanmış; 4 suşta (%14.28) ise *gyrA* gen bölgesinde mutasyon tespit edilmemiştir. Üropatojen *E.coli* suşlarında kinolonlara karşı direnç artışının görülmesi nedeniyle antimikrobiyal direncin aydınlatılabilmesi için moleküler çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar üropatojen *E.coli* kinolon direncinin moleküler profilini ortaya koymaktadır.

**Anahtar sözcükler:** *gyrA* gen bölgesi, kinolon direnci, üropatojen *E.coli*.

## **ACINETOBACTER BAUMANNII SALGIN ANALİZLERİNDEKİ KLONAL İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİNDE “ARBİTRARİLY PRİMED PCR”İN ROLÜ**

Yasemin Işık<sup>1</sup>, Murat Dizbay<sup>2</sup>, Derya Keten Tozlu<sup>2</sup>, Meltem Yalınay Çırak<sup>3</sup>

Gazi Üniversitesi <sup>1</sup>Sağlık Bilimleri Enstitüsü, <sup>2</sup>Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, <sup>3</sup>Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

*Acinetobacter* türleri son yıllarda ülkemizde yoğun bakım servislerinde en sık rastlanan gram- negatif enfeksiyon etkenleri arasında yer almaktadır. Özellikle hastane enfeksiyonlarında önemli bir etken olarak ortaya çıkan bu bakteriler, yüksek oranda morbidite ve mortaliteye neden olurlar. *A. baumannii* izolatları, birçok antibiyotik grubuna karşı da yüksek direnç göstermektedir. Bu çalışmanın amacı, 2006-2008 yılları arasında yoğun bakım ünitelerinde farklı hastane enfeksiyonlarına neden olan toplam 99 *A. baumannii* suşu arasındaki klonal ilişkinin ortaya konulmasıdır. Çalışmaya, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Yoğun Bakım Üniteleri (YBÜ)’nde 2006-2007 yıllarında yatan hastalardan toplanan 74 klinik örnek ile 2008 yılında YBÜ’nde ventilatörle ilişkili pnömoni (VİP) gelişen hastalardan alınan 25 endotrakeal aspirat örnekleri alınmıştır. *A. baumannii* olarak tiplendirilen suşlardan DNA izolasyonu kaynatma yöntemiyle yapılmış ve M13F (5’-GTAAAACGACGGCCAGTGAA-3’) primeri kullanılarak “Arbitrarily Primed” polimeraz zincir reaksiyonu (AP-PCR) yöntemi uygulanmıştır. Amplifikasyon ürünleri %2’lik agaroz jelde 150 Volt’luk akımda yürütülmüştür. Elektroforez işlemi sonucunda jel transillüminatör üzerine alınarak UV ışığı altında görüntüledikten sonra ortaya çıkan bant profillerinin UPGMA programı ile dendogramı elde edilmiş ve aralarındaki ilişki incelenmiştir. Çalışmamızda AP-PCR sonrası yapılan analiz ile; 2006-2007 yılları arasında hastane enfeksiyonu gelişen 74 hastaya ait suşlar ve 2008 yılında VİP gelişen 25 hastaya ait suşlar arasında klonal ilişkiler saptanmıştır. İncelenen 74 suş için, kümelenme gösteren 1 ana genotip olmak üzere 5 ayrı genotip belirlenirken, diğer 25 suş için kümelenme gösteren 2’si ana genotip olmak üzere toplam 6 genotip tespit edilmiştir. AP-PCR yöntemi, epidemiyolojik çalışmalarda hızlı ve diğer moleküler yöntemlere göre daha ucuz olması, salgının moleküler epidemiyolojik ön değerlendirilmesinde ise kullanışlı olması ile tercih edilebilir bir yöntemdir.

**Anahtar sözcükler:** *Acinetobacter baumannii*, AP-PCR, hastane enfeksiyonu.



## REKTAL SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE VANKOMİSİNE DİRENÇLİ ENTEROKOK SAPTANMASINDA GENEXPERT *vanA/vanB* REP-PCR YÖNTEMİ İLE KÜLTÜR YÖNTEMİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Süleyman Durmaz<sup>1</sup>, Barış Derya Erçal<sup>1</sup>, Emine Alp<sup>2</sup>, Duygu Perçin<sup>1</sup>

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, <sup>1</sup>Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri.

Vankomisine dirençli enterokok (VRE) taşıyıcılarının doğru ve hızlı bir yöntemle belirlenmesi VRE geçişini azaltmaya yönelik enfeksiyon kontrol programlarının önemli bir parçasıdır. Bu çalışmada VRE kolonizasyonunu belirlemede GeneXpert *vanA/vanB* (Cepheid, ABD) real time-PCR yönteminin kültür yöntemi ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, VRE kolonizasyonu açısından yüksek riskli olarak değerlendirilen 136 hastadan iki uçlu eküvyonlarla alınan rektal sürüntü örneği dahil edilmiştir. Eküvyonlardan biri GeneXpert *vanA/vanB* real time-PCR ile *vanA* ve *vanB* genlerinin araştırılmasında, diğeri ise 6 µg/ml vankomisin içeren “bile-esculin azide agar” ile kültür için kullanılmıştır. Kültürden izole edilen bakteriler API Rapid ID 32 STREP (BioMerieux, Fransa) sistemi ile tanımlanmış; suşların vankomisin ve teikoplanine karşı duyarlılıkları E-test (AB Biodisk, İsveç) yöntemi ile araştırılmıştır. Hastaların 23’ünde hem PCR hem de kültür ile VRE saptanırken 10 hastada PCR pozitif, kültür negatif bulunmuştur. PCR pozitif, kültür negatif hastaların 3’ünde *vanB* pozitifliği saptanmıştır. Dört hastada ise haftalık rutin taramalarda PCR çalışmasından bir hafta sonraki rektal sürüntü kültürlerinin pozitifleştiği görülmüştür. Bu durumda, kültür altın standart olarak kabul edildiğinde, testin duyarlılığı %100, özgüllüğü %94.5, pozitif prediktif değeri %81.8 ve negatif prediktif değeri %100 olarak hesaplanmıştır. İzole edilen suşların duyarlılık testi sonuçlarına göre 22’si (%95.6) *VanA* fenotipi taşıyan *Enterococcus faecium*, real time-PCR ile *vanB* geni pozitif bulunan bir suş ise *VanB* fenotipi taşıyan *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. GeneXpert *vanA/vanB* real time-PCR yöntemi VRE kolonizasyonunun erken belirlenmesinde kullanılabilecek hızlı ve duyarlı bir yöntemdir; ancak bu yöntemle tespit edilen *vanB* varlığı kültürle mutlaka doğrulanmalıdır.

**Anahtar sözcükler:** Vankomisine dirençli enterokok, rep-PCR, GeneXpert.

P01-10

## ERCIYES ÜNİVERSİTESİ HASTANESİNDE VANKOMİSİNE DİRENÇLİ ENTEROKOKLARDA KLONAL YAKINLIĞIN ARAŞTIRILMASI

Barış Derya Erçal, Süleyman Durmaz, Duygu Perçin

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

Vankomisine dirençli enterokok (VRE)'lar salgınlara yol açabilen önemli hastane enfeksiyonu etkenlerindedir. Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde rektal sürüntü ve klinik örneklerden izole edilen VRE'lerin glikopeptid direnç fenotiplerinin ve klonal yakınlıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, 2004-2010 yılları arasında hastaların klinik örneklerinden izole edilen 28, rektal sürüntü örneklerinden izole edilen 45 olmak üzere toplam 72 enterokok suşu alınmıştır. Suşlar API Rapid 32 Strep kiti (BioMerieux, Fransa) kullanılarak tanımlanmıştır. Suşların vankomisin ve teikoplanine karşı duyarlılığı E-test (AB Biodisk, İsveç) yöntemiyle değerlendirilmiştir. İzolatların genetik yakınlıkları, rep-PCR (repetitive PCR; DiversiLab, BioMerieux, Fransa) yöntemiyle araştırılmıştır. Suşların 64'ü (%88.9) Kasım 2008-Mayıs 2009 tarihleri arasında izole edilmiştir. Antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre, tüm izolatlar vankomisin ve teikoplanine yüksek düzey dirençli *VanA* fenotipi gösteren *Enterococcus faecium* olarak tanımlanmıştır. Rep-PCR sonrasında izolatların 11 farklı klona ait olduğu ancak 2008-2009 tarihleri arasında izole edilen 64 ve 2006 yılında Pediatri Yoğun Bakım Ünitesi (YBÜ)'sinden izole edilen iki suş olmak üzere toplam 66'sının (%91.7) 4 ana klona ait olduğu görülmüştür. Bu 4 ana klondan A klonunun (%19.4) Pediatri ve Beyin Cerrahi YBÜ'lerinde, B klonunun (%29.2) Yenidoğan YBÜ'sinde, C klonunun (%16.7) Dahili ve Cerrahi YBÜ'lerinde, D klonunun ise (%23.6) Genel Cerrahi Kliniğinde hakim olduğu izlenmiştir. Sonuç olarak, hastanemizde Kasım 2008-Mayıs 2009 tarihleri arasında dört VRE klonunun salgınlara yol açtığı belirlenmiş; A klonuna ait iki suşun hastanemizde ilk kez 2006 yılında ortaya çıktığı, ancak 2008'e dek tekrar izole edilmediği görülmüştür. VRE'lara bağlı salgınların önlenmesi için salgınların erken ve hızlı bir şekilde tanımlanması önemlidir. Çalışmamızda, DiversiLab rep-PCR sisteminin, salgınların tespit edilmesinde hızlı ve kolay uygulanabilir bir yöntem olduğu kanısına varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Vankomisine dirençli enterokok, rep-PCR, klonal ilişki.

## MERSİN BÖLGESİNDE TÜKETİME SUNULAN KIYMALARDAN İZOLE EDİLEN ENTEROKOK TÜRLERİNİN PREVALANSI VE TIPLENDİRİLMESİ

Gül Bayram, Nuran Delialioğlu, Gürol Emekdaş

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Mersin.

Enterokoklar insan ve hayvanların normal florasında bulunan bakterilerdir. Bu bakteriler doğada her türlü çevresel koşulda canlı kalabilmekte ve insanlara ekzojen yolla geçebilmektedir. Enterokoklar, son yıllarda hastane enfeksiyonu etkenleri arasında yer aldığından daha büyük önem kazanmıştır. Bu çalışmanın amacı, bölgemizde çeşitli süpermarket ve kasaplarda tüketime sunulan kıymalardan izole edilen enterokok türlerinin tiplendirilmesi ve antibiyotik direncinin araştırılmasıdır. Çalışmaya, Şubat-Mart 2010 tarihlerinde Mersin ilindeki çeşitli market ve kasaplardan steril kaplar içerisine alınan toplam 40 adet koyun ve dana kıyması örneği dahil edilmiştir. Hemen laboratuvara ulaştırılan örneklerden 25'er gram alınarak önce triptik soy buyyon besiyerinde homojenize edilmiş ve daha sonra "Enterococcosel Agar"a (bioMerieux, Fransa) ekim yapılmıştır. Üreten kolonilerden eskülin pozitif olanlara Gram boyama ve katalaz testi uygulanmıştır. Gram-pozitif kok morfolojisinde olan ve katalaz negatif koloniler, VITEK-2 Compact yarı otomatize cihazında (bioMerieux, Fransa) gram-pozitif bakteri tanımlama paneli ile tür düzeyinde tiplendirilmiş ve daha sonra CLSI tarafından önerilen şekilde antibiyotik duyarlılık testi yapılmıştır. Çalışma sonucunda, 40 örneğin 11'inden (%27.5) enterokok türleri izole edilmiş; bir örnekte ise iki türün birlikte ürediği (*E.faecalis* ve *E.hirae*) izlenmiştir. İzolatların 5'i *E.faecalis* (%41.7), 2'si *E.faecium* (%16.7), 2'si *E.hirae* (%16.7) ve birer adedi (%8.3) de *E.durans*, *E.gallinarum* ve *E.raffinosis* olarak tiplendirilmiştir. Suşların antimikrobiyal direnç oranları incelendiğinde; iki izolat hem ampisiline hem eritromisine, bir izolat ise ampisiline dirençli olarak bulunmuştur. Çalışılan diğer antibiyotiklere karşı (kloramfenikol, gentamisin, norfloksasin, penisilin, linezolid, teikoplanin, vankomisin, trimetoprim-sülfametoksazol) direnç tespit edilmemiştir. Sonuç olarak, bölgemizdeki et ürünlerinde enterokokların saptanması, hayvan kesim işlemi ve kıymaların hazırlandığı ortamdaki sanitizasyonun yeterli olmadığını göstermektedir.

**Anahtar sözcükler:** Enterokok türleri, antibiyotik direnci, et ürünü.

## ÇOCUKLARDA *HELICOBACTER PYLORI* KLARİTROMİSİN DİRENCİNİN MOLEKÜLER OLARAK TESPİTİ

Meltem Yalınay Çırak<sup>1</sup>, Yasemin Işık<sup>2</sup>, Evren Doruk Engin<sup>3</sup>, Sinan Sarı<sup>4</sup>, Buket Dalgıç<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>2</sup>Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

<sup>3</sup>Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.

<sup>4</sup>Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Gastroenteroloji Bilim Dalı, Ankara.

*Helicobacter pylori* tüm dünyada yaygın olarak gözlenen, dünya nüfusunun yaklaşık yarısını çocukluk yaşlarından itibaren enfekte eden bir bakteridir. Enfeksiyonun önlenmesinde çocukluk çağıının hedef alınması gerekmektedir. *H.pylori*'de klaritromisin direncinden sorumlu mutasyonlar çoğunlukla bakteriyel ribozomların 50S alt ünitesinin V. bölgesinin peptidil transferaz aktivitesine sahip kısmındadır. En sık tanımlanan mutasyonlar 23S rDNA'da A2142G/C ve A2143G/C'dir. Bu çalışmada, pediatrik gastroenteroloji polikliniğine başvuran çocuklarda *H.pylori* varlığı ve klaritromisin direncinin saptanması amaçlanmıştır. Çalışmaya, 2006-2010 yılları arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Gastroenteroloji polikliniğine başvuran 166 hastadan toplanan 278 klinik örnek dahil edilmiştir. Hastalardan endoskopi yardımıyla antrum ve korpus bölgelerinden her bir hasta için birer biyopsi örneği alınmıştır. Hasta başında endoskopi tüp içerisine aktarılarak kısa sürede Moleküler Bakteriyoloji Laboratuvarına ulaştırılan örnekler -20°C'de dondurularak PZR için DNA izolasyon işlemine kadar saklanmıştır. Mide biyopsi örneklerinden DNA izolasyonu için "Invisorb® Spin Tissue Kit" kullanılmıştır. Klinik örneklerde *H.pylori* varlığı önce PZR yapılarak tespit edilmiş, daha sonra floresan ile işaretli probalar kullanılarak klaritromisin direncinin saptanması gerçek zamanlı PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Çocuklarda mide biyopsisi örneklerinde saptanan *H.pylori* pozitiflik oranları yıllara göre irdelendiğinde; 2006 yılı için %63.3 (19/30), 2007 için %54 (20/37), 2008 için %58 (36/62), 2009 için %59.3 (19/32) ve 2010 yılının ilk ayları için %40 (2/5) olmak üzere, toplam %57.8 (96/166) olarak saptanmıştır. *H.pylori* pozitifliği saptanan olgularda, suşların klaritromisine direnç oranları ise yıllara göre sırasıyla; %42.1 (8/19), %50 (10/20), %22.2 (8/36), %47.3 (9/19) ve %50 (1/2) olarak belirlenmiş; suşlarda toplam direnç oranı %37.5 (36/96) olarak tespit edilmiştir. *H.pylori* enfeksiyonları açısından önemli bir grup olan pediatrik hastalarda, mikroorganizmanın ve klaritromisin direncinin tanımlanmasında moleküler yöntemlerin tanı değeri yüksektir. Moleküler tanı yöntemleri ile her yaş grubunda yapılan çalışmalar, hastalığın yayılma yolları, mikroorganizmanın genetik farklılıkları, direnç durumu ve patojenitesinin aydınlatılmasına ışık tutacaktır.

**Anahtar sözcükler:** *Helicobacter pylori*, klaritromisin direnci, çocuk hasta.

## FARKLI MİDE PATOLOJİLERİNE SAHİP HASTALARDAN İZOLE EDİLEN *HELICOBACTER PYLORI* *cag PAI* ÇEŞİTLİLİĞİNİN MİDE EPİTEL HÜCRELERİNE ETKİSİ

Ahmet Güner<sup>1</sup>, Bora Kazım Bölek<sup>1</sup>, Barık Salih<sup>1</sup>, Soykan Arıkan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fatih Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İstanbul.

<sup>2</sup>İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Cerrahi Bölümü, İstanbul.

*Helicobacter pylori* *cag* patojenik adasının (*cag PAI*), mide epitel hücrelerine (insan gastrik karsinoma hücre kültürü; AGS) olan etkisi üzerine yapılan çalışmaların sonuçları çelişkilidir. Bu çalışmada, *cag PAI* bölgesinin bütün halinde, kısmi delesyonlu ya da tam delesyonlu olmasının bu hücreler üzerine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. *cag PAI* bölgesinin tespiti için 5' ile 3' uç bölgesi arasındaki *cagE*, *cagM*, *cagT* ve *cagA* genleri araştırılmış; bununla birlikte *cagA* 3' bölgesi EPIYA motiflerinin, epitel hücrelerinde "hummingbird fenotipi" (HF; hücrelerde uzama ve dağılma) oluşturma potansiyeli incelenmiştir. Yaş aralığı 23-78 yıl arasında değişen toplam 43 dispeptik hastadan alınan biyopsi örnekleri homojenize edilerek Columbia agar besiyerine ekilmiş ve üreyen *H.pylori* kolonilerinden QIAamp kiti ile (Qiagen) DNA izolasyonu yapılmıştır. *cagE*, *cagM*, *cagT*, *cagA* geni 3' uç bölgesi EPIYA-A-B-C motifleri PZR ile belirlenmiş, DNA dizi analizi ise ABI Prism 310 (Applied Biosystems) cihazıyla yapılmıştır. Aynı izolatlar ile AGS hücreleri enfekte edilip HF gözlemlenmiş ve ileriki safhada tirozin fosforilasyonu ve IL-8 sekresyonunun tespiti için örnek alınmıştır. Çalışılan toplam 43 izolattan 17'sinde bütün *cag PAI*, 15'inde *cag PAI*da kısmi delesyonlar ve 11'inde tam delesyonlar bulunmuştur. Gastritli 22 hastanın 19'unda *cagA* 3' bölgesi EPIYA ABC, 3'ünde ise ABCC; duodenum ülseri olan 8 hastanın 5'inde ABC, 2'sinde ABCC, birinde ise ABC ve ABCCCCC suşlarının karışımı; mide ülseri olan 2 hastada da ABC motifleri belirlenmiştir. CLC DNA Workbench programıyla DNA dizileri aminoasit dizilerine dönüştürülmüş ve ClustalW2 programı kullanılarak izolatların aminoasit dizileri 2 referans suşla (26695 ve J99) karşılaştırılmıştır. Enfeksiyon sonucunda ise, tüm AGS hücrelerinde HF tespit edilmiştir. Sonuç olarak çalışmamızda, bütün halindeki *cag PAI* bölgesinin, AGS hücrelerinde HF oluşturma potansiyelinin, kısmi veya tam delesyonlu bölgelere oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** AGS, *cag PAI*, EPIYA motifi, *Helicobacter pylori*, hummingbird fenotipi.

**PREAURİKÜLER LEZYONDA ANAEROP ENFEKSİYON SAPTANAN BİR OLGU**

İhsan Hakkı Çiftçi<sup>1</sup>, Sevgi Çiftçi<sup>2</sup>, Fahriye Keskin<sup>2</sup>, Abdullah Ayçiçek<sup>3</sup>, Özlem Yoldaş<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar.

<sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

<sup>3</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, Afyonkarahisar.

Preauriküler sinüs, kulak katlantısının ön kısmında görülen ve birinci faringeal katlantının dorsal kısmının tam kapanmaması sonucu oluşan konjenital bir anomalidir. Genellikle asemptomatik olup, nadiren kronik enfeksiyonlarla bir arada görülür. Enfeksiyon durumunda yapılan mikrobiyolojik çalışmalarda, etken olarak en sık %31 oranında *Staphylococcus epidermidis* saptanmaktadır. Bu çalışmada, *Porphyromonas gingivalis* ve *Treponema denticola* tarafından oluşturulan bir preauriküler abse olgusu sunulmaktadır. Hastanemizin Kulak Burun Boğaz polikliniğine kulak önünde şişlik yakınması ile başvuran 39 yaşında kadın hastadan, punch biyopsi yöntemi ile örnek alınmıştır. Örneğin Gram ve ARB boyaması yapılmış, moleküler incelemeler için DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Örneğin moleküler incelemesinde; fakültatif ve zorunlu anaerop bakteriler (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces israelii*, *Dialister pneumocintes*, *Filifactor alocis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Tannerella forsythia*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas gingivalis*, *Eikenella corrodens*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella pallens*, *Treponema denticola*) ile Epstein-Barr virus (EBV) ve sitomegalovirus (CMV) varlığı konvansiyonel PCR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Hastanın biyopsi örneğinde ARB pozitifliği saptanmamış; Gram boyamada *Actinomyces* yönünden anlamlı bir bulgu gözlenmemiş, ancak PCR incelemesinde *P.gingivalis* ve *T.denticola* nükleik asitlerinin varlığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, preauriküler sinüs inatçı enfeksiyon, ülserleşme ve selülit gibi klinik durumlarda önem kazanmaktadır. Özellikle inatçı enfeksiyonlarda tedavi protokollerinin, anaerop etkenlerin göz önüne alınarak düzenlenmesinin, sürece katkı sağlayabileceği düşüncesindeyiz.

**Anahtar sözcükler:** Anaerop enfeksiyon, preauriküler abse.

## İSHALLİ HASTALARDA ENTEROTOKSİJENİK *BACTEROIDES FRAGILIS* PREVALANSI VE *bft* GENİ ALT TİPLERİNİN BELİRLENMESİ

Mehtap Akpınar<sup>1</sup>, Elif Aktaş<sup>1</sup>, Füsün Cömert<sup>1</sup>, Canan Külâh<sup>1</sup>, Vildan Sümbüloğlu<sup>2</sup>  
Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi, <sup>1</sup>Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Biyostatistik Anabilim Dalı, Zonguldak.

Bu çalışmada, bölgemizdeki ishallerde enterotoksijenik *Bacteroides fragilis* (ETBF) prevalansının saptanması ve ishal ile *bft* geni alt tipleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, laboratuvarımıza gönderilen 200 ishallerde dışkı örneği ile sağlıklı kontrollerden alınan 200 dışkı örneği dahil edilmiştir. Direkt dışkı örneklerinde enterotoksin (*bft*) genini araştırmak için “nested” polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılmıştır. ETBF olarak tanımlanan izolatlarda PZR yöntemi ile *bft* alt tip ayrımı yapılmıştır. Çalışmamızda, hastaların 29’unda (%14.5) ve kontrollerin 27’sinde (%13.5) *bft* geni tespit edilmiştir. İshallerde hastalar ile kontrol grubu arasında ETBF prevalansı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. İshallerde hasta grubunda en yüksek ETBF pozitiflik oranı 1-5 yaş aralığında iken (%41.4), kontrol grubunda en yüksek ETBF pozitiflik oranının 17-64 yaş grubunda (%44.4) olduğu izlenmiştir. Hasta ve kontroller her bir yaş grubu için karşılaştırıldığında, ETBF oranları açısından anlamlı fark bulunmamıştır. ETBF toksin geni saptanan 29 ishallerde dışkı örneğinin 24’ünde *bft*-1, beşinde *bft*-2 alt tipi; 27 kontrol dışkı örneğinin 24’ünde *bft*-1, üçünde *bft*-2 alt tipi tespit edilmiş; *bft*-3 alt tipine rastlanmamıştır. Gruplar arasında *bft* alt tipleri açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiş; *bft*-1 en sık görülen alt tip olarak belirlenmiştir. İshallerde hastaların %9’unda (18/200) ETBF tek patojen olarak bulunurken, %5.5’inde (11/200) başka bir etken (9 hastada rotavirus, 2 hastada *Entamoeba histolytica*) ile birlikte saptanmıştır. ETBF’nin rotavirus ile birliktelik oranının (9/29; %31) yüksek olduğu dikkati çekmiştir.

**Anahtar sözcükler:** İshal, *Bacteroides fragilis*, enterotoksin, ETBF, *bft* geni.

**BACTEROIDES FRAGILIS KÖKENLERİNİN KARBAPENEMLERE DİRENCİNİ BELİRLEMEDE MEROPENEM E- TESTİNİN YERİ**

Nurver Toprak Ülger, Arzu İlki, Nilay Özel, Neşe Balkan, Güner Söyletir  
*Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.*

*Bacteroides fragilis* normal kolon florasında yer alan, anaerob enfeksiyonlardan en sık izole edilen patojenlerdendir. Karbapenemler, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörleri ve metronidazol gibi sınırlı sayıda antibiyotiklere duyarlıdırlar. Son zamanlarda bazı ülkelerde karbapenemlere dirençli *B. fragilis* kökenleri bildirilmiştir. Karbapenemlere direnç, *cfiA* geni tarafından kodlanan metallo-beta-laktamaz aktivitesiyle gerçekleşmektedir. Duyarlılık testleri, CLSI'nın önerdiği agar dilüsyon yöntemiyle yapılmaktadır. E-test ise, yaşamı tehdit eden durumlarda ve *Bacteroides* enfeksiyonlarında alternatif yöntem olarak gösterilmiştir. Bu çalışmada, *B. fragilis* kökenlerinde karbapenem direncini ve *cfiA* genini belirlemede meropenem E-testinin yeri araştırılmıştır. Çalışmaya, 47'si klinik örneklerden, 16'sı dışkıdan izole edilmiş toplam 63 *B. fragilis* kökeni alınmış; meropenem E-testi (AB Biodisk, İsveç) ile minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile *cfiA* geni varlığı araştırılmıştır. Meropenem E-test sonuçlarına göre; MİK aralıkları  $<0.002 - >32$  µg/mL, direnç oranı %8 olarak bulunmuştur. Kökenlerin %41'inde *cfiA* geni gösterilmiştir. Direnç geni varlığıyla MİK değerleri arasındaki ilişki araştırıldığında, "MİK $\geq$ 1 µg/mL" değerlerine sahip kökenlerde *cfiA* geninin varlığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.0001). Benzer şekilde, MİK değerleri 1 µg/mL'den az olduğunda *cfiA* geninin negatif olması da istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmiştir (p=0.0001). Hastanemizde karbapenemlerin yaygın kullanılması, kökenlerimizde karbapenem direncini kodlayan *cfiA* geninin ve meropeneme direnç oranının yüksek olmasına neden olmaktadır. Laboratuvarda meropenem E-testi uygulanması halinde, "MİK $\geq$ 1" olması, bir kökende *cfiA* geninin bulunma olasılığının yüksek olduğunu; dolayısıyla, bu kökende karbapenemlere ve diğer beta-laktamlara direncin gelişebileceği öngörüsünü mümkün kılabilir. Başarılı bir tedavinin programlanmasında ve sürdürülmesinde meropenem E-test MİK sonuçları yol gösterici olabilir.

**Anahtar sözcükler:** *Bacteroides fragilis*, meropenem, E-test, *cfiA* geni.



**BACTEROIDES FRAGILIS KÖKENLERİNDE ENTEROTOKSİN (*bft*) VE KARBAPENEMAZ (*cfiA*) GEN BİRLİKTELİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nurver Toprak Ülger, Arzu İlki, Nilay Özel, Neşe Balkan, Güner Söyletir  
*Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.*

Kolon florası elemanlarından *Bacteroides fragilis*, polimikrobiyal enfeksiyonlardan izole edilen anaerop patojenler arasında birinci sırada bulunmakta ve bu özelliği birtakım virülans faktörlerine bağlanmaktadır. Bazı *B. fragilis* kökenleri, *bft* geniyle kodlanan metallo-enzim yapısında enterotoksin (fragilizin) üretmektedir. Enterotoksin, barsak epitelinde morfolojik değişikliklere yol açmakta, dolayısıyla ishale ve bazı kronik inflamatuvar barsak hastalıklarına neden olmaktadır. Bacteroides'ler, antibiyotiklere diğer anaeroplara göre daha fazla direnç göstermektedirler. Son dönemlerde karbapenemlere direnç geliştiren kökenler bildirilmiş ve direncin, *cfiA* geni ile kodlanan metallo-enzimlerle gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada, ikisi de birer metallo-enzim olan; virülans ve karbapenem direncini kodlayan *bft* ve *cfiA* genlerinin, *B. fragilis* kökenlerinde birlikte bulunma durumları araştırılmıştır. Hastanemizde (47'si klinik örneklerden, 16'sı dışkıdan) izole edilmiş toplam 63 *B. fragilis* kökeni çalışmaya alınmış, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile *cfiA* ve *bft* genleri araştırılmıştır. Kökenlerin %41'inde *cfiA*, %33'ünde *bft* geni gösterilmiştir. Direnç geni ve *bft* geninin birlikte görülmesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0.65$ ). Fragilizin (*bft*) geni pozitif ve negatif kökenler arasında, *cfiA* gen dağılımının istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen, bu iki genin birlikte pozitif olduğu *B. fragilis* köken oranımız diğer ülke verilerine göre daha yüksek bulunmuştur. Hastanemizde karbapenemlerin yaygın kullanılıyor olması gelecekte, antibiyotiklere daha dirençli, virülansı daha yüksek kökenlerin baskın hale geleceğini düşündürmektedir. Bu olasılık, kökenlerimizin özelliklerini yakından izlememizi gerekli kılmaktadır.

**Anahtar sözcükler:** *Bacteroides fragilis*, PZR, *bft* geni, *cfiA* geni.

## HASTANEMİZ YOĞUN BAKIM ÜNİTELERİNDE VENTİLATÖR İLE İLİŞKİLİ PNÖMONİ ETKENİ OLAN MİKROORGANİZMALARIN SAPTANMASI

Meral Uslu<sup>1</sup>, Barış Öztürk<sup>1</sup>, Ferit Kuşcu<sup>1</sup>, Volkan Aslan<sup>2</sup>, Yunus Gürbüz<sup>1</sup>, Emine Ediz Tütüncü<sup>1</sup>, İrfan Şencan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>S.B. Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara.

<sup>2</sup>S.B. Muş Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Muş.

Bu çalışmada, yoğun bakım üniteleri (YBÜ)'nde, ventilatör ile ilişkili pnömoni (VİP) etkeni olan mikroorganizmaların belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, vücut ısısında değişiklik, lökositoz/lökopeni ve akciğer grafilerinde yeni infiltrasyon olan 64 hastanın, entübasyon veya trakeostomi kanüllerinden alınan endotrakeal aspirat örnekleri dahil edilmiştir. Gram boyamada, 100X büyütmede 25 lökosit ve 10'un altında epitel hücresi olan materyaller, kültür için %5 koyun kanlı agar ve EMB agara, 10 ml'lik özeyle ekilip, bir gece 37°C'lik etüvde inkübe edilmiştir. Üreme için 10<sup>5</sup> cfu/ml koloni varlığı anlamlı kabul edilmiştir. İzole edilen mikroorganizmaların tanımlanması, rutin mikrobiyolojik yöntemler ile API 20E, API 20 NE, API Staph, API Strep ve API 20CAUX (bioMérieux, Fransa) kullanılarak yapılmıştır. Çalışmamızda, VİP etkeni olarak 64 hastadan 79 mikroorganizma türü izole edilmiştir. Bakteriyele izolatların %64.5'i gram-negatif ve %33'ü gram-pozitif olarak saptanmış; 2 etken ise *Candida albicans* olarak tanımlanmıştır. Üreyen bakterilerin dağılımına bakıldığında; *Pseudomonas* spp. %24, *Acinetobacter* spp. %18, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* %14, metisiline duyarlı koagülaz negatif stafilokok (KNS) %7, metisiline duyarlı *S.aureus* %6, metisiline dirençli KNS %5, *E.coli* %4, *Klebsiella* spp. %4 ve diğerleri %18 oranında izole edilmişlerdir. Erken VİP etkeni olarak 22 hastadan toplam 23 (%27'si polimikrobiyal), geç VİP etkeni olarak ise 42 hastadan toplam 56 mikroorganizma (%28.6'sı polimikrobiyal) izole edilmiştir. Erken VİP etkenleri arasında ilk üç sırayı *S.aureus* (n=7), *Pseudomonas* spp. (n=6) ve KNS'lar (n=4) alırken, geç VİP etkeni olarak ilk üç sırayı *Acinetobacter* spp. (n=14), *Pseudomonas* spp. (n=13) ve *S.aureus* (n=9) paylaşmıştır. VİP etiolojisinde yer alan etkenler, hastanenin ve YBÜ'nin florasına ve hastaların özelliklerine göre değişiklik gösterir. Literatürde, etkenlerin %60-70'inin gram-negatif bakterilerden oluştuğu bildirilmektedir. Erken VİP'de genellikle toplum kökenli bakteriler, geç VİP'de ise hastane kökenli dirençli bakteriler etkindir. Çalışmamızda saptanan erken VİP etkenlerinin, toplum kökenli bakterilerden farklı olması, hastanemizin florası ve hastaların altta yatan hastalıkları ile ilişkili olabilir. Benzer olarak *C.albicans* suşları da, uzun süredir hastanede yatan ve altta yatan hastalığı olan iki hastamızdan izole edilmiştir. Sonuç olarak, YBÜ'nde düzenli surveyans yapılması, hastane florasının belirlenmesi, hastane enfeksiyonlarının azaltılması ve özellikle de ampirik tedavinin yönlendirilmesi açısından önemlidir.

**Anahtar sözcükler:** Ventilatör ile ilişkili pnömoni, hastane enfeksiyonu, endotrakeal aspirat.

## VAJİNAL AKINTI ÖRNEKLERİNİN DİREKT GRAM BOYAMA VE KÜLTÜR YÖNTEMLERİYLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Dilek Kaya<sup>1</sup>, Dolunay Gülmez<sup>2</sup>, Gülşen Haşçelik<sup>2</sup>, Mehmet Sinan Beksaç<sup>3</sup>, Şayeste Demirezen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>2</sup>Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>3</sup>Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Ankara.

Bu çalışmada, hastanemizin Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı polikliniklerine çeşitli jinekolojik yakınmalarla başvuran hastalardan alınan vajinal akıntı örneklerinin Gram boyama ve kültür yöntemleriyle değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya dahil edilen 200 hastanın yaş aralığı 19-78 yıl arasında değişmektedir. Bu hastalardan steril eküvyonla alınan vajinal akıntı örnekleri çukolata agar, kanlı agar, Columbia agar ve MacConkey agara ekildikten sonra eküvyonda kalan örnekler lama yayılarak her hastaya ait iki adet direkt yayma hazırlanmıştır. Bu direkt yaymalar Gram boyama yöntemine göre boyanıp ışık mikroskopik olarak epitel hücreleri, laktobasil, nötrofil-lökosit, maya ve “clue cell” varlığı açısından değerlendirilmiştir. Direkt yaymasında maya ve/veya “clue cell” tespit edilen hastalara ait aerobik kültürler ise *Gardnerella vaginalis* ve *Candida* spp. açısından ileri incelemeye alınmıştır. Sonuç olarak çalışmamızda, 188 vajinal örnekte normal vajinal flora üyesi mikroorganizma üremesi görülürken, 7 hastada *G.vaginalis*, 4 hastada *C.albicans* ve 1 hastada da *C.glabrata* varlığı saptanmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Gram boyama, aerobik kültür, vajinal akıntı örneği.

**IFAT İLE ANTİ-*BARTONELLA HENSELAE* ANTİKORLARININ SAPTANMASINDA HELA VE VERO HÜCRELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Çağrı Ergin<sup>1</sup>, Yüksel Akkaya<sup>1</sup>, Özgün Kiriş Satılmış<sup>1</sup>, Cansev Yılmaz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

<sup>2</sup>TC Sağlık Bakanlığı Devlet Hastanesi, Kars.

İndirekt immüno Floresans antikor tekniği (IFAT), *Bartonella henselae*'nin toplumda ve/veya risk gruplarında yapılan seroprevalans taramalarında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. İntrasellüler üreyebilen *B.henselae*, hücre kültürü serilerinde kokültüvasyon ile çoğaltılmakta ve IFAT'nde kullanılacak lamlara kaplanmaktadır. Kokültür için çoğunlukla Vero hücreleri kullanılmaktadır. Yapılan ön çalışmalarda, alfa-proteobakterilerin HeLa hücrelerinde de üreyebildiği gösterilmiştir. Sunulan çalışmada, HeLa ve Vero hücrelerinde *B.henselae* kokültüvasyonu yapılarak IFAT ile antikor saptama oranları değerlendirilmiştir. Çalışmaya tıbbi etik kurul tarafından antikor varlığının araştırılmasına onay verilen 284 serum örneği alınmıştır. *B.henselae* ATCC 49882 (Houston-1) kökeni standart teknikler ile Vero ve HeLa hücrelerinde kokültüvasyon ile çoğaltılmış ve teflon lamlara kaplanmıştır. Serum örneklerinde *B.henselae* antikor varlığı, IFAT ile 1/64 tarama sulandırımında araştırılmıştır. Kişisel faktörleri dışlamak amacıyla, örnekler aynı deneyimli araştırmacılar tarafından değerlendirilmiştir. Araştırmaya alınan serum örneklerinin 126'sı (%44.3) Vero hücreleri ile kokültüve edilmiş *B.henselae* antijeni ile, 113'ü (%39.7) HeLa hücreleri ile kokültüve edilmiş *B.henselae* antijeni ile pozitif reaksiyon vermiştir. Test edilen iki hücre grubu arasındaki rastlantısal olmayan uyum "Cohen kappa" değeri 0.68 (güçlü tutarlı) olarak bulunmuştur. Vero hücrelerinde eş zamanlı üremenin daha çok olduğu ve buna bağlı olarak değerlendirmenin daha kolay olduğu gözlenmiştir. Literatürde *B.henselae* seroprevalans verileri çoğunlukla Vero hücreleri ile elde edilerek yayınlanmaktadır. Bu nedenle taramalarda Vero hücrelerini kullanmak, veri karşılaştırmalarına daha uygundur. Sonuçlarımız, kokültüvasyon işleminde Vero hücreleri yerine HeLa hücrelerinin kullanılmasının da verilerin yorumlanmasında tartışmalara yol açmayacağını vurgulamaktadır. Benzer araştırmaların farklı hücre serileri ile tekrarlanması, tanı ve etyopatogeneze yönelik araştırmalar için önemlidir.

**Anahtar sözcükler:** *Bartonella henselae*, IFAT, Vero, HeLa.

## KLİNİK ÖRNEKLERDEN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* SAPTANMASINDA KULLANILAN FARKLI HOMOJENİZASYON-DEKONTAMİNASYON YÖNTEMLERİNİN KÜLTÜR VE KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI PCR İLE KARŞILAŞTIRILMASI

Nur Merve Kaya, Zeynep Sarıbaş, Alpaslan Alp

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

Tüberküloz, yüksek morbidite ve mortalite ile sonuçlanan ve tüm dünyayı tehdidi altına alan global bir sağlık sorunudur. Tüberkülozun kontrol altına alınmasında ilk basamağı, hızlı ve doğru tanı oluşturmaktadır. Tüberkülozun tanısı, klinik örneklerde *Mycobacterium tuberculosis* varlığının saptanması ile konmaktadır. *M. tuberculosis* izolasyonu için alınan örneklerin normal flora elemanlarını da içermesinden dolayı, bu örneklerle çeşitli dekontaminasyon-homojenizasyon işlemleri uygulanmaktadır. Bu yöntemlerin, hem mikobakterilerin yapılarına zarar verebildiği, hem de kontaminasyona neden olan diğer mikroorganizmaların tamamını ortadan kaldıramadığı, çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu çalışmada, Petroff, NALC-NaOH ve USP (Universal sample processing) dekontaminasyon-homojenizasyon yöntemlerinin, kültür ve kantitatif gerçek zamanlı (real-time) PCR (RT-PCR) yöntemleri kullanılarak karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla tüberküloz olmayan hastalardan alınan balgam örnekleri bir havuzda toplanarak 3'er ml tüplere dağıtılmış ve McFarland 2 bulanıklığında hazırlanan *M.tuberculosis* H37Ra suşunun seri dilüsyonları yapılarak balgam içeren tüplere eklenmiştir. Her örneğe ayrı ayrı bu üç dekontaminasyon-homojenizasyon yöntemi uygulanmıştır. Homojenizasyon-dekontaminasyon sonucu Middlebrook 7H10 agara ekim yapılmış ve aynı zamanda balgam örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapılarak kantitatif gerçek zamanlı PCR yöntemi uygulanmıştır. Kültür sonuçları karşılaştırıldığında, Petroff yöntemi ile ancak  $10^{-2}$  dilüsyonundaki basillerin, NALC-NaOH yöntemi ile ise  $10^{-3}$  dilüsyonundaki basillerin saptanabildiği görülmüştür. Buna karşın, USP yöntemiyle  $10^{-4}$  ve  $10^{-5}$  dilüsyonlarda dahi üremelerin olduğu tespit edilmiştir. En az kültür kontaminasyonunun USP yöntemi sonrasında olduğu gözlenmiştir.  $10^{-2}$  dilüsyondaki RT-PCR sonuçları değerlendirildiğinde, basil sayılarının Petroff yöntemiyle 3668 kopya/ml, NALC-NaOH yöntemiyle 7676 kopya/ml; USP yöntemiyle ise 12415 kopya/ml olduğu saptanmıştır. Petroff yöntemiyle, daha düşük konsantrasyonlarda PCR ile basil saptanamamıştır. NALC-NaOH ve USP yöntemleriyle basil saptanabilen en düşük dilüsyonun  $10^{-4}$  olduğu gözlenmiş ve bu dilüsyondaki basil sayıları sırasıyla 193 ve 144 kopya/ml olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, rutin mikobakteriyoloji laboratuvarlarında dekontaminasyon-homojenizasyon işlemi için USP yönteminin, yaygın olarak kullanılmakta olan NALC-NaOH yöntemine iyi bir alternatif olabileceği düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** *Mycobacterium tuberculosis*, homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemleri, kültür, gerçek zamanlı PCR.

**STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE VE HAEMOPHILUS INFLUENZAE'NİN ORTA KULAK EFÜZYONUNDA GERÇEK ZAMANLI PCR İLE TANIMLANMASI**

Özgen Köseoğlu Eser<sup>1</sup>, Kaan İpçi<sup>2</sup>, Şehnaz Alp<sup>1,3</sup>, Alpaslan Alp<sup>1</sup>, Gülşen Haşçelik<sup>1</sup>, Levent Sennaroğlu<sup>2</sup>, Deniz Gür<sup>4</sup>

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, <sup>1</sup>Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; <sup>2</sup>Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı; <sup>3</sup>İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Enfeksiyon Ünitesi; <sup>4</sup>İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

Bu çalışma, hastanede takip edilmekte olan efüzyonlu otitis media (EOM) tanısı almış hastalarda orta kulak sıvısı patojenlerinin sıklığını göstermeyi amaçlayan prospektif bir araştırma olarak planlanmıştır. Araştırma, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Etik Komitesi tarafından onaylanmıştır. Araştırmaya 1 Ocak- 30 Haziran 2006 yılları arasında EOM tanısı alan hastalar dahil edilmiş; ventilasyon tüp replasmanı sırasında elde edilen orta kulak sıvısı örnekleri “Bactec Peds Plus” (BD, Sparks, MD, USA) kültür şişelerine ekilmiştir. Tüm patojenler konvansiyonel kültür yöntemleri kullanılarak tanımlanmıştır. Tüm örneklerle eş zamanlı gerçek zamanlı (real-time) PCR (RT-PCR) yöntemi uygulanmıştır. RT-PCR yöntemi ile örneklerde *Haemophilus influenzae* type B “capsulation locus” geni (*HIB*) ve *Streptococcus pneumoniae* “pneumolysin (*ply*)” geni varlığı araştırılmıştır. Tüm klinik örneklerin DNA izolasyonu QIAamp (Qiagen, Hilden, Germany) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm örneklerde RT-PCR ve konvansiyonel kültür yöntemleri çift kör çalışılmıştır. Araştırmada, 59 EOM hastasından (yaş aralığı 1-12 yıl) 105 orta kulak sıvısı örneği (hastaların 49’undan her iki kulaktan da örnek) alınmıştır. Konvansiyonel kültür yöntemi ile hastaların sadece 8’inde (%13.5) orta kulak patojeni olan bu iki tür saptanmıştır. *H.influenzae* 5 (%8.5) ve *S.pneumoniae* 3 (%5.1) hastada belirlenmiştir. Buna karşın, orta kulak sıvısı örneklerinde bu patojenlerden en az birinin pozitiflik oranı RT-PCR ile %61.9 olarak bulunmuştur. Hastaların 20 (%44.5)’inde *H.influenzae*, 6 (%13.3)’sında ise *S.pneumoniae* pozitif olarak belirlenmiş; 19 (%42.2) hastada her iki patojen birlikte pozitif saptanmıştır. Hastaların yalnız biri kültür ile *S.pneumoniae* pozitif olmasına rağmen RT-PCR yöntemi ile negatif olarak belirlenmiştir. RT-PCR, orta kulak sıvısı örneklerinde *S.pneumoniae* ve *H.influenzae* belirlenmesi için konvansiyonel kültür yöntemine göre daha duyarlı bir yöntemdir. Bu çalışmada, EOM tanısı olan hastalarda orta kulak sıvısı örneklerinde gerçek zamanlı PCR yöntemi ile mikrobiyolojik tanının konulması, hızlı tanı nedeniyle anlamlı bulunmuştur.

**Anahtar sözcükler:** *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, otitis media, gerçek zamanlı PCR.

P02-01

## YAYMA POZİTİF BALGAM ÖRNEKLERİNDE RİFAMPİSİN VE İZONİAZİDE DİRENÇLİ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*'İN HIZLI TANISI İÇİN GENOTYPE® MTBDR TESTİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hamit Öz Saraç<sup>1</sup>, Figen Tursunoğlu<sup>1</sup>, Gülnur Tarhan<sup>1</sup>, Melike Atasever<sup>2</sup>, Hülya Şimşek<sup>1</sup>, Begüm Kayar<sup>3</sup>, Ahmet Tombak<sup>1</sup>, Uğur Güner<sup>1</sup>, Berat Başer<sup>1</sup>, İsmail Ceyhan<sup>1</sup>, Fatih Köksal<sup>3</sup>, Mustafa Ertek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı, Ankara.*

<sup>2</sup>*Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi, Ankara.*

<sup>3</sup>*Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana.*

Tüberküloz tüm dünyada ölüme neden olan enfeksiyon hastalıklarının başında gelmektedir. Hastalığın kontrol altına alınmasında dirençli olguların hızlı bir şekilde tanımlanması, bu izolatların yayılımı, direnç gelişiminin önlenmesi ve uygun tedavi stratejisinin belirlenmesinde büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda klinik örneklerden ilaç direncini saptamaya yönelik moleküler yöntemler rutin kullanıma girmiştir. Çalışmamızda, laboratuvarımızın 2009 yılında başlattığı antitüberküloz ilaç direnci sürveyans programı kapsamında çoklu ilaca direnç (ÇİD) şüphesi taşıyan 126 yayma pozitif balgam örneği; GenoType® MTBDR testi ile konvensiyonel kültür, tür tayini ve ilaç duyarlılık testleri ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. İncelemeye alınan balgam örneklerinde rifampisin direnci %89, izoniazid direnci %87 oranında uyumlu olarak saptanmıştır. Çalışmada, GenoType MTBDR testinin ÇİD şüpheli olguların hızlı tanısında kullanılabilir yararlı bir yöntem olduğu, aynı zamanda *Mycobacterium tuberculosis* ve atipik mikobakteri ayrımının yapılmasında önemli bir avantaj sağladığı sonucuna varılmıştır. Testin en önemli dezavantajı ise maliyetinin yüksek olmasıdır.

**Anahtar sözcükler:** *Mycobacterium tuberculosis*, çok ilaca direnç, PCR.

## ÇOK İLACA DİRENÇLİ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* İZOLATLARINDA RİFAMPİSİN VE İZONİAZİD DİRENCİNİN MOLEKÜLER TANISI

Gülnur Tarhan, Hamit Özsera, Figen Tursunoğlu, Hülya Şimşek, Ahmet Tombak, Uğur Güner, Erol Coşkun, Berat Başer, İsmail Ceyhan, Mustafa Ertek  
*Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı, Ankara.*

Çok ilaca dirençli (ÇİD) *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının ortaya çıkması ulusal tüberküloz kontrol programlarının en önemli sorunlarından biridir. ÇİD olgularının tanımlanmasında konvensiyonel yöntemler ile tür tayini ve ilaç duyarlılık testleri uzun zaman almaktadır. GenoType MTBDR (Hain Lifescience, Nehren, Germany) testi klinik örnekler ve izolatlardan *rpoB* ve *katG* gen mutasyonlarını tanımlayan revers hibridizasyon temeline dayalı bir line prob testidir. Çalışmamızda GenoType® MTBDR testinin ÇİD izolatlardaki rifampisin ve izoniazid direncini tanımlama yeteneği, ülkemizin değişik coğrafi bölgelerinden izole edilen 117 ÇİD *M.tuberculosis* izolatı kullanılarak araştırılmıştır. Test sonuçları, konvensiyonel proporsiyon yöntemi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak GenoType® MTBDRplus testi; izoniazid için %94.87 (111/117), rifampisin için %97.43 (114/117) olarak bulunmuştur. Bu verilere göre, MTBDR testinin ÇİD *M.tuberculosis* izolatlarında yaygın mutasyonların belirlenmesi ve direncin tanımlanması amacıyla kullanılacak standardize ve hızlı bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** *Mycobacterium tuberculosis*, çok ilaca direnç, GenoType MTBDR.



P02-03

## ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* KOMPLEKS SUŞLARININ *gyrB* PCR-RFLP İLE TÜR AYRIMLARININ YAPILMASI

Banu Bayraktar, Ayşe Bayrı Barış, Buket Toksoy, Emin Bulut

*Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul.*

*Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBC) içinde insan ve hayvanlarda tüberküloz etkeni olan bir-biriyle genetik olarak çok yakın türler yer almaktadır. Bu türlerin 16S rRNA genleri ve internal “transcribed spacer” (ITS) dizileri tümüyle benzer olup insersiyon dizilerinin sayısı da aynıdır. MTBC içinde yer alan türlerin konakları ve patojeniteleri birbirinden farklılık gösterebilmekte, ayrımlarının yapılması gerek epidemiyolojik gerekse klinik tanı açısından yararlı olabilmektedir. Bu çalışmada, laboratuvarımızda izole edilen MTBC suşlarının tür ayrımlarının yapılması amaçlanmıştır. Çeşitli klinik örneklerden Mİ-GIT ve LJ besiyerleri kullanılarak üretilen ardışık 62 suş, konvansiyonel yöntemler ve hsp65 PCR-RFLP yöntemleri ile MBTC olarak tanımlanmıştır. Bu suşların *gyrB* genleri MTUB primerleri ile çoğaltılmış ve 1020 bç’lik ürün elde edilmiştir. Daha sonra bu ürün Rsa1 ve Taq enzimleri ile kesilerek *M. tuberculosis*/africanum alt tip II, *M. africanum* alt tip I, *M. bovis*, *M. microti* ayrımları yapılmıştır. Suşların çoğu (n=57, %92) *M. tuberculosis*/africanum alt tip II grubunda yer almaktadır. Toplam 5 adet *M. bovis* suşu tespit edilmiştir. *M. bovis* suşları, yaşları 12-27 yıl arasında değişen hastalardan izole edilmiştir. Bu suşlar, iki biyopsi, bir periton sıvısı, bir idrar, bir açlık mide sıvısından üretilmiştir. *M. africanum* alt tip I ve *M. microti* suşuna rastlanmamıştır. Bulgularımız, ülkemizde, *M. africanum* alt tip II’nin yaygın olarak bulunmadığı kabul edildiğinde, tüberküloz enfeksiyonlarının çoğunluğundan *M. tuberculosis*’in sorumlu tutulabileceğini göstermektedir. *M. bovis*’in etken olduğu olguların ikisi son dönem böbrek yetmezliği olan bağışıklığı baskılanmış hastalardır. *M. bovis* enfeksiyonları, aşıya bağlı olabileceği gibi direkt olarak da kazanılabilmektedir. Bovis BCG aşı suşu mesane kanserlerinin immünoterapisinde kullanılmakla birlikte, idrarında *M. bovis* ürettiğimiz hastanın böyle bir tedavi öyküsü bulunmamaktadır.

**Anahtar sözcükler:** *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, *gyrB* PCR, MTUB.

## P02-04

**AKCİĞER VE AKCİĞER DIŞI ORGAN TÜBERKÜLOZU TANISINDA BD Probe Tec ET YÖNTEMİNİN GÜVENİLİRLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Nuri Özkütük, Olçay Özçolpan, Talat Ecemiş, Süheyla Sürücüoğlu  
*Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa.*

Nükleik asit amplifikasyon testleri, kısa sürede sonuç vermeleri nedeniyle tüberkülozun hızlı tanısında giderek daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada SDA (strand displacement amplification ) temeline dayanan BD Probe Tec ET (Becton Dickinson, Sparks, Md, USA) yönteminin akciğer ve akciğer dışı klinik örneklerde *Mycobacterium tuberculosis* saptanmasındaki güvenilirliği araştırılmıştır. Çalışmaya, Ocak 2009 – Aralık 2009 tarihleri arasında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tüberküloz Laboratuvarı'na gönderilen, 207'si solunum, 114'ü solunum yolu dışı olmak üzere toplam 321 klinik örnek alınmıştır. BD Probe Tec ET test sonuçları altın standart yöntem olan kültür sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. İncelenen tüm örnekler için BD Probe Tec ET testinin duyarlılığı %88.9, özgülüğü %95.7, pozitif prediktif değeri (PPD) %55.2 ve negatif prediktif değeri (NPD) %99.3 olarak bulunmuştur. Solunum yolu örnekleri için bu değerler sırasıyla %83.3, %97.4, %66.7 ve %98.9 olarak hesaplanmıştır. Solunum yolu dışı örnekler içinse, kültür pozitif olanlar kısıtlı sayıda (n=6) olmakla birlikte, bu tür örnekler için testin duyarlılığı %100, özgülüğü %92.6, PPD %42.8 ve NPD %100 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, BD Probe Tec ET testinin akciğer ve akciğer dışı organ tüberkülozunun hızlı tanısında kültür ile birlikte değerlendirildiğinde tanıyı destekleyebilecek bir yöntem olduğu kanısına varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** BD Probe Tec ET, strand displacement amplification, tanı, tüberküloz.

## TÜBERKÜLOZ KUŞKULU HASTA ÖRNEKLERİNDEN XPERT MTB, ARB, LÖWENSTEIN-JENSEN VE BACTEC İLE ALINAN SONUÇLARIN KARŞILAŞTIRILMASI

İhsan Hakkı Çiftçi<sup>1</sup>, Mehtap Hülya Aslan<sup>2</sup>, Gülşah Aşık<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar.

<sup>2</sup>Nihat Kıtıaçı Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Hastanesi, Erzurum.

Xpert MTB sistemi ile uzmanlaşmış personele gerek duymaksızın *Mycobacterium tuberculosis*'in moleküler tanısının iki saatten kısa sürede gerçekleşebileceği ifade edilmektedir. Xpert MTB/RIF çalışmalarında, *rpoB* gen bölgesinin 81 bç'lik (RRDR) bölümü hedef alınmakta ve 5 farklı prob ile bir kontrol olmak üzere toplam 6 farklı proba multipleks olarak gerçekleştirilmektedir. Çalışmamızda, tüberküloz kuşkusu ile alınan örneklerle gerçekleştirilen XpertMTB, ARB, Bactec ve Löwenstein-Jensen (LJ) çalışmaları sonucunda elde edilen verilerin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, tüberküloz kuşkusu ile olan 36'sı erkek toplam 52 hasta dahil edilmiştir. Xpert MTB çalışmaları GeneXpert (USA) sistemi aracılığı ile üretici önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Örnekler, standart homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemlerini takiben yayma yapılarak Ziehl-Neelsen yöntemi ile boyanmış, Löwenstein Jensen besiyeri ve Bactec 460 otomatize sisteminde kültürleri yapılmıştır. Çalışmada; 34 balgam, 14 bronkoalveolar lavaj, 2 idrar, 2 torasentez sıvısı olmak üzere toplam 52 örnek incelenmiştir. Örneklerin 16'sında (%31) Xpert MTB, 16'sında (%31) Bactec, 13'ünde (%25) LJ ve 4'ünde (%8) ARB ile pozitiflik bulunmuştur. Bactec sonuçları referans olarak alındığında; Bactec ile Xpert MTB ve LJ sonuçları arasında yüksek düzeyde korelasyon saptanmıştır ( $r=0.910$ ,  $r=0.866$ ). Ek olarak Xpert MTB'nin özgüllüğü %93, duyarlılığı %97, pozitif prediktif değeri %97, negatif prediktif değeri %96 ve doğruluk oranı da %96 olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda Xpert MTB'nin 2 saat gibi bir sürede sonuç veren moleküler yöntem olması önemli bir avantaj olarak görülmüştür. ARB negatif örneklerde *M. tuberculosis* tanısında kullanılan mevcut yöntemlerle benzer performans gösteren Xpert MTB'nin hızlı tanı amaçlı kullanılabileceği kanaati uyanmıştır. Ancak yöntemin pahalı olduğunun vurgulanması ve çalışmalar planlanırken maliyet-etkinlik analizlerinin ayrıntılı yapılmasının gerekliliği gözlenmiştir.

**Anahtar sözcükler:** *Mycobacterium tuberculosis*, tüberküloz, tanı, Xpert MTB/RIF.

## P02-06

## MOLEKÜLER MİKROBİYOLOJİDE ISO 15189 GEREKLİLİKLERİ NEDENİYLE TBC PCR VERİFİKASYON SONUÇLARI

Burcu Öksüz, İskender Karaltı, Yasemin Öztürk, Zuhale Tazegün Tekkanat, Yeşim Gürol, Gülden Yılmaz

Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul.

Nükleik asit amplifikasyon (NAA) testleri, *Mycobacterium tuberculosis*'i kültüre kıyasla çok hızlı tayin etmede, kültürle birlikte rutin tanı testi olarak kullanılmaktadır. Ancak ISO 15189 gereği NAA testi, CE/IVD belgeli bir kitle uygulanacak olsa da, NAA testinin verifikasyonunun mutlaka yapılması gerekir. Verifikasyon için doğruluk (accuracy), kesinlik (precision) ve kantitatif testler için doğrusallık (linearity) çalışmaları yapılır. Bu verifikasyon çalışması, CE/IVD belgeli Way2Gene (TibMolbiol) *Mycobacterium* spp. kitinin, moleküler mikrobiyoloji laboratuvarında klinik amaçlı test kiti olarak kullanılmasından önce, güvenilirliğinin belirlenmesi amacıyla yapılmış ve kantitatif nükleik asit testlerinin verifikasyonuna bir örnek olması açısından sunulması uygun bulunmuştur. Çalışmada beş pozitif, beş düşük pozitif ve üç negatif örnek kullanılmıştır. Pozitif ve negatif örnekler dış kalite kontrollerden seçilmiştir. Düşük pozitifler, pozitif örneklerin 1/100 dilüsyonu ile elde edilmiştir. Doğruluk için; üç pozitif, üç düşük pozitif ve üç negatif örnek çalışılmıştır. Çalışma içi (intraassay) doğruluk için, bir pozitif ve bir düşük pozitif örnek aynı çalışmada üçer kez çalışılmıştır. Çalışmalar arası (interassay) doğruluk için, bir pozitif ve bir düşük pozitif örnek üç farklı çalışma ile tekrar edilmiştir. Bu verifikasyon çalışması sonucunda, elde edilen sonuçların tutarlı olduğu görülmüş (Tablo) ve adı geçen kit kullanarak hasta örneklerinde rutin tetkikler başlatılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** ISO 15189, *Mycobacterium* spp., nükleik asit amplifikasyonu, verifikasyon.

**Tablo: *Mycobacterium* spp. PCR Verifikasyon Sonuçları**

Doğruluk	Ornek Sayısı	Bilinen Değeri	Elde Edilen Sonuçlar
Pozitif	1	POZİTİF	POZİTİF
	2	POZİTİF	POZİTİF
	3	POZİTİF	POZİTİF
Düşük Pozitif	1	POZİTİF	POZİTİF
	2	POZİTİF	POZİTİF
	3	POZİTİF	POZİTİF
Negatif	1	NEGATİF	NEGATİF
	2	NEGATİF	NEGATİF
	3	NEGATİF	NEGATİF

Intraassay Doğruluk	Ornek Sayısı	Bilinen Değeri	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
Pozitif	1	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF
Düşük Pozitif	1	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF

Interassay Doğruluk	Ornek Sayısı	Bilinen Değeri	1. Gün	2. Gün	3. Gün
Pozitif	1	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF
Düşük Pozitif	1	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF

P02-07

**ASİDE DİRENÇLİ BASİLLERİN ARAŞTIRILMASINDA ERLICH-ZIEHL-NEELSEN VE FLOROKROM BOYAMA YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Mehmet Emin Demircili, Mehmet Özdemir, Mahmut Baykan, Bülent Baysal  
*Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya.*

Kültür yöntemlerinin zaman alıcı olması nedeniyle, tüberkülozun erken tanısında yeni ve hızlı tanı yöntemleri geliştirilmiştir. Bu çalışmada, Erlich-Ziehl-Neelsen (EZN) ve florokrom (Auramine-Rhodamine) boyama yöntemlerinin tanı değerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Ocak-Mart 2010 tarihleri arasında tüberküloz ön tanısı ile laboratuvarımıza gönderilen 171 hasta örneği alınmış ve homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemlerinden sonra EZN ve florokrom yöntemleri ile boyanmıştır. Örneklerin kültürü için BD BACTEC™ MGIT 960 (Becton Dickinson, USA) sistemi kullanılmıştır. Çalışılan 171 örneğin 143'ü (%83.6) balgam, 10'u (%5.8) bronkoalveolar lavaj, 9'u (%5.2) mide açlık sıvısı, 3'ü (1.7) idrar, 1'i (%0.5) beyin omurilik sıvısı, 1'i (%0.5) periton sıvısı ve 1'i (%0.5) plevra sıvısıdır. Örneklerin 18'i (%10.5) EZN yöntemi ile, 22'si (%12.8) florokrom yöntemi ile pozitif bulunmuştur. Florokrom yöntemi ile pozitif bulunan örneklerden biri dışında diğerleri, otomatize sistem ile elde edilen kültür sonuçlarıyla uyumludur. EZN yöntemiyle pozitif bulunan 18 örneğin kültür sonuçları da pozitif bulunmuş, EZN ile negatif sonuç veren 3 örnekte (florokrom yöntemi ile pozitif) otomatize sistem ile üreme tespit edilmiştir. Her iki boyama yöntemi ile de negatif sonuç veren bir örneğin ise kültürü pozitif olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, floresan mikroskopu mevcut olan laboratuvarlarda tüberküloz tanısında asidorezistan basillerin florokrom yöntemi ile araştırılmasının faydalı olacağı kanaatine varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** *M.tuberculosis*, Erlich-Ziehl-Neelsen, florokrom boyama yöntemi, auramin-rhodamin.

P02-08

## MIDDLEBROOK 7H10 AGAR BESİYERİ KULLANILARAK *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* TANISI

Elif Cihadiye Öztürk<sup>1</sup>, Seda Karaman<sup>1</sup>, Handan Ankaralı<sup>2</sup>, Asiye Altınöz<sup>1</sup>

*Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, <sup>1</sup>Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Biyoistatistik Anabilim Dalı, Düzce.*

Bu çalışmada, hastanemiz tüberküloz laboratuvarında Nisan-Haziran 2009 tarihleri arasında, Bactec 12B besiyeri altın standart alınarak, *Mycobacterium tuberculosis*'in izolasyonunda Middlebrook 7H10 agar besiyeri ile Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerinin karşılaştırmalı olarak araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, tüberküloz şüpheli hastalara ait 179 örnek alınmış ve tüm örneklerin her üç besiyerinde kültürleri yapılmıştır. Middlebrook 7H10 agarda görülen mikrokoloniler 10X büyütmede incelenerek yılan-benzeri kordon oluşumu araştırılmıştır. Örneklerin 22 (%12.2)'sinde Bactec 12B besiyerinde, 15 (%8.3)'inde LJ besiyerinde ve 13 (%7.2)'ünde Middlebrook 7H10 agar besiyerinde *M.tuberculosis* üremesi saptanmıştır. Çalışmamızda, Middlebrook 7H10 ve LJ besiyerleri arasında duyarlılık ve özgüllük açısından benzer sonuçlar saptanırken, Middlebrook 7H10 agarın, LJ besiyerine göre daha hızlı sonuç verdiği görülmüştür. Ek olarak Middlebrook 7H10 agarda mikrokoloni değerlendirilmesinin *M.tuberculosis* tanısında güvenilir bir yöntem olduğu belirlenmiş ve kullanımının yaygınlaşması gerektiği düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** *M.tuberculosis*, tanı, Middlebrook 7H10 agar, Löwenstein-Jensen besiyeri.

## **ASPERGILLUS CİNSİ MANTARLARIN KLİNİK ÖRNEKLERDE GÖSTERİLMESİNE YÖNELİK GELİŞTİRİLEN GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU YÖNTEMİNİN KALİTE KONTROLÜ**

Merve Aydın, Sevgi Özyeğen Aslan, Israa Jabban, Ayşe Seyer, Ali Fouad, Burçe Yalçın, Feyza Demir, Gülşah Biter, Ayşe Kalkancı, Semra Kuştimur  
*Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.*

*Aspergillus* cinsi ile oluşan enfeksiyonların tanısında sorunlar yaşanmaktadır. Bu çalışmada, *Aspergillus* cinsi mantarların DNA'sının gösterilmesi için geliştirilen gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunun kalite kontrol basamakları sunulmaktadır. *Aspergillus* DNA'sının gösterilmesi için ilk basamakta rDNA gen bölgesinden seçilen beşer adet primer ve prob dizisi belirlenmiştir. Seçilen hedeflerin tanısallık değerini araştırmak için her birinde 10 örnek olmak üzere; koloni süspansiyonlarında, *Aspergillus* kolonisi ile kontamine edilen kan örneklerinde, aspergilloz oluşturulan deney hayvanı kan ve dokularında ve aspergilloz şüphesi ile takip edilen galaktomannan antijeni pozitif hasta örneklerinde olmak üzere toplam 50 örnek, her primer ve prob kombinasyonu ile test edilmiştir. Örneklerde DNA varlığı spektrofotometrik olarak doğrulandıktan sonra amplifikasyon işlemine başlanmıştır. Amplifikasyon LightCycler 2.0 (Roche, ABD) cihazında TaqMan protokolüne uyularak gerçekleştirilmiştir. *Aspergillus* DNA'sının klinik örneklerde gösterilmesi için en özgül ve duyarlı primer-prob kombinasyonunun, rDNA gen bölgesi 28S alt ünitesinden seçilen CTG TCC GAG CGT CAT TG, TCC TCC GCT TAT TGA TAT primerleri ve FAM ve TAMRA ile işaretli olan AGC CAG CAC CCA ACT TTA TTT TaqMan prob olduğu görülmüştür. Bu kombinasyon ile yapılan deneylerde en düşük yanlış pozitiflik oranları elde edilmiştir. Bütün örneklerin %20'sinde (10 örnek) *Aspergillus* DNA'sı kaybedilmiştir. En çok yalancı negatiflik, deneysel olarak aspergilloz oluşturulmuş hayvanların doku örneklerinde elde edilmiştir. Hayvan doku örneklerinin 4 tanesinde, kan örneklerinin 3 tanesinde, simüle kan örneklerinin 2 tanesinde, hasta örneklerinin bir tanesinde yalancı negatif sonuç alınmıştır. Koloni süspansiyonlarının tamamı pozitif bulunmuştur. Geliştirdiğimiz yöntemin başta hasta kan örnekleri olmak üzere bütün klinik örneklerde kullanılabilir, hızlı ve ucuz bir moleküler tanı yöntemi olduğu düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** *Aspergillus*, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, kalite kontrolü.

## CANDIDA DNA'SININ KLİNİK ÖRNEKLERDE GÖSTERİLMESİ İÇİN GELİŞTİRİLEN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU RUTİN UYGULANDIĞINDA LABORATUVAR İÇİN GELİR GETİRİR Mİ ?

Ayşe Seyer, Sevgi Özyeğen Aslan, Burçe Yalçın, Merve Aydın, Israa Jabban, Ali Fouad, Gülşah Biter, Feyza Demir, Ayşe Kalkancı, Semra Kuştimur  
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Bu çalışmanın amaçları, *Candida* DNA'sının gösterilmesi için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu geliştirilmesi ve bu yöntemin Sağlık Uygulama Tebliği (SUT) kapsamında 908.120 kod ve 84.80 TL olarak listelenmiş olan "*Candida* PCR" testi esas alınarak maliyet analizinin yapılmasıdır. *Candida* DNA'sının gösterilmesi için 100 klinik örnek, koloni süspansiyonları, kandidozlu deneklerin kan ve dokuları ve *Candida* süspansiyonu karıştırılan kan örnekleri kullanılmıştır. Elde edilen DNA'nın çoğaltılması için rDNA bölgesinden seçilen TCCTCCGCTTATTGATAT ve CCTGTTTGAGCGTCRTTT primerleri ile FAM-TAMRA ile işaretlenmiş CATTGCTTGCGGCGGTA TaqMan probu kullanılmıştır. Amplifikasyon LightCycler 2.0 (Roche, ABD) cihazında gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol örneklerinden 2 adet doku örneğinde (%5) yalnızca negatiflik elde edilmiştir. Klinik örneklerin 17 tanesinde (%17) pozitif sonuç alınmıştır. Çalışmanın ikinci bölümünde, testin maliyet analizinin yapılması için üç ayrı firmadan fiyat teklifi alınmıştır. Fiyat teklifi veren firma isimleri saklı tutularak, önerilen test protokolleri modifiye edilmiştir. Amplifikasyon karışımı için önerilen 25 mikrolitre yerine, 12.5 mikrolitre ve 10 mikrolitre kullanıldığında sonuçların değişmediği görülmüştür. SUT fiyatı gelir olarak, 25, 12.5 ve 10 mikrolitrelik amplifikasyon karışımlarının maliyeti gider olarak hesaplanmıştır. Giderler SUT fiyatından çıkarılarak net kar hesaplanmıştır. Amplifikasyon karışımı 25 mikrolitre olarak kullanıldığında, 14.80 TL ile 24.80 TL, 12.5 mikrolitre kullanıldığında 29.60 TL ile 49.60 TL, 10 mikrolitre olarak kullanıldığında ise 35.52 TL ile 59.52 TL arasında değişen test başı net kar elde edilmiştir. Sonuç olarak, SUT'daki adı ile "*Candida* PCR" testinin rutin olarak uygulanmasının hastalar için çok değerli sonuçlar verdiği, üstelik test içeriğinde kalite kontrolü göz ardı edilmeksizin yapılan düzenlemelerin, bu testin uygulandığı laboratuvarlara dört kata kadar kar kazandırabileceği gösterilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** *Candida*, PCR, maliyet analizi, Sağlık Uygulama Tebliği.



P02-11

## KANDİDOZLU SIÇAN BÖBREK DOKULARINDA IL-17 GEN İFADELENMESİNİN GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE GÖSTERİLMESİ

Seda Usta, Işıl Fidan, Ayşe Kalkancı, Emine Yeşilyurt

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

Bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların sistemik mantar enfeksiyonlarına duyarlılıkları artmaktadır. Bu hastalardaki enfeksiyonlar; şiddetli, hızlı ilerleyen, tanısı ve tedavisi zor olan enfeksiyonlardır. Normal flora elemanı olarak bulunan *Candida* türleri insanda fırsatçı enfeksiyonların en önemli nedenlerindedir. *Candida* cinsi mayalara verilen bağışık yanıtın humoral (sıvısal) ve hücrel olması, derecesi ve bunlardan birine ait öncelik sırası, enfeksiyonun türüne göre değişir. CD4+ yardımcı T hücreleri değişik sitokinleri üreterek farklı fonksiyonlara neden olan efektör hücre alt gruplarına farklılaşabilirler. 2006 yılında, farklılaşmamış CD4+ T hücrelerinin ortamda interlökin (IL)-1, IL-17, IL-6, IL-21 ve IL-23 varlığında Th17 hücrelerine dönüştükleri gösterilmiştir. Th17 hücrelerinin hangi enfeksiyonlara karşı görev aldıkları araştırılmaktadır. Bu çalışmada, invazif kandidoz oluşturulmuş sıçan modelinde IL-17 ifadesinin araştırılması hedeflenmiştir. Enfeksiyon modeli, sıçanlara verilen *C.albicans* ATCC 10231 referans kökeni ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca kontrol grubu oluşturularak enfekte grup ile karşılaştırma yapılmıştır. Gen ifadenmesinin gösterilmesi için CTCAGACTACCTCAACCGTTC ve GTGCCTCCCAGATCACAGAAG primerleri ile SYBR Green kullanılarak gerçek zamanlı PCR yöntemi uygulanmıştır. Erime eğrisi analizleri yapılarak değerlendirme yapılmıştır. Hayvanlardan alınan böbrek dokularından yapılan kültürde *Candida* kolonileri izole edilmiştir. Mantara özgül primerler kullanılarak enfeksiyon varlığı doğrulanmıştır. Kandidemi grubunda PCR çalışması sonucunda IL-17 ifadenmesi, 12 örneğin 10'unda (%83.3) pozitif bulunmuştur. Kontrol grubundaki örneklerin hiçbirinde pozitiflik saptanmamıştır. Buna göre, kandidoz sırasında immün hücrelerle ilişkide IL-17'nin önemli rol oynadığı düşünülmüştür. Etken olan sitokin profillerinin tam olarak belirlenmesinin, *Candida* enfeksiyonlarından korunmada ve tedavide yeni seçeneklerin geliştirilmesine olanak sağlayacağı düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** *Candida*, sitokin, IL-17, gen ifadenmesi.

## **TRICHOPYHTON MENTAGROPHYTES VE TRICHOPHYTON RUBRUM KOMPLEKS YAPILARININ FOURIER DÖNÜŞÜMLÜ KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİ (FT-IR) ANALİZİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Çağrı Ergin<sup>1</sup>, Macit İlkit<sup>2</sup>, Yaşar Gök<sup>3</sup>, Mustafa Zafer Özel<sup>4</sup>, Ahmet Hilmi Çon<sup>5</sup>, Nilgün Kabay<sup>3</sup>, Sevil Zencir<sup>3</sup>, Aylin Ateş<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

<sup>2</sup>Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Mikoloji Bilim Dalı, Adana.

<sup>3</sup>Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Denizli.

<sup>4</sup>York Üniversitesi, Kimya Bölümü, YO10 5DD, York, İngiltere.

<sup>5</sup>Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Denizli.

*Trichophyton mentagrophytes* ve *Trichophyton rubrum* kompleks'in ayrımı genellikle zaman alıcı ve karmaşıktır. Moleküler temelli yöntemler ise pahalıdır ve deneyim gerektirir. Bu çalışmada, iki farklı dermatofit türünün Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi analizi sonuçlarına göre ayırım gösteren bölgelerinin varlığı araştırılmıştır. Çalışmada, 6 *T.mentagrophytes* (*T.asteroides* CBS 424.63, *T.erinacei* CBS 344.79, CBS 511.73, CBS 677.86; *T.mentagrophytes* CBS 110.65 ve *T.quinckeanum* CBS 572.75) ve 11 *T.rubrum* kökeni (*T.fischeri* CBS 1000081, *T.kanei* CBS 289.86, *T.kuryangei* CBS 518.63, CBS 422.67; *T.raubitschekii* CBS 202.88, CBS 102856, CBS 125604, CBS 125605; *T.rubrum* CBS 392.58, CBS 302.60 ve *T.rubrum var.nigricans* CBS 100237) incelenmiştir. *Trichophyton* kökenleri Kimming agarda 3 hafta süre ile inkübe edilerek üretilmiş ve liyofilize edilmiştir. FT-IR spektroskopisi analizi Perkin-Elmer cihazında yapılmıştır. Çalışmada, 1700-960 cm<sup>-1</sup> spektral sınırlar alınmış ve bu sınırlar içinde gruplaşan bölgeler karşılıklı olarak değerlendirilmiştir. Veriler Ward sınıflama metodu ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak, FT-IR ile dermatofitlerin türler arası ve/veya tür içinde ayırımında kullanılabilir spektral bölge(ler) bulunamamıştır. Bulgularımız, *T.mentagrophytes* ve *T.rubrum* kompleksin ayırımında FT-IR spektroskopinin tek başına yeterli olamayacağına işaret etmektedir. FT-IR spektroskopisi temelinde geliştirilen benzer yöntemlerin de *Trichophyton* spp. ayırımında yararları test edilmelidir. Test öncesinde, mantar hücre duvarının organizasyonunda standardizasyonun sağlanabilmesi durumunda daha kesin verilere ulaşılabileceği düşünülmüştür. Daha çok köken ile verilerin yeniden incelenmesi yararlı olabilecektir.

**Anahtar sözcükler:** *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, FT-IR, spektroskopisi.

## ***PNEUMOCYTIS JIROVECIİ* PNÖMONİSİ TANISINDA GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU KULLANILMASI**

Gülşah Biter, Ayşe Seyer, Israa Jabban, Merve Aydın, Sevgi Özyeğen Aslan, Ali Fouad, Feyza Demir, Burçe Yalçın, Ayşe Kalkancı, Semra Kuştimur  
*Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.*

*Pneumocystis jirovecii*, tanısında direk örneklerin gomori-metanamin gümüşleme ile boyanması veya direk floresan antijen yöntemi ile incelenmesi önerilen pnömoni etkeni fırsatçı bir mantardır. Hastaların bir çoğunda ampirik tedavi uygulanması, örneklerin tedavi başladıktan sonra alınması gibi nedenler ile örneklerde yeterli sayıda kist görülemediği için, tanıda zorluklar yaşanmaktadır. *Pneumocystis* pnömonisi, tanıdaki güçlükler nedeniyle moleküler tanı yöntemlerinin çok yararlı olacağı bir enfeksiyon hastalığıdır. Bu çalışmada, solunum yolu örneklerinde *P.jirovecii* DNA'sının saptanması amacıyla geliştirilen gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) protokolü sunulmaktadır. Haziran 2009-Ocak 2010 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen bronko-alveolar lavaj, balgam, trakeal aspirat ve ağız çalkantı suyundan oluşan 236 klinik örnek çalışmaya dahil edilmiştir. Örneklerden DNA eldesi için Heliosis Ekstraksiyon Modülü (Metis Biyoteknoloji, Ankara) kullanılmıştır. 5.8S ribozomal gen bölgesinden seçilen primerler (5-GGC TGA TCA TCA AAG AAG CAT GGA TA-3) (5-CGG CAT AGA CAT ATT CGA TAC TTG TT-3) ve prob (FAM-TGC GTG AAA CAG ATA CAT GGA GCT CTA CCC-TAMRA) kullanılmıştır. Amplifikasyon solüsyonu için primer ve prob karışımı, FastStart DNA Master Plus HybProbe kiti kullanılarak, gerçek zamanlı PCR yöntemi (LightCycler 2.0, Roche, ABD) uygulanmıştır. Amplifikasyon TaqMan yöntemi ile gerçekleştirilmiş, veriler 530 kanalıdan kantitasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Pnömoni ön tanısı ile izlenen 225 hastanın toplam 236 örneğinden %16.1'inde (38 örnek) *P.jirovecii* DNA'sı pozitif bulunmuştur. *P.jirovecii* tanısında kullanılmakta olan PCR temelli bir ticari sistem bulunmamaktadır. Geliştirilmiş olan her yöntem bu açıdan değer taşımaktadır. Geniş hasta gruplarında, diğer tanı yöntemleri ile karşılaştırılmalı sonuçların elde edilmesi, testin kullanımını yaygınlaştıracaktır.

**Anahtar sözcükler:** *Pneumocystis jirovecii*, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu.

## OTOİMMÜN HASTALIKLARDA ANTİNÖTROFİL SİTOPLAZMİK ANTİKORLARIN ARAŞTIRILMASI

Mehmet Özdemir, Nadire Seval Gündem, Bülent Baysal

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

Antinötrofil sitoplazmik antikorlar, monositlerin lizozomları ve nötrofillerin sitoplazmik granüllerinde bulunan antijenlere karşı oluşan otoantikordur. Özellikle Wegener granüloomatosis olmak üzere pek çok sistemik vaskülitte tanı değeri olan prognostik belirteçlerdir. Bu çalışmada, hastanemizde 2009 yılında otoimmün hastalık veya vaskülit ön tanısı alan 1040 hastanın serum örneklerinde antinötrofil sitoplazmik antikorlar (ANCA) indirekt immüno Floresans yöntemi ile araştırılmış, hedef antijenleri ve nötrofillerde oluşturdukları paternlere göre sitoplazmik (cANCA) veya perinükleer (pANCA) ANCA varlığı kalitatif olarak belirlenmiştir. Toplam 1040 hastanın 44'ünde (%4.2) ANCA pozitif olarak bulunmuş; bunların 34'ü (%3.2) pANCA, 10'u (%1) cANCA olarak izlenmiştir. Toplam 44 hastanın 4'ü vaskülit, 4'ü romatoid artrit, 5'i bağ dokusu hastalığı, 5'i artrit, 2'si SLE, 10'u kronik akciğer hastalığı tanısı alan hastalardır. 14 hasta ise herhangi bir hastalık tanısı almamıştır. ANCA pozitifliğinin otoimmün hastalıklarda özellikle vaskülitlerde olmak üzere tanı açısından önemli bir yeri vardır. ANCA, otoimmün hastalıklarda tanıya yardımcı, araştırılması gereken önemli bir otoantikordur.

**Anahtar sözcükler:** Antinötrofil sitoplazmik antikor, otoantikor, otoimmün hastalık.

## VİSERAL VE KÜTANÖZ *LEISHMANIASIS* ENFEKSİYONLARININ TANISI İLE PARAZİTİN TÜR VE TÜRİÇİ FARKLILIKLARININ TÜRKİYE'DE ENDEMİK BÖLGELERE GÖRE BELİRLENMESİ

Seray Özensoy Töz<sup>1</sup>, Aslı Tetik<sup>5</sup>, Yusuf Özbel<sup>1</sup>, Hatice Ertabaklar<sup>2</sup>, Fadile Yıldız Zeyrek<sup>3</sup>, Gülnaz Çulha<sup>4</sup>, M. Ziya Alkan<sup>5</sup>, Cumhuriyet Gündüz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir.

<sup>2</sup>Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın.

<sup>3</sup>Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa.

<sup>4</sup>Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Antakya, Hatay.

<sup>5</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir.

Türkiye'de kutanöz *Leishmaniasis* (KL)'e *Leishmania tropica* ve *L.infantum*, viseral *Leishmaniasis* (VL)'e ise *L.infantum* sebep olmaktadır. Şanlıurfa ve Aydın illerindeki hastalardan izole edilen *L.tropica* izolatlarının ön çalışmalarda genotipik olarak farklı olduğu belirlenmiş, bu durum konvansiyonel yöntem izoenzim analizi ile de onaylanmıştır. Köpeklerin rezervuar rolü oynadığı visseral *Leishmaniasis* etkeni *L.infantum* da ülkemizde iki farklı zimodemde saptanırken PZR-RFLP yöntemi ile üç farklı grup oluşturmuşlardır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalardan ülkemizdeki *Leishmania* türlerinin zimodem analizlerine yansiyabilecek düzeyde genotipik farklılıklar içerdiği anlaşılmaktadır. Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerle gerçek zamanlı PZR yöntemi ile hızlı, kolay ve standardize edilmiş tanı koyarken, aynı zamanda da etken parazitin tür tayini ve/veya tür içi genotip grubunun saptanması amaçlanmıştır. Nükleer ITS ve kinetoplastik DNA'nın bir bölümü hedef olarak seçilmiştir. Çalışmada, toplam olarak 430 klinik örnek incelenmiş ve tür tanımlanması açısından uygun olduğu saptanan *ITS1* bölgesi için bu çalışmada hazırlanan prob ile tür tanımlanması çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca 134 örnek gerçek zamanlı PZR ile çoğaltılan bölgeden sekans analizi yaptırılarak analiz edilmiştir. *ITS1* gerçek zamanlı PZR ile pozitif olarak saptanan 402 örneğin 341'inde (%84.8) tür ayrımı gerçekleştirilmiş, 61'inde (%15.2) ise çift pik elde edilmiş ve uygulanan diğer moleküler analizlerle kesin tür ayrımı yapılmasının mümkün olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Aile ağacı analizinde, *L.infantum*'un hem VL hem de KL etkeni olduğu, farklı hasta örneklerinde düşük tür içi farklılık gösterdiği; *L.tropica*'nın ise fazla heterojenite gösterdiği ve KL'nin yanı sıra VL etkeni de olabileceği belirlenmiştir. Epidemiyolojik değerlendirme sonucunda *ITS1* PZR ve dizi analizlerine göre saptanan *Leishmania* tür sonuçları ile il bazında aile ağaçları ve *Leishmaniasis* dağılımını gösteren haritalar hazırlanmıştır.

**Anahtar sözcükler:** *Leishmania*, *Leishmaniasis*, kutanöz, viseral, tanı, tür, genotip.

P02-16

**DIŞKIDA PARAZİT ARANMASINDA TAZE PREPARAT İNCELEMESİ İLE BİR KONSANTRASYON YÖNTEMİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Elif Cihadiye Öztürk<sup>1</sup>, Asiye Altınöz<sup>1</sup>, Şahika Göçmen<sup>1</sup>, Fulya Özaras<sup>1</sup>, Emel Çalışkan<sup>1</sup>, Gülkan Karadağ<sup>1</sup>, Fatma Avcioğlu<sup>1</sup>, Handan Ankaralı<sup>2</sup>  
*Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, <sup>1</sup>Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Biyoistatistik Anabilim Dalı, Düzce.*

Kasım 2009 tarihinde Düzce Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilen bu prospektif çalışmada, ilimize bağlı bir ilçedeki okul çocuklarında barsak parazitleri araştırılmıştır. Çalışmaya, 523 çocuktan toplanan dışkı örnekleri dahil edilmiştir. Örnekler önce direkt ve lugollü taze preparat hazırlanarak, sonrasında ise bir konsantrasyon yöntemi ile incelenmiş ve her iki yöntem ile alınan sonuçlar karşılaştırılmıştır. Direkt taze preparat incelemesinde; 77 örnekte *Giardia intestinalis*, 1 örnekte *Ascaris lumbricoides* ve 1 örnekte *Hymenolepis nana* saptanırken, konsantrasyon yöntemi ile 79 örnekte *G.intestinalis*, 1 örnekte *A.lumbricoides* ve 1 örnekte *H.nana* saptanmıştır. Çalışmamızda, direkt inceleme ve konsantrasyon ile inceleme yöntemleri arasındaki uyum Kappa analizi ile değerlendirilmiş ve yöntemler arasında yüksek düzeyde uyum olduğu (Kappa=0.985; P=0.0001) belirlenmiştir. Direkt ve lugollü taze preparat incelemesinin konsantrasyon yöntemine göre değerlendirmesinde ise, duyarlılığı %97.5, özgüllüğü %100, negatif prediktif değeri %99.6 ve pozitif prediktif değeri %100 olarak bulunmuştur. Çalışmamızın sonuçları, direkt lugollü taze preparat incelemesinin dışkıda parazitlerin saptanmasında tek başına da yeterli olabileceği düşündürmektedir.

**Anahtar sözcükler:** Direkt inceleme, dışkı, parazit, konsantrasyon yöntemi.

## CANDIDA ALBICANS ÜZERİNE OMEPRAZOLÜN İN VİTRO ANTİFUNGAL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI VE MOLEKÜLER OLARAK TANIMLANMASI

Fahriye Küçükaslan<sup>1</sup>, Sabri Sümer<sup>1</sup>, Hasibe Cingilli Vural<sup>2</sup>, Zeki Severoğlu<sup>1</sup>, Orçun İşler<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

<sup>2</sup>Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Konya.

İmmün sistemi baskılanmış hastalarda sistemik mantar enfeksiyonlarının mortalitesinin yüksek olması nedeniyle, erken tanı ve tedavi büyük önem taşımakta ve hastaların yaşam oranını yükseltmektedir. Hızlı tanı için son yıllarda etkenin nükleik asidini tespit etmeye yönelik moleküler yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* suşlarının in vitro omeprazol duyarlılığının araştırılması ve tür ayırımı ve genotipik farklılıkların saptanmasında polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)'nun değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde yatan ya da polikliniklere başvuran 0-78 yaş arasındaki hastaların çeşitli klinik örneklerinden (kan, idrar, balgam, oral lezyon, genital lezyon) izole edilen 150 *C.albicans* suşu alınmıştır. İzolatlar, konvansiyonel mikrobiyolojik ve biyokimyasal (API *Candida*) yöntemlerle tanımlanmış; antifungal duyarlılık testleri CLSI standartlarının M27-A3 kılavuzunda belirtilen mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak yapılmıştır. PZR yöntemi için örneklerden DNA ekstraksiyonu, EZ1 otomatik nükleik asit izolasyon sistemi (Qiagen, Germany) ile gerçekleştirilmiş ve amplifikasyon için *Candida* genomunda virülans genlerini hedefleyen özgül primerler kullanılmıştır. Ayrıca türler içerisindeki genetik polimorfizm, standart suşlarla karşılaştırılarak filogenetik olarak incelenmiştir. Tüm deneylerde kontrol olarak *Candida albicans* ATCC 90028 ve *Candida krusei* ATCC 6258 standart suşları kullanılmıştır. Çalışmamızda, omeprazolün belirli bir MİK aralığında ( $\leq 320\mu\text{g/ml}$ ) (Sümer Z ve ark. C.Ü.Tıp Fak. Derg 2005; 27:74) etkili olduğu, yüksek konsantrasyonlarda ise mantarın üremesini destekleyen yönde etki gösterdiği görülmüştür. Moleküler çalışmalarda, *C.albicans* izolatlarında virülans faktörlerinin belirlenmesinde HIS1-2 primeri ile başarılı amplifikasyon sağlanmış ve ayrıca *C.albicans* izolatları arasında anlamlı bir genotipik farklılık tespit edilmemiştir. Buna karşın konvansiyonel yöntemlerle *C.albicans* olarak tanımlanan bir suşun, moleküler yöntemle *C.dublinskiensis* olduğu belirlenmiş; ARG4 primerinin *C.dublinskiensis*'e özgü olduğu ve tür ayırımı için seçici önemli bir belirteç olduğu düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** *Candida albicans*, omeprazol, antifungal, genotip, PZR.

## İSTANBUL'DA BİR LİSE ORTAMINDAKİ BAKTERİYEL KOLONİZASYONUN VE AEROFUNGAL FLORANIN ARAŞTIRILMASI

Mustafa Katı<sup>1</sup>, Mehmet Ali Onaran<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Üsküdar Milli Eğitim Müdürlüğü, Selimiye Anadolu Tarım Meslek Lisesi, İstanbul.

<sup>2</sup>Muğla Milli Eğitim Müdürlüğü, Muğla Anadolu Lisesi, Muğla.

Bu çalışmada, İstanbul, Selimiye Tarım Meslek Lisesi içindeki çeşitli ortamlardan alınan çevre örneklerinde bakteriyel kolonizasyonun araştırılması ve okul çevresindeki havada fungus florasının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, bir eğitim günü sonunda temizlik yapılmadan önce, rutin temizlik işleminden sonra ve sodyum hipoklorit ile yapılan temizlik işleminden sonra olmak üzere üçer kez merdiven trabzanı, öğrenci tuvaletlerindeki musluk başları ve kapı kolları ile rastgele seçilen öğrenci sıralarından sürüntü örnekleri alınmıştır. Örnekler, koyun kanlı ve EMB agar besiyerlerine ekilerek 37°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve üreyen koloniler hem konvansiyonel yöntemlerle (Gram boyama, biyokimyasal testler) hem de otomatize ticari bir sistem ile tanımlanmıştır. Hava örnekleri ise, okul çevresinde belirlenen dört farklı bölgeden, Saboraud dekstroza agar besiyerleri kullanılarak, petri açma yöntemiyle (1.5-2 m yükseklikte 20 dk tutulmak suretiyle) birer ay arayla dörder kez toplanmış ve 28°C'de bir hafta süreyle inkübe edilmiştir. Aerofungus kolonilerinin tanımlanması konvansiyonel mikroskopik yöntemlerle yapılmış ve standart kılavuzlar kullanılarak mantarlar cins düzeyinde tanımlanmıştır. Çalışmamızda, temizlik öncesi alınan tüm örneklerde yoğun olarak ( $\geq 60$  koloni oluşturan ünite/pleyt) *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella* spp., *Bacillus* spp. ve difteroid basil varlığı saptanmış; rutin temizlik işleminden sonra aynı bölgelerden alınan örneklerde bakteri sayılarında ortalama 2.8 log<sub>10</sub> düzeyinde azalma olduğu izlenmiş; sodyum hipoklorit ile yapılan temizlikten sonra ise aynı bölgelerden alınan örneklerin hiçbirisinde bakteri üremesinin olmadığı belirlenmiştir. Aerofungal floranın değerlendirilmesinde; hava örneklerinde birbirlerine benzer oranlarda olmak üzere (ortalama: 5-8 koloni oluşturan ünite/pleyt) *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* ve *Alternaria* türleri izole edilmiş ve cins dağılımları açısından bölgeler arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p > 0.05$ ). Sonuç olarak, önemli bir toplu yaşam alanı olan okullarda, çevresel ve çapraz kontaminasyonun azaltılması/önlenmesi amacıyla standart dezenfeksiyon yöntemlerinin titizlikle uygulanması gerektiği düşünülmüş; ayrıca öğrencilerin, el yıkama ve kişisel hijyen konusunda eğitilmesi gerektiği ve hava kaynaklı mantar florasının atopik kişilerde alerjik reaksiyon oluşturma potansiyeli konusunda bilinçlendirilmesinin yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Çevresel kontaminasyon, dezenfeksiyon, aerofungus, fungal alerji.



## BOR'UN BİNA DUVARLARINDAN İZOLE EDİLEN KÜF MANTARLARINA KARŞI ANTİFUNGAL ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Mustafa Katı<sup>1</sup>, Mehmet Ali Onaran<sup>2</sup>, Anı Altuğ Curna<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Selimiye Anadolu Tarım Meslek Lisesi, Üsküdar, İstanbul.

<sup>2</sup>Muğla Anadolu Lisesi, Merkez, Muğla.

Küf mantarları, yaşanılan/çalışılan ev ve binalarda, insan sağlığı üzerinde ciddi olumsuz etkiler oluşturmuş "hasta bina sendromu"na neden olan birçok faktör arasında ilk sıralarda yer almaktadır (Kreiss K. Am J Public Health 1990; 80:1172). Bu nedenle, rutubete ve bağıl neme bağlı olarak binaların iç veya dış ortamlarında meydana gelen küf kolonizasyonu/kontaminasyonunun önlenmesi amacıyla, inşaatlarda kullanılan yapı ve yalıtım malzemelerinin seçimi önem taşımaktadır. Diğer taraftan, günümüzde birçok alanda yaygın olarak kullanılan bor (Boron; B) bileşiklerinin, küf ve maya mantarlarına karşı antifungal etkisinin olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir (Baker SJ, et al. J Med Chem. 2006; 49:4447. ; Rock FL, et al. Science 2007; 316: 1759. ; Hicks JW, et al. Chem Biodivers 2008;5:2415.; Qin G, et al. Int J Food Microbiol 2010; 138:145). Bu çalışmada, bina duvarlarından toplanan örneklerden izole edilen küf mantarlarına karşı bor'un in vitro antifungal etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Muğla ili, Düğerek ve Orhaniye mahallelerinde rastgele seçilen ev ve binaların rutubetli iç ve dış duvarlarından kazımak suretiyle alınan örnekler dahil edilmiştir. Steril serum fizyolojik içine 100'er gr olarak alınan örnekler, homojenize edildikten sonra 1/1, 1/10 ve 1/100 oranlarında sulandırılmış ve her sulandırımından ikişer adet olmak üzere, farklı konsantrasyonlarda (50 mM, 150 mM, 300 mM ve 600 mM) borik asit içeren ve içermeyen Sabouraud dekstroza agar besiyeri plaklarına kantitatif ekim yapılmıştır. 30°C'de 48 saat inkübasyondan sonra besiyerlerinde üreyen koloniler, makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, alınan tüm örneklerden, tek ve aynı cins küf mantarı (olası tanı; *Penicillium*) izole edilmiş ve bu durumun aynı ya da komşu bölgelerdeki ev/bina duvarlarından alınmış olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bor içermeyen besiyerlerinde yoğun küf üremesi saptanırken (ortalama;  $1.8-3.5 \times 10^3$  cfu/ml), 50 mM ve 150 mM bor içeren besiyerlerinde koloni sayılarında dramatik olarak azalma saptanmış (sırasıyla ortalama;  $2.1-4.3 \times 10^1$  ve  $0.3-0.5 \times 10^1$  cfu/ml), 300 mM ve 600 mM bor içeren besiyerlerinde ise fungus üremesinin tamamen inhibe olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, binaların yapım ve izolasyonunda, %3 bor oksit içeren (500 mM borik aside eşdeğer) BAB (borlu aktif belit) çimentosunun kullanılmasının, inşaat sektöründeki birçok avantajının yanı sıra, rutubetlenme ve küf kolonizasyonunun, dolayısıyla da alerjik semptomların önlenmesi/azaltılması açısından da önemli yarar sağlayacağı düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** Bor, küf mantarı, antifungal etki, hasta bina sendromu.

P03-01

## PANDEMİK İNFLUENZA A (H1N1) TANISINDA HIZLI ANTİJEN TESTİ İLE PZT'NİN KARŞILAŞTIRILMASI

Begüm Nalça Erdin<sup>1</sup>, Özgen Alpay Özbek<sup>1</sup>, Murat Duman<sup>2</sup>, Ayça Arzu Sayiner<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

<sup>2</sup>Çocuk Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir.

Pandemik influenza A virusu (H1N1v), Nisan 2009 tarihinde ilk kez Amerika'da saptandıktan sonra hızla dünyanın diğer ülkelerine de yayılmıştır. Pandemik virus enfeksiyonunun kesin tanısı için polimeraz zincir tepkimesi (PZT) yöntemi önerilmektedir. Hızlı antijen tanı testlerinin, mevsimsel influenza için duyarlılık ve özgüllüğü, genellikle sırasıyla %70-75 ve %90-95 arasında değişmektedir. Ancak bu testlerin pandemik virus için de duyarlılık ve özgüllüklerinin değerlendirilmesine ihtiyaç vardır. Bu çalışmanın amacı, pandemik virus enfeksiyonu tanısında hızlı antijen testlerini, gerçek zamanlı PZT ile karşılaştırarak, testin duyarlılık, özgüllük ve prediktif değerlerini belirlemektir. Çalışmada, Kasım 2009 - Ocak 2010 aylarında, DEÜ Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'na gönderilen, tamamı çocuklardan alınan 68 adet nazofarengeal aspirat, hızlı antijen tanı testi (Becton Dickinson, Directigen EZ Flu A+B Test, USA) ile influenza A açısından ve gerçek zamanlı RT-PZT (Artus Infl./H1 LC/RG RT-PCR Kit, Qiagen, Almanya) ile influenza A/B ve H1N1v açısından incelenmiştir. 68 örneğin, 26'sı hızlı antijen testi ile, 40'ı influenza PZT ile pozitif bulunmuştur. Hızlı antijen tanı testinin, influenza PZT'ye göre duyarlılığı %62.5, özgüllüğü %96.4; H1N1v PZT'ye göre ise duyarlılığı %63.4, özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur (Tablo). Antijen testinin, H1N1 PZT'ye göre pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri %64.2 olarak hesaplanmıştır. Hızlı antijen testi pediatrik hasta grubunda tanıya yardımcı olarak kullanılabilir. Antijen testinin yalancı pozitifliğinin olmaması ancak duyarlılığının düşük olması, antijen pozitif olguların enfekte olarak kabul edilebileceğini, ancak negatif örneklerin PZT ile çalışılması gerektiğini göstermektedir. Örnekler sadece çocuk yaş grubundan olduğu için erişkinlerle ilgili yorum yapılamamıştır. Saptanan prediktif değerler, çalışmanın yapıldığı pandeminin tepe dönemine aittir.

**Anahtar sözcükler:** Pandemik influenza A virusu, hızlı antijen tanı testi, polimeraz zincir tepkimesi.

**Tablo :** Antijen testi ile influenza A/B ve H1N1v RT-PZT sonuçlarının karşılaştırılması

İnfluenza A antijen testi	İnfluenza A RT-PZT			H1N1v RT- PZT		
	Pozitif	Negatif	Toplam	Pozitif	Negatif	Toplam
Pozitif	25	1	26	26	0	26
Negatif	15	27	42	15	27	42
Toplam	40	28	68	41	27	68

## PANDEMİK INFLUENZA 2009 VİRUSUNUN TESPİTİNDE KULLANILAN GERÇEK ZAMANLI PCR SİSTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Nurhan Albayrak<sup>1</sup>, Ayşe Başak Altaş<sup>1</sup>, Gülay Korukluoğlu<sup>1</sup>, Mustafa Ertek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara.

<sup>2</sup>Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Ankara.

Çalışmamızda, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi İnfluenza Laboratuvarı'nda pandemik influenza virusunun tanısı için kullanılan "in house" gerçek zamanlı (real-time) PCR sistemi ile ticari iki kit ile gerçekleştirilen gerçek zamanlı PCR sisteminin sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır. "In house" PCR testi, "Centers for Disease Control and Prevention" (CDC) önerileri doğrultusunda CDC'den sağlanan primer ve prob ile gerçekleştirilmiştir. İnfluenza virusunun tanısı için İnfluenza A, swİnfluenza A, swİnfluenza H1 ve RNaseP primer prob setleri kullanılmış ve 4 parametre aynı döngüde çalışılmıştır. Inf A, tüm tip A influenza viruslarını; swInfA, tüm "swine" (sw) influenza A viruslarını ve swH1 "swine" H1 influenza viruslarını tespit etmektedir. RNaseP ise örneğin insan RNA'sı içerip içermediğinin kontrolü (eksternal internal kontrol) için kullanılmaktadır. Qiagen Artus Infl/H1 (Qiagen Artus, Germany) ve Roche Launches Complete Detection Kit for İnfluenza A /H1N1 (Roche, Germany) ticari kitleri tek döngüde çalışılmak üzere genel influenza ve sw influenza H1 primer prob setlerini içermektedir. Çalışmamızda, sw influenza pozitif vakaların takip örneklerinden (5-10. günlerde alınan örnekler) oluşan toplam 33 örnek, CDC ve kitlerin protokolüne göre ayrı ayrı çalışılmıştır. Örneklerinin 5'i her üç sistem ile de negatif, 24 örnek ise her üç sistemin tüm parametreleri ile pozitif olarak tespit edilmiştir. Kalan 4 örnekte ise; CDC primer seti ve Roche kiti kullanıldığında sadece InfA'ları pozitif saptanırken, Qiagen kiti ile bu örneklerin yalnızca swH1'leri pozitif olarak tespit edilmiştir. Sadece bir parametre açısından pozitif tespit edilen bu 4 örnek, semptomların başlangıcından sonraki 8-10. günlerde alınan örneklerdir. Çalışmamızın sonucunda, semptomların başlangıcından itibaren ilk yedi gün içerisinde alınan solunum örneklerinde her üç sistemin de sw influenza virusunu tespit ettiği, ancak bir haftadan sonra CDC ve Roche firmasına ait InfA primer setinin ve Qiagen firmasına ait swH1 setinin duyarlılığını koruduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Pandemik influenza, influenza A virusu, gerçek zamanlı PCR.

**SAMSUN HIFZISSIHHHA ENSTİTÜSÜ H1N1 PANDEMİ DENEYİMİ**

Abdullah Güvenli<sup>1</sup>, Okan Kadir Nohut<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*RSHM Samsun Hıfzıssıhha Enstitü Müdürlüğü Viroloji Laboratuvarı, Samsun.*

<sup>2</sup>*Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun.*

Bu çalışmada, Samsun Hıfzıssıhha Enstitüsü Müdürlüğü Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarına Karadeniz bölgesi Artvin, Rize, Trabzon, Ordu, Giresun, Samsun, Sinop, Amasya, Tokat illerinden, influenza A H1N1 enfeksiyonu şüphesiyle gönderilen örneklerin, gerçek zamanlı PCR yöntemi ile çalışılması sonunda elde edilen verilerin hasta bilgileri ile birlikte değerlendirilmesi ve bölgesel pandemi tablosunun ortaya konulması amaçlanmıştır. Çalışmaya, pandemik influenza enfeksiyonu şüphesi olan 640 hastadan (358 erkek, 282 kadın) alınan sürüntü örnekleri dahil edilmiştir. Hastaların 233 (%36)'ünde  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  ateş, 292 (%46)'sinde ise solunum güçlüğü semptomları mevcuttur. Örneklerden viral nükleik asit ekstraksiyonu, RNA izolasyon kiti (Qiagen, EZ1 Virus Mini Kit v2.0) ile yapılmış ve elde edilen RNA'lar Artus Infl./H1 LC/RG RT-PCR kiti kullanılarak amplifiye edilmiştir. Sonuçlar Rotor-Gene Q Software version 1.7.94 ile değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, 117 (%18.3) örnekte H1N1 pozitifliği tespit edilmiş; pozitiflik oranı 0-25 yaş arası hastalar için %54.7 (64/117), 25- $\geq 60$  yaş arası hastalar için ise %47 (55/117) olarak belirlenmiştir. H1N1 pandemisi sırasındaki bu çalışmalar, ileride gelişebilecek salgınlara yaklaşım yönünden, Samsun Hıfzıssıhha Enstitüsü laboratuvarlarının donanım açısından çok daha iyi konuma gelmesini sağlamış ve sonuçlar hiçbir problemle karşılaşmadan Sağlık Bakanlığı ve RSHM Başkanlığı'nın tüm birimlerine zamanında iletilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** H1N1, pandemi, gerçek zamanlı PCR, Samsun.

## İNFLUENZA A H1N1 SALGINININ LABORATUVAR BİLGİLERİNDEN İZLENMESİ VE ÖZELLİKLERİ

Işın Akar<sup>1</sup>, Tanıl Kocagöz<sup>1</sup>, Nadi Bakırcı<sup>2</sup>, Sesin Kocagöz<sup>3</sup>, Merve Bayav<sup>4</sup>, İbrahim Ünsal<sup>5</sup>  
 Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, <sup>1</sup>Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Halk Sağlığı Anabilim Dalı,  
<sup>3</sup>Enfeksiyon Hastalıkları Bölümü, <sup>5</sup>Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul.  
<sup>4</sup>Acıbadem Labmed, İstanbul.

Dünya çapında 2009 yılında yaşanan influenza A H1N1 salgını ülkemizde de önemli bir salgına neden olmuştur. Bu çalışmada, büyük çoğunluğu İstanbul'dan Acıbadem Labmed laboratuvarına, influenza A H1N1 tanısı için gönderilen hasta örneklerinin incelenmesi ile salgının özelliklerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Örnekler, 2009 Mayıs ayının ikinci yarısında gönderilmeye başlanmış ve 2010 Ocak ayı sonuna kadar toplam 5.242 örnek gönderilmiştir. Virus RNA'sı izlenebilir (real-time) PZT ile araştırılmış ve örneklerin 2.769'unda influenza A H1N1 pozitifliği saptanmıştır. Buna göre pozitiflik oranı %52.8 olarak hesaplanmıştır. Mayıs ve Haziran aylarında az sayıdaki başvuruda (23 başvuru) influenza virusuna rastlanmazken, Temmuz ve Ağustos aylarındaki başvurularda artma görülmüş, Eylül ayında ise yaklaşık dörtte bir oranında azalma izlenmiştir. Bu üç ayda pozitiflik oranı %10-17 arasında seyretmiştir. Ekim ayının ortasında başvurularda ciddi bir artış ortaya çıkmış ve bu artış Kasım ayında en üst düzeyine ulaşmıştır. Örnek sayısının artmasıyla birlikte pozitiflik oranı da %70'in üzerine çıkmıştır. Aralık ayında pozitiflik oranında hızlı bir azalma görülmüş ve Ocak ayında gelen 40 örnekten sadece birinde influenza A H1N1 saptanmıştır. Bu veriler değerlendirildiğinde; Eylül ayının sonunda okulların açılmasının Ekim ayı ortasından sonra salgının hızla yayılmasına neden olduğu, Kasım ayında toplumun çoğunun bağışık hale gelmesiyle Aralık ayında hasta sayısının hızla azaldığı düşünülmüştür. Hastaların yaş ortalaması 18.2±15.7 yıl olup, örneklerin yarısı 12 yaşın altındaki hastalara aittir. H1N1 pozitifliği saptanan hastaların yaş ortalamasının (14.8±13.1 yıl), negatif olanlara göre (22.1±17.4) anlamlı düzeyde düşük olduğu ve pozitifliğin özellikle 20 yaşın altında artış gösterdiği izlenmiştir. Erkeklerdeki pozitiflik oranı (%54.2), kadınlara göre (%51.3) göreceli olarak daha yüksek saptanmıştır. Salgının, daha ziyade genç yaşta bireyleri etkilemiş olması, yaşlı kişilerin daha önce geçirdikleri influenza enfeksiyonları nedeniyle çapraz korumaya sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu çalışma, laboratuvara gönderilen örneklerle ait bilgilerin iyi tutulması ve değerlendirilmesi durumunda, salgınların izlenmesi ve özellikleri hakkında önemli bilgiler edinilebileceğini vurgulamaktadır.

**Anahtar sözcükler:** İnfluenza A H1N1, salgın, özellikler, Türkiye.

## KRONİK HEPATİT B'Lİ HASTALARDA LAMİVUDİN, ADEFOVİR VE ENTEKAVİR İLE TEDAVİ SONUNDA OLUŞAN, İLAÇ DİRENCİNE SEBEP OLAN HBV POLİMERAZ MUTASYONLARI İLE BU MUTASYONLARIN HBV KOR VE PREKOR BÖLGESİNDE ORTAYA ÇIKAN MUTASYONLAR İLE OLAN MUHTEMEL İLİŞKİSİ

Mehmet Sami Serin<sup>1</sup>, Gürol Emekdaş<sup>2</sup>, Gönül Aslan<sup>2</sup>, Orhan Sezgin<sup>3</sup>, Engin Altıntaş<sup>3</sup>, Aylin Döğen<sup>1</sup>, Seda Tezcan<sup>2</sup>, Enver Üçbilek<sup>3</sup>

*Mersin Üniversitesi <sup>1</sup>Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, <sup>3</sup>Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Anabilim Dalı, Mersin.*

Hepatit B virusu (HBV), bir DNA virusu olmasına rağmen, hata yapmaya açık bir viral revers transkriptaz enziminin görev aldığı pregenomik RNA ters transkripsiyon olayı ile replike olmaktadır. Bu sebeple HBV, genom içerisinde değişik mutasyonları olan geniş bir “quasispecies” havuzu oluşturmaktadır.

Sunulan bu çalışmada, 2004-2009 yılları arasında lamivudin (LAM) ve adefovir (ADV) ile en az iki yıl tedavi görmüş sırasıyla 100 ve 110 hasta serumu ile entekavir (ETV) ile bir yıl tedavi görmüş 20 hasta serumu olmak üzere toplam 230 serum örneğinde, ilaç direncine neden olan polimeraz gen bölgesinin B, C ve D kangallarında ortaya çıkan mutasyonların ve prekor ve kor bölgesi mutasyonlarının “hemi-nested” PCR ve DNA “cycle-sequencing” metodları ile araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda kümülatif LAM, ADV ve ETV muhtemel dirençleri sırasıyla; %23 (23/100), %2.75 (3/110) ve %0 (0/20) olarak tesbit edilmiştir. LAM direncine sebep olan rtM204I ve rtM204V-rtL180M dual mutasyonları sırasıyla; %13 (13/100) ve %7.27 (8/100) olarak, ADV direncine sebep olan rtN236T mutasyonu ise %2.75 (3/110) olarak saptanmıştır. ETV direncine sebep olan mutasyonlar 20 örneğin hiç birisinde tesbit edilmemiştir. Ayrıca, ADV ile tedavi görmüş grupta rtM204I ve rtM204V-rtL180M mutasyonları sırasıyla; %7.27 (8/110) ve %4.54 (5/110) olarak, ETV ile tedavi görmüş grupta rtM204I mutasyonu %15 (3/20) olarak belirlenmiştir. Bunlara ilaveten ADV ile tedavi edilmiş grupta net olarak tanımlanamamış olan rtI233V, rtN238R, P237H ve rtK241E mutasyonlarına da düşük oranlarda rastlanmıştır (sırasıyla; %2.75, 1.8, 0.9 ve 0.9). Direnç ile ilişkili mutasyon tesbit edilen toplam 26 örneğin 20'sinde (%76.9), nt 1896 G-A mutasyonu tesbit edilmiştir. Çalışmamız sonucunda, ilaç direnci mutasyonları ve bu mutasyonların HBV kor ve prekor bölgesinde ortaya çıkan e-minus mutasyonları ile anlamlı bir birliktelik sergiledikleri tesbit edilmiştir (p<0.05).

**Anahtar sözcükler:** Hepatit B virusu, direnç, mutasyon, adefovir, lamivudin, entekavir, PCR, DNA dizi analizi.

## ESKİŞEHİR'DE OKÜLT (GİZLİ) HEPATİT B VİRUS (HBV) ENFEKSİYONU PREVALANSI

Yurdanur Akgün, Tercan Us, Nilgün Kaşifoğlu, Münire Pınarbaşı

*Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Eskişehir.*

Okült HBV enfeksiyonu, HBV antikorları olsun ya da olmasın, saptanamayan HBsAg ile birlikte serumda, immün sistem hücrelerinde ve/veya karaciğerde düşük titrede HBV-DNA pozitifliği ile karakterizedir. Prevalansı, HBV enfeksiyonunun toplumdaki prevalansına, test edilen hasta popülasyonuna, serolojik ve moleküler testlerin duyarlılığına bağlı olarak değişir. Tek başına anti-HBc (+) bireylerde prevalans %0-15 arasında değişmektedir. Bu çalışmada, viral hepatit B ön tanılı hastalarda, okült HBV enfeksiyonu prevalansı araştırılmıştır. ESOGÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 2001-2009 yılları arasında gönderilen HBV enfeksiyonu ön tanılı hastalara ait 9.577 serumda HBV-DNA, gerçek zamanlı PCR (Qiagen); HBV, HCV ve HDV serolojik işaretleri ise, EIA (AxSYM, Abbott) yöntemi ile çalışılmıştır. HBsAg negatif, HBV-DNA pozitif serumların aminotransferaz düzeyleri araştırılmıştır. HBV DNA'sı pozitif olan 2.335 hastanın 35'inde (%1.5) HBsAg negatifliği saptanmıştır. Bu 35 hastanın tümünde anti-HBc IgM (-), 16'sında (%45.7) tek başına anti-HBc (+), 3'ünde (%8.5) tek başına anti-HBs (+), 8'inde (%22.9) anti-HBs ve anti-HBc birlikte (+), 8'inde (%22.9) ise tüm HBV serolojik işaretleri negatif olarak bulunmuştur. Üç hastada anti-HCV pozitif olup, tüm hastalarda anti-HDV negatiftir. 14 (%40) hastada ALT değerleri yüksek saptanmıştır. 12 (%34.3) hasta immün düşkün konak özelliği taşımaktadır. Sonuç olarak çalışmamızda, Eskişehir'de okült HBV enfeksiyonu prevalansı %1.5 olarak belirlenmiştir. Bu veri, Türkiye'deki diğer çalışma sonuçlarıyla uyumludur. Ülkemizdeki çalışmalarda okült HBV enfeksiyon oranları; Akduman ve ark. tarafından 935 HBsAg (-) olguda %5.77, Yalçinkaya ve ark. tarafından 363 sağlıklı bireyde %1.1 olarak bildirilmiş; Şener ve ark. 122 HBV-DNA pozitif hasta serumunda HBsAg negatifliğini %3.7 olarak saptamışlardır. İmmün düşkün hasta oranımız (%34.3) dikkate alındığında, okült HBV enfeksiyon tanısı konmasının; reaktivasyonun önlenmesi ve tedavi stratejisinin belirlenmesi açısından önemi de ortaya çıkmaktadır.

**Anahtar sözcükler:** Hepatit B virusu, okült (Gizli) HBV enfeksiyonu, prevalans, Eskişehir.

P03-07

## HEMODİYALİZ HASTALARINDA HEPATİT B VİRUS (HBV) VE HEPATİT C VİRUS (HCV) ENFEKSİYONLARININ SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Ayla Ergani<sup>1</sup>, Hadiye Demirbakan<sup>2</sup>, Hüseyin Koçak<sup>3</sup>, Murat Tuncer<sup>4</sup>, Gözde Öngüt<sup>5</sup>, Halide Akbaş<sup>6</sup>, H. Asuman Yavuz<sup>7</sup>, Bülent Yıldırım<sup>8</sup>, Dilek Çolak<sup>5</sup>

<sup>1</sup>*Laboratoire de Virologie Moléculaire et Structurale Gif sur Yvette CNRS, Fransa.*

<sup>2</sup>*Şehitkamil Devlet Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Birimi, Gaziantep.*

<sup>3</sup>*Mardin Devlet Hastanesi, Mardin.*

<sup>4</sup>*Medicalpark, Antalya*

<sup>5</sup>*Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.*

<sup>6</sup>*Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Antalya.*

<sup>7</sup>*Atatürk Devlet Hastanesi, Antalya.*

<sup>8</sup>*Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Antalya.*

Son dönem böbrek yetmezliği nedeni ile hemodiyaliz (HD) uygulanan hastalarda hepatit en önemli nedenleri hepatit B virusu (HBV) ve hepatit C virusu (HCV)'dur. Kronik HD hastalarında HBV ve HCV tanısında viral serolojik testlerde atipik profiller sık görülmektedir. Bu çalışmanın amacı, kronik HD hastalarında HBV ve HCV serolojik göstergelerinin, viral yüklerinin ve serum aminotransferaz düzeylerinin incelenerek birbirleri ile ilişkilerinin araştırılması ve HBV ve HCV genotiplerinin belirlenmesidir. Çalışmamıza Antalya'da üç ayrı hemodiyaliz merkezinden toplam 201 son dönem böbrek hastası alınmıştır. Olguların HBV ve HCV serolojik profilleri, AST ve ALT düzeyleri ve HBV-DNA ve HCV-RNA viral yükleri saptanmış, HBV-DNA ve HCV-RNA pozitifliği görülen olguların DNA dizi analizleri yapılarak genotipleri değerlendirilmiştir. Çalışmamızda; HBV aşı yanıtı olan hastalar hariç tutularak, en az bir HBV göstergesi pozitifliği oranı %49.8 olarak bulunmuştur. HBsAg ve HBV-DNA pozitifliği sırasıyla %2.5 ve %2.5'tir. Anti-HCV pozitif olarak saptanan 38 (%18.9) olgunun 22'sinde HCV RNA'nın da pozitif olduğu görülmüştür. Bununla birlikte anti-HCV antikorları negatif olan üç olguda da HCV-RNA pozitifdir. Anti-HCV ve/veya HCV-RNA pozitiflik oranı %20.4'dür. Hastaların %11.9'unda HBV ve HCV enfeksiyonu birlikteliği mevcuttur. Bir olguda okült HBV enfeksiyonu saptanmıştır. HBV izolatları genotip D ve HCV izolatları genotip 1b olarak tiplendirilmiştir. Sonuç olarak, HD hastalarında viral serolojik göstergeler negatif bile olsa periyodik olarak HBV-DNA ve HCV-RNA varlığının araştırılması gerektiği düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** Hepatit B virusu, hepatit C virusu, hemodiyaliz, okült HBV.



## ANTI-HCV VE HCV PCR TESTLERİNİN SERUM ALT DÜZEYLERİYLE İLİŞKİSİNİN RETROSPEKTİF İRDELENMESİ

Tuba Köse<sup>1</sup>, Hikmet Öztel Ocak<sup>1</sup>, Celal Kurtuluş Buruk<sup>1</sup>, Süleyman Caner Karahan<sup>2</sup>, Neşe Kaklıkkaya<sup>1</sup>, Faruk Aydın<sup>1</sup>

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, <sup>1</sup>Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon.

Hepatit C virusu (HCV) hepatosit hasarı ile akut hepatit, kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinomaya neden olabilen önemli bir viral hastalık etkenidir. Hastalığın takibinde önemli ve sık kullanılan laboratuvar belirteçleri anti-HCV, serum ALT ve HCV PCR testleridir. Bu çalışmada, laboratuvarımıza gönderilmiş hasta kan örneklerinden çalışılan anti-HCV ve HCV RNA test sonuçlarının serum ALT ile ilişkisinin retrospektif olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, 01.01.2008–15.03.2010 tarihleri arasında K.T.Ü. Tıp Fakültesi Hasta Hizmetleri Laboratuvarı'na, anti-HCV istemi ile gönderilen 65.014 örnek içinden anti-HCV ile eş zamanlı HCV RNA ve serum ALT düzeyleri birlikte çalışılan 625 örnek alınmıştır. Anti-HCV ARCHITECT ELISA testi ile (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Almanya), HCV PCR Cobas Ampliprep-Taqman Real time PCR sistemi ile (Roche Molecular Systems, inc Branchburg NJ, USA) çalışılmıştır. ALT düzeyleri, ROCHE MODULAR ANALYTICS sisteminde (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) enzimatik spektrofotometrik yöntem ile tespit edilmiştir. Anti-HCV sonucu ve HCV RNA viral yükünün ALT ile ilişkisi Spearman korelasyon analizi uygulanarak değerlendirilmiştir. Anti-HCV istemi ile gönderilen 65.014 örnekte anti-HCV pozitiflik oranı %2.46; HCV RNA pozitiflik oranı çalışılan 1.981 örnekte %53.25 olarak bulunmuştur. Çalışmaya dahil edilen 625 örnek anti-HCV ve HCV RNA sonuçlarına göre dört grupta incelenmiş, her grubun ALT düzeyleri ile ilişkisi sınır değer 40 IU/L alınarak değerlendirilmiştir (Tablo). Sonuç olarak çalışmamızda, anti-HCV pozitif olan grupta viral yük ile ALT düzeyi arasında pozitif yönde orta derecede istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmış ( $r=0.51$ ;  $p<0.0001$ ); anti-HCV negatif olan grupta ise viral yük ile ALT düzeyi arasında bir korelasyon olmadığı belirlenmiştir ( $r=-0.039$ ;  $p=0.690$ ).

**Anahtar sözcükler:** Hepatit C virusu, anti-HCV, HCV PCR, ALT.

**Tablo :** Anti-HCV ve HCV PCR sonuçlarının ALT düzeylerine göre dağılımı

	ALT ≤ 40 IU/L Sayı (%)	ALT > 40 IU/L Sayı (%)	Toplam Sayı (%)
Anti-HCV (+) / HCV PCR (+)	124 (41.2)	177 (58.8)	301 (100)
Anti-HCV (+) / HCV PCR (-)	184 (84.02)	35 (15.98)	219 (100)
Anti-HCV (-) / HCV PCR (+)	7 (77.7)	2 (22.3)	9 (100)
Anti-HCV (-) / HCV PCR (-)	67 (69.8)	29 (30.2)	96 (100)
Toplam	382 (61.12)	243 (38.88)	625 (100)

**HEPATİT C VİRUSU (HCV) RNA POZİTİF OLGULARDA GENOTİP DAĞILIMI**

İhsan Hakkı Çiftci, Gülşah Aşık, Halil Er, Zafer Çetinkaya, Mustafa Altındış, Orhan Cem Aktepe  
*Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı,  
Afyonkarahisar.*

Hepatit C virusu (HCV), *Flaviviridae* ailesinde yer alan bir RNA virusudur. Akut hepatitlerin %20'si, kronik hepatitlerin ise %70'inden sorumlu tutulmaktadır. HCV enfeksiyonlarında farklı genotiplerin, oluşacak hastalık tablosu ve tedavide farklılıklar ortaya çıkardığı bilinmektedir. Bu nedenle HCV genotiplerinin belirlenmesi klinik ve epidemiyolojik açıdan önem taşımaktadır. Bu çalışmada, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Labratuarına gönderilen ve hepatit C şüphesi bulunan hastalara ait kan örneklerinden elde edilen, HCV-RNA pozitif 22 serumda HCV genotip profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, 22 hastaya ait kan örneklerinden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve aynı gün HCV-RNA kantitasyonu gerçek zamanlı (real-time) polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Qiagen) cihazı yardımıyla çalışılmıştır. Örneklerin genotiplendirilmesi "Geno Sen's HCV Genotyping 1/2/3/4 Real Time PCR Reagents Kit"i kullanılarak yapılmıştır. Hastalardan 14'ünün kadın 8'inin erkek olduğu, yaşlarının 31 ile 70 arasında değiştiği, yaş ortalamalarının 53.2 olduğu gözlenmiştir. Hastalara ait viral yük  $39 \times 10^3$  kopya/ml ile  $17 \times 10^6$  kopya/ml arasında bulunmuş, ortalama değer  $39 \times 10^5$  kopya/ml olarak saptanmıştır. Toplam 22 örneğin 20'si genotip 1 olarak saptanırken 2 örneğin genotip 4 olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, klinik sürecin takibi ve antiviral tedavinin seçiminde HCV'nun genotip tayini yol göstericidir. Tüm dünyada ve ülkemizde olduğu gibi çalışmamızda da en yaygın genotipin tip 1 olduğu gözlenmiştir. Bölgemiz verilerini yansıtan bu çalışmada nadir görülen tip 4'ün de görülmüş olması dikkate değer bulunmuştur. Bu bağlamda bölgemizde HCV enfeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisinin belirlenmesi, genotip profilinin takibi açısından bu tip çalışmaların devamının gerekliliği düşünülmektedir.

**Anahtar sözcükler:** Hepatit C virusu, HCV-RNA, gerçek zamanlı PCR, genotip.

## ‘PİROSEKANSLAMA’ TEKNOLOJİSİ İLE HEPATİTİS C VİRUS GENOTİPLERİNİN BELİRLENMESİ

Seyyal Rota, Işıl Fidan, Zübeyde Lale, İlknur Çekiç  
*Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.*

Hepatitis C virusu (HCV), akut ve kronik hepatit, karaciğer sirozu ve hepatosellüler karsinomaya neden olabilen önemli bir insan patojenidir. HCV enfeksiyonunun seyri ve antiviral tedaviye yanıt HCV genotipi ile yakından ilişkili olabilmektedir. Bu çalışmada, ‘pirosekanslama’ teknolojisi ile HCV genotiplerinin saptanması ve HCV genotip dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır. Anti-HCV ve HCV RNA’sı pozitif olarak belirlenen 50 hasta çalışma kapsamına alınmıştır. Viral yük, kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile Qiagen Artus RG PCR Kit (Qiagen, Hamburg, Almanya) kullanılarak Rotor-Gene 6000 cihazında (Corbett Research, Avustralya) belirlenmiştir. HCV genotiplerinin belirlenmesinde hızlı ve kolay yorumlanan bir sekanslama yöntemi olan ‘pirosekanslama’ teknolojisi kullanılmıştır (PyroMark Q24, Qiagen, Hamburg, Almanya). Çalışmaya alınan 50 hastanın 47’sinde (%94) HCV genotip 1b, birinde HCV genotip 2a (%2), birinde HCV genotip 2b (%2) ve birinde de HCV genotip 4 (%2) tespit edilmiştir. Sonuç olarak, ülkemizde yaygın HCV genotipi olan genotip 1b, çalışmamızda da en yüksek oranda saptanan tip olmuştur. Yeni bir sekanslama yöntemi olan ‘pirosekanslama’ teknolojisinin HCV genotiplerinin belirlenmesinde de hızlı ve kolay uygulanan bir yöntem olduğu görüşüne varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Hepatit C virusu, HCV-RNA, gerçek zamanlı PCR, pirosekanslama, genotip.

**DOĞU KARADENİZ BÖLGESİ'NDE HCV GENOTİP DAĞILIMI**

Ahu Kamburoğlu, Celal Kurtuluş Buruk, Gülçin Bayramoğlu, Faruk Aydın  
*Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.*

Hepatit C virusu (HCV) ilk kez 1989 yılında non-A, non-B hepatitli insanların kanları ile enfekte edilen şempanzelerin plazmalarından klonlanarak saptanmıştır. HCV enfeksiyonu dünyada yaygın olarak görülmektedir. Hepatite neden olmakla birlikte HCV enfeksiyonu, siroz ya da hepatosellüler karsinoma ya ilerleyebilmektedir. Dünyada 6 majör HCV genotipi belirlenmiştir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda, baskın HCV genotipinin 1b olduğu gösterilmiştir. Doğu Karadeniz Bölgesi'ne ait HCV genotip bilgisine ulaşılamamıştır. Bu çalışmada Doğu Karadeniz Bölgesi'nde HCV genotip dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır. Eylül 2009 - Mart 2010 tarihleri arasında KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarına gönderilen anti-HCV ve HCV RNA'sı pozitif 70 farklı kişiye ait serum örneği HCV genotipleri açısından "line probe assay" (LIPA) yöntemiyle araştırılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 70 serum örneğinin tamamında HCV genotipinin, genotip 1 olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte toplam 70 örneğin 66'sında (%94.3) HCV genotipi 1b olarak belirlenirken, 3 örneğin (%4.3) genotip 1a, bir örneğin (%1.4) de genotip 1a/1b olduğu saptanmıştır. Genotip 1b ile enfekte hasta grubunda cinsiyet dağılımı benzer bulunurken (%51.5 kadın, %48.5 erkek), HCV genotip 1a ile enfekte olduğu belirlenen 3 kişinin hepsinin kadın olduğu görülmüştür. HCV genotip dağılımı illere göre değerlendirildiğinde; Trabzon'da genotip 1a (n=1) ve 1b (n=36); Rize'de genotip 1a (n=2), 1b (n=12) ve 1a/1b (n=1); Gümüşhane'de genotip 1b (n=5), Giresun'da genotip 1b (n=10), Bayburt'ta genotip 1b (n=2) ve Artvin'de genotip 1b (n=1) tespit edilmiştir. Trabzon ilinden gelen hastalarda genotip 1a görülme sıklığı %2.7 iken; Rize'de bu oranın %7.7 olduğu dikkati çekmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Hepatit C virusu, genotip.

## HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE TRANSPLANT ALICILARINDA SİTOMEGALOVİRUS (CMV) YÜKÜNÜN CMV ANTİJENEMİ TESTİ VE İKİ FARKLI GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TESTİ İLE ÖLÇÜLMESİ

Dilek Çolak<sup>1</sup>, Mediha Kazık<sup>2</sup>, Derya Mutlu<sup>1</sup>, Vedat Uygun<sup>2</sup>, Aydan Karagül<sup>1</sup>, Volkan Hazar<sup>2</sup>  
*Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, <sup>1</sup>Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Pediyatrik Hematoloji-Onkoloji Bilim Dalı, Antalya.*

Bu çalışmanın amacı, iki farklı ticari sitomegalovirus (CMV) gerçek zamanlı (real-time) polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) testinin sonuçlarını, CMV antijenemi testi sonuçları ile karşılaştırarak, PCR testleri için preemtif tedavi sınır (cut-off) değerlerinin belirlenmesidir. Hematopoetik kök hücre transplant alıcılarından sağlanan 170 kan örneğinde eş zamanlı olarak CMV antijenemi testi ve iki farklı CMV RT-PCR testi (CMV R-gene, Argene SA, Varilhes, Fransa ve LightCycler CMV Quant Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) çalışılmıştır. Antijenemi testinde 200.000 periferik kan lökosit (PKL) içinde 1 veya daha fazla pp65 hücre pozitifliği değerine karşılık gelen PCR sonuçları ROC eğri analizi ile incelenmiş ve sınır değerleri CMV R-gene ve LightCycler CMV Quant Kit için sırasıyla; 1543.5 kopya/ml (duyarlılık %72.4, özgüllük %90.2) ve 423 kopya/ml (duyarlılık %70.7, özgüllük %79.5) olarak bulunmuştur. Antijenemi testinde daha yüksek bir sınır değeri seçildiğinde; 10 veya daha fazla pp65 pozitif hücre için eşdeğer PCR sonuçları CMV R-gene için 5803 kopya/ml (duyarlılık %84.2, özgüllük %88.7) ve LightCycler CMV Quant Kit için 7645 kopya/ml'dir (duyarlılık %78.9, özgüllük %90.1). İki RT-PCR testi sonuçları arasında pearson korelasyon katsayısı;  $r=0.993$  olarak bulunmuştur ( $p<0.001$ ). Son zamanlarda CMV DNA'sının kantitatif olarak RT-PCR yöntemi ile saptanması oldukça popüler bir yaklaşım olmakla birlikte, bu yöntemle antiviral tedavi uygulanmasında henüz kesinleşmiş bir protokol bulunmamaktadır. Bu çalışmada; RT-PCR testleri için preemtif tedavi sınır değerlerinin her RT-PCR kiti için ayrı ayrı hesaplanması gerekliliği ortaya konmuştur. Sonraki aşamada elde edilen sınır değeri klinik olarak doğrulanmalıdır.

**Anahtar sözcükler:** Sitomegalovirus, CMV, gerçek zamanlı PCR.

## PEDİATRİK KÖK HÜCRE TRANSPLANT ALICILARINDA SİTOMEGALOVİRUS VE İNSAN HERPESVİRUS 6 İZLEMİ

Derya Mutlu<sup>1</sup>, Vedat Uygun<sup>2</sup>, Aydan Karagül<sup>1</sup>, Gülsün Tezcan<sup>2</sup>, Hatice Yazısız<sup>3</sup>, Volkan Hazar<sup>2</sup>, Dilek Çolak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

<sup>2</sup>Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Hematoloji-Onkoloji Bilim Dalı, Antalya.

<sup>3</sup>Atatürk Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Antalya.

Hematopoetik kök hücre transplantasyonu (HKHT) sonrasında en önemli problemlerden biri sitomegalovirus (CMV) enfeksiyonlarıdır. CMV ile benzer olarak insan herpesvirus 6 (HHV-6) da immün-yetmezlikli konakta yüksek patojeniteye sahiptir. Bu çalışmanın amacı; pediatrik kök hücre transplant alıcılarında CMV ve HHV-6 enfeksiyonlarının prevalansını saptamaktır. HKHT'ni takiben 15 transplant alıcısından ilk iki ay haftada bir, sonraki ay ise 15 günde bir periferik kan örnekleri toplanmıştır. Toplam 138 plazma örneğinde CMV-DNA ve HHV-6 DNA'sı gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile kantitatif olarak araştırılmıştır. Çalışmamızda, 15 hastanın 11'inde (%73) CMV-DNA ve 8'inde (%53) HHV-6 DNA'sı pozitif saptanmıştır. Altı (%40) hastada CMV ve HHV-6 DNA'ları birlikte pozitif olarak bulunmuştur. Transplantasyondan sonra CMV-DNA ortalama 31. gün (6-89 gün), HHV-6 DNA ise ortalama 15. gün (6-23 gün) ilk olarak pozitifleşmiştir. Ortalama viral yük miktarı CMV ve HHV-6 için sırasıyla; 906 kopya/ml (aralık: 10-46028) ve 368 kopya/ml (aralık: 4-254907) olarak bulunmuştur. "Graft-versus-host" hastalığı olan iki hastada yüksek viral yük düzeyi saptanmış, diğeri olan iki hastada ise CMV-DNA pozitifliği belirlenmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Sitomegalovirus, CMV, insan herpesvirus 6, HHV-6, kök hücre transplantasyonu.

## EPSTEİN-BARR VİRUS VE HERPES SİMPEKS VİRUSLARIN ROMATOİD ARTRİT VE SİSTEMİK LUPUS ERİTEMATOZUS ETYOLOJİSİNDEKİ YERİ

Tercan Us<sup>1</sup>, Esin Çetin<sup>1</sup>, Nilgün Kaşifoğlu<sup>1</sup>, Timuçin Kaşifoğlu<sup>2</sup>, Yurdanur Akgün<sup>1</sup>  
*Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, <sup>1</sup>Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, <sup>2</sup>İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Romatoloji Bilim Dalı, Eskişehir.*

Otoimmün, kronik, ilerleyici bir hastalık olan romatoid artrit (RA)'in etyoloji ve patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. Genetik, hormonal, çevresel faktörler ve bir çok enfeksiyon etkeninin rolü olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda, Herpesvirus ailesinden Epstein-Barr virus (EBV) ve Herpes simpleks virus tip 1 ve 2 (HSV-1, HSV-2)'nin RA etyolojisindeki yerinin araştırılması hedeflenmiştir. Ocak 2007-Ocak 2008 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalı'na başvuran, 1987 yılında kabul edilen ACR (American College of Rheumatology) tanı kriterlerine göre kesin tanısı konmuş, 87 RA hastası, 50 sistemik lupus eritematozus (SLE) hastası ve kan bankasına başvuran sağlıklı donörlerden 50 kişilik kontrol grubu çalışmaya alınmıştır. Gruplardan alınan serum örneklerinde EBV VCA-IgG, VCA-IgM, EA-D IgG, EBNA-IgG (Trinity Biotech, USA), HSV-1 ve HSV-2 IgM ve IgG (Dia-Pro Diagnostic, Italy) seropozitifliği ELISA yöntemiyle, viral DNA ise kantitatif gerçek zamanlı PCR (Qiagen, USA) yöntemiyle araştırılmıştır. İstatistiksel analiz, SPSS 15.0 programı ile yapılmıştır. RA, SLE ve kontrol grubunun tümünde EBV VCA-IgM negatif olarak saptanmış; gruplar arasında VCA-IgG ve EBNA-IgG pozitifliğine açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (p>0.05). SLE grubunda EBV EA-D IgG pozitifliği RA grubundan ileri düzeyde (p<0.001), kontrol grubundan ise anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p<0.05). RA grubu ile kontrol grubu arasında EBV EA-D IgG pozitifliği açısından fark belirlenmemiştir (p>0.05). RA, SLE ve kontrol grupları arasında HSV-1 IgM, HSV-1 IgG, HSV-2 IgM ve HSV-2 IgG pozitifliği açısından fark bulunamamıştır (p>0.05). RA, SLE ve sağlıklı kontrol gruplarının tümünde EBV, HSV-1 ve HSV-2 DNA'ları negatif olarak saptanmıştır. Sonuç olarak çalışmamızda, EBV, HSV-1 ve HSV-2 virusları RA etyopatogenezi ile ilişkilendirilememiş; bununla birlikte sonuçlarımız EBV ile SLE etyopatogenezi arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmüştür. Bu virusların RA etyopatogenezindeki rolünün daha iyi anlaşılabilmesi için, daha geniş kapsamlı, hastaların sinovyal doku ve sıvı örneklerinin de dahil edildiği, çok merkezli ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar sözcükler:** Epstein-Barr virus, herpes simpleks virus, romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, etyoloji.

## PARVOVİRUS B19'UN ROMATOİD ARTRİT VE SİSTEMİK LUPUS ERİTEMATOZUS ETYOLOJİSİNDEKİ YERİ

Tercan Us<sup>1</sup>, Esin Çetin<sup>1</sup>, Nilgün Kaşifoğlu<sup>1</sup>, Timuçin Kaşifoğlu<sup>2</sup>, Yurdanur Akgün<sup>1</sup>  
*Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, <sup>1</sup>Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, <sup>2</sup>İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Romatoloji Bilim Dalı, Eskişehir.*

Romatoid artrit (RA), sistemik, kronik, ilerleyici otoimmün bir hastalıktır. RA'nın etyolojisi birçok otoimmün hastalıkta olduğu gibi kesin olarak bilinmemektedir. Genetik, enfeksiyöz ajanlar ve çevresel faktörlerin hastalık gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Çalışmamızda RA etyopatogenezinde etken olabileceği düşünülen enfeksiyöz ajanlardan Parvovirus B19' un RA etyolojisindeki yerinin araştırılması hedeflenmiştir. Ocak 2007-Ocak 2008 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Bilim Dalı'na başvuran, 1987 yılında kabul edilen ACR (American College of Rheumatology) tanı kriterlerine göre kesin tanısı konmuş, 87 RA hastası, 50 sistemik lupus eritematozus (SLE) hastası ve kan bankasına başvuran sağlıklı donörlerden 50 kişilik kontrol grubu çalışmaya alınmıştır. Gruplardan alınan serum örneklerinde, Parvovirus B19 IgM ve IgG antikorları ELISA yöntemiyle (Focus Diagnostics Cypress, USA) araştırılmıştır. Örneklerde viral genom varlığı ve yükü, gerçek zamanlı PCR yöntemi (Parvovirus B19 RG PCR Kit; Qiagen, USA) ile araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar SPSS 15.0 programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. RA, SLE ve sağlıklı kontrol grupları arasında Parvovirus B19 IgM antikor pozitifliğine göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ( $p>0.05$ ). RA grubunda saptanan Parvovirus B19 IgG pozitifliği ile diğer gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilememiş ( $p>0.05$ ); ancak SLE grubunda saptanan Parvovirus B19 IgG antikor pozitifliğinin sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir ( $p<0.05$ ). RA, SLE ve sağlıklı kontrol gruplarının hiçbirisinde Parvovirus B19 DNA'sı tespit edilmemiştir. Çalışmamızda, Parvovirus B19, RA etyopatogenezini ile ilişkilendirilememiş; bununla birlikte elde edilen veriler Parvovirus B19 ile SLE etyopatogenezini arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmüştür. Bu konuda daha geniş kapsamlı, sistemik, çok merkezli yeni araştırmaların yapılmasına ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Parvovirus B19, romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, etyoloji.



## ROTAVİRUS G TIPLENDİRMESİNDE FARKLI PRİMERLER KULLANILARAK İKİ PCR YÖNTEMİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Gülçin Alp<sup>1</sup>, Ulaş Tuğcu<sup>2</sup>, Gülendamar Bozdayı<sup>1</sup>, Figen Şahin<sup>2</sup>, F. Nur Aksakal<sup>3</sup>, Ufuk Beyazova<sup>2</sup>, Seyyal Rota<sup>1</sup>

*Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, <sup>1</sup>Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Pediyatri Anabilim Dalı, <sup>3</sup>Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Ankara.*

Rotavirus enfeksiyonları, 0-5 yaş arası çocuklarda şiddetli diyare ile gelişen ve ölümlerle sonuçlanan en önemli morbidite ve mortalite sebebidir. Son on yılda gelişen moleküler yöntemlerle tanı ve tiplendirilmesi yapılmaya başlanmış olan rotavirus için bu çalışmada, G tiplerinin belirlenmesinde farklı primerlerle tasarlanan iki PCR yönteminin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Gazi Üniversitesi Hastanesine Mayıs 2008 - Nisan 2009 tarihleri arasında başvuran 0-5 yaş arası çocuklardan rotavirus aşısı yapılan ve yapılmayan toplam 550 çocuğun takibi yapılmıştır. Takip süresince diyare olan 65 çocuğun dışkı örnekleri ELISA ile incelenerek, rotavirus pozitifliği saptanan örneklerden fenol-kloroform-izoamilalkol yöntemiyle genomik dsRNA ekstrakte edilmiştir. RT-PCR kullanılarak G ve P tipleri çalışılmıştır. G tiplendirme yönteminde farklı primerlerle tasarlanan iki PCR yöntemi uygulanmıştır. Her iki yöntemde de VP7 geni, ortak Beg9 ve End9 primerleri ile amplifiye edilmiştir. Birinci PCR'da G tipleri için RVG9, aBT1, aCT2, aDT4, ET3, aAT8, aFT9 primerler; ikinci PCR'da ise VP7-R, aBT1, aCT2, aDT4, G3, G9 primerler kullanılmıştır. ELISA ile 65 örneğin 6'sında rotavirus saptanmıştır. Birinci yöntem kullanılarak yapılan tiplendirmede G1(1), G4(1) ve G9(1) olmak üzere toplam 3 adet G tipi saptanırken, ikinci yöntemde G1(2), G4(1) ve G9(1) olmak üzere 4 adet G tipi belirlenmiştir. Yeni primer dizileri ile, birinci PCR yönteminde negatif olarak belirlenen bir hasta pozitif (G1) olarak tespit edilmiştir. P tiplendirmede ise elde edilen üç P tipi de P[8] olarak belirlenmiştir. Moleküler yöntemlerdeki değişikliklerle elde edilen verilerin yeterliliğinin artacağı düşüncesi ile yapılan bu çalışmada, farklı primerler kullanılarak iki PCR yönteminin karşılaştırması yapılmış ve ikinci yöntemde kullanılan primerler ile istatistiksel bir anlam taşımamakla beraber pozitiflik oranı daha yüksek bulunmuştur. Gelecekteki çalışmalarımızda ikinci yöntemde yer alan primer dizilerinin kullanılmasına karar verilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Rotavirus, çocuk, diyare, PCR, tiplendirme.

## ROTAVİRUSUN 0-5 YAŞ ARASI ÇOCUKLARDA PCR YÖNTEMİ İLE SEROTİPLENDİRİLMESİ VE PAGE İLE ELEKTROFEROTİPLENDİRİLMESİ

Melda Meral<sup>1</sup>, Güleendam Bozdayı<sup>1</sup>, Gülçin Alp<sup>1</sup>, Buket Dalgıç<sup>2</sup>, Seçil Özkan<sup>3</sup>

Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, <sup>1</sup>Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Pediyatrik Gastroenteroloji Anabilim Dalı, <sup>3</sup>Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Ankara.

Bu çalışmada, hastanemize başvuran akut gastroenteritli 0-5 yaş arasındaki çocuklarda rotavirus enfeksiyonlarının prevalansının belirlenmesi ve bölgemizde yaygın olan rotavirus serotip ve elektroferotiplerinin saptanması amaçlanmıştır. Çalışma, Nisan 2009 - Şubat 2010 tarihleri arasında gastroenterit şikayetiyle hastanemize başvuran 0-5 yaş arasındaki 251 hastanın gaita örnekleri toplanarak gerçekleştirilmiştir. ELISA yöntemi ile antijen pozitifliği saptanan örneklerden fenol-kloroform-izoamil-alkol metodu ile dsRNA'lar izole edilmiştir. İzolatlar daha önce belirlenen yönteme göre poliakrilamid jel elektroforesi (PAGE) ile elektroferotiplendirilmiştir. Rotavirus VP-7 amplifikasyonu, Beg9 ve End9 primerleri kullanılarak, G tiplendirme G1-G4 ve G9 için özgül primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. VP-4 amplifikasyonu con-2 ve con-3 primerleri kullanılarak yapılmıştır. P tipleri P[8], P[4], P[6] ve P[9] özgül primerleri ile belirlenmiştir. Çalışmaya alınan hastaların 53'ünde (%21.1) ELISA ile antijen varlığı saptanmış; antijen pozitif örneklerin ise 31'inde (%58.5) PCR ile G1-4 ve G9 tipleri ve 24'ünde (%45.3) P tipleri tespit edilmiştir. Çalışmamızda G1, G2, G3, G4 ve G9 tipleri sırasıyla %16.1, %12.9, %38.7, %25.8 ve %6.5 oranında; P[8], P[6] ve P[9] tipleri ise sırasıyla %87.5, %8.3 ve %4.2 oranında saptanmıştır. G/P birlikteliğinden (%34) en sık G3P[8] (%38.9) görülmüştür. PAGE sonucunda E tipi sıklığı %43.4 olarak saptanmış; E tiplerinin dağılımı E1 (%43.5), E2 (%43.5), E3 (%4.3) ve E5 (%8.7) olarak belirlenmiştir. Rotavirus enfeksiyonu, %37.7 oranı ile en fazla 12-23 aylık çocuklarda ve sırasıyla sonbahar, kış, yaz ve ilkbahar aylarında izlenmiştir. Çalışmamızın sonucunda, ülkemizde G1-4 ve G9 tiplerinin yaygınlığını koruduğu, ancak oranlarda belirgin şekilde G1'den G3 ve G4'e geçiş olduğu, G9'un azaldığı ve G1P[8]'in yerini G3P[8]'in aldığı gözlenmiştir. Önceki çalışmalarda tüm E tipleri görülebilmemesine rağmen, çalışmamızda ancak 4 tip tespit edilmiştir. Verilerimiz, globalleşmenin bir sonucu olarak, önceki dönemlerde rastlanan oranlarda sapmalar olduğunu ortaya koymaktadır.

**Anahtar sözcükler:** Rotavirus, serotip, PAGE, elektroferotip.

## SOLUNUM YOLU VİRUSLARININ TANISINDA KULLANILAN PCR SİSTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Nurhan Albayrak<sup>1</sup>, Ayşe Başak Altaş<sup>1</sup>, Gülay Korukluoğlu<sup>1</sup>, Mustafa Ertek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi, Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara.

<sup>2</sup>Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Ankara.

Bu çalışmada, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarında solunum yolu viruslarının tanısında farklı PCR kitleri ve “in-house” gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır. “In house” gerçek zamanlı multipleks PCR testi, Gunson ve arkadaşlarının önerdiği primer ve problemler kullanılarak “FTD Respiratory System Multiplex PCR” (Fast-track Diagnostics, Luxembourg) kiti içeriğindeki primer ve problemler ile; enzim karışımı olarak da “AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit”i kullanılarak ABI 7500 (ABI, USA) gerçek zamanlı PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, “Seegene Respiratory Viruses Detection Kit” (Seegene, Italy) ile “Dual Specific Oligonucleotide” teknolojisi kullanılarak solunum yolu viruslarının araştırılması jel tabanlı sistemde yapılmıştır. PCR öncesi nükleik asit izolasyonu “Invitrogen Total Nucleic Acid Kit”i (Invitrogen, USA) kullanılarak yapılmıştır. Herbir sistemde ya da kit içeriğinde yer alan solunum yolu virusları tabloda görülmektedir. Çalışmamızda, daha önce en az bir solunum yolu virusu açısından pozitif olduğu tespit edilen 20 örnek kullanılmıştır. “In-house” gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) ile FTD RT-PCR sonuçları, içerdikleri etkenler kapsamında eşdeğer bulunmuştur. RT-PCR sonuçları jel tabanlı Seegene PCR sistemi ile karşılaştırıldığında; Seegene’nin RT-PCR sistemleri ile pozitif bulunan 2 influenza B ve 1 insan metapneumovirusu negatif olarak; 1 RSV + rhinovirus ve 1 coronavirus + adenovirus koenfeksiyonunu RSV B ve coronavirus pozitif olarak tespit ettiği görülmüştür. Buna karşılık RT-PCR sistemleri ile parainfluenza 2, parainfluenza 3 ve influenza B tespit edilen üç örnekte Seegene kiti ile parainfluenza 2 + rhinovirus, parainfluenza 3 + rhinovirus ve influenza B + rhinovirus koenfeksiyonu saptanmıştır. Çalışmamızın verileri, solunum yolu viruslarının tanısında kullanılan PCR yöntemlerinin standardizasyonunun sağlanması için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu vurgulamaktadır.

**Anahtar sözcükler:** Solunum yolu virusları, tanı, multipleks PCR.

**Tablo :** Farklı multipleks PCR sistemleri ile araştırılan solunum yolu virusları

	İnfA	İnfB	CoV NL63	CoV 229E	CoV OC43	HMV	PI 1-3	PI 4	RSV A/B	RSV A	RSV B	RhV	AdV
In-house RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	
Fast-track RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+
Seegene PCR	+	+		+	+	+	+			+	+	+	+

İnfA: Influenza A; İnfB: Influenza B; CoV: Coronavirus; HMV: Human Metapneumovirus; PI: Parainfluenza virus; RSV: Respiratory Syncytial virus; RhV: Rhinovirus; AdV: Adenovirus

## ANTİVİRAL TEDAVİ ALAN KRONİK HEPATİT B HASTALARINDA DİRENÇ MUTASYONLARININ SAPTANMASI- ÖN ÇALIŞMA

Sibel Aydoğan<sup>1</sup>, Koray Ergünay<sup>1</sup>, Filiz Emir<sup>2</sup>, Dürdal Us<sup>1</sup>, Halis Şimşek<sup>3</sup>, Alparslan Alp<sup>1</sup>, Gülşen Hasçelik<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>2</sup>Engin Tıbbi Ürünler ve Laboratuvar Malzemeleri Tic. Ltd. Şti., Ankara.

<sup>3</sup>Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Ünitesi, Ankara.

Kronik hepatit B enfeksiyonunun tedavisinde başarısızlığa sebep olan en önemli faktör, viral polimeraz genindeki mutasyonlara bağlı olarak gelişen ilaç direncidir. Bu çalışmada, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji ünitesi tarafından takip edilen ve bir yıldan uzun süreli ilaç tedavisi altında olan hastaların, hepatit B virusu (HBV) ilaç direnci mutasyonları açısından değerlendirmesine ait ilk sonuçlar sunulmaktadır. Çalışmaya Eylül 2009 - Nisan 2010 tarihleri arasında örnek alınan 25 kronik hepatit B hastası dahil edilmiştir. Direnç mutasyonlarının saptanması amacıyla, HBV polimeraz gen bölgesine ait 253 bazçiftlik bir bölüm nested PCR ile çoğaltılarak DNA dizi analizi ile değerlendirilmiştir. Dizi analizi uygulanan bölgede, çeşitli ilaçlara dirençle ilişkili olduğu bilinen V173L, L180M/I/V, A181V/T, M204I/V, Q215S/P/S, I233V ve N236T mutasyonları incelenmiştir. Sonuç olarak, 9 hastada eşzamanlı olarak araştırılan virus yükü düşük olduğu için direnç mutasyonu analizi yapılamamış, 12 hastada ise mutasyon saptanmamıştır. Toplam 4 hastada pozitif sonuç elde edilerek 2 hastada lamivudin direnci ile ilişkili L180I ve M204I/V mutasyonları, 1 hastada adefovir direnci ile ilişkili Q215S mutasyonu ve diğer bir hastada Q215 “stop” kodonunun varlığı izlenmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Lamivudin, adefovir, DNA dizi analizi, antiviral direnç, mutasyon.



# YAZAR İNDEKSİ



- Abacıoğlu, Hakan 114  
Akan, Özyay Anıkan 101  
Akbaş, Halide 183  
Akçalı, Alper 137  
Akğün, Yurdanur 182, 190, 191  
Akkaya, Yüksel 155  
Akpınar, Mehtap 150  
Aksakal, F. Nur 192  
Aksu, Arif 137  
Aktaş, Elif 150  
Aktaş, Zerrin 57  
Aktepe, Orhan Cem 185  
Akyar, Işın 180  
Albayrak, Nurhan 178, 194  
Alkan, M. Ziya 172  
Alp, Alparslan 195  
Alp, Alpaslan 156, 157  
Alp, Emine 144  
Alp, Gülçin 192, 193  
Alp, Şehnaz 157  
Altaş, Ayşe Başak 178, 194  
Altındiş, Mustafa 185  
Altınöz, Asiye 165, 173  
Altıntaş, Engin 181  
Ankaralı, Handan 165, 173  
Ankan, Soykan 148  
Aslan, Gönül 181  
Aslan, Mehtap Hülya 162  
Aslan, Sevgi Özyeğen 166, 167, 170  
Aslan, Volkan 153  
Aşık, Gülşah 162, 185  
Atasever, Melike 158  
Ateş, Aylin 169  
Avcıoğlu, Fatma 173  
Ayçiçek, Abdullah 149  
Ayдын, Ali 140  
Ayдын, Faruk 184, 187  
Ayдын, Merve 166, 167, 170  
Aydoğan, Sibel 195  
Aytekin, Nihan 38  
Badur, Selim 107  
Bakırcı, Nadi 180  
Balkan, Neşe 151, 152  
Baran, Caner 136  
Barış, Ayşe Bayrı 160  
Başer, Berat 158, 159  
Bayav, Merve 180  
Baykan, Mahmut 164  
Bayraktar, Banu 160  
Bayram, Gül 146  
Bayramoğlu, Gülçin 187  
Baysal, Bülent 164, 171  
Baysan, Betül Özhak 136  
Beksaç, Mehmet Sinan 154  
Belliler, Esra 141  
Beyazova, Ufuk 192  
Biter, Gülşah 166, 167, 170  
Bozdayı, Güleendam 71, 192, 193  
Bölek, Bora Kazım 148  
Bulut, Emin 160  
Bulut, Yasemin 75  
Buruk, Celal Kurtuluş 184, 187  
Caner, Ayşe 50  
Can, Füsün 70  
Ceyhan, İsmail 158, 159  
Ciblak, Meral Akçay 110  
Coşkun, Erol 159  
Cömert, Füsün 150  
Curna, Anı Altuğ 176  
Çalışkan, Emel 173  
Çekiç, İknur 186  
Çetin, Esin 190, 191  
Çetinkaya, Zafer 185  
Çırak, Meltem Yalınay 84, 142, 143, 147  
Çiftci, İhsan Hakkı 149, 162, 185  
Çiftçi, Sevgi 149  
Çolak, Dilek 136, 183, 188, 189  
Çon, Ahmet Hilmi 169  
Çulha, Gülnaz 172  
Dalgiç, Buket 147, 193  
Değirmenci, Aysu 54  
Delialioğlu, Nuran 146  
Demirbakan, Hadiye 183  
Demir, Cemil 139  
Demircili, Mehmet Emin 164  
Demirezen, Şayeste 154  
Demir, Feyza 166, 167, 170  
Dizbay, Murat 143  
Doluca, Mine 88  
Döğen, Aylin 181  
Döşkaya, Mert 47  
Duman, Murat 177  
Duran, Gülay Gülbol 139  
Duran, Nizami 139  
Durmaz, Süleyman 144, 145  
Ecemiş, Talat 161  
Emekdaş, Gürol 146, 181  
Emir, Filiz 195  
Ener, Beyza 92  
Engin, Evren Doruk 147  
Erçal, Barış Derya 144, 145  
Erdin, Begüm Nalça 177  
Erensoy, Selda 114  
Ergani, Ayta 136, 183  
Ergin, Çağrı 23, 155, 169  
Ergünay, Koray 195  
Er, Halil 185  
Ermertcan, Şafak 141  
Ertabaklar, Hatice 172  
Ertek, Mustafa 158, 159, 178, 194  
Eser, Özgen 67  
Eser, Özgen Köseoğlu 157  
Fidan, Işıl 168, 186  
Fouad, Ali 166, 167, 170  
Gazel, Deniz 137  
Göçmen, Şahika 173  
Gök, Yaşar 169  
Gülmez, Dolunay 154  
Gültekin, Meral 103  
Gündem, Nadire Seval 171  
Gündüz, Cumhuriyet 172  
Güner, Ahmet 148  
Güner, Uğur 158, 159  
Günseren, Filiz 136  
Gürbüz, Yunus 138, 153  
Gür, Deniz 157  
Gürol, Yeşim 163  
Gürüz, A. Yüksel 45  
Güvenli, Abdullah 179  
Haşçelik, Gülşen 154, 157, 195  
Hazar, Volkan 188, 189  
Işık, Yasemin 143, 147  
İlki, Arzu 151, 152  
İlkit, Macit 169  
İpçi, Kaan 157  
İşler, Orçun 174  
Jabban, İsraa 166, 167, 170  
Kabay, Nilgün 169  
Kahraman, Duygu 142  
Kaklıkkaya, Neşe 184  
Kalkancı, Ayşe 26, 166, 167, 168, 170  
Kamburoğlu, Ahu 187  
Karadağ, Gülkan 173  
Karagül, Aydan 188, 189  
Karahana, Süleyman Caner 184  
Karahana, Z. Ceren 62  
Karaltı, İskender 163  
Karaman, Seda 165  
Kaşifoğlu, Nilgün 182, 190, 191  
Kaşifoğlu, Timuçin 190, 191  
Kadı, Mustafa 175, 176  
Kaya, Dilek 154  
Kaya, Nur Merve 156  
Kayar, Begüm 158  
Kazık, Mediha 188  
Keskin, Fahriye 149  
Kocagöz, Sesin 180  
Kocagöz, Tanıl 18, 33, 180  
Koçak, Hüseyin 183  
Korkmaz, Metin 98  
Korukluoğlu, Gülay 178, 194  
Köksal, Fatih 158  
Köse, Tuba 184  
Kubar, Ayhan 129  
Kuşcu, Ferit 138, 153  
Kuştımur, Semra 166, 167, 170  
Küçükaslan, Fahriye 174  
Külah, Canan 150  
Lale, Zübeyde 186  
Meral, Melda 193  
Mutlu, Derya 136, 188, 189  
Nohut, Okan Kadir 179  
Ocak, Hikmet Öztel 184  
Ok, Ülgen Zeki 94  
Onaran, Mehmet Ali 175, 176  
Otkun, Müşerref Tatman 137  
Öğünç, Dilara 136  
Öksüz, Burcu 163  
Öktem, Hüseyin Avni 21  
Öktem, Sinem 35  
Öngüt, Gözde 183  
Önlen, Yusuf 139  
Özacar, Tijen 70  
Özaras, Fulya 173  
Özbek, Özgen Alpay 177  
Özbel, Yusuf 172  
Özbek, Nilgün 137  
Özçolpan, Olcay 161  
Özdemir, Mehmet 164, 171  
Özel, Mustafa Zafer 169  
Özel, Nilay 151, 152  
Özer, Burçin 139  
Özkan, Seçil 193  
Özkul, Aykut 127  
Özkütük, Nuri 161  
Özsaraç, Hamit 158, 159  
Öztürk, Barış 153  
Öztürk, Doğan Banış 138  
Öztürk, Elif Cihadiye 165, 173  
Öztürk, Yasemin 163  
Perçin, Duygu 144, 145  
Pınarbaşı, Münire 182  
Rota, Seyyal 186, 192  
Saliş, Barış 148  
Sarınbaş, Zeynep 156  
Sarı, Sinan 147  
Satılmış, Özgün Kiriş 155  
Sayiner, Arzu 114  
Sayiner, Ayça Arzu 177  
Sennaroğlu, Levent 157  
Serin, Mehmet Sami 181  
Sertöz, Rüçhan Yazan 29  
Severoğlu, Zeki 174  
Seyer, Ayşe 166, 167, 170  
Sezgin, Orhan 181  
Sınırtaş, Melda 42  
Söyletir, Güner 15, 151, 152  
Sudağidan, Mert 140  
Sümbüloğlu, Vildan 150  
Sümer, Sabri 174  
Sürücüoğlu, Süheyla 161  
Şahin, Figen 192  
Şencan, İrfan 138, 153  
Şener, Alper 137  
Şimşek, Halis 195  
Şimşek, Hülya 158, 159  
Tarhan, Gülnur 158, 159  
Tekkanat, Zuhul Tazegün 163  
Tetik, Aslı 172  
Tezcan, Gülsün 189  
Tezcan, Seda 181  
Toksoy, Buket 160  
Tombak, Ahmet 158, 159  
Tozlu, Derya Ketan 143  
Töz, Seray Özensoy 172  
Tuğcu, Ulaş 192  
Tuncer, Murat 183  
Tursunoğlu, Figen 158, 159  
Tütüncü, Emin Ediz 138  
Tütüncü, Emine Ediz 153  
Us, Dürdal 195  
Uslu, Meral 153  
Usta, Seda 168  
Us, Tercan 182, 190, 191  
Usubütin, Alp 80  
Uygun, Vedat 188, 189  
Uçbilek, Enver 181  
Ülger, Nurver Toprak 151, 152  
Ünsal, İbrahim 180  
Vural, Hasibe Cingilli 174  
Yalçın, Burç 166, 167, 170  
Yavuz, H. Asuman 183  
Yazısız, Hatice 189  
Yeşilyurt, Emine 168  
Yıldırım, Bülent 183  
Yılmaz, Cansev 155  
Yılmaz, Gülden 163  
Yoldaş, Özlem 149  
Yurtman, Ayşe Nur 141  
Zencir, Sevil 169  
Zeyrek, Fadile Yıldız 172



## KONGREYE DESTEK VEREN KURULUŞLAR

### Teşekkürü borç biliriz..

Abbott Molecular-Ata Diagnostik

Artimed Medikal

ATQ Biyoteknoloji İç ve Dış Tic. Ltd. Şti.

Becton Dickinson İth İhr. Ltd. Şti

BioDPC Teşhis Sistemleri A.Ş.

BioMerieux Diagnostik Malz. ve Hiz. Tic. A.Ş.

Engin Tıbbi Ürünler ve Lab. Malz. Tic. Ltd. Şti

İnovatif Biyoteknoloji Organizasyonu Tic. Ltd. Şti.

Nükleer A.Ş.

Özmen Tıbbi Laboratuvarları Teşhisleri A.Ş

Radmed A.Ş.

Roche Diagnostics

Tenay Elektronik Medikal Özel Sağlık, İnşaat, İlaç San. ve Tic. Ltd. Şti.

Firma isimleri alfabetik sırayla verilmiştir.